

**IL -10 და მეტაბოტროპული გლუტამატის რეცეპტორის
ურთიერთქმედების ზოგიერთი მექანიზმი**

სოფიკო ყორიაული

სადისერტაციო ნაშრომი წარდგენილია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის
საბუნებისმეტყველო მეცნიერებებისა და საინჟინრო ფაკულტეტზე სიცოცხლის შემსწავლელ
მეცნიერებათა დოქტორის აკადემიური ხარისხის მინიჭების მოთხოვნის შესაბამისად

სიცოცხლის შემსწავლელ მეცნიერებათა სადოქტორო პროგრამა

სამეცნიერო ხელმძღვანელები:

დავით მიქელაძე - აკადემიკოსი, პროფესორი, ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი
თამარ ბარბაქაძე - ასოცირებული პროფესორი, დოქტორი ბიოლოგიაში

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი

თბილისი, 2016

განაცხადი

როგორც წარდგენილი სადისერტაციო ნაშრომის ავტორი, ვაცხადებ, რომ ნაშრომი წარმოადგენს ჩემს ორიგინალურ ნამუშევარს და არ შეიცავს სხვა ავტორების მიერ აქამდე გამოქვეყნებულ, გამოსაქვეყნებლად მიღებულ ან დასაცავად წარდგენილ მასალებს, რომლებიც ნაშრომში არ არის მოხსენიებული ან ციტირებული სათანადო წესების შესაბამისად.

სოფიკო ყორიაული

22.01.2016

აბსტრაქტი

კისტური ფიბროზი(კფ), ანთებითი პროცესებით მიმდინარე დარღვევა, გამოწვეულია ქლორის იონების გადამტანი ტრანსმემბრანული რეგულატორული ცილის(CFTR) მუტაციის შედეგად. T-ლიმფოციტებში მისი დისფუნქცია იწვევს ინტერლეიკინი-8 მატებას და ინტერლეიკინი-10 სეკრეციის შემცირებას. ინტერლეიკინი-10 წარმოიქმნება გლიურ უჯრედებშიც და სასიცოცხლო მნიშვნელობა აქვთ ნეიროდეგენერაციულ/ნეიროანთებით პროცესებში. ჩვენს მიზანს წარმოადგენდა ნორმალური და კფ-პაციენტების ლიმფოციტებში გლუტამატის მოქმედების შესწავლა ინტერლეიკინი-8 და ინტერლეიკინი-10 გამოყოფაზე და მეტაბოტროპული გლუტამატის რეცეპტორის ქვეტიპი-1(mGluR1) ექსპრესიაზე ლიმფოციტების მემბრანულ ფრაქციაში. შეგვესწავლა ინტერლეიკინი-10-ის მოქმედება არგინაზას და აზოტის ოქსიდის სინთაზას(NOS) აქტივობაზე ინტერლეიკინი-10-ის გენით ნოკაუტირებული თაგვების(KO) და საკონტროლო(Wt) ჯგუფის თაგვების სინაპტონიეროსომებში და ინტერლეიკინი-10-ის როლი ენდოპლაზმური რეტიკულუმის სტრესის(ერ-სტრესი) განვითარებაში. დადგინდა, რომ კფ-პაციენტების T-უჯრედები ინტერლეიკინი-2-ს თანაობისას აწარმოებენ მეტ ინტერლეიკინი-8 და ინტერლეიკინი-10, ნორმალურთან შედარებით. მხოლოდ ნორმალურ ლიმფოციტებში გლუტამატის მაღალი კონცენტრაციის($10^{-4}M$) ზემოქმედების შედეგად გაძლიერებულად გამოიყოფოდა ინტერლეიკინი-10, გლუტამატ-დამოკიდებული გამოყოფა არ ითრგუნებოდა NMDA-რეცეპტორის და AMPA-რეცეპტორის ანტაგონისტებით. მხოლოდ mGluR1-ის ანტაგონისტი-LY367385, ამცირებდა ინტერლეიკინი-10-ის გამოყოფას. ამ მონაცემებზე დაყრდნობით ლიმფოციტების პლაზმურ მემბრანაში შევისწავლეთ mGluR1, CFTR-თან ასოცირებული ლიგანდი(CAL) და Na^+/H^+ -მიმოცვლის რეგულატორული ფაქტორი-1(NHERF1) CFTR-იმუნოპრეციპიტაციის შემდეგ. დადგინდა, რომ არამუტირებული და მუტირებული CFTR ასოცირებული იყო mGluR1-თან, მაგრამ კფ-ლიმფოციტების პლაზმური მემბრანა შეიცავდა ნაკლებ mGluR1. არამუტირებული და მუტირებული CFTR ასოცირებული იყო NHERF-1 და CAL-თან, თუმცა მუტირებულ CFTR-ის მქონე ლიმფოციტებში CFTR-CAL კომპლექსის ზედაპირული ექსპრესიის დონე იყო

შემცირებული. შემდეგ შევისწავლეთ ინტერლეიკინი-10-ის მოქმედების სამიზნეები KO- და Wt-თაგვების სინაპტონეროსომებში. აღმოჩნდა, რომ KO-თაგვების სინაპტონეროსომებში დაქვეითებული იყო არგინაზას გენის ექსპრესია და პოლიამინების ბიოსინთეზი, ხოლო NOS აქტივობა იყო გაზრდილი. KO-თაგვების ტვინი ავლენდა სპერმინით გამოწვეულ $[^3\text{H}]\text{MK-801}$ -თან დაკავშირების მცირე გაძლიერებას. გლუტამატი დოზა-დამოკიდებულად ზრდიდა NO-ს წარმოქმნას საკონტროლო თაგვებში. NO-ს გლუტამატ-დამოკიდებული ზრდა იხსნებოდა LY367385-ით Wt-სინაპტონეროსომებში. ვესტერნ ბლოტმა აჩვენა, რომ NMDAR-ექსპრესია, nNOS დონე და iNOS-ექსპრესია არ იყო შეცვლილი KO-თაგვებში და მხოლოდ mGluR1a/b დონე იყო შემცირებული. შემდგომ, ერ-სტრესის განვითარებაში ინტერლეიკინი-10-ს როლის შესასწავლად განვსაზღვრეთ იმუნოგლობულინთან დამაკავშირებელი ცილა(BiP). დავადგინეთ, რომ Wt-თან შედარებით KO-თაგვებში BiP მკვეთრად იყო შემცირებული, ხოლო სიგმა რეცეპტორი-1-ს(SigR1) რაოდენობა არ იცვლებოდა. კოიმუნოპრეციპიტაციის ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ SigR1-ს ასოციაცია გტფ-აზაRac1-თან(Rac1), NMDA-რეცეპტორის NR2B სუბერთეულთან(NMDAR) და ინოზიტოლ-3-ფოსფატ-ის რეცეპტორთან(IP3R) უფრო მაღალია KO-თაგვებში. გარდა ამისა, გლუტამატი და სიგმა ლიგანდები არ ცვლიან გლუტამატ-დამოკიდებულ NADPH-ოქსიდაზას(NOX) აქტივობას საკონტროლო ჯგუფის თაგვებში. KO-თაგვებში მკვეთრად იზრდება გლუტამატ-დამოკიდებული ჟანგბადის რეაქტიული ფორმების(ROS) წარმოქმნა. გლუტამატ-დამოკიდებული ROS წარმოქმნა მცირდება ნორმალურ დონემდე სიგმა-აგონისტების მოქმედებით. მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ CFTR და mGluR1 კონკურირებენ CAL-თან დაკავშირებისთვის, რაც შესაბამისად ამცირებს mGluR1-ს გადაადგილებას და ინტერლეიკინი-10-ის სინთეზს. ინტერლეიკინი-10-ის ნეიროპროტექციული/ნეირორეგენერაციული თვისებები, მისი NR2B/NMDAR-ის სპერმინ-დამოკიდებული მოდულაციის უნართან და პოლიამინების მეტაბოლიზმზე ეფექტებთან ერთად, შესაძლოა ჩართული იყოს mGluR1a/b-ექსპრესიის რეგულაციაში. IL-10-ის ნაკლებობამ შეიძლება გამოიწვიოს ერ-სტრესი, BiP-ის ექსპრესია და SigR1-ის რედისტრიბუცია, შეცვალოს NMDAR-ის სპეციფიკური ორგანიზაცია, SigR1-მგრძნობიარე NMDAR ზედაპირული ექსპრესია. SigR1-

მგრძნობიარე NR2B-NMDAR ზედაპირული ექსპრესიის და ერ-სტრესის პირობებში იზრდება გლუტამატ-დამოკიდებული ROS წარმოქმნა, რომელიც იწვევს აპოპტოზის ჩართვას. მიღებული კვლევების გათვალისწინებით შეიძლება დავასკვნათ, რომ IL-10-ის დეპრივაციისას სიგმა-ლიგანდებმა შესაძლოა პრევენციული როლი ითამაშონ NMDA-რეცეპტორით გაშუალებული ექსციტოტოქსიკურობაში.

ძირითადი საძიებო სიტყვები: IL-10, გლუტამატი, mGluR1, სპერმინი, ერ-სტრესი

Abstract

Cystic fibrosis(CF) is caused by the mutations in the gene encoding the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator(CFTR) chloride channel. CFTR dysfunction in T cells could lead directly to aberrant immune responses: high level of IL-8 and low concentration of IL-10, suggesting that an intrinsic cytokine dysregulation might exist in immunoregulatory cells functionally expressing mutant CFTR. IL-10 provides trophic and survival effects directly on neurons. The action of glutamate on the secretion of IL-8 and IL-10 by lymphocytes derived from healthy subjects and cystic CF patients, the expression of metabotropic glutamate receptor subtype1(mGluR1) in the membrane fractions of lymphocytes was investigated. Results have shown that CF-derived T-cells in the presence of IL-2 produce more IL-8 and IL-10, than T-cell from healthy control. Only in normal lymphocytes a significant increase in the IL-10 secretion during exposure to high concentration of glutamate (10^{-4} M) was detected. Glutamate-dependent secretion of IL-10 was not inhibited either by NMDA-receptor(NMDAR), or by AMPA-receptor(AMPA) antagonists. Only mGluR1 antagonist, LY367385, decreased the production of IL-10. The content of mGluR1, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ligand(CAL), Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor1(NHERF-1), was analyzed in plasma membrane of lymphocytes after immunoprecipitation of CFTR. We have found that non-mutatedCFTR and mutated CFTR were associated with mGluR1, but the level of surface exposed mGluR1 in CF-lymphocytes was lower than in normal cells. Besides, non-mutatedCFTR and mutated CFTR were associated with NHERF-1 and CAL, however in lymphocytes with CFTR mutation the amount of cell-surface expressed CFTR-CAL complex was decreased. Then, we analyzed the activities of arginase and nitric oxidesynthase(NOS) in synaptoneurosomes derived from brain cortex derived from IL-10 gene-knockout(KO) and wild-type(Wt) mice and determined that the KO-synaptoneurosomes present lower arginase-II activity and lower spermine content than Wt-synaptoneurosomes. The basal NOS activity in the KO-synaptoneurosomes was higher than in the control. Moreover, the plasma membranes isolated from the KO-mice brain exhibit significantly lower spermine-induced

enhancement of [3H] MK-801 binding Wt mice. Glutamate increases the production of nitric oxide(NO) in Wt-synaptoneurosomes in a dose-dependent manner, whereas in the KO-synaptoneurosomes. The glutamate-dependent NO synthesis was abrogated by LY367385, antagonist of mGluR1a/b. The western blot analysis of the synaptoneurosomal proteins demonstrates that the expression of the subunits of NMDAR, the level of nNOS and the expression of iNOS are not changed in KO-mice, only the level of mGluR1a/b is reduced in the KO-synaptoneurosomes. It has been shown, in KO-brain, the amount of immunoglobulin binding protein(BiP) is increased, the content of sigma receptor-1(SigR1) is not changed. Co-immunoprecipitation experiments have shown that the association of SigR1 with small GTPase Rac1(Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1), NR2B subunit of NMDAR and inositol-3-phosphate receptor(IP3R) is higher in the IL-10 KO-mice brain than in the Wt-mice. Besides, we have found that either glutamate or sigma ligands, do not change glutamate-induced NADPH-oxidase(NOX) activity in Wt-mice brain membrane preparations, in IL-10 KO-mice high concentration of glutamate increases the NOX-dependent production of reactive oxygen species(ROS). Glutamate-dependent ROS production was decreased to the normal levels by the action of sigma-agonists.

We have concluded that CFTR and mGluR1 could compete for binding to CAL, which in turn downregulates the post-synthetic trafficking of mGluR1 and decreases the synthesis of IL-10. A neuroprotective/neuroregenerative property of IL-10, in addition to its effects on polyamine-metabolism and the spermine-dependent modulation of NMDAR, may involve in the regulation of mGluR1a/b expression. Moreover, IL-10 deprivation can lead to the induction of ER-stress, BiP expression and SigR1 redistribution between components of endoplasmic reticulum and plasma membrane. IL-10 deficiency can change the specific organization of NMDAR, increasing the surface expression of SigR1-sensitive-NR2B-containing-NMDAR. In these conditions, glutamate-dependent ROS production is greatly increased leading to the initiation of apoptosis. In this circumstances, sigma-ligands could play a preventive role against NMDA receptor-mediated excitotoxicity.

Keywords: CFTR, Interleukin-10, Polyamine, NO, NMDA-receptor, NR2B subunit, NADPH-oxidase, Rac1, BiP, SigR1, ER stress, Neurodegeneration, Neuroinflammation

მადლობა

წინამდებარე სადისერტაციო კვლევა შესრულდა ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტში. ნაშრომზე მუშაობის პერიოდში მუდმივად ვგრძნობდი ქიმიური ბიოლოგიის ინსტიტუტის თანამშრომლების ყურადღებას და თანადგომას ჩემი და ჩემი კვლევის მიმართ, რისთვისაც მსურს გულითადი მადლობა გადავუხადო თითოეულ მათგანს. მადლობას ვუხდით ი.ბერიტაშვილის ექსპერიმენტული ბიომედიცინის ცენტრის ბიოქიმიის დეპარტამენტის თანამშრომლებს. აღნიშნული ცენტრის ბაზაზე შესრულდა ნაშრომის გარკვეული ნაწილი. განსაკუთრებული მადლიერება მინდა გამოვხატო ჩემი სამეცნიერო ხელმძღვანელების პროფ. დავით მიქელაძისა და ასოც. პროფ. თამარ ბარბაქაძის მიმართ, რომელთა უშუალო მეთვალყურეობითაც განხორციელდა მოცემული კვლევა. მსურს მადლობა გადავუხადო მათ იმისთვის, რომ არ იშურებდნენ დროსა და ენერგიას საკუთარი გამოცდილების გასაზიარებლად. ასევე, განსაკუთრებული მადლობა მინდა გადავუხადო ქ-ნ ნინო ნაცვლიშვილს, ქ-ნ ლალი შანშიაშვილს და ქ-ნ ელენე ჟურავლიოვას ნაშრომზე მუშაობის პერიოდში გაწეული დახმარებისათვის.

სარჩევი

სარჩევი	ix
სურათების ჩამონათვალი	xii
სქემების ჩამონათვალი	xii
გრაფიკების ჩამონათვალი	xiii
აბრევიატურის ჩამონათვალი	xiv
შესავალი	1
სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა	6
თავი 1. ინტერლეიკინი-10;	6
1.1 ინტერლეიკინი-10 და მისი რეცეპტორი	6
1.2 ინტერლეიკინ-10-ის რეცეპტორის დაღმავალი სასიგნალო გზები	8
1.3 IL-10 ანტიანთებითი და ნეიროპროტექციული როლი	10
თავი 2. არგინაზა. პოლიამინები და აზოტის ოქსიდი	12
2.1 არგინაზა, მისი სტრუქტურა და ფუნქცია.	
არგინაზას შემცველობის რეგულაცია ორგანიზმში	12
2.2 არგინაზის ზემოქმედება აზოტის ოქსიდის სინთაზის	
აქტივობაზე და აზოტის ოქსიდის რაოდენობაზე	14
2.3 არგინაზას როლი პოლიამინების რაოდენობის	
რეგულაციაში და მათი მნიშვნელობა ორგანიზმისთვის.	15
2.4 აზოტის ოქსიდის (NO) პროდუქციის	
რეგულაცია არგინინის მეტაბოლიზმში მონაწილე ფერმენტებით	17
თავი 3. გლუტამატი და გლუტამტური რეცეპტორები.	
გლუტამატის როლი ნორმასა და პათოლოგიაში.	19
3.1 გლუტამატი.	19
3.2 გლუტამატური რეცეპტორები.	20
3.2.1 იონოტროპული გლუტამატური რეცეპტორები.	
NMDA გლუტამატის რეცეპტორთან ასოცირებული ცილოვანი კომპლექსი.	21
3.2.2 მეტაბოტროპული გლუტამატური რეცეპტორები	26

3.3 გლუტამატის როლი პათოლოგიურ პროცესებში.	
კისტური ფიბროზი (მუკოვისციდოზი)	28
თავი 4. კისტური ფიბროზი	30
4.1. კისტური ფიბროზი	30
4.2 კისტური ფიბროზის ტრანსმემბრანული გამტარებლობის რეგულატორული ცილა	33
4.3 CFTR-ის მუტაციები	34
4.3.1 CFTR მუტაციების კლასები	35
4.4 Na^+/H^+ მიმოცვლის მარეგულირებელ ფაქტორთა ოჯახი და PDZ დომენების შემცველი ცილებითავე	38
4.5 ფილოგენეტიკა	38
4.6 NHERF ცილების ლოკალიზაცია და მათთან დაკავშირებული უნიკალური პარტნიორები	40
5.ენდოპლაზმური რეტიკულუმის სტრესი	42
მეთოდოლოგია	48
თავი 1. გამოყენებული მასალა	48
1.1 გამოყენებული მასალა	48
1.2 კვლევის ობიექტი	48
თავი 2. გამოყენებული მეთოდები	49
2.1. სინაპტონერიოსომების მიღება	49
2.2. პერიფერიული ლიმფოციტების მომზადება	50
2.3 ციტოზოლური და პლაზმური მემბრანების მომზადება	51
2.4. NOS აქტივობის განსაზღვრა	51
2.5. არგინაზას აქტივობის განსაზღვრა	52
2.6.MK-801-ის დაკავშირების აქტივობის განსაზღვრა	53
2.7. პოლიამინების განსაზღვრა HPLC ანალიზით	53
2.8 იმუნოპრეციპიტაცია და Western ბლოტინგი	54
2.9 ELISA IL-8 და IL-10	55
2.10 ნიკოტინამიდ-ადენინ-დინუკლეტიდ-ფოსფატ ოქსიდაზას (NADPH) აქტივობის განსაზღვრა	56

2.11 მიღებული შედეგების სტატისტიკური დამუშავება	56
მიღებული შედეგები	58
თავი.1 გლუტამატის ზეგავლენა საკონტროლო და კისტური ფიბროზით დაავადებული პაციენტების ლიმფოციტების მიერ IL-8 და IL-10 -ის სეკრეციაზე და მეტაბოტროპული გლუტამატის რეცეპტორის სუბერთეულის (mGluR1) ექსპრესია ლიმფოციტების მემბრანულ ფრაქციაში.	58
თავი 2. ნორმალური და IL-10 გენის მიხედვით ნოკაუტირებულ(KO) თაგვების ტვინიდან მიღებულ სინაპტონეიროსომებში IL-10-ის ნეიროპროტექტორული ეფექტების შესწავლა.	64
2.1 არგინაზას აქტივობა, პოლიამინების და NO დონე KO და Wt სინაპტონეიროსომებში.	64
2.2 mGluR1-ის როლი გლუტამატ-დამოკიდებულ აზოტის ოქსიდის პროდუქციაზე.	67
2.3 სპერმინი და ნატრიუმის ნიტროპრუსიდი აძლიერებენ [3H]MK-801-ის დაკავშირებას.	70
თავი 3. ნორმალური და IL-10 გენის მიხედვით ნოკაუტირებულ (KO) თაგვების ტვინიდან მიღებულ სინაპტონეიროსომებში IL-10-ის დეფიციტის მნიშვნელობის შესწავლა ენდოპლაზმური რეტისკულუმის სტრესის განვითარებაში.	72
შედეგების განხილვა	75
დასკვნები	90
გამოყენებული ლიტერატურა	92

სურათების ჩამონათვალი:

სურათი 1: ინტერლეიკინ-10-ის რეცეპტორი და Jak/STAT-3 სასიგნალო გზა	9
სურათი 2: არგინაზა II-ის მოქმედება მიტოქონდრიაში	13
სურათი 3: NMDA რეცეპტორის სტრუქტურული აგებულება	25
სურათი 4: NMDA და mGluR-ის სტრუქტურული სქემა.	26
სურათი 5: კისტური ფიბროზის ტრანსმემბრანული	
გამტარობის რეგულატორული ცილის სამგანზომილებიანი გამოსახულება.	34
სურათი 6: ნორმალური და მუტირებული CFTR	35
სურათი 7: CFTR მუტაციების კლასები	37
სურათი 8: CFTR -თან ასოცირებული ცილების კომპლექსი	41
სურათი 9: ენდოპლაზმური რეტიკულუმის სტრესის სასიგნალო გზები.	47

სქემების ჩამონათვალი

სქემა 1: არგინაზას გაზრდილი აქტივობით მიღებული ეფექტები	14
---	----

გრაფიკების ჩამონათვალი:

გრაფიკი 1: IL -8 და IL -10 სეკრეციის ცვლილება გლუტამატის და IL -2 გავლენით საკონტროლო და CF ჯგუფის T ლიმფოციტების მიერ.	59
გრაფიკი 2: ციტოკინების სეკრეციის ცვლილება გლუტამატის, IL-2 და გლუტამატური რეცეპტორების ანტაგონისტების - 10^{-6} M MK-801, NBQX და LY 367385 არსებობის და არარსებობის შემთხვევაში.	60
გრაფიკი 3: CFTR, CAL, NHERF1, mGluR1 და β -actin ცილების ბლოტინგი და იმუნოპრეციპიტაცია შესაბამისი ანტისხეულებით საკონტროლო და CF ლიმფოციტებიდან მიღებულ სოლუბილიზებულ მემბრანულ ცილებში.	61
გრაფიკი 4: არგინაზას II დაქვეითებული რეგულაცია KO თავგების ტვინში	65
გრაფიკი 5: სპერმინის დაქვეითებული რეგულაციას KO თავგების ტვინში	66
გრაფიკი 6: აზოტის ოქსიდის ცვლილება KO და Wt თავგების ტვინიდან მიღებულ ციტოპლაზმურ ფრაქციებში.	66
გრაფიკი 7: აზოტის ოქსიდის გლუტამატ-დამოკიდებული პროდუქცია KO და Wt სინაპტონეიროსომებში.	67
გრაფიკი 8: nNOS, iNOS, NR2A, NR2B და mGluR1 ცილოვანი ფრაქციების ბლოტი KO და WT თავგების სინაპტონეიროსომებში.	68
გრაფიკი 9: mGluR-ის ანტაგონისტის მიერ LY367385 აზოტის ოქსიდის გლუტამატ-დამოკიდებულ პროდუქციის ბლოკირება KO თავგების სინაპტონეიროსომებში.	69
გრაფიკი 10: სპერმინის ეფექტი - [3 H]MK-801 სპეციფიკურ დაკავშირებაზე პლაზმურ მემბრანაზე, რომელიც მიღებულია KO და Wt სინაპტონეიროსომებიდან.	71
გრაფიკი 11: SigR1, BiP, Rac1, IP3R და NR2B ცილების ანალიზი ბლოტინგის საშუალებით KO და Wt თავგების მემბრანულ პრეპარატებში.	72
გრაფიკი 12: NADPH ოქსიდაზას აქტივობის ცვლილება გლუტამატის, ჰალოპერიდოლის და (+)-პენტაზოცინის გავლენით KO და Wt თავგების ტვინებში.	74

აბრევიატურების ჩამონათვალი

IL-10 -ინტერლეიკინი 10

IL-8 -ინტერლეიკინი 8

IL-2 -ინტერლეიკინი 2

NO - აზოტის ოქსიდი

NOS -აზოტის ოქსიდის სინთაზა

NADPH -ნიკოტინამიდ-ადენინ-დინუკლეტიდ-ფოსფატ-ოქსიდაზა

CF -კისტური ფიბროზი

CFTR -ქლორი იონების ტრანსმემბრანული რეგულატორი

NMDAR - გლუტამატის იონოტროპული რეცეპტორი

AMPA - გლუტამატის იონოტროპული რეცეპტორი

GluR - გლუტამატის მეტაბოტროპული რეცეპტორი

NHERF - Na^+/H^+ მიმოცვლის მარეგულირებელი ფაქტორი

CAL - გოლჯის კომპლექსთან ასოცირებული ცილა

SigR - სიგმა რეცეპტორი

BiP - იმუნოგლობულინ-დამაკავშირებელი ცილა

GTP - გუანოზინ-ტრიფოსფატი

ER - ენდოპლაზმური სტრესი

Jak - თიროზინ-კინაზური აქტივობის ცილა

STAT -ტრანსკრიპციის აქტივატორი და სიგნალის გარდაქმნის ცილა

PI3K -ფოსფატიდინოზიტოლ-3-კინაზა

ROS- რეაქციული ჟანგბადის შემცველი ნაერთები

MK-801, NBQX და LY 36738 -გლუტამატური რეცეპტორის ანტაგონისტები

AI, AII - ფერმენტები: არგინაზა I და არგინაზა II

შესავალი

თანამედროვე მედიცინის ერთ-ერთ აქტუალურ პრობლემად კვლავ რჩება ანთებითი პროცესებით მიმდინარე დაავადებები და მკურნალობის ეფექტური გზები. ანთება - წარმოადგენს დამცველობით რეაქციას, რის საშუალებითაც ცოცხალი ორგანიზმი ებრძვის ანთების გამომწვევ ამა თუ იმ მიზეზს და მთელი რიგი, რთული ბიოქიმიური მექანიზმების საშუალებით იწვევს ანთებითი პროცესის გამომწვევი ინფექციური აგენტის ინაქტივაციას. ნორმაში - ეს არის რამდენიმე ეტაპისგან შემდგარი, რთული, მაგრამ კოორდინირებული და შექცევადი პროცესების ერთობლიობა, რომელიც მიზნად ემსახურება ცოცხალი ორგანიზმის დაცვას სხვადასხვა პათოლოგიისგან, თუმცა ხშირ შემთხვევაში ანთებითი პროცესი იღებს შეუქცევად ხასიათს, რაც გამოწვეულია იმით რომ დათრგუნული და/ან შეჩერებულია ანტიანთებითი რეაქციების წარმოქმნის ინტენსივობა, შედეგად ადგილი აქვს ქსოვილების დაზიანებას. თუმცა, ანთებითი პროცესების დროს მიმდინარე მოლეკულური მექანიზმები არ არის ბოლომდე შესწავლილი, რამაც შესაძლოა მნიშვნელოვანი წვლილი შეიტანოს ანთებითი პროცესებით მიმდინარე დაავადებების მკურნალობის განვითარებაში. ერთ-ერთი ასეთი დაავადებაა კისტური ფიბროზი, დარღვევა, რომელიც გამოწვეულია ქლორის იონების გადამტანი, ტრანსმემბრანული რეგულატორული ცილის (CFTR) მუტაციის შედეგად. T ლიმფოციტების ზედაპირზე აღნიშნული სატრანსპორტო ცილის დისფუნქცია იწვევს იმუნური პასუხის ცვლილებას - ანთებით პროცესებში მონაწილე, ძირითადი ციტოკინების - (ინტერლეიკინი-8 და ინტერლეიკინი-10) სეკრეციის დარღვევით. ინტერლეიკინი-10 წარმოადგენს ძირითად ანტიანთებით ციტოკინს, რომელიც თავდაპირველად პროდუცირდება ინატურ უჯრედებში და სასიცოცხლო მნიშვნელობა აქვს დეგენერაციულ და ანთებით პროცესებში. თუმცა ინტერლეიკინი-10-ს პროტექციული მექანიზმები ბოლომდე დადგენილი არ არის.

კისტური ფიბროზი, იგივე მუკოვისციდოზი-(CF), მიეკუთვნება აუტოსომურ - რეცესიული ტიპის მემკვიდრულ დარღვევას, რომელიც წარმოადგენს მონოგენურ დაავადებას და განპირობებულია 7 ქრომოსომაში ლოკალიზებული, ერთ-ერთ გენის მუტაციური ცვლილების შედეგად. აღნიშნული გენის მიერ სინთეზირებული ცილა წარმოადგენს ქლორის იონების სატრანსპორტო არხს. ამ გენში მომხდარი

მუტაციური ცვლილება იწვევს დეფექტური ცილის სინთეზს. რის შედეგადაც, არასწორად სინთეზირებული ცილა ვეღარ ასრულებს შესაბამის ფუნქციას და ადგილი აქვს აღნიშნული ქლორის იონების ტრანსპორტის დარღვევას (Riordan et al., 1989; Guggino and Banks-Schlegel, 2004). აღნიშნული გენეტიკური დარღვევა წარმოადგენს სისტემურ, მულტიორგანულ დაავადებას, ხასიათდება მაღალი ლეტალურობით, განსაკუთრებით ადრეულ ასაკში. თუმცა, აღსანიშნავია, რომ დაავადებულ პირებში სიკვდილიანობის ძირითად მიზეზს წარმოადგენს მომატებული ანთებითი პროცესების შედეგად გამოწვეული სასუნთქი გზების ქრონიკული ინფექცია - (Sheppard and Welsh, 1999; Pamela and Davis, 2006); დაავადებისთვის დამახასიათებელია ასევე ნეიტროფილების, ლიმფოციტების და მათი პროდუქტების სეკრეციის დისბალანსი. განსაკუთრებით ისეთი პროანთებითი ციტოკინების მატება, როგორცაა ინტერლეიკინი -8 (IL-8); შესაბამისად, დაქვეითებულია ანტიანთებითი ციტოკინის ინტერლეიკინი -10 (IL-10) ექსპრესია. ეს ფენომენი მიგვანიშნებს, რომ IL-10 -ს აქვს დრამატული ფუნქცია მუტირებული ტრანსმემბრანული არხის ექსპრესიაში. (Moss et al., 2000; Hubeau et al., 2001; Soltys et al., 2002; Lyczak et al., 2002). ამას ადასტურებს ის ფაქტიც, რომ კისტური ფიბროზის მქონე პაციენტების ბრონქიალური უჯრედების ეპითელიუმში შეინიშნება დიდი რაოდენობით T ლიმფოციტების პროდუქცია (Hubeau et al, 2001).

ინტერლეიკინ-10 (IL-10) აღმოჩენა განაპირობა მისმა უნარმა დათრგუნოს T უჯრედების, მონოციტების და მაკროფაგების აქტივაცია და ეფექტორული ფუნქცია. IL-10 წარმოადგენს მულტიფუნქციურ ციტოკინს, რომელსაც გააჩნია განსხვავებული მოქმედება უმეტესობა ჰემატოპოეზურ უჯრედულ ტიპებზე. IL-10-ის ძირითადი და საყოველთაოდ მიღებული ფუნქციაა შეზღუდოს და საბოლოო ჯამში შეაჩეროს ანთებითი პროცესები. დამატებით, ამ აქტივობის გარდა, IL-10 არეგულირებს B უჯრედების, NK (ბუნებრივი ქილერები) უჯრედების, ციტოტოქსიკური და T ჰელპერული უჯრედების, გრანულოციტების, დენდრიტული უჯრედების, კერატინოციტების და ენდოთელური უჯრედების ზრდას და/ან დიფერენციაციას.

იმუნური უჯრედების გარდა, ციტოკინი - IL-10, მნიშვნელოვან ფუნქციას ასრულებს ნერვულ სისტემაშიც. იგი, როგორც ცნობილია, აუმჯობესებს ნევროლოგიურ მდგომარეობას ცენტრალური ნერვული სისტემის დაზიანების

შემდეგ; ასევე უჯრედულ კულტურებში ნეირონებს ხდის ნაკლებად მგრძნობიარეს არასასურველი ზემოქმედებების მიმართ. (Knobloch and Faden, 1998; Grilli et al., 2000; Boyd et al., 2003; Sharma et al., 2011; Thompson et al., 2013). IL-10-ის ტროფიკული და სასიცოცხლო გავლენა ნეირონებზე გაშუალებულია IL-10-ის რეცეპტორით და ეს ეფექტი იცავს ნეირონებს გლუტამატ-დამოკიდებული ექსციტოტოქსიკურობისგან (Zhou et al., 2009). გარდა ამისა, IL-10 აძლიერებს ნეირონების ზრდას და სტიმულირებს ნეიროგენერაციას. (Vidal et al., 2013). პირდაპირ ტროფიკულ და ნეიროპროტექციულ ეფექტთან ერთად IL-10 მოქმედებს, როგორც გლუტამატერგული ნეიროტრანსმისიის მონაწილე, რადგან შეუძლია შეცვალოს LTP და შეამციროს გლუტამატის გამოთავისუფლება სინაპტოსომებიდან (Kelly et al., 2001).

გლუტამატი, თავის მხრივ წარმოადგენს მნიშვნელოვან და ძირითად ამაგზნებელ ნეირომედიატორს ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში. ფიზიოლოგიური კონცენტრაციით იგი მონაწილეობას იღებს ისეთ მნიშვნელოვან ფუნქციებში, როგორიცაა - დასწავლა, მეხსიერება, ასევე სინაფსური პლასტიურობა და სინაპტოგენეზი.

გლუტამატი სინთეზირდება ნერვულ უჯრედებში გლუტამინის მჟავის საშუალებით, რომელიც წარმოადგენს ნეიროტრანსმიტერის პრეკურსორს. თავის მხრივ, გლუტამინის მჟავა წარმოიქმნება გლიური უჯრედების მიერ პრესინაფსურ ტერმინალებში, ხოლო შემდგომ მიტოქონდრიულ ფერმენტ - გლუტამინაზას საშუალებით, გარდაიქმნება გლუტამატად. არსებობს ასევე მეორე გზაც - 2-ოქსოგლუტარატის ტრანსამინირების შედეგად, ხდება გლუტამატის წარმოქმნა. აღსანიშნავია, რომ თუ ფიზიოლოგიური კონცენტრაციით გლუტამატი წარმოადგენს ცენტრალური ნერვული სისტემის უმნიშვნელოვანეს ნეირომედიატორს, მისი წარმოქმნა ჭარბი რაოდენობით იწვევს სხვადასხვა ტიპის ნევროლოგიურ (ეპილეფსია, თავის ტვინის ტრავმა, იშემიით გამოწვეული დარღვევები) და ნეიროდეგენერაციულ (ჰანდინგტონის ქორეა, ალცჰეიმერის სინდრომი) დარღვევებს.

ენდოპლაზმურ ბადეზე ახლად სინთეზირებული ცილების გაძლიერებული ძვრადობა და დარღვეული პროცესინგი, ცნობილია როგორც ენდოპლაზმური რეტიკულუმის სტრესის (ER) სახელწოდებით. იგი წარმოადგენს ძირითად

უჯრედულ პროცესს, რომელიც გადამწყვეტ როლს ასრულებს სხვადასხვა ნეიროდეგენერაციული დაავადებების განვითარებაში (Cuervo et al., 2010; Hol and Scheper, 2008; Kundu and Thompson, 2008). ტერმინი -ენდოპლაზმური რეტიკულუმის (ER) სტრესი-გულისხმობს არაფუნქციური ცილოვანი პეპტიდების ჩანაცვლებას ფუნქციური ცილოვანი ფრაქციებით. აღნიშნული პროცესის შედეგად, ხდება უფუნქციო და/ან არასწორი კონფორმაციის მქონე ცილოვანი პეპტიდების ჩანაცვლება, რის შედეგადაც აცილებულია უჯრედზე ცილა-ცილოვანი ურთიერთქმედების ციტოტოქსიური გავლენა. ცოცხალი უჯრედისთვის ესოდენ მნიშვნელოვან პროცესში ძირითად როლს ასრულებს უჯრედში მოქმედი პროტეოლიზური სისტემა, რომელიც თავისი ფუნქციიდან გამომდინარე მნიშვნელოვანია უჯრედული ჰომეოსტაზის შენარჩუნებაში. ამ ფაქტის გათვალისწინებით, პროტეოლიზური სისტემის ფუნქციის შესუსტება მჭიდროდაა დაკავშირებული სხვადასხვა ნეიროდეგენერაციული დაავადებების განვითარებასთან.

ენდოპლაზმური რეტიკულუმის ერთ -ერთ მნიშვნელოვან პროტეინს წარმოადგენს სიგმა-1 რეცეპტორი (Sig-1R). ეს რეცეპტორი მონაწილეობს უჯრედში მიმდინარე როგორც ფიზიოლოგიურ, ასევე პათოლოგიურ მოვლენებში, როგორიცაა: ნეიროპროტექტორული პროცესები, კარცინოგენეზი და ნეიროპლასტიურობა. ჩვეულებრივ, ეს რეცეპტორი ქმნის კომპლექსს ფუნქციურად და სტრუქტურულად განსხვავებულ ცილებთან, ასევე მიტოქონდრიებთან ასოცირებულ ცილოვან კომპლექსებთან და სხვა შაპერონებთან, როგორიცაა ცილა- BiP. სიგმა რეცეპტორთან დაკავშირებული ეს ფაქტი კიდევ ერთხელ ადასტურებს, რომ ცილა-ცილოვანი ურთიერთობები მნიშვნელოვანია სიგმა რეცეპტორის ფუნქციურ აქტივობაში. სხვადასხვა სტიმულების საპასუხოდ, მას შეუძლია დისოცირება და ტრანსლოკაცია. უჯრედში მისი გადმოსვლა ანეიტრალურს ენდოპლაზმური რეტიკულუმის სტრესის მიმართ უჯრედის პასუხს, ხოლო ტრანსლოკაციის პროცესის შემცირება აძლიერებს აპოპტოზის პროცესს.

ყოველივე ზემოთქმულიდან გამომდინარე, მეტად საინტერესოა აღნიშნული ანტიანთებითი ციტოკინის ინტერლეიკინი-10-ს მოქმედების მექანიზმის შესწავლა, როგორც ცენტრალური ნერვული სისტემის, ასევე იმუნური სისტემის დონეზე და

ამავდროულად იმ სასიგნალო გზების გარკვევა, რომელთა საშუალებითაც ციტოკინი - IL-10 განიხილება, როგორც მულტიფუნქციური ციტოკინი.

IL-10-ის, როგორც ძირითადი ანტიანთებითი ციტოკინის მნიშვნელობის შესასწავლად ორგანიზმის ნორმალურ და პათოლოგიურ მდგომარეობაში და მისი სასიგნალო გზების დასადგენად მიზნად დავისახეთ შეგვესწავლა:

1. გლუტამატის ზეგავლენა საკონტროლო და კისტური ფიბროზით დაავადებული პაციენტების ლიმფოციტების მიერ IL-8 და IL-10 -ის სეკრეციაზე და მეტაბოტროპული გლუტამატის რეცეპტორის (mGluR1) ექსპრესია ლიმფოციტების მემბრანულ ფრაქციაში.

2. ნორმალური და IL-10 გენის მიხედვით ნოკაუტირებულ (KO) თაგვების ტვინიდან მიღებულ სინაპტონეიროსომებში IL-10-ის ნეიროპროტექტორული ეფექტების შესწავლა.

3. ნორმალური და IL-10 გენის მიხედვით ნოკაუტირებულ (KO) თაგვების ტვინიდან მიღებულ სინაპტონეიროსომებში IL-10-ის დეფიციტის მნიშვნელობის შესწავლა ენდოპლაზმური რეტიკულუმის სტრესის განვითარებაში.

სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა

თავი 1. ინტერლეიკინი-10.

1.1 ინტერლეიკინი-10 და მისი რეცეპტორი.

ციტოკინები წარმოადგენენ მცირე ზომის, ჩვეულებრივ, 30 კილოდალტონზე ნაკლები, ცილოვანი და/ან გლიკოპროტეინული სტრუქტურის მქონე, სასიგნალო ბუნების მოლეკულებს (სურ.1). ციტოკინების წარმოქმნაში მონაწილეობას იღებს გლიური და მაკროფაგული უჯრედები, B და T ლიმფოციტები, ენდოთელური უჯრედები, ფიბრობლასტები, ელენთის სტრომული უჯრედები, ასევე თიმუსი და ძვლის ტვინი. ციტოკინების ძირითად ფუნქციას წარმოადგენს იმუნური პასუხის მოდულირება, ხოლო იმუნური სისტემის გარეთ უდიდესი როლი ენიჭებათ განვითარების პროცესში, კერძოდ, მონაწილეობენ უჯრედების დიფერენცირებაში, ზრდა-განვითარებასა და მიგრაციაში. ზოგადი თვისების მიხედვით, ციტოკინები იყოფა ორ დიდ ჯგუფად: პრო-და ანტი-ანთებითი ციტოკინები. ანტი-ანთებითი ციტოკინების ჯგუფის ძირითადი წარმომადგენელია ინტერლეიკინი-10(IL-10), რომელიც წარმოადგენს პლეიოტროპული მოქმედების, ძირითად იმუნომარეგულირებელ ციტოკინს. ინტერლეიკინი-10 (IL-10) წარმოადგენს ჰომოდიმერს, თითოეული სუბერთეული შედგება 178 ამინომჟავური თანმიმდევრობისგან, კლასიფიცირებულია, როგორც მე-2 ტიპის ციტოკინი და მიეკუთვნება ციტოკინების ოჯახს, რომელშიც გაერთიანებულია სხვადასხვა ციტოკინები - IL-19, IL-20, IL-22, IL-26, IL-28 და IL-29, ასევე ინტერფერონის ოჯახი და ინტერფერონის მსგავსი ცილები, როგორიცაა - IL-28, IL-29 და IL-28B. ყველა ამ ციტოკინს გააჩნია მსგავსი ინტრონ-ეგზონური გენომური ორგანიზაცია, ხოლო მსგავსი სტრუქტურებით და ზოგ შემთხვევაში საერთო კომპონენტებით უკავშირდებიან რეცეპტორებს. უნდა აღინიშნოს, რომ IL-10 წარმოადგენს JAK- STAT სასიგნალო გზის ძირითად აქტივატორს (Riley JK et al., 1999).

ზემოხსენებული საერთო თვისებების მიუხედავად ამ ოჯახის ციტოკინებს აქვთ განსხვავებული ბიოლოგიური აქტივობები, რაც დამოკიდებულია: 1. იმ უჯრედებზე, რომლებიც პროდუცირებენ შესაბამის ციტოკინებს; 2. უჯრედებზე, რომლებიც

პასუხობენ მათ და 3. იმ იმუნურ გარემოზე, რომელშიც ისინი გამონთავისუფლდებიან.

IL-10-ის ძირითადი ბიოლოგიური ფუნქციაა ანთებითი პროცესების შეზღუდვა და ტერმინაცია, ასევე სხვადასხვა იმუნური უჯრედების დიფერენციაცია და პროლიფერაცია, როგორებიცაა T უჯრედები, B უჯრედები, ბუნებრივი ქილერები (NK), ანტიგენის-წარმოდგენი უჯრედები და გრანულოციტები. უახლესი მონაცემებით IL-10-ს, აგრეთვე, გააჩნია იმუნომასტიმულირებელი თვისება, რომელიც განაპირობებს ინფექციური და არაინფექციური ნაწილაკების ელიმინაციას ანთებითი პროცესების ჩასაქრობად (Shankar Subramanian Iyer et al. 2012).

IL-10-ის ზეექსპრესია ნაპოვნია ზოგიერთ სიმსივნეში, როგორიცაა მელანომა და სხვადასხვა სახის ლიმფომები. ასევე ითვლება, რომ IL-10 ხელს უწყობს სიმსივნის შემდგომ განვითარებას. IL-10-ის სისტემური გამოთავისუფლება ძლიერი იარაღია ცენტრალური ნერვული სისტემისთვის მწვავე სტრესული რეაქციების აქტივაციით ჰიპერანთებითი პროცესების პრევენციის მიზნით. ამის საწინააღმდეგოდ, IL-10-ის შედარებითი დეფიციტი და ეს დეფიციტი განხილულია, როგორც პათოფიზიოლოგიური მნიშვნელობის მქონე, ნანახია განსაზღვრულ ანთებით დაავადებებში, რომლებსაც ახასიათებთ პირველი ტიპის ციტოკინური პასუხი, მაგალითად, როგორიცაა ფსორიაზი, რევმატოიდულ ართრიტი, ანთებითი ნაწლავური დაავადებები და ქრონიკული ჰეპატიტ C. თუმცა უნდა ითქვას, რომ კვლევის შედეგები არაერთგვაროვანია და იძლევა ახალ მიდგომებს IL-10 -ის იმუნობიოლოგიაში. ზემოთქმულიდან გამომდინარე, IL-10/IL-10-ის რეცეპტორული სისტემა შესაძლებელია გახდეს ახალი თერაპიული სამიზნე (Thompson et al., 2013).

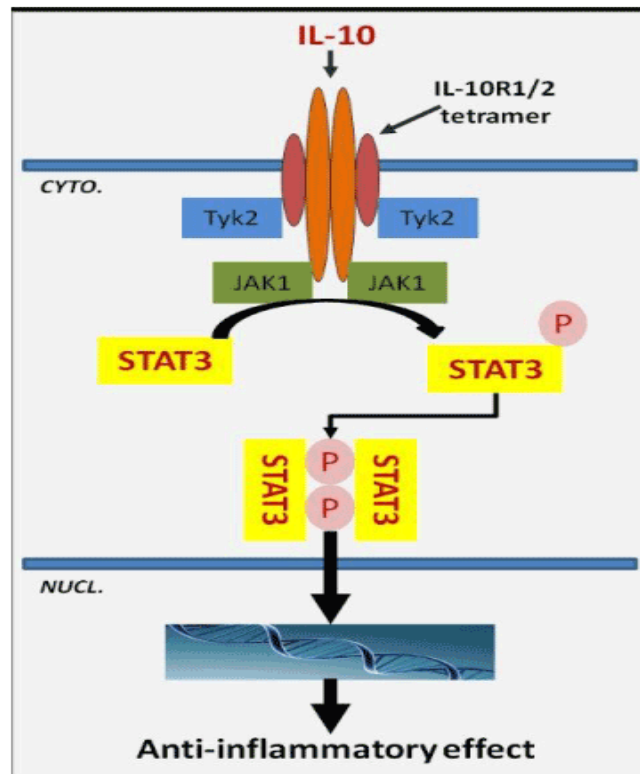
IL-10-ის რეცეპტორი, ისევე როგორც IL-10-ის ოჯახის მოლეკულების ყველა რეცეპტორი მიეკუთვნება მე-2 ტიპის ციტოკინების რეცეპტორების ოჯახს (CRF2). ისინი ძირითადად ტრანსმემბრანული გლიკოპროტეინებია, რომელთა უჯრედგარე დომენი შეიცავს დაახლოებით 210 ამინომჟავას. რეცეპტორი წარმოდგენილია III ტიპის ფიბრონექტინის ორი ტანდემური დომენით და შეიცავს რამდენიმე კონსერვატიულ ამინომჟავურ თანამიმდევრობას, რომელიც მნიშვნელოვანია მეორეული სტრუქტურის შენარჩუნებისთვის (Jones et al. 2002; Zdanov et al. 1995). უკანასკნელ პერიოდში აღმოჩნდა, რომ ადამიანის IL-10-ის ზოგიერთი ჰომოლოგი

იყენებს როგორც, ერთ რეცეპტორულ ჯაჭვს ასევე მთელ რეცეპტორულ კომპლექსსაც. IL-10-ის სასიგნალო მოქმედება გაშუალებულია ორი ტიპის IL-10-ის რეცეპტორით - IL-10 რეცეპტორი-1 (IL-10R1) და IL-10 რეცეპტორი-2 (IL-10R2). IL-10R1 იკავშირებს IL-10-ს შედარებით მაღალი მგრძნობელობით (50-200 pM), IL-10R2 კომპლექსს კი შეაქვს მხოლოდ მარგინალური წვლილი ლიგანდის დაკავშირებაში. ამგვარად, ფუნქციური რეცეპტორი წარმოადგენს ორი - IL-10R1 და IL-10R2 ჰეტეროდიმერისგან შემდგარ დიმერს. ჰემატოპოეზური უჯრედების უმეტესობა კონსტიტუციურად ექსპრესირებს IL-10R1-ის დაბალ დონეს, და რეცეპტორის ექსპრესია ხშირ შემთხვევაში დრამატულად იზრდება სხვადასხვა სტიმულების მოქმედებით. არა-ჰემატოპოეზურ უჯრედებს, როგორებიცაა ფიბრობლასტები და ეპითელიური უჯრედები, აგრეთვე, უნარი აქვთ უპასუხოვნ სტიმულს IL-10R1-ის გაზრდილი რეგულაციით. IL-10R2 ექსპრესირდება უჯრედების უმეტესობაში, და ამიტომაც, სხვადასხვა უჯრედს უნარი აქვს დაიკავშიროს IL-10. ეს წარმოადგენს პრობლემას რეკომბინანტული IL-10 (rIL-10) თერაპიული მართვისთვის, რადგან ციტოკინების უმრავლესობა მოქმედებს არა-იმუნურ უჯრედებზე, რაც ამცირებს მიღებული დოზის ეფექტურობას (Simone M. et al. 2005).

1.2. ინტერლეიკინ-10-ის რეცეპტორის დადამავალი სასიგნალო გზები

ანტიანთებით ციტოკინს - IL-10, აქვს ტროფიკული და სასიცოცხლო ზეგავლენა ნეირონებზე. ლიტერატურულ მონაცემებში ნაჩვენებია, რომ ქერქის პირველადი ნეირონული კულტურა, რომელიც მიღებულია IL-10-ის გენ-ნოკაუტირებული (KO) თაგვების ტვინიდან, უფრო მგრძნობიარეა ორივე - ექსციტოტოქსიკურობის და ერთობლივი, ჟანგბად-გლუკოზის დეპრივაციის მიმართ, ვიდრე უჯრედული კულტურა, რომელიც მიღებულია ველური ტიპის (Wt) თაგვების ტვინიდან (Grilli et al., 2000). უფრო მეტიც, უჯრედულ კულტურებზე თაგვის რეკომბინანტული IL-10-ის დამატება განაპირობებს ექსციტოტოქსიურობით განპირობებული ნეირონული დაზიანების კონცენტრაცია-დამოკიდებულ პრევენციას, ერთი უჯრედული შტამიდან აღებული ქერქოვან და ნათხემის გრანულარულ უჯრედულ კულტურებში. IL-10, აგრეთვე, უზრუნველყოფს არა-გააქტიურებული უჯრედების გადარჩენას,

რომელიც გამოწვეულია IL-10-ის ან პროლიფერაციული, ან ანტი-აპოპტოზური მოქმედებით. IL-10 პირდაპირ ზრდის ქერქოვანი და ცერებრალური გრანულარული უჯრედების, ასტროციტების და ოლიგოდენდროციტების სიცოცხლისუნარიანობას და იცავს მიკროგლიურ უჯრედებს აპოპტოზისგან, აინჰიბირებს რა მიტოქონდრიით ინიცირებულ უჯრედის აპოპტოზური სიკვდილის გზას. ეს დაკვირვებები მოწმობს, რომ IL-10-ს გააჩნია პოტენციური ნეიროპროტექციული მნიშვნელობა ნეირონული უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის რეგულაციაში (Villacampa N, et al 2015).



სურ.1. ინტერლეიკინ-10-ის რეცეპტორი და Jak/STAT-3 სასიგნალო გზა

გარდა ამისა, IL-10 ცვლის ნეირონების პლასტიკურობას და ზრდას. ის ასევე უმნიშვნელოვანესია ნეირორეგენერაციისთვის (Vidal et al., 2013). IL-10-ის რეცეპტორის აქტივაცია აძლიერებს რეტინას განგლიოზური უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას სტრესის საპასუხოდ (Boyd et al., 2003). IL-10R-ზე IL-10-ის მოქმედების შედეგად აქტივდება Jak/STAT-3 და PI3K/Akt სასიგნალო გზები (სურ.1). IL-10-ზე დამოკიდებული Jak/STAT-3 სასიგნალო გზის აქტივაცია იმუნურ უჯრედებში ცენტრალურ როლს ასრულებს მწვავე და ქრონიკული ანთებითი პროცესების დროს (Moore et al., 2001), მაშინ, როდესაც ნეირონებში დომინირებს PI3K/Akt სასიგნალო გზა (Zhou et al., 2009a). ამგვარად IL-10-დამოკიდებული

PI3K/Akt/STAT-3 ნეიროპროტექციული ეფექტი განსხვავდება ციტოკინის ანტი-ანთებითი ეფექტისგან (Zhou et al., 2009b; Sharma et al., 2011).

გარდა ამისა, ნეირონებში, STAT-3 ტრანსკრიპციული ფაქტორის აქტივაციის გარდა, IL-10-ის დადებითი ეფექტი მდგომარეობს ტრანსკრიპციული ფაქტორის, NF- κ B, დნმ-თან დაკავშირების აქტივაციაში, რაც განაპირობებს ანთიაპოპტოზური გენების ტრანსკრიპციის გაძლიერებას (Zhou et al., 2009). უფრო მეტიც, ნაჩვენებია, რომ IL-10 სასიგნალო გზა მოიცავს CCAAT/გამაძლიერებელ დამაკავშირებელ ცილებს (C/EBP), რაც ხელს უწყობს მის მოდულატორულ აქტივობას (Robb et al., 2002). ამ ცილებს შეუძლიათ წარმოქმნან პირდაპირი ტრანსკრიპციული კომპლექსი NF- κ B-თან სამიზნე პრომოტორების სრული აქტივაციისთვის (Stein et al., 1993) და როგორც ფიქრობენ, ნეირონებში ეს ქიმერული კომპლექსი პასუხისმგებელია IL-10-ის მოქმედებაზე. შეიძლება ითქვას, რომ IL-10 კოორდინირებს სხვადასხვა ტრანსკრიპციული ფაქტორის აქტივაციას და შეუძლია გამოიწვიოს ფართო რიგის გენების ექსპრესია.

1.3 IL-10 ანტიანთებითი და ნეიროპროტექციული როლი

IL-10 აღმოჩენა განაპირობა მისმა უნარმა - დათრგუნოს T უჯრედების, მონოციტების და მაკროფაგების აქტივაცია და მათი ეფექტორული ფუნქცია. IL-10 წარმოადგენს მულტიფუნქციურ ციტოკინს, რომელსაც გააჩნია განსხვავებული მოქმედება უმეტესობა ჰემატოპოეზურ უჯრედულ ტიპზე. IL-10-ის ძირითადი და საყოველთაოდ მიღებული ფუნქციაა შეზღუდოს და საბოლოო ჯამში შეაჩეროს ანთებითი პროცესები. დამატებით, ამ აქტივობის გარდა, IL-10 არეგულირებს B უჯრედების, NK (ბუნებრივი ქილერები) უჯრედების, ციტოტოქსიკური და T-ჰელპერული უჯრედების, გრანულოციტების, დენდრიტული უჯრედების, კერატინოციტების და ენდოთელური უჯრედების ზრდას და/ან დიფერენციაციას (Grilli et al, 2000; Boyd, Z.S et al, 2003; Zhou et al, 2009; Vidal, P.M et al, 2013).

ციტოკინი, IL-10, როგორც ცნობილია, აუმჯობესებს ნევროლოგიურ მდგომარეობას ცენტრალური ნერვული სისტემის დაზიანების შემდეგ; ასევე უჯრედულ კულტურებში ნეირონებს ხდის ნაკლებად მგრძნობიარეს არასასურველი

ზემოქმედებების მიმართ (Knobloch and Faden, 1998; Grilli et al., 2000; Boyd et al., 2003; Sharma et al., 2011; Thompson et al., 2013). IL-10-ის ტროფიკული და სასიცოცხლო გავლენა ნეირონებზე გაშუალებულია IL-10-ის რეცეპტორით და ეს ეფექტი იცავს ნეირონებს გლუტამატ-დამოკიდებული ექსციტოტოქსიკურობისგან (Zhou et al., 2009). გარდა ამისა, IL-10 აძლიერებს ნეირონების ზრდას და სტიმულირებს ნეირორეგენერაციას (Vidal et al., 2013). პირდაპირ ტროფიკულ და ნეიროპროტექციულ ეფექტთან ერთად, IL-10 მოქმედებს, როგორც გლუტამატერგული ნეიროგადაცემის უშუალო მონაწილე, რადგან შეუძლია შეცვალოს ხანგრძლივი პოტენციაცია (LTP) და შეამციროს გლუტამატის გამოთავისუფლება სინაპტოსომებიდან (Kelly et al., 2001). ეს ციტოკინი ზრდის ნერვული უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას, რომელიც კორელირებს მიკროგლიური ფენოტიპის, სიმკვრივის და მიკროგლიური კლასტერიზაციის ცვლილებებთან. (Villacampa N, et al 2015). მიკროგლიის მიერ წარმოებული IL-10 ამცირებს ნერვული უჯრედების ანთებით პროცესს და ზრდის ნეირონების სიცოცხლისუნარიანობას, რომელიც გაშუალებულია NADPH ოქსიდაზის აქტივობის ინჰიბირებით (Park KW. et al, 2007). IL-10-ის ყველა ნეირონული ეფექტი გაშუალებულია ნეირონული IL-10 რეცეპტორთან პირდაპირი ურთიერთქმედებით და განსხვავდება იმუნურ უჯრედებში ცნობილი ანტი-ანთებითი მოქმედებისაგან (Zhou Z et al, 2009)

IL-10-ის მოქმედების ერთ-ერთ სამიზნე გენს წარმოადგენს არგინაზას გენი, რომლის გააქტივდება დამოკიდებულია STAT-3 აქტივობის გაზრდაზე (Lang,R et al.,2002).

თავი II. არგინაზა. პოლიამინები და აზოტის ოქსიდი

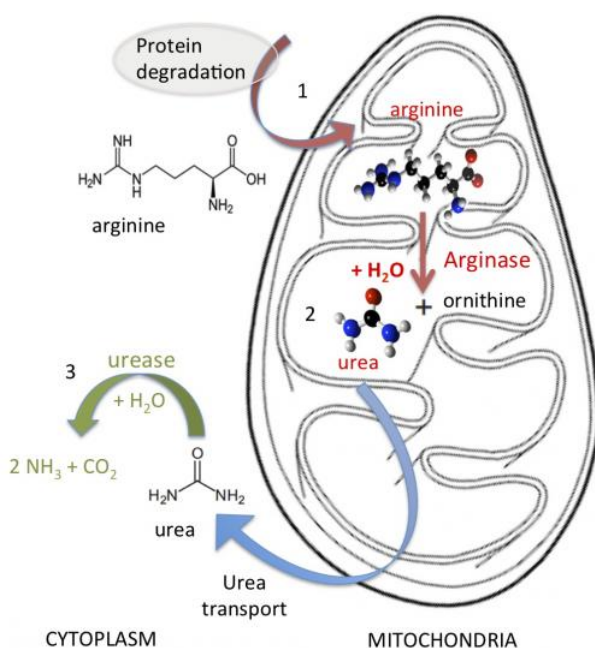
2.1 არგინაზა, მისი სტრუქტურა და ფუნქცია

არგინაზა მიეკუთვნება ურეოჰიდროლაზების (ureohydrolases) ოჯახს (Ouzounis, et al., 2008). ეს ცილები მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ არგინინის მეტაბოლიზმში, შარდოვანას ციკლში და სხვა მსგავსს პროცესებში. არგინაზა სპეციფიკურად მონაწილეობს ორგანიზმიდან ამონიაკის მოცილებაში (Jenkinson et al., 1996). არგინაზას აქვს სასიცოცხლო მნიშვნელობა ყველა სახეობისთვის და ამ ფერმენტული ცილის დეფიციტი ორგანიზმში იწვევს კატასტროფულ შედეგებს.

არგინაზა წარმოადგენს ფერმენტს, რომელსაც გააჩნია ორი იზომერული ფორმა - ტიპი 1 და ტიპი 2. პირველი ტიპის არგინაზა წარმოადგენს ციტოპლაზმურ ფორმას და უმეტესად ექსპრესირდება ღვიძლში, ხოლო მეორე იზომერული ფორმა წარმოადგენს მიტოქონდრიულს და ექსპრესირდება თითქმის ყველა ქსოვილში, განსაკუთრებით თირკმელებში, წინამდებარე ჯირკვალში, წვრილ ნაწლავში და ტვინში (Munder, M et al., 1999). არგინაზა არის ფერმენტი, რომელიც გამოიყენება შარდოვანას ციკლში, როგორც კატალიზატორი, არგინინის და წყლის გარდაქმნაში, ხოლო გარდაქმნის საბოლოო პროდუქტს წარმოადგენს ორნიტინი და შარდოვანა. არგინაზას ასევე მნიშვნელოვანი როლი აკისრია ცენტრალური ნერვული სისტემის უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობასა და რეგენერაციის პროცესში (Martin et al., 1988; Ratan et al., 1994a,b; Serghini et al., 1994; Dreyer et al., 1995; Koh et al., 1995). თანამედროვე მონაცემებით, არგინაზას ნეიროპროტექციული ეფექტი შესაძლებელია გამოწვეული იყოს ენდოპლაზმური ბადის სტრეს-პასუხის აქტივაციით, რასაც თან სდევს იმ პროფილის გენების ექსპრესიის ცვლილება, რომლებიც განაპირობებენ სიცოცხლისუნარიანობის გაუმჯობესებას (Harding HP, et al., 2000). გარდა ამისა, ნეირონების რეგენერაციის პროცესის აქტივაცია, რომელიც გამოწვეულია ენდოგენური არგინაზა I-ის რეგულაციის გაზრდით, განპირობებულია ასევე პოლიამინებით - არგინინის მეტაბოლიზმის პროდუქტებით - რომელთაც ახასიათებთ მრავლობითი ბიოლოგიური ეფექტები. ამ ფაქტებიდან გამომდინარე, მნიშვნელოვანია არგინაზა I-ის გენის ექსპრესიის რეგულაციის შესწავლა

ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში. ზოგიერთი ტრანსკრიპციული ფაქტორი, როგორიცაა Sp1, C/EBP (CCATT/enhancer-binding protein) და CREB ჩართულები არიან არგინაზა I-ის ტრანსკრიპციულ კონტროლში და შესაძლებელია მონაწილეობდნენ არგინაზა I-ის კომპლექსურ ექსპრესიაში თავის ტვინის ცალკეულ რეგიონებში (Liu P, et al., 2003).

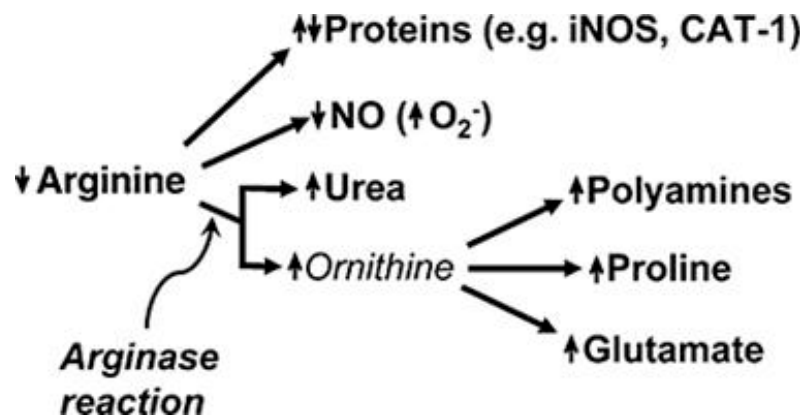
არგინაზას მოქმედება შარდოვანას ციკლის ფინალური საფეხურია. არგინაზას ფუნქციობა უმნიშვნელოვანესია ცხოველური ორგანიზმიდან ამონიაკის დისპერსიის უზრუნველყოფისთვის (Morris Jr et al., 2002). კუნთებში, ამინომჟავები შესაძლებელია მეტაბოლიზირდნენ გლუკოზად, ჩაერთონ ცხიმოვანი მჟავების სინთეზში, ან კატაბოლიზირდნენ ადენოზინტრიფოსფატის წარმოქმნით (ატფ) ენერგიით უზრუნველყოფისთვის. ჭარბი ამინომჟავები სწრაფად გარდაიქმნიებიან გლუტამატად კუნთოვან უჯრედებში. გლუტამატი გარდაიქმნება ალანინად ალანინ-ამინოტრანსფერაზას დახმარებით. ამ ფორმით, მოლეკულას შეუძლია გადაინაცვლოს ღვიძლში შემდგომი გადამუშავებისთვის ამ ციკლში.



სურ. 2. არგინაზა II -ის მოქმედება მიტოქონდრიაში

ორგანიზმში არგინაზას დონის ცვლილება იწვევს ვასკულარულ, პულმონალურ და ასევე, ინფექციურ დაავადებებს, იმუნური უჯრედების უფუნქციობას და

სიმსივნეს. არგინაზას ზე-ექსპრესია, როგორც აღმოჩნდა, გავლენას ახდენს ცილების, აზოტის ოქსიდის, შარდოვანს და ორნიტინის რაოდენობის რეგულაციაზე (სქემა.1).



სქემა.1. არგინაზას გაზრდილი აქტივობით მიღებული ეფექტები

2.2 არგინაზის ზემოქმედება აზოტის ოქსიდის სინთაზის აქტივობაზე და აზოტის ოქსიდის რაოდენობაზე

როდესაც არგინაზას დონე აღემატება არგინინის შემცველობას ორგანიზმში, აზოტის ოქსიდის (NO) სინთეზი შესაძლებელია შემცირდეს და, ამგვარად, შესაძლებელია გააქტივდეს აზოტის ოქსიდის სინთაზა (NOS) (Morris Jr., S.M. et al., 2009). აზოტის ოქსიდის სინთაზა (NOS) აკატალიზებს აზოტის ამიდის ოქსიდაციას არგინინის წარმოქმნით და მოქმედებს, როგორც ვაზოდილატატორი ორგანიზმში. ეს განაპირობებს პულმონალურ ჰიპერტენზიას. დამატებით, ის წარმოადგენს ისეთი ცილების ექსპრესიის გაზრდის, ან შემცირების ჩამრთველს, როგორებიცაა კათიონური ამინომჟავების ტრანსპორტერი და აზოტის ოქსიდის სინთაზას იზოფორმა - iNOS (Morris jr.,m S.M. et al., 2009). კათიონური ამინომჟავური ტრანსპორტერი ხელს უწყობს არგინინის უკუშეწოვას ორგანიზმში. თუ არგინინის დონე მაღალია ორგანიზმში, ეს იწვევს ჰიპერარგინინემიას. ჰიპერარგინინემია წარმოადგენს არგინაზას გენის აუტოსომურ რეცესიულ დეფექტს. ამ დეფექტების სიმპტომები არ ვლინდება სიცოცხლის პირველი ხუთი წლის განმავლობაში და ხასიათდება გაზრდილი არგინინის დონით სისხლსა და ცერებროსპინალურ სითხეში. თუ არგინინის დონე დაბალია ორგანიზმში არსებულ არგინაზასთან შედარებით, მაშინ ორგანიზმში იზრდება პულმონარული ჰიპერტენზიის ალბათობა. iNOS-ს შეუძლია სწრაფი ურთიერთქმედება ჟანგბადთან და სუპეროქსიდთან

პეროქსინიტრილის რადიკალის წარმოქმნით, რომელიც იწვევს უჯრედის ციტოტოქსიკურ დაზიანებას. iNOS-ის დეფიციტი ორგანიზმში ზრდის მის მგრძნობელობას ინფექციების მიმართ (Murray et al., 2009).

ენდოთელურ უჯრედებში არგინაზა I, ან არგინაზა II-ის ზე-ექსპრესიას შეუძლია შეამციროს აზოტის ოქსიდის სინთეზი. აზოტის ოქსიდს გააჩნია ფიზიოლოგიური მნიშვნელობა ორგანიზმისთვის. ის მოქმედებს როგორც ვაზოდილატატორი და მნიშვნელოვანია სისხლის წნევის რეგულაციისთვის. აზოტის ოქსიდი გავლენას ახდენს ნეიროტრანსმიტერებზე თავის ტვინში, პერიფერიულ ნერვულ სისტემაზე, გახანგრძლივებულ პოტენციალიაზე, ნეიროტოქსიკურობაზე, კუნთების მოდუნებაზე, პირველად იმუნურ სისტემაზე. აღმოჩნდა, რომ ის აინჰიბირებს თრომბოციტების ადჰეზიას, აქტივაციას და აგრეგაციას.

შარდოვანას შეუძლია დათრგუნოს აზოტის ოქსიდის რაოდენობა, რომელიც წარმოიქმნება ენდოთელურ უჯრედებში. დამატებით, შარდოვანას შეუძლია შეამციროს არგინაზას K_m არგინინის მიმართ და გააქტივოს არგინაზა. შარდოვანას მაღალი დონე სისხლის ნაკადში დაკავშირებულია პრე-ეკლამპსიასთან და იზრდება იმის ალბათობა, რომ არგინაზას შარდოვანა-დამოკიდებულ აქტივაციას, შეუძლია გამოიწვიოს პულმონარული ჰიპერტენზია (Morris et al., 2009). შარდოვანას მაღალი კონცენტრაცია ჩვეულებრივ განაპირობებს ჰიპერამონემიას, ზრდის ამონიკის დონეს ორგანიზმში და ხშირად, შედეგი ფატალურია.

2.3 არგინაზას როლი პოლიამინების რაოდენობის რეგულაციაში და მათი მნიშვნელობა ორგანიზმისთვის.

არგინაზას ერთერთ ფუნქციას წარმოადგენს L-არგინინის გარდაქმნა L-ორნიტინად. ორნიტინი გამოიყენება როგორც პოლიამინების, პროლინის და გლუტამატის სინთეზის პრეკურსორი. ამიტომ არგინაზა წარმოადგენს ამ პროდუქტების სინთეზის მალიმიტირებელ ფაქტორს. არგინაზა I-ის ზე-ექსპრესიის შედეგს ვასკულარულ გლუვ კუნთოვან უჯრედებში წარმოადგენს პოლიამინების სინთეზის და უჯრედების პროდუქციის გაზრდა. ენდოთელურ უჯრედებში

არგინაზა I, ან არგინაზა II-ის ზე-ექსპრესია ზრდის პოლიამინების და პროლინის სინთეზს. (Morris Jr., S.M. et al., 2009)

ორნიტინი წარმოადგენს პოლიამინების პროდუქციის წინამორბედს, რომლებიც არეგულირებენ უჯრედების პროლიფერაციას და სიცოცხლისუნარიანობას. პოლიამინები ფუნდამენტურ როლს ასრულებენ ნერვული სისტემის განვითარებაში: პოლიამინების ბიოსინთეზის ინჰიბირება განაპირობებს დეფექტებს ნეირონულ მორფოგენეზში (Schweitzer et al., 1989), მაშინ როდესაც ეგზოგენური პოლიამინები სტიმულირებენ აქსონურ რეგენერაციას. (Chu et al., 1995). პოლიამინებს მნიშვნელოვანი როლი აკისრიათ ნორმალური ნეირონული ფუნქციების შენარჩუნებაში, ნეიროტრანსმიტერული რეცეპტორების რეგულაციასა და დამახსოვრება/დასწავლის პროცესების მოდულაციაში. პოლიამინები, აგრეთვე, ზეგავლენას ახდენენ ნეიროგადამცემის პროცესზე, იონოტროპულ გლუტამატურ რეცეპტორებზე ზემოქმედების გზით (NMDAR N-მეთილ-D-ასპარტატის ტიპის გლუტამატურ რეცეპტორზე). (Williams, 1997; Pellagrini-Giampietro, 2003; Liu et al., 2008).

იმუნურ უჯრედებში, არგინაზა I და II-ის გენები რეგულირდება განსხვავებულად IL-10-ის საშუალებით. არგინაზა II, როგორც ცნობილია, სტიმულირდება პირდაპირ IL-10-ის საშუალებით, მაშინ როცა ეს ციტოკინი იწვევს არგინაზა I ექსპრესიის გაძლიერებას, მხოლოდ IL-4 თანაობისას (Lang et al., 2002). ორივე IL-10 და IL-4 მოქმედებენ STAT3 და STAT6 ტრანსკრიპციული ფაქტორების საშუალებით (O'Shea et al., 2007; Sica and Bronte, 2007), რომელთა ექსპრესიაც კოორდინირებულად რეგულირდება სხვადასხვა ტრანსკრიპციული ელემენტებით, რომელთა შორისაა CCAAT/enhancer დამაკავშირებელი ცილა b (C/EBP) (Gotoh et al., 1997; Oliva et al., 2012). CCAAT/enhancer დამაკავშირებელი ცილა b - C/EBP ტრანსკრიპციული ფაქტორების ოჯახის წარმომადგენელია, რომელიც რეგულირდება მრავლობით დონეებზე განსხვავებულ ფიზიოლოგიურ და პათოლოგიურ პირობებში სხვადასხვა ჰორმონების და ციტოკინების მოქმედებით (Ramji, Foka, 2002). C/EBP მონაწილეობს გენების ფართო რიგის ტრანსკრიპციაში, მათ შორის მეტაბოტროპული გლუტამატის რეცეპტორი-1 ((mGluR1) გენის ტრანსკრიპციაში (Crepaldi et al., 2007; Kfoury and Kapatos, 2009). მეორეს მხრივ, C/EBP

გენი გაძლიერებულ ექსპრესიას განიცდის სპეციფიკურად IL-10-ის საშუალებით (Lang et al., 2002). ამგვარად, IL-10-ის დეფიციტი შესაძლოა ამცირებდეს C/EBP-ცილის და C/EBP-დაკავშირებული გენების ექსპრესიას, რომელთა შორისაა STAT3 და მეტაბოტროპული გლუტამატის რეცეპტორის მე-7 სუბერთეულის (Grm7) გენები. (Crepaldi et al., 2007; Kfoury and Kapatos, 2009).

2.4. აზოტის ოქსიდის პროდუქციის რეგულაცია არგინინის მეტაბოლიზმში მონაწილე ფერმენტებით

არგინაზას გენის ექსპრესიის გაზრდა და შედეგად NO-ს წინამორბედის (პრეკურსორის) არგინინის დეგრადაცია ამცირებს NO-ს წარმოქმნას NO-სინთაზას მეშვეობით და პოტენციურად იცავს ნეირონებს და აქსონებს (Mori and Gotoh, 2000; Wiesinger, 2001; Lange et al., 2004). მოტორულ ნეირონების სუბპოპულაციაში, NO-ს პროდუქცია შესაძლებელია შემცირებული იყოს არგინინის დაბალი დონით, რაც გამოწვეულია არგინაზას მაღალი აქტივობით, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ NO-ს უნარი, მიაღწიოს ტოქსიკურ დონეს, დამოკიდებულია ნეირონულ NO-სინთაზას და არგინაზას აქტივობას შორის ბალანსის შენარჩუნებაზე უჯრედში (Mori and Gotoh, 2000; Wiesinger, 2001; Lange et al., 2004). დადგენილია, რომ ნეირონებში NO-ს სინთეზი რეგულირდება უპირატესად გლუტამატის რეცეპტორით. ნეირონული აზოტის ოქსიდის სინთაზა (nNOS), რომელიც PSD-95-ს საშუალებით ურთიერთქმედებს NMDAR-ის NR2B სუბერთეულთან შესაძლებელია ეფექტურად გააქტივდეს NMDAR გაშუალებული Ca^{2+} -ის ნაკადით (Aarts et al., 2002). Ca^{2+} -დამოკიდებული nNOS-აქტივაციას მივყავართ აზოტის ოქსიდის (NO) პროდუქციამდე, რომელიც ჭარბი რაოდენობით ტოქსიკურია, როდესაც დაუკავშირდება სხვა ROS-ს, (რეაქციული ჟანგბადის შემცველ ნაერთებს), როგორცაა მაგალითად, სუპეროქსიდი. ამასთანავე ნეირონებში, პირველი ჯგუფის mGluR -ის გააქტივება განაპირობებს Ca^{2+} -ის დიდი რაოდენობით გამოთავისუფლებას შიდაუჯრედული კომპარტმენტებიდან, რასაც თავისი წვლილი შეაქვს Ca^{2+} დამოკიდებული შიდაუჯრედული პროცესების რეგულაციაში (Ribeiro et al., 2010a). უამრავი კვლევა მიუთითებს იმაზე, რომ mGluR-ების გააქტივება იწვევს ან

ნეიროპროტექციას ან ექსციტოტოქსიკურობას (Maiese, K., et al, 2005;). თუმცა, პირველი ჯგუფის mGluR-ის უნარი გამოიწვიოს ექსციტოტოქსიკურობა, თუ ნეიროპროტექცია (დამცველობითი ეფექტი), დამოკიდებულია უჯრედის სასიგნალო გზებზე და მთელი რიგი ექსპერიმენტები აჩვენებს, რომ mGluR1/5-ის აქტივაცია განაპირობებს ნეიროპროტექციას (Baskys et al., 2005; Ribeiro et al., 2010b; Chen et al., 2012). ზემოხსენებულიდან გამომდინარე შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ ეს რეცეპტორები შესაძლოა გამოყენებულ იყოს, როგორც მულტიპოტენციური თერაპიული სამიზნე.

ჩვენი ვარაუდით, რომ IL-10-ის დადებითი ეფექტი ნეირონებზე დამოკიდებულია არგინაზას გენის გაძლიერებულ რეგულაციაზე, რაც პოტენციურად განაპირობებს ნეიროპროტექციას პოლიამინების ბიოსინთეზის გაზრდით და NO-ს კონცენტრაციის შემცირებით. დამატებით, ჩვენ ვფიქრობთ, რომ IL-10-ის მოქმედებაში, აგრეთვე, შესაძლებელია ჩართული იყოს გლუტამატ-დამოკიდებული NO-ს გენერაციის მოდულაცია. IL-10 ნოკაუტირებულ და გარეული ტიპის თაგვების ნეირონებში NO-ს პროდუქციაზე გლუტამატის მოქმედების შესწავლისთვის ჩვენ გამოვიყენეთ სინაპტონეიროსომები, როგორც მოდელური სისტემა. სინაპტონეიროსომული პრეპარატი შეიცავს პრე- და პოსტსინაპსური სტრუქტურების პოპულაციას (Hollingsworth et al., 1985), რომელსაც შენარჩუნებული აქვს ინტაქტური ტვინისთვის დამახასიათებელი ბევრი მოლეკულური ეფექტი, მათ შორის ნეიროტრანსმიტერის გამოთავისუფლება, რეცეპტორით-განპირობებული სიგნალის ტრანსდუქცია და ცილების სინთეზი. (Wwiler et al., 1997). სინაპტონეიროსომული პრეპარატები შესანიშნავი მოდელია ნერვულ ქსოვილში გლუტამატ-დამოკიდებული ბიოქიმიური პასუხების შესწავლისთვის (Benavides et. al., 1988; Muddashetty et.al., 2007; Kim et. al., 2010).

აქედან გამომდინარე, ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა განგვესაზღვრა აზოტის ოქსიდის გლუტამატ-დამოკიდებული სინთეზი სინაპტონეიროსომებში, რომლებიც გამოყოფილია C57BL/6 IL-10 გენ-ნოკაუტირებული (KO) თაგვების ტვინიდან და ველური ტიპის (Wt) ცხოველების თავის ტვინიდან. ის რომ, IL-10-ს ორივე, mGluR1-დამოკიდებული გზით და პოლიამინების ბიოსინთეზით, შეუძლია

არეგულიროს NO-ს მეტაბოლიზმი ნეირონებში, შესაძლოა უმნიშვნელოვანესი იყოს IL-10-ის ნეიროპროტექციულ და ნეიროდეგენერაციულ მოქმედებაში.

თავი 3. გლუტამატი . მისი როლი ნორმასა და პათოლოგიაში

3.1 გლუტამატი

გლუტამატი, წარმოადგენს მნიშვნელოვან და ძირითად ამაგზნებელ ნეირომედიატორს ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში. ნერვულ ქსოვილში ფუნქციონირებად თავისუფალ ამინომჟავათა 70% სწორედ გლუტამატზე და სტრუქტურულად მის მსგავს ამინომჟავებზე მოდის. (Lodge D, Schoeppe D, 1993). ფიზიოლოგიური კონცენტრაციით იგი მონაწილეობას იღებს ისეთ მნიშვნელოვან ფუნქციებში, როგორიცაა - დასწავლა, მეხსიერება, ასევე სინაფსური პლასტიურობა და სინაპტოგენეზი.

გლუტამატი დიკარბონულ მჟავას წარმოადგენს, რომელიც სინთეზირდება ნერვულ დაბოლოებებში გლუტამინიდან, თავის მხრივ, გლუტამინის წარმოქმნა ხდება გლიური უჯრედების მიერ პრესინაფსურ ტერმინალებში, ხოლო შემდგომ მიტოქონდრიულ ფერმენტ - გლუტამინაზას საშუალებით, გარდაიქმნება გლუტამატად. არსებობს მეორე გზაც - 2- ოქსოგლუტარატის ტრანსამინირების შედეგად, ასევე ხდება გლუტამატის წარმოქმნა. მისი დაგროვება მიმდინარეობს სინაფსურ ვეზიკულებში, საიდანაც პრესინაფსური მემბრანის დეპოლარიზაციისას გამოთავისუფლდება კალციუმ-დამოკიდებული ეგზოციტოზის გზით (Nicholls DG, Sihra TS, 1986). გლუტამინის მჟავა მონაწილეობს მრავალრიცხოვან მეტაბოლურ გარდაქმნებში, მათ შორის; ამონიუმის დეტოქსიფიკაციის პროცესში, ცილებისა და პეპტიდების, მაგალითად, გლუტათიონის სინთეზში, აგრეთვე წარმოადგენს ძირითადი შემკავებელი ნეირომედიატორის - გამა-ამინოჰიბოსმაჟავას პრეკურსორს. თავის ტვინში გლუტამატის დონის რეგულაცია ნაკლებადაა დამოკიდებული სისხლში არსებული გლუტამატის რაოდენობაზე. სისხლიდან გლუტამატის ტრანსპორტი ტვინში ჰემატოენცეფალური ბარიერის გავლით გაცილებით ძნელად ხორციელდება, ამიტომ მისი შემცველობა ტვინში ძირითადად მისი სინთეზით ხორციელდება. ცნობილია, რომ გლუტამატი უზრუნველყოფს ინფორმაციის გადაცემის მაღალ სიჩქარეს (Kaneko et al 1990).

აღსანიშნავია, რომ თუ ფიზიოლოგიური კონცენტრაციით გლუტამატი წარმოადგენს უმნიშვნელოვანეს ნეირომედიატორს, ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში, ჭარბი რაოდენობით იგი იწვევს სხვადასხვა ტიპის ნევროლოგიურ დარღვევებს, ეპილეფსიას, (Shimamoto, et al., 1998, Campbell and Hablitz, 2005)); თავის ტვინის ტრამვის და იშემიის შედეგად გამოწვეულ დარღვევებს (Longuemare and Swanson, 1995, Phillis, et al., 2000)) და ნეიროდეგენერაციულ (ჰანდინგტონის ქორეა (Sun, et al., 2001)); ალცჰეიმერის სინდრომი (Bell, et al., 2006, Mangano and Schwarcz, 1981; Ferrarese, et al., 2001)); პარკინსონის სინდრომი (Bergman, et al., 1994, Hassani, et al., 1996, Hutchison, et al., 1998, Benazzouz, et al., 2002)) დაავადებებს.

3.2 გლუტამატური რეცეპტორები

გლუტამატი, როგორც ავლნიშნეთ, წარმოადგენს ძირითად ამაგზნებელ ნეიროტრანსმიტერს ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში, შესაბამისად, გლუტამატური რეცეპტორები წარმოადგენენ ძირითად ამაგზნებელ სინაპსურ რეცეპტორებს, რაც ნიშნავს, რომ ეს ცილოვანი სტრუქტურები მოთავსებულნი არიან სინაპსურ მემბრანებში, სადაც მონაწილეობენ ცოცხალი ორგანიზმის ისეთ უმნიშვნელოვანეს ფუნქციაში, როგორიცაა-სინაპსური გადაცემა ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში. აღნიშნული რეცეპტორები განლაგებულია ასევე დენდრიტულ უჯრედებზე, ოლიგოდენდროციტებზე და ასტროციტებზე (Lee et al., 2010). ელექტროფიზიოლოგიური და ფარმაკოლოგიური თვისებების მიხედვით გლუტამატის რეცეპტორები ორ ძირითად ქვეტიპად იყოფა : იონოტროპული (**iGluRs**) და მეტაბოტროპული (**mGluRs**) რეცეპტორები. რეცეპტორების ეს ორი ჯგუფი ხასიათდება მოქმედების განსხვავებული მექანიზმით, თუმცა უნდა აღინიშნოს, რომ ორივე ტიპის რეცეპტორი მოქმედებს სინაპსურ პლასტიურობაზე (Baudry and Lynch, 2001; Malinow and Malenka, 2002; Manabe et al., 1992; Massicotte, 2000; Izumi et al., 2000).

3.2.1 იონოტროპული გლუტამატური რეცეპტორები

იონოტროპული გლუტამატური რეცეპტორები (iGluRs) წარმოადგენენ მემბრანის გამჭოლ იონურ არხებს და განსხვავდებიან ლიგანდ-სპეციფიურობით. გლუტამატის იონოტროპული რეცეპტორები იყოფა სამ კლასად: რომელთა დასახელება ემთხვევა შერჩევითი აგონისტების დასახელებას - **NMDA** (N-მეთილ -D-ასპარაგინის მჟავა), **AMPA** (α - ამინო -3-ჰიდროქსი -5-მეთილ -4-იზოქსაზოლპროპიონის მჟავა) და კაინის მჟავას რეცეპტორები. გლუტამატის რეცეპტორების მოლეკულურმა კლონირებამ 90 -იანი წლების დასაწყისში საშუალება მისცა მეცნიერებს დაწვრილებით შეესწავლათ მათი ფიზიოლოგია, ფარმაკოლოგია და პათოლოგიური ფიზიოლოგია მოლეკულურ დონეზე.

გლუტამატის რეცეპტორები ძირითადად ექსპრესირდება ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში, მაგრამ არსებობს ზოგიერთი ყურადღება მისაქცევი გამონაკლისიც, მაგალითად ნაჩვენებია, რომ კუჭქვეშა ჯირკვლის ლანგერჰანის კუნძულების უჯრედებში ხდება გლუტამატის რეცეპტორების ექსპრესია (Iganaki, 1995), აგრეთვე - NMDA ტიპის გლუტამატის რეცეპტორი ექსპრესირდება ოსტეობლასტებსა და ოსტეოკლასტებში (Chen 1998, Patton 1998), კანის მცირე არამიელინოზირებულ დაბოლოებებში, პოხიერ უჯრედებში , სადაც NMDA -ს აგონისტები ამცირებენ ჰისტამინის გამოყოფას (Purall, 1996).

NMDA ტიპის გლუტამატის რეცეპტორი ტიპური იონოტროპული რეცეპტორია, რომლის ნეიროტრანსმიტერული ეფექტი განპირობებულია იონური არხების პირდაპირი გახსნით, იგი შედგება შვიდი სუბერთეულისგან - **NR1**, **NR2A-D** და **NR3A-B**, რომლებიც სხვადასხვა გენის პროდუქტს წარმოადგენენ. ლიტერატურაში არსებობს სუბერთეულთა ნომენკლატურის ორი ტიპი :

1. **NR1**, **NR2A-D**, **NR3A-B** სუბერთეულები

2. **ε1**, **ε2** და **ε3** სუბერთეულები

NMDA რეცეპტორები, როგორც წესი წარმოადგენენ ჰეტეროდიმერებს, სადაც NR1 ერთ-ერთი სუბერთეულია, ან შედგება მხოლოდ NR1 სუბერთეულისგან

(Barnard 1992). NMDA რეცეპტორს აქვს ლიგანდის დაკავშირების რამდენიმე უბანი, რაც მიუთითებს იმაზე, თუ რამდენად ფართოდაა ჩართული ნერვული სისტემის სასიგნალო გზებში. რეცეპტორის გააქტივება ხდება უშუალოდ გლუტამატის და გლიცინის დაკავშირების შემდგომ. რეცეპტორზე ასევე წარმოდგენილია Mg^{2+} -ის, სტეროიდების, pH-მგრძნობიარე, პოტენციალმგრძნობიარე და პოლიამინების (სპერმინი და სპერმიდინი) დაკავშირების უბნები, რომლებიც ახდენენ რეცეპტორის აქტიურობის რეგულაციას სხვადასხვა ნეიროფიზიოლოგიური პროცესების დროს. ამ რეცეპტორზე ლოკალიზებულია აგრეთვე უბანი, რომელიც იკავშირებს თუთიას. NMDA რეცეპტორის აქტივობის რეგულაცია აგრეთვე ხდება მისი ზოგიერთი უბნის ფოსფორილირება-დეფოსფორილირების გზით. NMDA გლუტამატის რეცეპტორი, შეიძლება ფოსფორილირებული იყოს PKA (პროტეინკინაზა A), PKC (პროტეინკინაზა C) და CAMKII (Ca^{2+} /კალმოდულინ დამოკიდებული კინაზა II) საშუალებით და დეფოსფორილდეს Ca^{2+} /კალმოდულინ დამოკიდებული ფოსფატაზით (Lieberman 1994). თავის ტვინში NR1 და NR2 სუბერთეულების 10% და 70%, შესაბამისად ფოსფორილირებულია PKA ან PKC- თი ერთ ან რამდენიმე უბანში. ფოსფორილირებული სუბერთეულების ასეთი შეფარდება მნიშვნელოვნად ზრდის NMDA გლუტამატის რეცეპტორის ოჯახის მოლეკულურ და ფუნქციურ ჰეტეროგენულობას (Leonard and Hell, 1997).

რაც შეეხება NMDA გლუტამატის რეცეპტორის ფარმაკოლოგიას, იგი საკმაოდ რთული და მრავალფეროვანია. მის აგონისტებს მიეკუთვნება L- გლუტამატი, რომლის დაკავშირების უბანი მდებარეობს NR2 სუბერთეულზე. სავარაუდოდ, აქ არის ლოკალიზებული L-ასპარტატის უბანიც (Patneau and Mayer, 1990). გლიცინი, რომელიც გვევლინება როგორც კოაგონისტი, უკავშირდება რეცეპტორს NR1 სუბერთეულზე.

დადგენილია NMDA გლუტამატის რეცეპტორის მრავალი ანტაგონისტი, რომლებიც იყოფიან 3 ჯგუფად. კონკურენტული, არაკონკურენტული და ბლოკატორები (ე.წ. ღია არხის ბლოკატორები). აგრეთვე, ცალკე აღსანიშნავია ნაწილობრივი ანტაგონისტები, რომლებიც მოქმედებენ უცნობი მექანიზმით. NMDA გლუტამატის რეცეპტორის დამაკავშირებელი უბნის კონკურენტულ ანტაგონისტებს

მიეკუთვნება მოკლე ჯაჭვიანი 5-7 ამინომჟავიანი პეპტიდები, როგორებიცაა AP5 და AP7, ხოლო გლიცინის საიტის კონკურენტულ ანტაგონისტებს წარმოადგენს ჰალოგენირებული ქინოქსალინედიონები და კინურენის მჟავა, ფტალაზინედიონის და ბენზაზეპინედიონის წარმოებულები (Priestley 1995, Parsons 1997, Guzowski 1999). არაკონკურენტული ანტაგონისტების განხილვისას, განსაკუთრებულ ყურადღებას იქცევს იფენპროდილი და მისი ანალოგები, რომლებიც აბლოკირებენ NMDA გლუტამატის რეცეპტორს პოტენციალ-დამოკიდებული გზით და ამასთან ერთად არ ამცირებენ აგონისტის დაკავშირების თვისობას. ამ პროცესებში მონაწილეობს NR2B სუბერთეულის N-დაბოლოების ნაშთები (Williams 1993, Gallagher 1996). იფენპროდილი ზრდის არეში არსებული პროტონების პოტენციას დააბლოკირონ NMDA გლუტამატის რეცეპტორი (Mott 1998) და შეამცირონ არხის გახსნის ალბათობა. NMDA გლუტამატის რეცეპტორის არაკონკურენტული ანტაგონისტებს მიეკუთვნება, აგრეთვე, ეთანოლი არატოქსიკურ დოზებში (Peoples and Weight 1997), ტრიქლორეთანოლი და ზოგიერთი დადებითად დამუხტული პეპტიდი - დინორფინი, აგრეთვე, ზოგიერთი ზღვის გველის ტოქსინი (Zhang 1997, Zhou 1996). NMDA გლუტამატის რეცეპტორის ბლოკატორებს შორის აღსანიშნავია Mg^{2+} -ის იონები, რომლებიც უკავშირდებიან იონურ არხს და ხელს უშლიან იონების შესვლას უჯრედში. ბლოკატორებს, აგრეთვე, მიეკუთვნება ისეთი ნაერთები, როგორებიცაა **MK-801** და ფენციკლიდინი, რომლებიც შეუქცევადად აბლოკირებენ NMDA გლუტამატის რეცეპტორის ღია არხს (MacDonald 1991, Dzubay and Jahr 1996). უკანასკნელ წლებში, უფრო და უფრო დიდ ყურადღებას იქცევს დისოციაციური საანესთეზიო საშუალებები - კეტამინი, დექსტრომეტორფანი და დექსტროფანი (Netzer 1993), მემანტინი და ამანტადინი (ადამანტინის წარმოებულები), რომელთა ეფექტი NMDA გლუტამატის რეცეპტორზე ნაწილობრივი და შექცევადი ხასიათისაა, რაც შესაძლებელია, გამოყენებული იყოს კლინიკურ მედიცინაში იშემიური დაავადებების სამკურნალოდ (Sobolevsky and Koshelev 1998). რაც შეეხება ანტაგონისტებს, მოქმედების უცნობი მექანიზმით, მიეკუთვნება აზოტის ოქსიდი, ე.წ. „სიცილის გაზი“, რომელიც ანესტეზიურ დოზებში ინჰიბირებს NMDA გლუტამატის რეცეპტორის აქტივაციას (Jevtovic-Todorovic 1998) და ენდოგენური სულფატირილებული სტეროიდები, რომელთა მაბლოკირებელი მოქმედება NMDA

გლუტამატის რეცეპტორზე, ხორციელდება შერეული კონკურენტულ/არაკონკურენტული მექანიზმით (Weaver 1997).

NMDA გლუტამატის რეცეპტორის ასეთი რთული ფარმაკოლოგიის მიუხედავად, არსებობს დამატებითი მექანიზმები მისი აქტივაციის სარეგულაციოდ, რომელთა შორის აღსანიშნავია რეცეპტორის დესენსიტიზაციის პროცესები. დესენსიტიზაცია მოიცავს 3 ცალკეულ მექანიზმს.

1. გლუტამატის მოქმედება ხანგძლივი დროის განმავლობაში ამცირებს NMDA გლუტამატის რეცეპტორის პასუხს, რაც აიხსნება უარყოფითი ალოსტერული შეუღლებით გლუტამატის და გლიცინის დამაკავშირებელ უბნებს შორის. გლუტამატის მაღალი კონცენტრაციისას მცირდება გლიცინ-დამაკავშირებელი უბნების თვისობა (McBain and Mayer 1994).

2. გლიცინის მაღალი კონცენტრაციისას NMDA გლუტამატის რეცეპტორის 50%-80% უფრო სწრაფი დესენსიტიზაცია (Sather 1990).

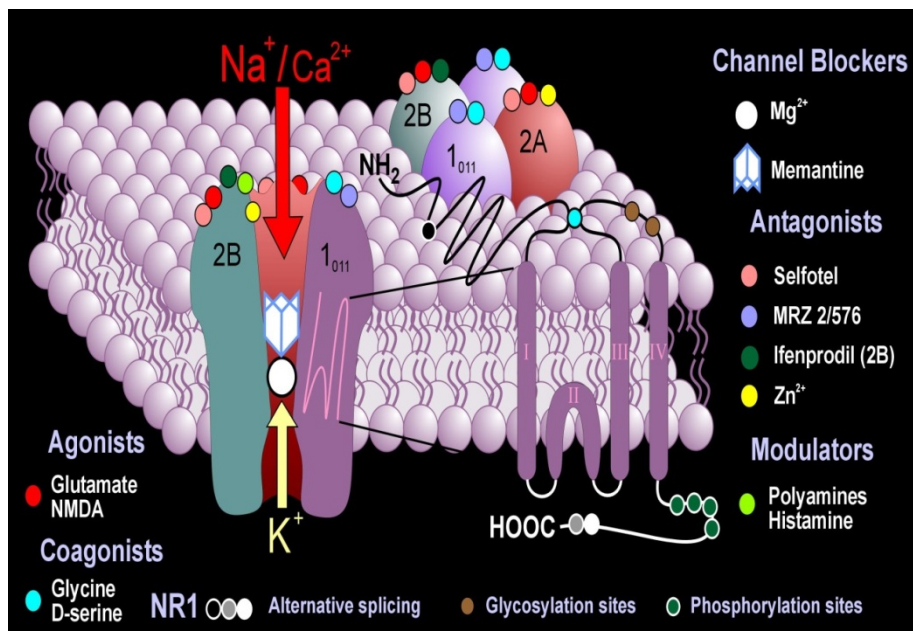
3. Ca^{2+} - დამოკიდებული მექანიზმი, რომელიც გულისხმობს უჯრედშიდა მგრძნობიარე უბნების არსებობას რეცეპტორზე (Vyklícky 1993).

NMDA ტიპის გლუტამატის რეცეპტორის აქტივობის რეგულაციის ასეთი მრავალფეროვანი და ნატიფი მექანიზმების არსებობა და მათი ურთიერთქმედების რთული სქემა, ნათლად მეტყველებს იმაზე, რომ გლუტამატის ეს რეცეპტორი ჩართულია მრავალ სასიგნალო გზაში და მნიშვნელოვან როლს თამაშობს ნერვული სისტემის ისეთ რთულ და მნიშვნელოვან პროცესებში, როგორიცაა ნეირონების მიგრაცია და სინაპსების ჩამოყალიბება ონტოგენეზში (უფრო ინტენსიურად ემბრიოგენეზში), ასევე მონაწილეობს დასწავლისა და მეხსიერების ფორმირების პროცესებში, რაც ნაწილობრივ განპირობებულია მისი არხის სელექტიურობით Ca^{2+} -ის მიმართ.

NMDA გლუტამატის რეცეპტორთან მემბრანაში ასოცირებულია ცილოვანი პროდუქტების მთელი კომპლექსი. დღეისთვის აღმოჩენილია მრავალი ცილა-მოდულატორი, რომელიც NMDA გლუტამატის რეცეპტორულ კომპლექსში შედის და განსაზღვრავს მის აქტივობას. ეს ცილოვანი პროდუქტები, შესაძლებელია

გავაერთიანოთ ორ დიდ ჯგუფში: PDZ დომენის არშემცველი და შემცველი მოლეკულები.

გლუტამატი სისხლის პლაზმაში მაღალი კონცენტრაციით (10–50 μM) არის წარმოდგენილი (Danbolt N.C, 2001; Graham T.E, 2000), თუმცა, სისხლის უჯრედების გლუტამატის რეცეპტორის აქტივაციის მექანიზმი ბოლომდე შესწავლილი არ არის. T ლიმფოციტების მუდმივი ცირკულაცია სისხლში, შეიძლება გახდეს გლუტამატური რეცეპტორის შემცირებული დონის ან დესენსიტიზაციის წამყვანი მიზეზი. ამის საპირისპიროდ, გლუტამატის ლოკალური მომატება, ან ტრეფიკინგი მცირე შემცველობის გლუტამატიან არეში (მაგალითად, თავ-ზურგ-ტვინის სითეში), შეიძლება საკმარისი გახდეს რეცეპტორის აქტივაციისთვის. ნაჩვენებია, რომ დენდრიტული უჯრედები T ლიმფოციტებთან კონტაქტისას, მნიშვნელოვნად ზრდიან გლუტამატის რაოდენობას ლოკალურად, ანტიგენის პრეზენტაციის შემდგომ. მეტაბოტროპული გლუტამატური რეცეპტორი, რომელიც ექსპრესირდება T ლიმფოციტზე, აძლიერებს ამ უჯრედების პროლიფერაციას და პროანთებითი ციტოკინების პროდუქციას (Pacheco R, 2006).

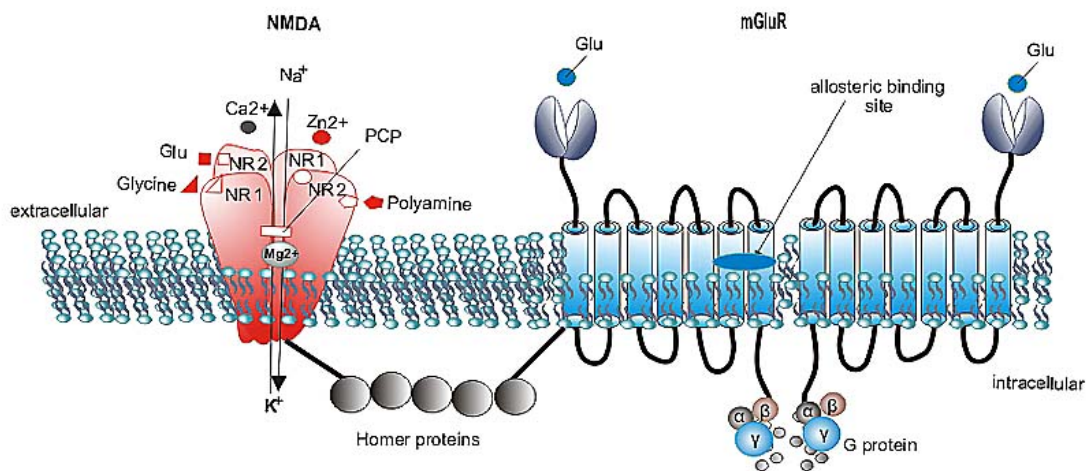


სურ.3. NMDA რეცეპტორის სტრუქტურული აგებულება

3.2.2 მეტაბოტროპული გლუტამატური რეცეპტორები

მეტაბოტროპული გლუტამატის რეცეპტორები შედგებიან 7 ტრანსმემბრანული დომენისგან და დაკავშირებული არიან G-ცილებთან, რომლებიც უზრუნველყოფენ ამ რეცეპტორების გააქტივების ეფექტების რეალიზებას. თვითონ რეცეპტორები 2 სუბერთეულისაგან შედგებიან, რომელთაგან ერთი იკავშირებს გლუტამატს (Kunishima et al., 2000). გლუტამატის მეტაბოტროპული რეცეპტორები იყოფიან 3 ჯგუფად: mGluRI, mGluRII და mGluRIII. თუმცა აღმოჩენილია 8 სხვადასხვა გენი, რომლებიც მათ კოდირებას ახდენენ (Pin et al., 1995). იმის გათვალისწინებით, რომ მეტაბოტროპულ გლუტამატურ რეცეპტორებს აქვთ უნარი, პოსტსინაპსური უჯრედების აქტივაციის როგორც მომატების, ასევე შემცირების, აქედან გამომდინარე, შეიძლება ითქვას, რომ აღნიშნული ტიპის რეცეპტორები მონაწილეობენ ფართო სპექტრის ფიზიოლოგიურ რეაქციებში (Lesage and Steckler, 2010).

1



სურ.4. NMDA და mGluR-ის სტრუქტურული სქემა.

პირველი მეტაბოტროპული გლუტამატის რეცეპტორი mGluR1a აღმოჩენილ იქნა 1991 წელს (Houamed K. et al., 1991). ამავე ავტორების მიერ ნანახი იქნა, რომ mGluR1a შესაძლოა დაუკავშირდეს ფოსფოლიპაზა C-ს და სხვა სასიგნალო ცილებს G-ცილის მეშვეობით. გლუტამატის მეტაბოტროპული რეცეპტორების მრავალფეროვნება მიიღება ალტერნატიული სპლაისინგის შედეგად. ეს იზოფორმები ძირითადად განსხვავდებიან ცილის G-ბოლოს სიგრძით. გლუტამატის მეტაბოტროპული რეცეპტორები ააქტივებენ შიდაუჯრედულ მეტაბოლიზმს, მნიშვნელოვან როლს

თამაშობენ ტვინის იშემიის დროს NMDA რეცეპტორების გააქტივებით გამოწვეული შიდაუჯრედული კალციუმის დონის რეგულაციაში და უჯრედის ცხოველქმედებაში გრძელვადიანი ცვლილებების ინდუცირებით მოდულატორულ ფუნქციას ასრულებენ (Winder D.G., 1993).

mGluR1 და mGluR2 მეტაბოტროპული რეცეპტორები მიეკუთვნებიან 7 ტრანსმემბრანული დომენის მქონე რეცეპტორთა რეცეპტორთა ოჯახს. I ჯგუფის მეტაბოტროპული რეცეპტორები შეუღლებულები არიან ფოსფოლიპაზა C-სთან და უჯრედშიდა კალციუმის სიგნალიზაციასთან;

II და III ჯგუფის მეტაბოტროპული რეცეპტორები კი შეუღლებულნი არიან ადენილატციკლასთან. მეტაბოტროპული რეცეპტორები mGlu1a სინაფსური რეცეპტორები არიან შეუღლებულნი არიან ადენილატფოსფოლიპაზა დომენის მქონე რეცეპტორთა ოჯახთან.

II (mGluR3) და III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 და mGluR8) ჯგუფის მეტაბოტროპული რეცეპტორები პრესინაფსებზე არიან განლაგებულნი.

როგორც ავღნიშნეთ, გლუტამატური რეცეპტორები ძირითადად გვხვდება ნერვულ უჯრედებზე და უმთავრესი როლი როლი აქვთ ცენტრალური ნერვული სისტემით განპირობებულ ფიზიოლოგიურ რეაქციებში. ასევე აღსანიშნავია მათი როლი ცოცხალი ორგანიზმის იმუნურ რეაქციებში, რომლებიც თავის მხრივ განპირობებულია იმუნური სისტემის შემადგენელი სხვადასხვა ტიპის უჯრედებით, მათ შორის ცენტრალური როლი აქვს T ლიმფოციტებს. T ლიმფოციტები უჯრედის ზედაპირზე აექსპრესირებენ სხვადასხვა ტიპის გლუტამატურ რეცეპტორებს, რომლებიც აკონტროლებენ იმუნურ პასუხს, იმუნური უჯრედების მომწიფებას, აქტივაციას და სიკვდილს. (Lombardi et al., 2001; Ganor et al., 2003; Boldyrev et al., 2004; Miglio et al., 2005; Chiocchetti et al., 2006; Kvaratskhelia et al., 2009). ზემოთ აღნიშნული გენეტიკური დარღვევის შედეგად, T ლიმფოციტების ზედაპირზე ექსპრესირდება დეფექტურ ტრანსმემბრანულ ცილა, რის შედეგადაც ირღვევა cAMP მექანიზმით გაშუალებული ქლორის იონების ტრანსპორტი. აღსანიშნავია, რომ შესაძლოა გლუტამატის ჭარბი რაოდენობა იწვევდეს

ლიმფოციტების ფუნქციის დაქვეითებას, რაც თავის მხრივ იწვევს მეორად იმუნოდეფიციტურ მდგომარეობას (Eck et al., 1989). გლუტამატის ეს ეფექტი როგორც ავლნიშნეთ, გაშუალებულია მეტაბოტროპული გლუტამატური რეცეპტორის საშუალებით, (Droge et al., 1988). აქვე უნდა აღინიშნოს ის ფაქტიც, რომ გლუტამატი ცვლის ვოლტაჟ-დამოკიდებულ კალიუმის არხის მუშაობას და ასუსტებს T ლიმფოციტების პროლიფერაციას (Poulopoulou et al., 2005). ამასთანავე, NMDA რეცეპტორის აქტივაცია აძლიერებს შიდაუჯრედული კალციუმის და ჟანგბადის რეაქტიული ფორმების წარმოქმნას (Miglio et al., 2005; Boldyrev et al., 2005) და ასევე ცვლის ორივე, პრო და ანტიანთებითი ციტოკინების IL- 8 და IL- 10 სეკრეციას (Kvaratskhelia et al., 2009). ამ მონაცემების შედეგად, შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ ლიმფოციტები თავის ზედაპირზე აქსპრესირებენ რამდენიმე ტიპის გლუტამატურ რეცეპტორს, რომელთა მოდულაცია შეიძლება წამყვანი როლი გახდეს ნეიროანთებითი დაავადებების მკურნალობაში.

3.3 გლუტამატის როლი პათოლოგიურ პროცესებში. კისტური ფიბროზი

(მუკოვინციდოზი)

სასუნთქი სისტემის სხვადასხვა ტიპის ანთებითი პროცესების შედეგად, ფილტვებიდან გამოთავისუფლდება დიდი რაოდენობით ენდოგენური გლუტამატი (Dickman et al., 2004; Wang et al., 2009). ამ შემთხვევაში, როცა დაზიანებული ნეიტროფილები იწვევენ გლუტამატის გამონათავისუფლებას მაღალი კონცენტრაციით (millimolar) (Collard et al., 2002), ეს შეიძლება გახდეს ანთებითი პროცესების დროს მომატებული ნეიტროფილების გავლენის შედეგად, ლიმფოციტების გააქტიურების მიზეზი. ასევე დამატებით, მომწიფების პროცესში მყოფი დენდრიტული უჯრედები (DC) ათავისუფლებენ გლუტამატს ფიზიოლოგიური ნორმის ფარგლებში, რომელიც სავსებით საკმარისია გლუტამატური რეცეპტორების აქტივაციისთვის (Pacheco et al., 2006). დენდრიტული უჯრედების მიერ გამონათავისუფლებული გლუტამატი, ანტიგენის პრეზენტირების შემდგომ, სტიმულირებს მეტაბოტროპული გლუტამატური რეცეპტორის 1 სუბტიპის ექსპრესიას და აძლიერებს T უჯრედების პროლიფერაციას, Th1 და პროანთებითი ციტოკინების სეკრეციას. მიუხედავად იმ მოსაზრებისა, რომ mGluR1 შესაძლოა თამაშობდეს მნიშვნელოვან როლს ლიმფოციტების რეგულაციაში ფილტვების

სხვადასხვა ანთებითი დაავადებების დროს, ჩვენ შევისწავლეთ, დაავადებული პაციენტებიდან მიღებულ ლიმფოციტებში mGluR1 დონე და როგორც მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა, ამ ლიმფოციტების პლაზმურ მემბრანაში mGluR1a/b ექსპრესია მნიშვნელოვნად შემცირებულია ფილტვის სხვადასხვა ანთებითი დაავადებების პირობებში. ამას გარდა, ჩვენ დავადგინეთ, რომ ამ პაციენტების ლიმფოციტებს არ აქვთ IL-10-ის სეკრეციის უნარი შესაბამისი რაოდენობით, გლუტამატის მაღალი კონცენტრაციის და IL-2 საპასუხოდ. მიღებული შედეგებიდან დავასკვნით, რომ გლუტამატის მიმართ შემცირებული სენსიტიურობა, შესაძლოა იყოს შედეგი პაციენტების პლაზმურ მემბრანაში mGluR1a/b კომპლექსის შემცირებული ექსპრესიისა, რომელიც თავის მხრივ იწვევს IL-10-ის შემცირებულ სეკრეციას.

კისტური ფიბროზი, იგივე მუკოვისციდოზი (CF), მიეკუთვნება აუტოსომურ - რეცესიული ტიპის მემკვიდრულ დარღვევას, რომელიც წარმოადგენს მონოგენურ დაავადებას და განპირობებულია 7 ქრომოსომაში ლოკალიზებული, ერთ-ერთ გენის მუტაციური ცვლილებით. აღნიშნული გენის მიერ სინთეზირებული ცილა წარმოადგენს ქლორის იონების სატრანსპორტო არხს. აღნიშნულ გენში მომხდარი მუტაციური ცვლილების გამო სინთეზირდება ასევე შეცვლილი ცილა, რომელიც ვეღარ ასრულებს შესაბამის ფუნქციას და ადგილი აქვს ქლორის იონების ტრანსპორტის დარღვევას (Riordan et al., 1989; Guggino and Banks-Schlegel, 2004). აღნიშნული გენეტიკური დარღვევა წარმოადგენს სისტემურ, მულტიორგანულ დაავადებას და ხასიათდება მაღალი ლეტალურობით, განსაკუთრებით ადრეულ ასაკში. თუმცა, აღსანიშნავია, რომ დაავადებულ პირებში სიკვდილიანობის ძირითად მიზეზს წარმოადგენს მომატებული ანთებითი პროცესების შედეგად გამოწვეული სასუნთქი გზების ქრონიკული ინფექცია - (Sheppard and Welsh, 1999; Pamela and Davis, 2006) ; ასევე დამახასიათებელია ნეიტროფილების, ლიმფოციტების და მათი პროდუქტების, განსაკუთრებით ისეთი პროანთებითი ციტოკინების მატება, როგორიცაა ინტერლეიკინი -8 (IL-8); შესაბამისად, დაქვეითებულია ანტიანთებითი ციტოკინების ექსპრესია, როგორიცაა ინტერლეიკინი -10 (IL-10); ეს ფენომენი მიგვანიშნებს, რომ IL-10 -ს აქვს წამყვანი ფუნქცია მუტირებული ტრანსმემბრანული არხის ექსპრესიაში. (Moss et al., 2000; Hubeau et al., 2001; Soltys et al., 2002; Lyczak et al., 2002).

აღნიშნული მონაცემები ადასტურებს მოსაზრებას, რომ პრო და ანტი-ანთებითი ციტოკინების დისრეგულაცია და ნეიტროფილების მომატებით განპირობებული ანთებითი პროცესები ძირითად როლს თამაშობს ფილტვის ფუნქციის, და შესაბამისად კისტური ფიბროზის მქონე პაციენტების ლეტალური გამოსავლიანობის პროცესში (Lyczak et al., 2002).

არსებობს სხვადასხვა მოსაზრება იმის შესახებ, რომ მუკოვისციდოზის მატარებელ პაციენტებში მნიშვნელოვნად მომატებულია IL - 8 სეკრეცია (Muhlebach and Noah, 2002) და საპირისპიროდ, შემცირებულია IL -10 (Chmiel et al., 2002) პროდუქცია. შედეგად, სახეზეა დისბალანსი ამ ორი, მნიშვნელოვანი ციტოკინის წარმოქმნას შორის, რაც იწვევს აღნიშნული გენეტიკური დარღვევის მქონე პაციენტებში სასუნთქი გზების ქრონიკულ ინფექციას, რის გართულებასაც საბოლოოდ წარმადგენს ფილტვებში მიმდინარე ანთებითი პროცესები. ასეთ პაციენტებში დიდი რაოდენობით გამომუშავებული გლუტამატის (Said, 1999; Dickman et al., 2004) ერთ-ერთი წყარო შეიძლება იყოს დაზიანებული ნეიტროფილები (Wang et al., 2009; Collard et al., 2002).

თავი 4. კისტური ფიბროზი

4.1. კისტური ფიბროზი

კისტური ფიბროზი (კფ) ერთ-ერთი გავრცელებული გენეტიკური, აუტოსომურ-რეცესიული ლეტალური დაავადებაა, რომელიც ხასიათდება ეკზოკრინული ჯირკვლების სისტემური დაზიანებებით. იგი ერთ-ერთი ყველაზე მეტად გავრცელებული გენეტიკური დაავადებაა. პლანეტის ყოველი მე-20 მცხოვრები დეფექტური გენის მატარებელია. იგი უფრო ხშირად ბავშვობაში ვლინდება, 4% იანი სიხშირით დიაგნოზირება ხდება მოზრდილობის ასაკში. კფ წარმოადგენს მულტიგენური დაავადების კლასიკურ მაგალითს. კფ გვხვდება საშუალოდ 2000-3000 ახალშობილიდან 1-ში, დაავადების გავრცელება მკვეთრად განსხვავდება სხვადასხვა ეთნიკურ ჯგუფებში. ევროპაში მის (delF508) გავრცელებაში შენიშნულია გარკვეული გრადიენტი ჩრილოეთიდან სამხრეთისაკენ და დასავლეთიდან აღმოსავლეთისაკენ: დანიაში აღწევს 85%-ს, 50%-მდე მცირდება იტალიაში და 20-30%-მდე ეცემა თურქეთში. შავ აფრიკულ და იაპონელ

მოსახლეობაში მისი სიხშირე შეადგენს 1:100 000. ჩრდილო ამერიკის თეთრ მოსახლეობას და ჩრდილოეთ ევროპის მოსახლეობას შორის მისი გავრცელების სიხშირეა 1:3000, ამერიკელ ზანგებში 1:17000, ჰავაის მოსახლეობაში 1:90 000. თუ კი ორივე მშობელი დეფექტური გენის მატარებელია, დაავადებული ბავშვის დაბადება 25%-ით არის მოსალოდნელი.

კისტურ ფიბროზს მუკოვისციდოზსაც უწოდებენ, რაც ლათინური სიტყვებიდან mucus (ლორწო) და viscidus (ბლანტი, წებვადი) წარმოდგება. სახელწოდება მიგვანიშნებს, რომ სხვადასხვა ორგანოებიდან გამოყოფილი სეკრეტები (ლორწო) ძალიან ბლანტი და წებვადები არიან. ამის შედეგად ზიანდებიან ორგანოები, მაგალითად : ბრონქიალური სისტემა, ფილტვები, კუჭქვეშა ჯირკვალი, ღვიძლი, ნაწლავის ჯირკვლები, ოფლისა და ნერწყვის ჯირკვლები, სასქესო ჯირკვლები. ფილტვებში ბლანტი სისველის დაგროვების გამო, ანთებითი პროცესები ვითარდება. ირღვევა ფილტვების ვენტილაცია და სისხლის მიმოქცევა. ინდივიდს ეწყება მტანჯველი ხველება - რაც ამ დაავადების ერთ-ერთი მუდმივი სიმპტომია. ფილტვები ადვილად ინფიცირდება, ხშირად სტაფილოკოკით ან *Pseudomonas aeruginosa*-თი. ავადმყოფებს უვითარდება განმეორებადი ბრონხიტები და პნევმონიები, ზოგჯერ სიცოცხლის პირველივე თვეებიდანვე. ინფექცია კიდევ უფრო ზრდის სიბლანტესა და სისველეს. ასეთი მდგომარეობა საკმაოდ საშიშია სიცოცხლისათვის. სწორედ სუნთქვითი უკმარისობით იღუპება ავადმყოფთა უმეტესობა. კისტური ფიბროზიანი პაციენტებისათვის დამახასიათებელია კუჭქვეშა ჯირკვლის ფერმენტების უკმარისობა და მათ ორგანიზმში საჭმელი ცუდად გადამუშავდება. ამიტომ ასეთი ბავშვები, მიუხედავად გაძლიერებული მადისა, წონაში ჩამორჩებიან. ნაღვლის შეკავების გამო, ზოგ ბავშვს უვითარდება ღვიძლის ციროზი, ქვები ნაღვლის ბუშტში. ამ დაავადების მქონე ადამიანების ფილტვები მხოლოდ 25%-ით მუშაობენ. მას შემდეგ, რაც ავადმყოფების სამკურნალოდ იყენებენ ანტიბიოტიკებსა და ფერმენტულ პრეპარატებს, ავადმყოფთა სიცოცხლის ხანგრძლივობა გაიზარდა. ახლა მათგან თითქმის 34% აღწევს მოზრდილობის ასაკს და დაახლოებით 10% ცხოვრობს 30 წელზე მეტ ხანს. სიცოცხლის ხანგრძლივობა საშუალოდ 28 წელს აღწევს. ასე, რომ კვ უკვე აღარ ითვლება ბავშვთა დაავადებად. კვ ვლინდება ქრონიკული ფილტვების იქფექციებით, რომლებიც საბოლოოდ

იწვევენ ბრონქოექტაზებს, კუჭქვეშა ჯირკვლის ეკზოგენური ფუნქციის უკმარისობას, სასქესო ჯირკვლების, თირკმელების, საჭმლის მომნელებელი სისტემის ფუნქციების მოშლას, ასევე უშვილობას.

მუტაციის შედეგად, ფილტვის ეპითელიუმი კისტური ფიბროზის ტრანსმემბრანული გამტარებლობის რეგულატორი ცილის - CFTR -ის დეფექტურ ფორმას შეიცავს. ამას მოსდევს ქრონიკული ინფექციები, ანთებები და თანდათანობით სუნთქვის აპარატი ინგრევა. ეს შედეგები შესაძლოა აღმოფხვრილ იქნას, თუ ფილტვების ეპითელურ უჯრედებში ქლორის არხის ფუნქციები აღდგენილ იქნება. ამ შემთხვევაში, რეტროვირუსული ვექტორები არაეფექტურებია, რამდენადაც ისინი აინფიცირებენ ფილტვის ეპითელიუმს. ძირითად მნიშვნელობას აქცევენ *in vivo* სტრატეგიას და ცდილობენ 2 გზით იმოქმედონ: პირველ რიგში, გამოიყენონ რეპლიკაცია დეფექტური ადენოვირუსები, და მეორეს მხრივ, ლიპოსომები. ასეთი ტიპის ექსპერიმენტები ჩატარებულია CFTR -გენით ნოკაუტირებულ თაგვებზე. ადამიანებზე ექსპერიმენტები ჩატარებულია ცხვირის ხვრელის ეპითელიუმზე. ნანახი იქნა დაავადებული ეპითელიუმის თვისებების მიახლოება ნორმალურთან. ამ ტიპის ექსპერიმენტები იძლევა ახალ შესაძლებლობას CFTR -ის გენის მაჟორული მუტაციების წარმოშობისა და გავრცელების ძირითადი მექანიზმების კვლევისათვის.

კისტური ფიბროზის რამოდენიმე ფორმა არსებობს: ფილტვების ფორმა, ნაწლავური ფორმა, მაგრამ ყველაზე მეტად გვხვდება შერეული ფორმა, როცა ერთდროულად დაზიანებულია კუჭ-ნაწლავის ტრაქტი და სუნთქვის ორგანოები.

კისტური ფიბროზით დაავადებულები ავადმყოფობის გამავრცელებლები არ არიან. ისინი გონებრივად სავსებით სრულფასოვნები არიან. ასეთ ბავშვებს შორის ბევრია ნიჭით დაჯილდოებული და ინტელექტუალურად საკმაოდ განვითარებული. მათ განსაკუთრებით კარგად გამოსდით ის საქმეები, რომლებიც ითხოვენ სიმშვიდესა და გონების კონცენტრირებას - სწავლობენ უცხო ენებს, ბევრს წერენ და კითხულობენ, დაკავებული არიან შემოქმედებით: მათგან შესანიშნავი მუსიკოსები და მხატვრები დგებიან. დაავადებულებს ოჯახის შექმნა შეუძლიათ. თუ

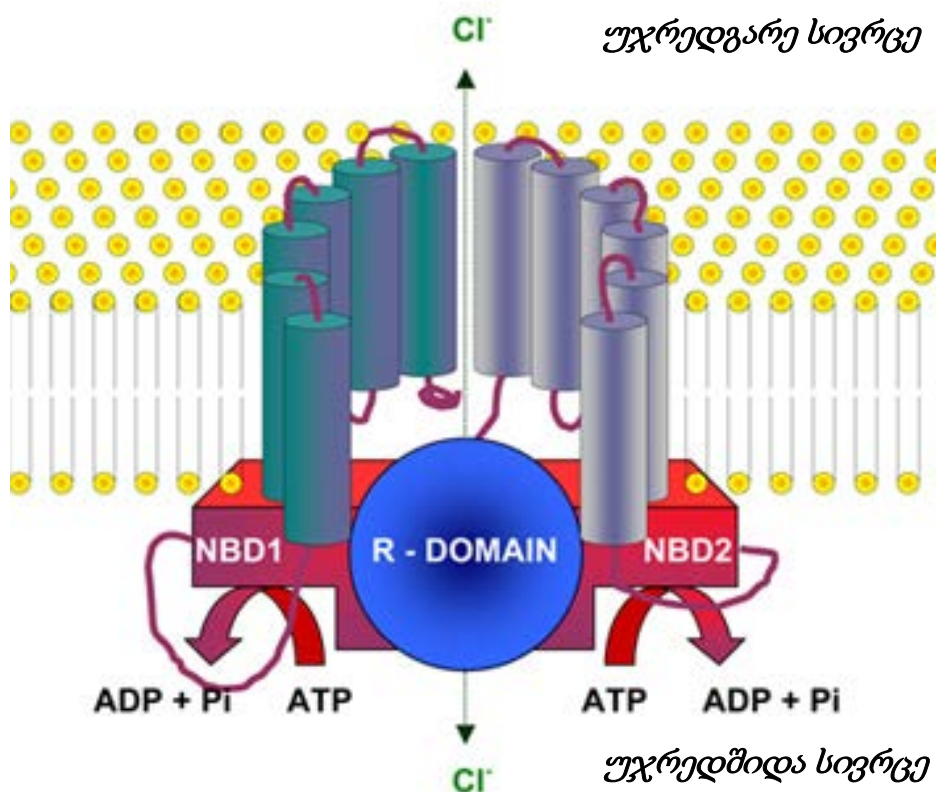
კი მეუღლე დეფექტური გენის მატარებელი არ არის, ასეთ წყვილებს ჯანმრთელი ბავშვები უჩნდებათ.

4.2. კისტური ფიბროზის ტრანსმემბრანული გამტარებლობის რეგულატორული ცილა

კისტური ფიბროზის ტრანსმემბრანული გამტარებლობის რეგულატორი ცილა (CFTR) არის 1480 ამინომჟავური ნაშთისაგან შემდგარი მემბრანასთან დაკავშირებული გლიკოპროტეინი, მისი მოლეკულური წონაა 170,000. იგი წარმოადგენს ატფ დამაკავშირებელი კასეტის (ABC – *ATP-binding cassette*) სუპეროჯახის წევრს. ცილა შედგება მემბრანის 6-ჯერ გამჭოლი 2 რეგიონისაგან, რომელთაგან თითოეული უკავშირდება ნუკლეოტიდის დამაკავშირებელ დომენს (NBD1, NBD2), ეს უკანასკნელი კი ატფ-ს იკავშირებს. ამ ორ რეგიონს შორის მოთავსებულია R დომენი, რომელიც შედგება მრავალი დამუხტული ამინომჟავური ნაშთისაგან (სურ.1).

კისტური ფიბროზის ტრანსმემბრანული გამტარებლობის რეგულატორი ცილის გენი იდენტიფიცირებულ და კლონირებულ იქნა 1989 წელს (Kerem B. Et al., 1989; Riordan et al., 1989). გენი მოთავსებულია მე-7 ქრომოსომის გრძელ მხარზე, 188,702 ფუძეს მოიცავს (პოზიცია 117,119,358-117,309,719). შედგება 27 ეგზონისაგან და მომწიფებული ტრანსკრიპტი კი - 6129 ნუკლეოტიდისაგან. CFTR -ის გენის ტრანსკრიფცია იწვევს პირველადი პროდუქტის - მრნმ-ის წარმოქმნას, რომელიც 6129 ნუკლეოტიდისაგან შედგება.

ცილოვანი პროდუქტი შეიცავს 1480 ამინომჟავურ ნაშთს. ცილა, როგორც ცამფ-ით რეგულირებადი ქლორის არხი, დამატებით ბევრ მნიშვნელოვან ფუნქციას ფლობს - არეგულირებს ქლორის სხვა და ნატრიუმის არხებს, მონაწილეობს წყლისა და ატფ-ის გატარებაში, წარმოადგენს ატფ-ის შიდაუჯრედული დონის სენსორს და ენდოპლაზმური ვეზიკულების ტრანსპორტის მედიატორს (Reddy M. et al., 1996). ამის



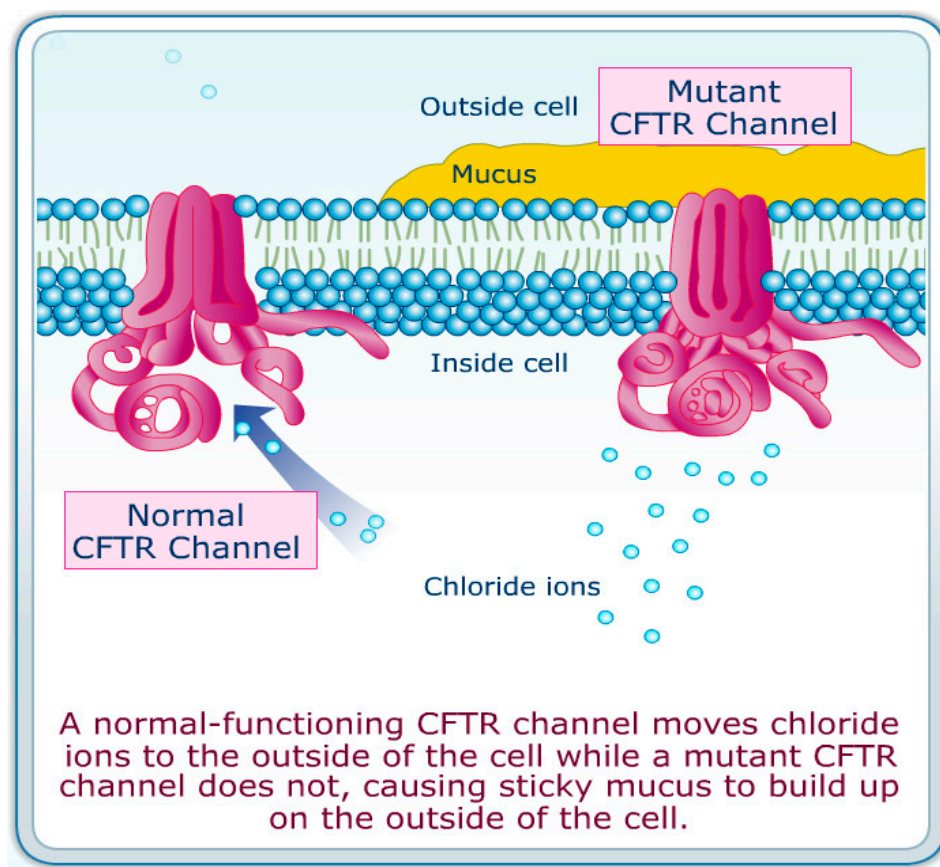
სურ. 5. კისტური ფიბროზის ტრანსმემბრანული გამტარობის რეგულატორული ცილის სამგანზომილებიანი გამოსახულება.

გამო, ამ ცილის სტრუქტურაში ნებისმიერი სახის ცვლილება, რომელიც გამოწვეულია მუტაციებით, იწვევს ელექტრონთა ტრანსპორტის რეგულაციის დარღვევას ეპითელურ უჯრედებში. CFTR -ის გენის ექსპრესიის შემცირებას 95%-ით მივყავართ კისტურ ფიბროზამდე, რომლითაც 1:2500 ახალშობილია დაავადებული ევროპულ პოპულაციებში.

4.3 CFTR -ის მუტაციები

დღეისათვის CFTR -ის თანამიმდევრობაში დაახლოებით 1700-მდე მუტაციაა აღრიცხული. მსოფლიოში ყველაზე ხშირად გავრცელებული მუტაციაა 508-ე პოზიციაში არსებული ფენილალანინის მაკოდირებელი სამი ნუკლეოტიდის დელეცია, მას უწოდებენ **p.Phe508del** -ს. ეს მუტაცია ცილას ენდოპლაზმურ ბადეში სწორად ჩაკეცვის უნარს უკარგავს. ამით იზრდება ენდოპლაზმური პროცესინგის შედეგად ცილის დეგრადაციის ხარისხი. p.Phe508del-CFTR-cDNA-ს ექსპრესია

აჩვენებს, რომ ეს მუტანტური ცილა იბავს არა კომპლექსურ ოლიგოსაქარიდულ ჯაჭვს, არამედ მის მხოლოდ ცენტრალურ ნაწილს. და ამის გამო, ვეღარ ახერხებს უჯრედის ზედაპირისაკენ ტრანსპორტირებას, რაც ჩვეულებრივ დამახასიათებელია არამუტანტური ცილისათვის. სხვა დამაზიანებელ ეფექტებთან ერთად, p.Phe508del ასუსტებს CFTR -ის სწორ ჩაკეცვას და ასევე კონფორმაციულად ნიღბავს სამი ნაშთის დიაციდურ გამოშვებრილ (გამოგრძელებულ) "კუდს", რომელიც აუცილებელია ენდოპლაზმური ბადიდან ექსპორტისათვის. აღნიშნული მუტაციის სიხშირე განსხვავებულია სხვადასხვა პოპულაციებში და იგი მცირდება ევროპის ჩრდილო-დასავლეთიდან სამხრეთ აღმოსავლეთის მიმართულებით.



სურ.6. ნორმალური და მუტირებული CFTR

4.3.1. CFTR მუტაციების კლასები

CFTR გენის მუტაციები შესაძლოა 6 კლასად დაიყოს, რაც დაფუძნებულია მათ მოლეკულურ მექანიზმებსა და **CFTR**-ის ბიოგენეზის, მეტაბოლიზმისა და ფუნქციის განსხვავებული ასპექტების შედეგებზე.

I კლასი: აქ განიხილავენ იმ მუტაციებს, რომლებიც შეეხება ცილის სინთეზს. ისინი იწვევენ მრნმ-ში "სტოპ კოდონის" დროზე ადრე წარდგენას. გადაჭრილი, ან ჩამოჭრილი ცილები არასტაბილურები და სწრაფად დეგრადირებადი არიან. საბოლოო შედეგია: არანაირი ცილა აპიკალურ მემბრანაზე. ასეთი ტიპის მუტაციებს მიეკუთვნება: p.Gly542X, c.489+1G>T (621+1G>T), c.579+1G>T (711+1G>T).

II კლასი: აქ განიხილავენ მუტაციებს, რომლებიც გავლენას ახდენენ ცილის მომწიფებაზე, ფორმირებაზე. შედეგად წარმოიქმნება ცილები, რომლებიც სწორად ვერ იკეცება და ამის გამო ვერ გადაადგილდებიან მათი ფუნქციონირების საიტამდე აპიკალურ მემბრანაზე. ასეთი ტიპის მუტაციებს მიეკუთვნება: p.Phe508del, p.Ile507del, p.Asn1303Lys.

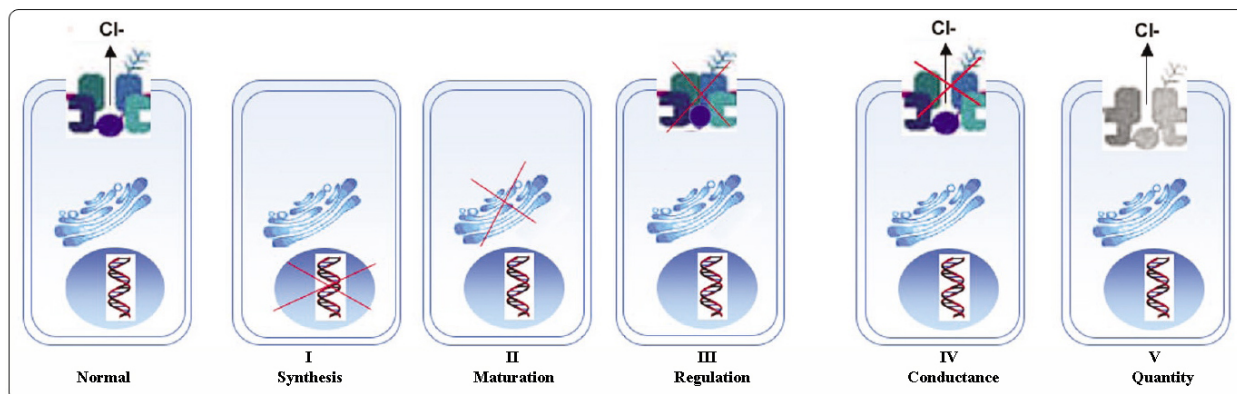
III კლასი: აქ განიხილავენ იმ მუტაციებს, რომლებიც გავლენას ახდენენ არხის რეგულაციაზე. მუტირებული ცილა სწორად იკეცება და გადაადგილდება დანიშნულების ადგილამდე, ლოკალიზდება პლაზმურ მემბრანაში, მაგრამ ვერ აქტიურდება, ანუ ვერ ფუნქციონირებს როგორც ქლორის არხი. ასეთი ტიპის მუტაციებს მიეკუთვნება: NBD დომენში ლოკალიზებული "უაზრო" თანამიმდევრობები, p.Gly551Asp.

IV კლასი: აქ განიხილავენ იმ მუტაციებს, რომლებიც გავლენას ახდენენ ქლორის იონის გამტარებლობაზე. ცილა სწორად გადაადგილდება უჯრედის მემბრანისაკენ, მაგრამ წარმოქმნის შემცირებულ Cl-ის ნაკადს. ასეთი ტიპის მუტაციებს მიეკუთვნება: მემბრანის გამჭოლ დომენებში ლოკალიზებული "უაზრო" თანამიმდევრობები, p.Arg117His, p.Arg334Trp.

V კლასი: აქ განიხილავენ იმ მუტაციებს, რომელთა შედეგად აპიკალურ მემბრანაზე მცირდება ნორმალურად ფუნქციონირებადი CFTR ცილის დონე. ასეთი ტიპის მუტაციებს მიეკუთვნება: ნაწილობრივ არასწორი სპლაისინგი ან "უაზრო" თანამიმდევრობების უსარგებლო ტრანსპორტი, c.1210-12T[5] (5T allele, c.3140-26A>G (3272-26A>G), c.3850-2477C>T (3849+10kbC>T).

V I კლასი: აქ განიხილავენ იმ მუტაციებს, რომელთა შედეგად მცირდება CFTR -ის სტაბილურობა, ასევე გავლენას ახდენენ სხვა არხების რეგულაციაზეც. მუხედავად

იმისა, რომ ასეთი მუტაციები მცირე რაოდენობის პაციენტებშია აღრიცხული და გამოკვლეული, მე-6 კლასის მუტაციების უმეტესობა მიეკუთვნება მწვავე ფორმას.



სურ.7. CFTR მუტაციების კლასები

მუტაციები, რომლებიც მიეკუთვნება I-III და VI კლასებს, იძლევიან არაფუნქციურ CFTR -ს აპიკალურ მემბრანაზე, და მიეკუთვნებიან მწვავე ფორმას. ისინი, ჩვეულებრივ, იწვევენ კლასიკურ კვ ფენოტიპს პანკრეასული უკმარისობით (CF-PI; pancreatic insufficiency), რომელიც მაინც ნარჩუნდება თუდაც ფილტვების დაავადების სიმწვავე შეიცვალოს უკეთესობისაკენ. IV და V კლასის მუტაციები ინარჩუნებენ CFTR-ის გარკვეულ აქტიობას და მიეკუთვნებიან უფრო მშვიდ ფენოტიპს. პაციენტებში, რომლებსაც სულ მცირე ერთი "მშვიდი" კვ ალელი აქვთ, CFTR -ის ფუნქცია საკმარისია საჭმლის მონელების ნორმალური წარმართვისათვის და ასევე, ფილტვის დაავადებაც ნაკლებ მწვავეა. ინდივიდებში, რომლებშიც *CFTR* mRNA -ის მხოლოდ 10%-ია მუტირებული, წარმოდგენილია მხოლოდ ერთი სიმპტომი, როგორიცაა მამრებში CBAVD (congenital bilateral absence of vas deferens, გამომტანი სისხლძარღვების თანდაყოლილი ბილატერალური უქონლობა). *CFTR* მუტაციის მქონე ჰეტეროზიგოტები შესაძლოა გაზრდილი რისკის ქვეშ მოექცნენ ისეთი "*CFTR*-თან დაკავშირებული დაავადებების" (*CFTR*-RD) მხრივ, როგორიცაა პანკრეატიტი, სინუსიტი, ან ალერგიული ბრონქოპულმონარული ასპერგილოზები. ამ შემთხვევებში, *CFTR* მუტაციები შესაძლოა იყვნენ გენეტიკური მიდრეკილების

ფაქტორები, ხოლო გენეტიკური ან გარემოს ცვლილებები შესაძლოა თამაშობდნენ დამატებითი ეფექტების როლს.

მუტაციების სხვადასხვა კლასებში დაჯგუფება მოსახერხებელია დისფუნქციის მექანიზმების გასაგებად. მაგრამ ამის მიუხედავად, თანამიმდევრობის მრავალი ცვლილება არის იშვიათი და უნიკალური და შესაძლოა მონაცემები არ იძლევიან მათი პათოგენურობის შეფასების საშუალებას. გარდა ამისა, ერთ მუტაციას შეუძლია გამოიწვიოს ერთზე მეტი გადახრა, ან შეუძლია შეცვლილი ფენოტიპის მოცემა.

4.4. Na^+/H^+ მიმოცვლის მარეგულირებელ ფაქტორთა ოჯახი და PDZ დომენების შემცველი ცილები

Na^+/H^+ მიმოცვლის მარეგულირებელ ფაქტორი ერთ-ერთ მნიშვნელოვან ტრანსპორტულ ელემენტს წარმოადგენს უჯრედში, რომლის საშუალებითაც Na^+ და H^+ ანტიპორტი მიმდინარეობს. ეს ცილა მრავალ ადჰიზიურ კომპონენტს შეიცავს, რომელთა შორისაც მნიშვნელოვანია PDZ დომენი. აღნიშნული დომენის საშუალებით წარმოებს ცილა-ცილოვანი ურთიერთობის ფორმირება და მეზრანაზე მულტიპროტეინული კომპლექსების წარმოქმნა. PDZ დომენები ასევე შეიძლება დაუკავშირდეს შიდა თანამიმდევრობებს რომელიც წააგავს ამ C-ტერმინალურ ლიგანდს, მაგრამ აქვს B თითისებრი კონფიგურაცია. C-ტერმინალი და შიდა PDZ დომენების ლიგანდების დაკავშირება ხდება PDZ დომენის სწორხაზოვან ღარში შესვლით (Hung, Sheng, 2002).

4.5 ფილოგენეტიკა

ეპითელური უჯრედები შეიცავს მრავალ PDZ ცილას, რომელიც ლოკალიზებულია სპეციფიკურ შიდაუჯრედულ დომენებში, მათ შორის ნაწლავის ხაოებში, ბაზოლატერალურ მემბრანებში, მჭიდრო ნაპრალოვან კავშირებში, აგრეთვე ლოკალიზებულია გოლჯის აპარატში (CAL) და ენდოსომებში (Brone, Eggermont, 2005). PDZ დომენის შემცველი ცილების ერთ-ერთი გამოვლენილი და სესწავლილი კლასი არის NHERF ოჯახი.

NHERF ცილის ოჯახში არის ოთხი წევრი, რომელთაგან თითოეული შეიცავს ორ ან ოთხ PDZ დომენს (Custer et al. 1997), ესენია:

NHERF1, ასევე უწოდებენ NHERF ან EBP50.

NHERF2, ასევე უწოდებენ E3KARP, SIP-1 ან TKA -1;

NHERF3, ასევე უწოდებენ PDZK1, CLAMP, CAP70, DIPHOR-1 ან NaPi-CaP1;

NHERF4, ასევე უწოდებენ IKEPP, DIPHOR-2 ან NaPi-CaP2.

ამ ცილების ამინომჟავური შემადგენლობა მერყეობს 337 და 519-ის ფარგლებში. NHERF1 და NHERF2 ასევე შეიცავს C-ტერმინალურ დომენთან დაკავშირებულ ERM-ს (Ezrin, Radixin, Moesin), ხოლო NHERF3 და NHERF4 არ შეიცავენ მას. ფილოგენეტიკური ანალიზით ნანახია, რომ ყველა ძუძუმწოვრის NHERF ოჯახის წევრი ცილა არის ერთმანეთის ახლომონათესავე, სხვა უფრო მონათესავე ცილებთან ერთად ქმნიან კლასს nexin 27-ს. NHERF ოჯახის 12 PDZ დომენს ჩაუტარდა ანალიზი მათი ნათესავური კავშირის დასადგენად. იდენტურობის მიხედვით ($\geq 20\%$), ისინი დაყოფილია ოთხ ჯგუფად (A-D) (Donowitz et al., 2005). თითოეული ამ PDZ დომენის ევოლუცია შესწავლილი იყო ჭიებზე და მწერებზე. მიუხედავად იმისა, რომ ბაქტერიებს, მცენარეებს და საფუარს აქვს მკვეთრად განსხვავებული ცილები, რომლებიც შეიცავს წრიულ დამაკავშირებელ ჯიბეებს, რაც ცხადყოფს, რომ ისინი ჩართულნი არიან სხვადასხვა სახის ცილა-ცილოვან ურთიერთობებში, ისინი არ წარმოქმნილა ბაქტერიებში, მცენარეებსა და საფუარში. ჭიებს აქვთ ორი მონათესავე PDZ დომენის შემცველი ცილა, CO1F6.6 და 4J893. PDZ დომენი CO1F6.6 და უპირატესად PDZ დომენი 4J893 იდენტურია და ალბათ, წინამორბედი ადამიანის NHERF ოჯახის C ჯგუფის PDZ დომენებისა. მეორე PDZ დომენი 4J893, რომელიც მხოლოდ 5%-ით არის პირველის იდენტური, ყველაზე მსგავსია ადამიანის A და B ჯგუფის PDZ დომენებისა. ადამიანის D ჯგუფის NHERF ოჯახის PDZ დომენები არ ენათესავენ *C. Elegans* ცილების PDZ დომენებს. *D. melanogaster*-ს ასევე აქვს ორი NHERF ოჯახის მონათესავე ცილა, რომლებიც მხოლოდ ~10%-ით არის ერთმანეთის იდენტური. ესენია CG10939-PA, რომელიც ამჟღავნებს ყველაზე მეტ ჰომოლოგიურობას ადამიანის A ჯგუფის PDZ დომენების მიმართ, და CG32758-PA, რომელიც ყველაზე მსგავსია ადამიანის D ჯგუფის. ამგვარად, A ჯგუფის PDZ დომენებს როგორც ჩანს, ცალკე გენეტიკური საწყისი აქვთ ჭიიდან და მწერებისაგან განსხვავებით, მაშინ როცა ადამიანის NHERF ოჯახის დანარჩენი სამი PDZ დომენი

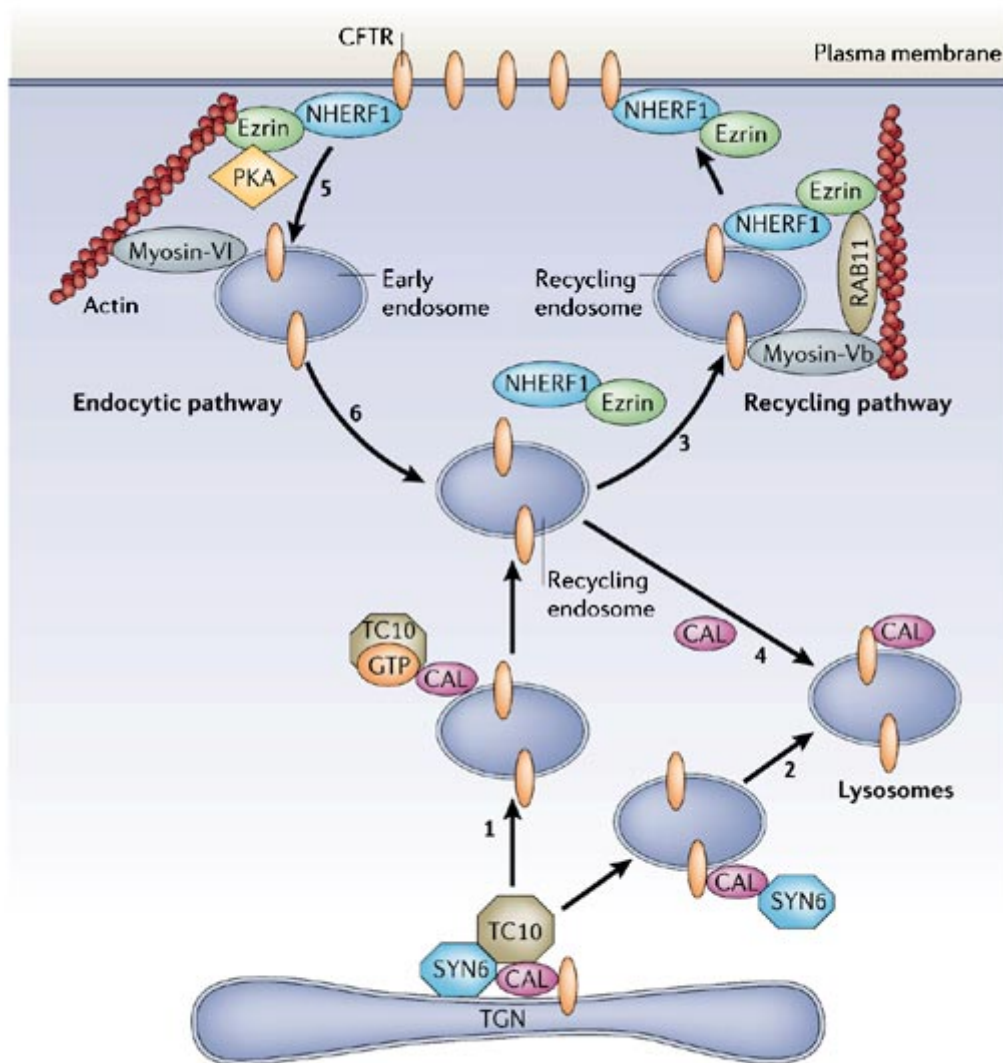
პოტენციურად წარმოშობილია მხოლოდ ჭიების, ან მწერების PDZ დომენის შემცველი გენიდან. საინტერესოა 22% იდენტობა ამინომჟავების შემადგენლობაში ჭიის მეორე 4J893 PDZ დომენს და ბუხის CC610939 PDZ დომენს შორის (Donowitz et al., 2005).

4.6 *NHERF* ცილების ლოკალიზაცია და მათთან დაკავშირებული უნიკალური პარტნიორები

ახლა ჩვენ დავუბრუნდეთ საკითხს, ნაწლავის ხაოების, ენტეროციტების ან თირკმლის პროქსიმალური მილაკების Na^+ მშთანთქმებელ პოლარიზებულ ეპითელურ უჯრედებში რატომ იმყოფება NHERF ოჯახის ოთხი მონათესავე და მაღალჰომოლოგიური PDZ პროტეინი. ნავარაუდებია, რომ მათ შეიძლება აქვთ სხვადასხვა ლოკალიზაცია და ასევე სხვადასხვა პარტნიორებს იკავშირებენ. ორივე ფაქტი შესაძლოა იმაზე მეტყველებდეს, რომ ისინი წარმოიშვა სხვადასხვა PDZ დომენებისგან ჭიებში, ან მწერებში.

ლოკალიზაციის იმუნოფლუორესცენტული კვლევები შესრულდა კონფოკალური მიკროსკოპის გამოყენებით, NHERF ოჯახის წევრებზე პოლარიზებულ Caco-2 უჯრედებში (ადამიანის მსხვილი ნაწლავის კიბოს Na^+ მშთანთქმებელი უჯრედების ხაზი), რომელიც შეიცავს NHE3-ს და თავის წვრილ ნაწლავში (თემოს ნაწლავი – წვრილი ნაწლავის ბოლო სეგმენტი). Caco-2 უჯრედებში, NHERF1 და NHERF3 (PDZK1) ჭარბი რაოდენობით არის წარმოდგენილი. NHERF2 იმყოფება ნაწლავის ხაოებში, მაგრამ ძირითადად ლოკალიზებულია მხოლოდ ხაოების ქვემოთ ნაწილში, მიკროხაოებს შორის არსებულ ღარის სივრცეებში. მას ახასიათებს გარკვეულწილად კოლოკალიზაცია NHE3-თან. NHERF4 (IKEPP) მინიმალურად არის ლოკალიზებული მიკროხაოებს შორის არსებულ ღარის სივრცეებში და პირველ რიგში, წარმოდგენილია ციტოზოლში (Donowitz et al., 2005). მსგავსი დაკვირვება გაკეთდა თავის წვრილ ნაწლავზე. NHERF1 და NHERF3 (PDZK1) არის უმეტესად მიკროხაოებს შორის არსებულ ღარის სივრცეებში. NHERF2 ასევე ლოკალიზდება მიკროხაოებს შორის არსებულ ღარის სივრცეებში და ამასთანავე, უმეტესად დიფუზირებულია ციტოზოლში. NHERF4 (IKEPP) მინიმალურად ან საერთოდ არ არის მიკროხაოებს შორის არსებულ ღარის სივრცეებში

ლოკალიზებული და ვრცელდება მთელ ციტოზოლში. NHERF2-ს აქვს N-უბანზე, დამაკავშირებელი წევრები, რომელიც არ უკავშირდება NHERF1-ს, რომელსაც უკავშირდება TAZ (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif), α -აქტინინი-4, ფოსფოლიპაზა CB₃, cGMP კინაზა I და II, DRA (ადენომის დაღმავალი რეგულატორი), podocalyxin, SRY-1 და SGK1. განსხვავებული ცილების NHERF ოჯახის წევრებთან ასოცირებულ უნიკალურ კომპლექსებად ორგანიზება შესაძლოა იყოს ერთ-ერთი რეზულტატი იმისა, რომ უჯრედის ერთიდაიგივე ნაწილში შესაძლოა იყოს NHERF ოჯახის მრავალი წევრი.



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

სურ.8. CFTR -თან ასოცირებული ცილების კომპლექსი

თავი 5. ენდოპლაზმური რეტიკულუმის სტრესი (ER სტრესი)

ენდოპლაზმურ ბადეზე ცილების გაძლიერებული ძვრადობა და დარღვეული პროცესინგი - ცნობილია, როგორც ენდოპლაზმური რეტიკულუმის სტრესი (ER). იგი წარმოადგენს ძირითად პათოლოგიურ რგოლს, რომელიც გადამწყვეტ როლს ასრულებს სხვადასხვა ნეიროდეგენერაციული დაავადებების განვითარებაში (Cuervo et al., 2010; Hol and Scheper, 2008; Kundu and Thompson, 2008).

ტერმინი - ენდოპლაზმური რეტიკულუმის (ER) სტრესი გულისხმობს არაფუნქციური ცილოვანი პეპტიდების ჩანაცვლებას ფუნქციური ცილოვანი ფრაქციებით. აღნიშნული პროცესის შედეგად, ხდება არაფუნქციური და/ან არასწორი კონფორმაციის მქონე ცილოვანი პეპტიდების ჩანაცვლება, რის შედეგადაც აცილებულია უჯრედზე „არასწორი“ ცილა-ცილოვანი ურთიერთქმედების ციტოტოქსიური გავლენა. „არასწორად“ ორიენტირებული მაკრომოლეკულები იშლებიან, და ამდენად, ცოცხალი უჯრედისთვის ესოდენ მნიშვნელოვან პროცესში ძირითად როლს ასრულებს უჯრედში მოქმედი პროტეოლიზური სისტემა, რაც თავისი ფუნქციიდან გამომდინარე მნიშვნელოვანია უჯრედული ჰომეოსტაზის შენარჩუნებაში. ამ ფაქტის გათვალისწინებით, პროტეოლიზური სისტემის ფუნქციის შესუსტება თავის მხრივ, მჭიდროდაა დაკავშირებული სხვადასხვა ნეიროდეგენერაციული დაავადებების განვითარებასთან (Garcia-Arencibia et al., 2010).

ცოცხალ უჯრედში არსებობს ორი ძირითადი მექანიზმი, რომელიც არეგულირებს ცილოვან კატაბოლიზმს: პირველი ეს არის - უბიქვიტინ - პროტეასომური გზა (UPP); და მეორე - აუტოსომურ-ლიზოსომური გზა (ALP) (Ciechanover et al., 2000; Vabulas, 2007, Kundu and Thompson, 2008). უბიქვიტინ - პროტეასომური გზა (UPP) - უზრუნველყოფს უჯრედში არსებული მქონე იმ ცილოვანი ფრაქციების ჩანაცვლება-მოშორებას, რომელთაც ახასიათებთ მცირე ნახევარდაშლის პერიოდი. კატაბოლიზმის ეს გზა უზრუნველყოფს მრავალი რეგულატორული ფუნქციის მქონე ცილების ხარისხობრივი კონტროლს. რაც შეეხება პროტეოლიზური სისტემის მეორე მექანიზმს, რომელიც წარმოადგენს აუტოსომურ-ლიზოსომური გზას (ALP) - საპირისპიროდ პირველი მექანიზმისა, პასუხისმგებელია, უჯრედში არსებული დიდი ნახევარდაშლის პერიოდის მქონე

ცილების კატაბოლიზმზე. თუმცა უნდა აღინიშნოს, რომ ორივე მექანიზმი შედეგის თვალსაზრისით ექვივალენტურია- ასევე საინტერესოა ისიც, რომ უბიქვითინ -პროტეასომური გზის (UPP) სამიზნე ცილოვანი პეპტიდები მკაცრად კონტროლირებადია უჯრედის შესაბამისი ენზიმებით, ხოლო ამ გზის საშუალებით, ცილების კატაბოლიზმი მოიცავს ორ საფეხურს: (i) შესაბამისი ფერმენტის მიერ ხდება უბიქვითინის გრძელი ჯაჭვის შემცველი ცილოვანი პეპტიდების კატაბოლიზირება, შედეგად, სუბსტრატის გამონთავისუფლება შესაბამისი პროტეასომისთვის (ii) პოლიუბიქვითინის ჯაჭვის შემცველი ცილის დეგრადაცია 26S პროტეასომით, რომელიც წარმოადგენს მულტიკატალიზური ფუნქციის მქონე ცილების კომპლექსს. ცილების პროტეოლიზის დროს უბიქვითინის ნაშთები ამოვარდება, ხდება რეციკლირება და სამიზნე ცილა დეგრადირდება მცირე ზომის პეპტიდურ მოლეკულებად, რომლებიც შემდგომ ჰიდროლიზდება სხვა უჯრედული პეპტიდაზების მიერ (Ciechanover et al., 2000).

აუტოფაგია (ALP) წარმოადგენს მრავალსაფეხუროვან პროცესს, რომელიც მოიცავს სპეციალური, ორმაგმემბრანოვანი სტრუქტურების - აუტოფაგოსომების წარმოქმნას. წარმოქმნილი აუტოფაგოსომები ჩვეულებრივ ერწყმის ლიზოსომურ ბუშტუკებს და წარმოიქმნება აუტოფაგოლიზოსომა, ხოლო ლიზოსომის შემცველი კომპონენტების დეგრადირება ხდება ჰიდროლიზური ფერმენტების საშუალებით. შემდეგ ეტაპზე ხორციელდება აღნიშნული ფერმენტების რეციკლირება უჯრედის მიერ, ახალი ცილების სინთეზისა და საჭირო ენერგიის უზრუნველყოფის მიზნით (kundu and Thompson, 2008). ისევე როგორც პირველი მექანიზმის შემთხვევაში, აუტოფაგიის დროსაც, ცილები, რომლებიც ტრანსპორტირდება აუტოფაგოსომების საშუალებით, არინ მონიშნულნი შესაბამისი სამიზნე ფერმენტების მიერ (Glick et al., 2010; Tan et al., 2008). თუმცა უნდა აღინიშნოს რომ, ცილების კატაბოლიზმის პროცესში ძირითად ეტაპად მაინც რჩება პოლიუბიქვითინიზაციის პროცესი. ამინომჟავა ლიზინის ნაშთი 48 -ე პოზიციაზე, დაკავშირებული უბიქვითინის ჯაჭვთან, წარმოადგენს ტიპურ სიგნალს ცილების დეგრადაციის პროცესში პირველი გზის (UPP) საშუალებით. მეორეს მხრივ, ცილები, რომლებიც შეიცავენ 63 -ე პოზიციაზე მყოფ ამინომჟავა ლიზინის ნაშთთან დაკავშირებულ პოლიუბიქვითინის ჯაჭვს, დეგრადირდება ALP გზის

საშუალებით (Tan et al., 2008). ამ უკანასკნელის საშუალებით ცილების ჰიდროლიზი შეიძლება შესუსტდეს შემდეგი ხუთი საფეხურიდან ერთ-ერთზე მომხდარი ცვლილების შედეგად. ეს ცვლილებები შეიძლება იყოს:

1. აუტოფაგოსომის მიერ ცილების შეცდომით მონიშვნა;
2. არაფუნქციური აუტოფაგოსომის ფორმირება;
3. აუტოფაგოსომის და ლიზოსომის არასწორი დაკავშირება;
4. ლიზოსომური ფერმენტების დეფიციტი და მოლეკულური შაპერონების დისფუნქცია
5. ლიზოსომური მემბრანის რეცეპტორული დისფუნქცია.

ჩამოთვლილთაგან რომელიმე, ერთ -ერთმა მიზეზმა შეიძლება გამოიწვიოს უჯრედისთვის არასასურველი ცილოვანი ფრაქციების აგრეგაცია და შესაბამისად, ციტოტოქსიურობის განვითარება, რაც შეიძლება უჯრედის სიკვდილის მიზეზი გახდეს (Glick et al., 2010; Tan et al., 2008). ცილების კატაბოლიზმის ზემოაღწერილი ორივე მექანიზმი ფუნქციურად მჭიდროდაა დაკავშირებული. უფრო მეტიც, არსებობს მონაცემები, რომ აუტოფაგიის აქტივაცია იწვევს ჰიდროლიზის პირველი გზის (UPP) ინჰიბირებას (Ding et al., 2007; Iwata et al., 2005; Massey et al., 2006; Pandey et al., 2007).

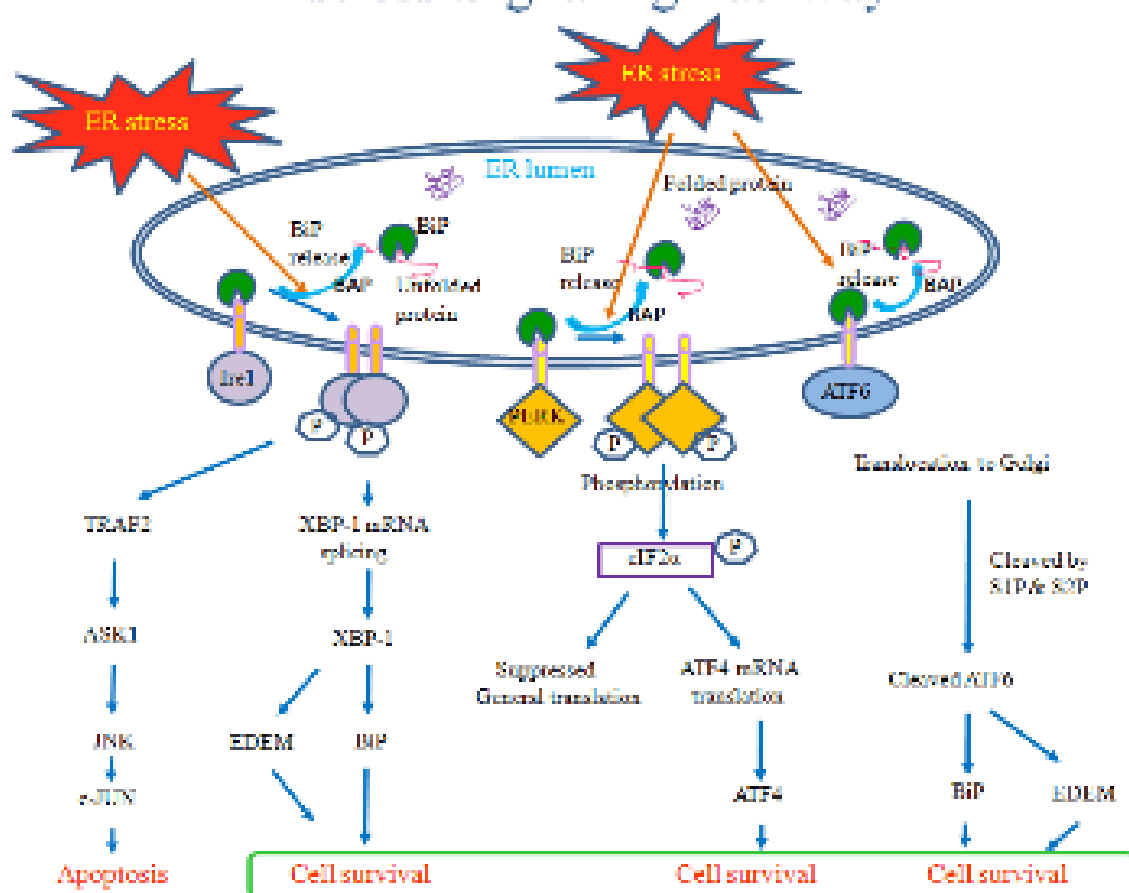
უჯრედში მოქმედი ცილოვანი კატაბოლიზმის სისტემის დეფიციტი, თავისი ფუნქციური მნიშვნელობიდან გამომდინარე, მჭიდრო კავშირშია სხვადასხვა ნეიროდეგენერაციული დაავადებების განვითარებასთან. გამომდინარე იქედან, რომ უჯრედის ამ მეტად მნიშვნელოვანი ფუნქციის შესუსტება ხშირად იწვევს სხვადასხვა ნეირონულ დაჯგუფებებში არასწორი კონფორმაციის მქონე ცილოვანი ფრაქციების დაგროვებას, წარმოადგენს აღნიშნული ფაქტის უტყუარ დადასტურებას. ამასთან დაკავშირებით, არსებობს მონაცემები, რომლებიც მიუთითებს, რომ ალცჰეიმერით და პარკინსონით დაავადებული პირების თავის ტვინში პროტეასომის ფუნქცია დათრგუნულია (Keller et al., 2000a; McNaught and Jenner, 2001); იგივე ფაქტს აქვს ადგილი ასევე ხანდაზმული პირების შემთხვევაში (Ding and Keller, 2001; Keller et al., 2000b). აღსანიშნავია, რომ პარკინსონის სინდრომის შემთხვევაში, პროტეასომულ მალფუნქციონირებასთან ერთად, დამატებით

აღინიშნება მუტირებული ცილა- α სინუკლეინის არსებობა, ხოლო მემკვიდრული ფორმის ამიოტროფული ლატერალური სკლეროზის დროს ადგილი აქვს ფერმენტ - სუპეროქსიდ-დისმუტაზას მუტაციის შემთხვევას (Bruijn et al., 1998). უჯრედული ჰომეოსტაზის პირობებში, ანომალური ან არასასურველი ცილების სინთეზი და შემდგომ მათი პროტეოლიზი, ფიზიოლოგიური, დინამიური პროცესია და ხორციელდება ზემოთ აღწერილი ორივე, ან ერთ-ერთი პროტეოლიზური გზის საშუალებით. ნეიროდეგენერაციული დაავადებების დროს კი ადგილი აქვს მალფუნქციონირებადი ცილების ჭარბ-წარმოქმნას და/ ან პროტეოლიზური სისტემების ფუნქციონირების შესუსტებას.

ენდოპლაზმური რეტიკულუმის ერთ--ერთ მნიშვნელოვან პროტეინს წარმოადგენს სიგმა-1 რეცეპტორი (Sig-1R). ეს რეცეპტორი მონაწილეობს უჯრედში მიმდინარე როგორც ფიზიოლოგიურ ასევე პათოლოგიურ მოვლენებში, როგორიცაა:- ნეიროგენეზული და ნეიროპროტექტორული პროცესები, ნეიროტრანსმიტერის გამოთავისუფლება, დასწავლისა და მეხსიერების პროცესები, ფარმაკოლოგიური პრეპარატების მიმართ დამოკიდებულების ჩამოყალიბება, კარცინოგენეზი და ნეიროპლასტიურობა (Maurice and Su 2009). ჩვეულებრივ, ეს რეცეპტორი ქმნის კომპლექსს ფუნქციურად და სტრუქტურულად განსხვავებულ ცილებთან, ასევე მიტოქონდრიებთან ასოცირებულ ცილოვან კომპლექსებთან და სხვა შაპერონებთან, როგორიცაა ცილა- BiP (Hayashi and Su, 2001; Aydar et al., 2002; H. Yamamoto et al., 2002). სიგმა რეცეპტორთან დაკავშირებული ეს ფაქტი კიდევ ერთხელ ადასტურებს, რომ ცილა-ცილოვანი ურთიერთობები მნიშვნელოვანია სიგმა რეცეპტორის ფუნქციურ აქტივობაში. სხვადასხვა სტიმულების საპასუხოდ, მას შეუძლია დისოცირება და ტრანსლოკაცია. უჯრედში მისი გადმოსვლა ანეიტრალურ ენდოპლაზმური რეტიკულუმის სტრესის მიმართ უჯრედის პასუხს, ხოლო ტრანსლოკაციის შემცირება აძლიერებს აპოპტოზის პროცესს. სიგმა რეცეპტორი წარმოადგენს არაოპოიდურ, ენდოპლაზმური რეტიკულუმის რეცეპტორულ ცილას, რომელიც შედგება ორი სუბტიპისგან: სიგმა-1(Sig-1R) და სიგმა-2 (Sig-2R) (Hayashi and Su, 2004a). სიგმა-1(Sig-1R) რეცეპტორი კლონირებულია და გაშიფრულია მისი თანმიმდევრობა (Hanner et al., 1996), ხოლო, რაც შეეხება სიგმა- 2(Sig-2R) რეცეპტორს, მისი ამონომჟავური თანმიმდევრობა უცნობია. სიგმა-1(Sig-1R)

რეცეპტორულ პროტეინს არ გააჩნია ჰომოლოგიური მსგავსება ძუძუმწოვრების სხვა რომელიმე ცილასთან, თუმცა ნაჩვენებია, რომ 30,3 % იდენტურია საფუარის C8-C7 სტეროლ-იზომერაზისა (Hanner et al., 1996). სიგმა 1 რეცეპტორის სუბერთეული უკავშირდება ბენზომორფანის ჯგუფის მქონე ნაერთებს, მაგ, პენტაზოცინს, სტეროიდებს და სხვადასხვა სახის ფსიქოტროპულ პრეპარატებს (Su et al., 1988; Snider and Largent, 1989). ნერვულ სისტემაში სიგმა -1 (Sig-1R) რეცეპტორი არეგულირებს ნეირიტების წარმოქმნას, კალიუმის არხების მუშაობას, IP3 რეცეპტორით გაშუალებულ Ca^{2+} სასიგნალო მექანიზმს, ასევე მონაწილეობს მეხსიერების პროცესებში და წამლების მიმართ დამოკიდებულების ჩამოყალიბებაში (Maurice and Lockhart, 1997; Hayashi and Su, 2001; Aydar et al, 2002; Matsumoto et al., 2003; Hayashi and Su, 2004a). სიგმა- 1 (Sig-1R) რეცეპტორის სუბერთეული ასევე ექსპრესირებულია პერიფერიულ ორგანოებში, მათ შორის ღვიძლში და კუჭქვეშა ჯირკვალში (Hanner et al., 1996), ასევე მისი ექსპრესია ნანახია სიმსივნურ უჯრედებში (Vilner et al., 1995). როგორც კვლევის ახალი შედეგები აჩვენებს, სიგმა რეცეპტორს გააჩნია მკვეთრად გამოხატული ანტიაპოპტოზური მოქმედება, რაც გამოიხატება ნეიროდეგენერაციული პროცესების დათრგუნვით; ასევე ნანახია მისი მონაწილეობა იშემიურ პროცესებში (Marrazzo et al., 2005; Vagnerova et al 2006). სიგმა რეცეპტორის ანტაგონისტები, როგორიცაა მაგ; NE – 100, ჰალოპერიდოლი, არ ახდენენ გავლენას Sig-1R - BiP კომპლექსის ასოციაციაზე, არსებობს მონაცემები მხოლოდ იმის შესახებ, რომ აღნიშნული ნაერთები იწვევენ სიმსივნური უჯრედების ზრდის დათრგუნვას (Spruce et al., 2004). მიუხედავად, აღნიშნული მონაცემებისა, ამ რეცეპტორის მოქმედების მოლეკულური მექანიზმი დღემდე უცნობია.

ER stress Signaling Pathway



სურ.9. ენდოპლაზმური რეტიკულუმის სტრესის სასიგნალო გზები.

მეთოდოლოგია

თავი 1. გამოყენებული მასალა

1.1 გამოყენებული მასალა

ყველა რეაგენტი ეკუთვნის Sigma-Aldrich-ს (Sigma-Aldrich Inc., USA). მონოკლონური ანტისხეულები NMDAR-2A, NMDAR-2B, mGluR1 a/B, iNOS და nNOS და პოლიკლონური ანტისხეულები CFTR, CAL, NHERF1, mGluR1a/b, მიღებულია Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Calif., USA).

1.2 კვლევის ობიექტი

თემის შესასრულებლად გამოყენებული იყო ორი კვლევის ობიექტი.

1. 8-12 კვირის მამრობითი ხაზის თაგვების ორი ჯგუფი-C57BL/6 WT და IL-10-KO C57BL/6. თაგვები შეძენილია Jackson ლაბორატორიიდან (**Bar Harbor, ME**) და მოწოდებულია თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტის სამედიცინო ბიოტექნოლოგიის განყოფილების მიერ. IL-10 გენის მიხედვით ნოკაუტირებული თაგვების ჯგუფი-(IL-10-KO C57BL/6): არიან სიცოცხლისუნარიანი და აქვთ ასევე გამრავლების უნარი, თუმცა აღენიშნებათ შეცვლილი ლიმფოციტური და მიელოიდური პროფილი, სისხლის შრატში აღენიშნებათ A ამილოიდის მომატებული დონე, ანთებითი პროცესების და აუტოიმუნური სტიმულების მიმართ შეცვლილი პასუხი, აღენიშნებათ დეპრესიული ქცევა და შემცირებული ნეიროპროპროტექციის უნარი.

პერიფერიული სისხლის ლიმფოციტები კონცენტრაციით - 10-15მლ. ლიმფოციტები აღებულ იქნა მოზრდილი ასაკის პაციენტების ვენური სისხლძარღვებიდან. კვლევის სტატისტიკა მოიცავდა 12 ჯანმრთელ საკონტროლო პირს (6 ქალი და 6 მამაკაცი, 4-15 წლის) და 18 პაციენტს (7 მამაკაცი, 11 ქალი ასაკით 4-14), რომელთაც დადასტურებული ჰქონდათ კისტური ფიბროზის დიაგნოზი იონოფორეზული პილოკარპინის ოფლის ტესტის საშუალებით, ამავდროულად პაციენტებს აღენიშნებოდათ პანკრეასის უკმარისობა. პაციენტები იმყოფებოდნენ კლინიკურად სტაბილურ გარემოში, არ აღენიშნებოდათ ფილტვების უკმარისობა და არ იღებდნენ სისტემურად კორტიკოსტეროიდებს, ასევე იმყოფებოდნენ ქრონიკული

ბაქტერიული ენდობრონქიტის საწინააღმდეგო ანტიბიოტიკოთერაპიის ქვეშ. ყველა პაციენტს გავლილი ქონდა გენეტიკური ტესტი CFTR მუტაციაზე, მათგან 6 პაციენტი (50%) $\Delta F508$ მუტაციის მიხედვით იყვნენ ჰომოზიგოტები, გარდა ერთი პაციენტისა, რომელიც G542x მუტაციის მიხედვით იყო ჰეტეროზიგოტი, დანარჩენებს კი (45%), ასევე აღენიშნებოდათ $\Delta F508$ მუტაციური ფორმა ჰეტეროზიგოტულ მდგომარეობაში.

თავი 2. გამოყენებული მეთოდები

2.1 სინაპტონეიროსომების და პლაზმური მემბრანების მიღება

სინაპტონეიროსომებს ვლუბლობდით (Kim et al.,2010) მეთოდის მიხედვით. თავგების დეკაპიტაციის შემდეგ მიღებულ ტვინებს ვჭრიდით და ვახდენდით ქერქის ჰომოგენიზირებას ტეფლონის ჰომოგენიზატორით, ვიყენებდით ჰომოგენიზაციის ბუფერს (100mg ტვინი - 2ml ჰომოგენიზაციის ბუფერი), რომელიც შეიცავდა 50 mM HEPES- pH 7,5; 125 mM NaCl, 2 mM KCl, 100mM Sucrose, 1,8mM $CaCl_2$, 1mM $MgCl_2$; ბუფერს ასევე ვუმატებდით პროტეაზას ინჰიბიტორებს (Gordox და Trasylol 20 units/ml), რომელიც ემატება უშუალოდ ცდის წინ. ჰომოგენატს ვფილტრავდით თანმიმდევრულად, ჯერ 100 მიკრონიან 3 შრიანი ნეილონის საცრისებურ ფილტრზე და შემდეგ 8-შრიან 100 მიკრონიან ნეილონის ფილტრზე. ფილტრებს ყველა საფეხურზე წინასწარ ვალბობდით ჰომოგენიზაციის ბუფერში. საბოლოო ფილტრატს ვაცენტრიფუგირებდით (4000 x g, 1 წთ, 4°C), მიღებულ სუპერნატანტს ისევ ვაცენტრიფუგირებდით (7000 x g, 15 წთ). მიღებული ნალექი წარმოადგენდა სინაპტონეიროსომულ ფრაქციას. საბოლოოდ, სინაპტონეიროსომულ ფრაქციას რესუსპენზირების მიზნით ვამატებდით მცირე რაოდენობით ჰომოგენიზაციის ბუფერს.

სინაპტონეიროსომებიდან პლაზმური მემბრანების მისაღებად, სინაპტონეიროსომების ნალექს ვუმატებდით 200 μ L 0.1% Triton X-100 და ვაინკუბირებდით 4°C, 30 წუთის განმავლობაში. შემდგომ ვახდენდით ლიზატის ჰომოგენიზირებას ინსულინის ნემსით, ხოლო შემდგომ ვამატებდით 100 μ L 25mM Tris-HCl, ვაცენტრიფუგირებდით 1000xg სიჩქარეზე, 10წუთის განმავლობაში, მიღებულ სუპერნატანტს ვაცენტრიფუგირებთ 9500 x g სიჩქარეზე 30 წთ-ის

განმავლობაში. შემდგომ ეტაპზე ვაგრძელებდით ცენტრიფუგირებას 20,000×g სიჩქარით, 20წუთის განმავლობაში, მიღებულ ნალექს სუსპენზირების მიზნით ვუმატებდით 20 mM Tris-HCl შემცველ ბუფერს pH- 7.4, რომელიც შეიცავდა 0.1 mM PMSF, 2 mM EDTA, 5 mg/mL პეპსტატინს და 5 U/mL აპროტინინს (ბუფერი B), რათა მიგვეღო სუსპენზია 5 მგ/მლ კონცენტრაციის ცილის შემცველობით. ბოლოს ვყინავდით -40°C . მიღებული მემბრანული ფრაქციის სოლუბილიზირება ხდებოდა სოლუბილიზაციის ბუფერით, რომელიც შეიცავდა (20 mM Tris-HCl pH8,0, 137mM NaCl, 10% გლიცეროლს, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA). სოლუბილიზაციის ბუფერთან ინკუბაცია მიმდინარეობდა 30 წთ 4°C ტემპერატურაზე. არასოლუბილირებული მასალის მოცილება ხდებოდა ცენტრიფუგირებით 20,000 × g სიჩქარეზე, 1 სთ-ის განმავლობაში. მიღებულ სუპერნატანტს ვიყენებდით, როგორც სოლუბილიზირებული პლაზმური მემბრანები.

2.2 პერიფერიული ლიმფოციტების მიღება

საკონტროლო ჯგუფის და პაციენტების ვენური სისხლძარღვებიდან აღებული სისხლის ნიმუშები განზავებულ იქნა იგივე მოცულობის, შემდეგი შემადგენლობის (10 mM Hepes, 0.1% BSA, 5 mM d-glucose, 145 mM NaCl და 5 mM KCl) HEPES ბუფერით-PH-7.4; მონონუკლეური ფრაქციები განვაცალკევეთ ცენტრიფუგირების საშუალებით (Ficoll-Paque), შემდგომ ვრეცხავდით ორჯერ, ხოლო მონოციტები მოვაშორეთ პლასტიკატზე ადჰეზიის გზით. დამუშავების შედეგად მიღებული სინჯების >98 % წარმოადგენდა მომწიფებულ ლიმფოციტებს. შემდეგ ეტაპზე ვრეცხავდით 3-ჯერ RPMI-1640 საშუალებით, რომელიც არ შეიცავდა გლუტამატს, საბოლოოდ ვახდენდით გადატანას პეტრის თასებზე და სტიმულირების მიზნით ვუმატებდით IL -2 კონცენტრაციით -10 ng/ml , 37°C ტემპერატურაზე, 4 სთ-ის განმავლობაში, ამის შემდეგ ვამატებდით RPMI-1640 შემცველ საკვებ არეს, რომელსაც დამატებული ჰქონდა გლუტამატი $1\times 10^{-5}\text{M}$ კონცენტრაციით. ვაინკუბირებდით შემდეგი რეჟიმის მიხედვით - 5%CO₂, 37°C ტემპერატურაზე, 48 საათის განმავლობაში. ინკუბაციის პერიოდში არ იყო გამოყენებული რაიმე სახის შრატი. ინკუბაციის შემდგომ,

მოვახდინეთ ლიმფოციტების გამოყოფა ცენტრიფუგირების საშუალებით 800×g სიჩქარით, 20 წთ-ის განმავლობაში. უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა შემოწმებულ იქნა 0.4% ტრიპანის ლურჯით და შეადგენდა 70–80%.

2.3 ციტოზოლური და პლაზმური მემბრანების მომზადება ლიმფოციტებიდან

მემბრანული ფრაქციების მისაღებად გამოვიყენეთ (Cuadra et al. 2004) მეთოდი. ამ მეთოდის მიხედვით, ლიმფოციტური კულტურა გავრეცხეთ PBS ის საშუალებით, მოვახდინეთ რესუსპენზირება 0.5 ml ჰიპოტონური ლიზის ბუფერით. ბუფერის შემადგენლობა იყო შემდეგი: 20 mM Tris-HCl, pH- 7.5, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF. ბუფერს ასევე დამატებული ჰქონდა პროტეაზას ინჰიბიტორი. შემდგომ მოვახდინეთ ინკუბაცია 30 წთ-ის განმავლობაში, 4°C ტემპერატურაზე, ინკუბირების შემდეგ მოვახდინეთ უჯრედების ჰომოგენიზაცია ცენტრიფუგირების საშუალებით, რომელიც მიმდინარეობდა 10 წუთის განმავლობაში, 1000×g სიჩქარეზე, რის საშუალებითაც მოხდა ბირთვების და უჯრედული ჩანართების მოცილება, მიღებული ჰომოგენატი კვლავ ვაცენტრიფუგირეთ 40 წთ, 14,000 × g, რის შედეგადაც მოვახდინეთ მემბრანების საბოლოო სახით მიღება, ხოლო დარჩენილი სუპერნატანტი გავყინეთ და შემდგომში გამოვიყენეთ ციტოზოლური პრეპარატის მისაღებად. მიღებული ნალექი, რომელიც წარმოადგენდა პლაზმურ მემბრანებს, ვარესუსპენზირეთ 1% ნატრიუმის ქოლატით, რომელიც შეიცავდა - 50 mM Tris-HCl, pH -7.5, ვაინკუბირეთ 4°C ტემპერატურაზე, 24 საათის განმავლობაში, შემდეგ ისევ ვაცენტრიფუგირეთ 40 წთ, 14,000 × g. მიღებული სუპერნატანტი განიხილებოდა, როგორც სოლუბილიზირებული პლაზმური მემბრანები

2.4 აზოტის ოქსიდის სინთაზას (NOS) აქტივობის და აზოტის ოქსიდის (NO) რაოდენობრივი განსაზღვრა

ფერმენტის-აზოტის ოქსიდის სინთაზას (NOS) აქტივობა ისაზღვრებოდა არეში, რომელიც შეიცავდა 50 mM კალიუმის ფოსფატის ბუფერს (K_2PO_4 , pH7.2) 400μM L-არგინინს, 500μM NADPH, 0,1μM კალმოდულინს, 2mM $CaCl_2$, 2μM FAD, 2μM FMN,

10 μ M ტეტრაჰიდრობიოპტერინსი, 0,01u/ml აზოტის რედუქტაზას და 100 μ g სინაპტონეიროსომულ ცილას. გლუტამატის დოზა-დამოკიდებული ეფექტის განსაზღვრისთვის სინაპტონეიროსომებს ვაინკუბირებდით 37°C ტემპერატურაზე 30წთ-ის განმავლობაში სხვადასხვა კონცენტრაციის გლუტამატთან. ინკუბაციის შემდეგ სინაპტონეიროსომებს ვაცენტრიფუგირებდით 20წთ, 16000xg სიჩქარით და სუპერნატანტს ვამუშავებდით 200mM 2,3-დიამინაფტალინით (DAN). ინკუბაცია გრძელდებოდა 10 წუთი, სიბნელეში-ოთახის ტემპერატურაზე. ფერმენტული რეაქციის შესაჩერებლად, ვამატებდით ნატრიუმის ჰიდროქსიდს (NaOH). ნიტრიტის ფლუორესცენციულ გამოსხივებას ვსაზღვრავდით ფლუორიმეტრზე (JenwayFluorimeter,6200) შემდეგი პარამეტრების გამოყენებით: აგზნების მაქსიმალური ტალღის სიგრძე 350 nm; ემისია - 425 nm ტალღაზე.

წარმოქმნილი აზოტის ოქსიდის მთლიან რაოდენობას ვსაზღვრავდით სინაპტოპლაზმაში გრისის რეაგენტის საშუალებით (1% სულფანილამიდი და 0.1% ნაფტალინ -ეთილენდიამინ დიჰიდროქლორიდი გახსნილი 5% H₃PO₄). გრისის რეაგენტის დამატებიდან 15 წუთის შემდეგ, სინჯები იცვლიდა ფერს და წარმოქმნილ პროდუქტს ვსაზღვრავდით კოლორიმეტრული მეთოდით 550 nm ტალღაზე სპექტროფოტომეტრის გამოყენებით (Jenway 6535).

2.5 არგინაზას აქტივობის განსაზღვრა

არგინაზას აქტივობა ისაზღვრებოდა სინაპტოპლაზმაში (Munder M.et al;) მეთოდის მცირეოდენი მოდიფიკაციით. სინაპტონეიროსომების ლიზისს ვატარებდით 200 μ l 0,1% Triton X-100 ბუფერის დამატებით, ინკუბაცია გრძელდებოდა 4°C ტემპერატურაზე, 30 წთ-ის განმავლობაში სანჯღრევლაზე. 30წთ-ის გასვლის შემდეგ ლიზატს ვაჰომოგენიზირებდით ინსულინის შპრიცის საშუალებით, ვამატებდით 10ml 10mM MnCl₂ და ფერმენტის გააქტივების მიზნით ვათბობდით 10 წუთის განმავლობაში 56°C-ტემპერატურაზე. არგინინის ჰიდროლიზს ვატარებდით 100ml 0,5M L-არგინინთან (pH-9,7) ლიზატის ინკუბაციით, 37°C ტემპერატურაზე 15-120 წუთის განმავლობაში. რეაქციას ვაჩერებდით 900 μ l H₂SO₄(96%), H₃PO₄(85%), H₂O (1/3/7, v/v/v) ნარევის დამატებით. შარდოვანას კონცენტრაციას ვზომავდით 540 nm ტალღაზე სპექტროფოტომეტრის გამოყენებით

(Jenway 6535) 40 μ l a-იზონიტროზო-პროპიოფენონის (რომელიც გახსნილია 100% ეთანოლში) დამატებით და 30წთ-ის განმავლობაში 95°C ტემპერატურაზე გაცხელების შემდეგ. ფერმენტის აქტივობის ერთი ერთეული განისაზღვრება, როგორც ფერმენტის რაოდენობა, რომელიც აკატალიზებს 1mmol შარდოვანას წარმოქმნას წუთში.

2.6 MK-801-ის დაკავშირების აქტივობის განსაზღვრა

MK-801-ის დაკავშირების აქტივობის განსაზღვრას ვახდენდით ორი პარალელური სინჯების საშუალებით - 250 μ L მოცულობაში, ოთახის ტემპერატურაზე. თითოეული სინჯი შეიცავდა 50 μ l მემბრანულ სუსპენზიას (ცილის საბოლოო კონცენტრაციაა - 0,4mg/ml), 2nM [³H]MK-801 და სპერმინს შემდეგი კონცენტრაციის ფარგლებში (1-10000 nM), ან ნატრიუმის ნიტროპრუსიდს (SNP) კონცენტრაციით (50-50 000 nM). სინჯები გახსნილი იყო 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) ბუფერში. არასპეციფიკურ დაკავშირებას ვსაზღვრავდით არამონიშნული (არარადიექტიური) MK-801-ის დამატებით 500 nM რაოდენობის სინჯში. 45 წუთიანი ინკუბაციის შემდეგ სინჯებს სწრაფად ვფილტრავდით Whatman GF/B შუმის ბიჭკოვან ფილტრებში. შემდგომ სინჯარებს და ფილტრებს სწრაფად ვრეცხავდით Tris-HCl (pH 7.4) ბუფერით სამჯერ. გაშრობის შემდეგ ფილტრები გადაგვქონდა ფლაკონებში, რომლებიც შეიცავდა 5ml ტოლუოლის სცინცილატს. რადიექტიური MK-801-ის დაკავშირების აქტივობას ვითვლიდით LKB Rack-PTM მთვლელით.

2.7 პოლიამინების განსაზღვრა მაღალი წნევის თხევადი ქრომატოგრაფის (HPLC) ანალიზით

სინაპტოპლაზმაში პოლიამინების შემცველობას ვსაზღვრავდით (*Sethi et al, 2011*) მეთოდის მცირეოდენი მოდიფიკაციის მიხედვით. ექსპერიმენტს ვატარებდით მაღალი წნევის თხევადი ქრომატოგრაფის (HPLC) საშუალებით. სინაპტოპლაზმურ სინჯებს ვიღებდით 350 - 350 μ L კონცენტრაციით, ცილების მოშორების მიზნით ვამატებდით ექვივალენტური კონცენტრაციით 0.6 N HClO₄ და შემდგომ ვაცენტრიფუგირებდით 15,000 $\times$ g სიჩქარეზე 20 წუთის განმავლობაში. პოლიამინების ბენზოლილირების მიზნით სუპერნატანტს ჯერ ვუმატებდით ბენზოილ ქლორიდს, ხოლო შემდეგ ნეიტრალიზებას ვახდენდით 2N NaOH საშუალებით და ვაინკუბირებდით 25 წუთის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე. ბენზოილ-პოლიამინის გამოყოფას ვახდენდით დიეთილის ეთერით 2-2 ჯერ. ორგანულ შრეში

იყო ბენზოილირებული პოლიამინები, რომელსაც ვიღებდით ცალკე და ვაშრობდით. მიღებულ ნალექს ვხსნიდით 10 μ L აცეტონიტრილში. შემდგომი ანალიზისთვის ვიყენებდით თითოეული სინჯის 20 μ L და ბენზოილირებული პოლიამინების დონეს ვსაზღვრავდით 198, 229, და 254 nm. ტალღის სიგრძეზე მაღალი წნევის თხევადი ქრომატოგრაფის (HPLC, Agilent, ოთხ ტუმბო 1260, აუტოსემპლერი 1290, და UV დეტექტორი 1260) გამოყენებით.

ვიღებდით თითოეული სინჯის 20 μ L (<50mmoles) და ვფილტრავდით 0,45 მიკრონიან ფილტრში, აუტოსემპლერით დაგვქონდა C-18 (Nova – Pac C-18) სვეტზე, რომელიც გაწონასწორებული იყო 20%-იანი A (acetonitrile) გამხსნელით. სვეტიდან ბენზოილირებული პოლიამინების ჩამოხსნა მიმდინარეობდა აცეტონიტრილის გრადიენტული ბუფერით (20-100%) 12 წთ-ის განმავლობაში. შემდეგ 100% A ბუფერით რეცხვა გრძელდებოდა 3 წთ და საბოლოოდ 100% A გამხსნელი გადადიოდა 20% A ბუფერში. გაწონასწორება მიმდინარეობდა 2წთ-ის განმავლობაში. ნაკადის სიჩქარე იყო 0,5მლ/წთ და დაყოფის სრული დრო შეადგენდა 19 წუთს.

2.8 იმუნოპრეციპიტაცია და Western ბლოტინგი

სინჯების იმუნოპრეციპიტაციის მიზნით ლიმფოციტების ციტოზოლური და პლაზმური მემბრანების სოლუბილიზირებული სინჯებს ვაინკუბირებდით შესაბამის პირველად ანტისხეულებთან ანტი-CFTR ან ანტი-mGluR1a/b ანტისხეულებთან. სინაპტოთეროსომების სოლუბილიზირებული მემბრანული ფრაქციების სინჯებს ვაინკუბირებდით SigR1 პირველად ანტისხეულთან 60წთ-ის განმავლობაში, 4°C ტემპერატურაზე. ცილების იმუნო-პრეციპიტაციის მიზნით ვუმატებდით წინასწარ გარეცხილ პროტეინ A/G-აგაროზას 5 μ L ოდენობით (400 μ გრამ ცილაზე). ინკუბაცია გრძელდებოდა მთელი ღამის განმავლობაში. შემდგომ ეტაპზე ვრეცხავდით 12000 x g, 20 წთ-ის განმავლობაში. ანტიგენ-ანტისხეულის შემცველ კომპლექსს რესუსპენზირების მიზნით დავუმატეთ 100 mM გლიცინი, pH-3.0, შემდეგ დამატებულ იქნა 1.0 M Tris, pH-9.5, იმისათვის, რომ მიგვეღო pH-7.4. მოვახდინეთ სუპერნატანტის ცენტრიფუგირება 1000xg, 12 წუთის განმავლობაში, ხოლო მიღებული ცილოვანი კომპლექსების ანალიზი მოხდა ბლოტინგის საშუალებით. სინაპტოთეროსომებში iNOS, nNOS, NMDAR-2A, NMDAR-2B, mGluR 1a/b -ის, SigR1 ანტისხეულით იმუნოპრეციპიტაციის შედეგად მიღებულ

სინაპტონერიოსომულ სინჯებში BiP, Rac1, IP3R და NR2B გლუტამატის რეცეპტორის, ხოლო ლიმფოციტებში ანტი-CFTR-ით და ანტი-GluR1a/b დალექილი იმუნოპრეციპიტირებულ სინჯებში CAL, NHERF1, mGluR1a/b -ის თვისობრივი ანალიზის მიზნით ვატარებდით ცილების იმუნობლოტინგის ექსპერიმენტებს. ამისათვის, ვახდენდით ცილების დენატურაციას 5 წუთის განმავლობაში 90°C ტემპერატურაზე SDS-PAGE sample buffer-თან, ფრაქციონირებას ვატარებდით SDS-PAGE 15% გელის საშუალებით, შემდეგ ვახდენდით ტრანსფერს ნიტროცელულოზის მემბრანაზე. ტრანსფერის შემდგომ, მემბრანის ბლოკირებას ვახდენდით 5% ხარის შრატის ალბუმინის და 0,05% Tween-ის საშუალებით, რომელიც გახსნილია 20%-იან Tris-HCl-ის ბუფერში. ბლოკინგის მერე, მემბრანებს ვაინკუბირებდით პირველად ანტისხეულებთან. მონიშნული ფრაქციების ვიზუალიზაციისთვის ვიყენებდით ქემილუმინესცენციის (Amersham Biosciences) მეთოდს, ხოლო ანალიზისთვის დენსიტომეტრულ სკანირებას. მემბრანებზე მიღებული ხაზების ინტენსივობა შეესაბამება დატანილი ცილის ნიმუშების რაოდენობას. ცილის კონცენტრაციას ვსაზღვრავდით საღებავ-დაკავშირების მეთოდით (Bio-Rad).

2.9 ციტოკინების (IL-8 , IL-10) იმუნოსორბენტული (ELISA) ანალიზი

საკვლევ სინჯებში ციტოკინების IL-8, IL-10 რაოდენობრივი ანალიზს ვატარებდით იმუნოსორბენტული მეთოდის საშუალებით. აღნიშნული მეთოდის მგრძნობელობა იყო 5 pg/ml, ხოლო ისაზღვრებოდა 2 pg/ml კონცენტრაციებზე ნაკლები. ვიღებდით 50 µL სუპერნატანტის შემცველ სინჯებს, ვამატებდით 50 µL ბიოტინს თითოეულ სინჯს, ვაინკუბირებდით ოთახის ტემპერატურაზე 1.5 საათის განმავლობაში. ინკუბაციის შემდეგ ჯერ ვახდენდით სინჯების ასპირაციას, შემდეგ ვრეცხავდით 4-ჯერ სპეციალური გამრეცხი ბუფერით. ბოლო ეტაპზე თითოეულ სინჯს, ვამატებდით სპეციალურ რეაგენტს-სტრეპტავიდინს, რომელსაც მიმზღული აქვს მეორადი ანტისხეული, ვაინკუბირებდით ოთახის ტემპერატურაზე 30 წუთი, კვლავ ვიმეორებდით ასპირაციას და რეცხვას 4-ჯერ სპეციალური გამრეცხი ბუფერით. ვამატებდით 100 µL ქრომოგენს და ინკუბაციას ვახდენდით ოთახის ტემპერატურაზე 30 წუთის განმავლობაში სიბნელეში, შემდგომ ვამატებდით 100 µL ხსნარს, რომელიც იწვევს რეაქციის შეჩერებას. მიღებულ შედეგებს ვზომავდით

სპექტროფოტომეტრზე, 450nm ტალღის სიგრძეზე. მიღებული მონაცემები ასახულ იქნა, სიცოცხლისუნარიანი უჯრედების შემდეგ კონცენტრაციაზე - pg/ml/1×10⁶ გადანგარიშების გათვალისწინებით. (ELISA kits, Biosource International, Camarillo, CA).

2.10 ნიკოტინამიდ-ადენინ-დინუკლეტიდ-ფოსფატ ოქსიდაზას(NADPH) აქტივობის განსაზღვრა

ფერმენტ ნიკოტინამიდ-ადენინ-დინუკლეტიდ-ფოსფატ ოქსიდაზას (NADPH) აქტივობა თავგების ტვინში განსაზღვრულ იქნა (*Brien et al., 2009*) მეთოდის მიხედვით. მემბრანული ფრაქციის შემცველ სინჯებს რესუსპენზირების მიზნით დავამატეთ 50mM ფოსფატური ბუფერი pH-7.4. შემდგომ მემბრანული ცილების 20-60 µg ვუმატებდით 10mM ფოსფატურ ბუფერს, 130 mM NaCl, 1mM EGTA, 10µM ფლავინ-ადენინ-დინუკლეოტიდი (FAD), 2mM NaN₃, 50µM დაჟანგული ციტოქრომი c და 10µM გუანოზინ 5'-[β,γ-იმიდოტრიფოსფატი(GppNHp). ექსპერიმენტი მიმდინარეობდა ორ, პარალელურ რეჟიმში. პირველ შემთხვევაში საკვლევ სინჯებს ემატებოდა 100µM გლუტამატი, 1µM(+)-პენტაზოცინი, 1µM ჰალოპერიდოლი, 1µM 4-PPBP ან 1µM BD1063. ექსპერიმენტის ერთ რიგში სინჯები შეიცავდა სუპეროქსიდ-დისმუტაზას (SOD;Sigma-Aldrich) 200ერთეულს. ექსპერიმენტის ინიცირება ხდებოდა 200µM NADPH დამატებით. 1 საათის შემდეგ ფერმენტ -NADPH ოქსიდაზას აქტივობა 550 nm-ზე ისაზღვრებოდა სუპეროქსიდ-დისმუტაზას(SOD) ინჰიბირების მომატების პირდაპირპროპორციულად. ექსპერიმენტის შედეგებიდან აღმოჩნდა, რომ NOX სისტემის აქტივობა გამოიხატება, როგორც 1წუთში, 1მგ ცილაზე გადანგარიშებული აღდგენილი ციტოქრომი C რაოდენობა.

2.11 მიღებული შედეგების სტატისტიკური დამუშავება

სტატისტიკური ანალიზი ტარდება one-way ANOVA ტესტით. შედეგები ითვლება სარწმუნოდ როდესაც $p < 0,05$. თითოეულ შემთხვევაში ხდება მინიმუმ სამი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის დამუშავება.

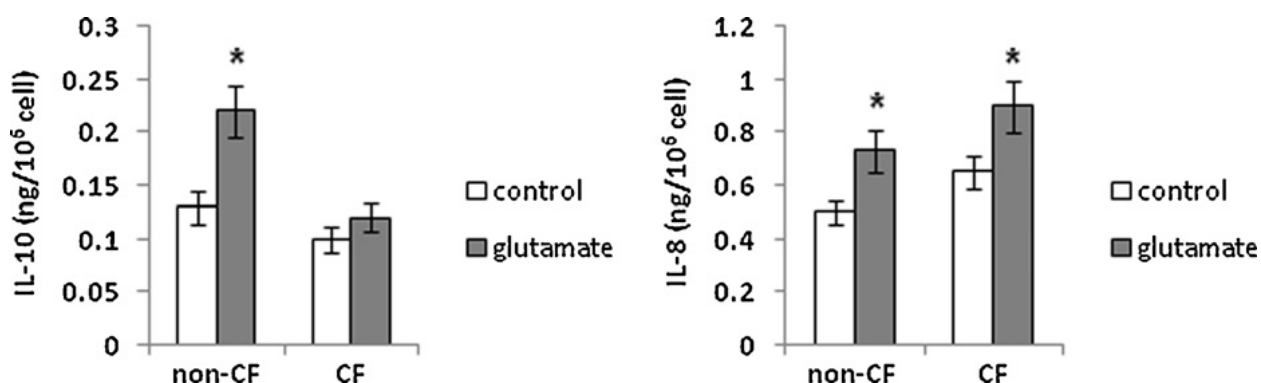
საკონტროლო ჯგუფსა და კისტური ფიბროზის მქონე პაციენტებს შორის სტატისტიკური შედარების მიზნით გამოვიყენეთ ორი, პარალელური

ექსპერიმენტული ვარიანტები, ხოლო მიღებული შედეგების ანალიზი მოვახდინეთ დამოუკიდებლად. მონაცემები გამოისახება, როგორც $\pm$ SD. თუ P სიდიდე < 0.05 , მონაცემებს ვთვლიდით სარწმუნოდ. მონაცემები ასახული იყო როგორც გადაანგარიშებული სიცოცხლისუნარიანი უჯრედების შემდეგ კონცენტრაციაზე - pg/ml/ 1×10^6 .

მიღებული შედეგები

თავი.1 გლუტამატის ზეგავლენა საკონტროლო და კისტური ფიბროზით დაავადებული პაციენტების ლიმფოციტების მიერ IL-8 და IL-10 -ის სეკრეციაზე და მეტაბოტროპული გლუტამატის რეცეპტორის სუბერთეულის (mGluR1) ექსპრესია ლიმფოციტების მემბრანულ ფრაქციაში.

პრო- და ანტი-ანთებითი ციტოკინების სეკრეციის დისბალანსი და ნეიტროფილების მომატების შედეგად განპირობებული ანთებითი პროცესი თამაშობს ძირითად როლს ფილტვის დაავადების პათოგენეზში კისტური ფიბროზის (CF) მქონე პაციენტებში (Lyczak et al., 2002). IL-8 -ის სეკრეცია არის მნიშვნელოვნად მომატებული კისტური ფიბროზის მქონე (CF) პაციენტების ბრონხოციტებში, სადაც ის მონაწილეობს ნეიტროფილების გავრცელებაში სასუნთქი გზების ენდოთელიუმში (Muhlebach and Noah, 2002). მეორეს მხრივ, აღმოჩნდა რომ კისტური ფიბროზის მქონე პაციენტების რესპირატორულ გზებში ადგილი აქვს ძირითადი ანტი-ანთებითი ციტოკინის IL-10-ის დეფიციტს (Chmiel et al., 2002). ამგვარად, წარმოქმნილი დისბალანსი პრო - და ანტი -ანთებით ციტოკინებს შორის, იწვევს ანთებითი პროცესის ინტენსივობის გაზრდას კისტური ფიბროზის მქონე (CF) პაციენტების ფილტვის ქსოვილში. აღსანიშნავია, რომ გლუტამატი ასრულებს მოდულატორულ როლს T ლიმფოციტების აქტივაციის პროცესში (Pacheco et al., 2006). ჩვენ შევისწავლეთ გლუტამატის ($10^{-4}M$) ეფექტი IL-8 და IL-10 ის სეკრეციაზე კისტური ფიბროზის (CF) მქონე პაციენტების ლიმფოციტებში. როგორც ციტოკინების რაოდენობრივმა ანალიზმა (ELISA) აჩვენა, CF პაციენტების ლიმფოციტების მიერ მომატებულია IL-8 სეკრეციის დონე, მაშინ როცა IL-10 - ის რაოდენობა მნიშვნელოვნად არ იცვლება. (გრაფიკი.1).

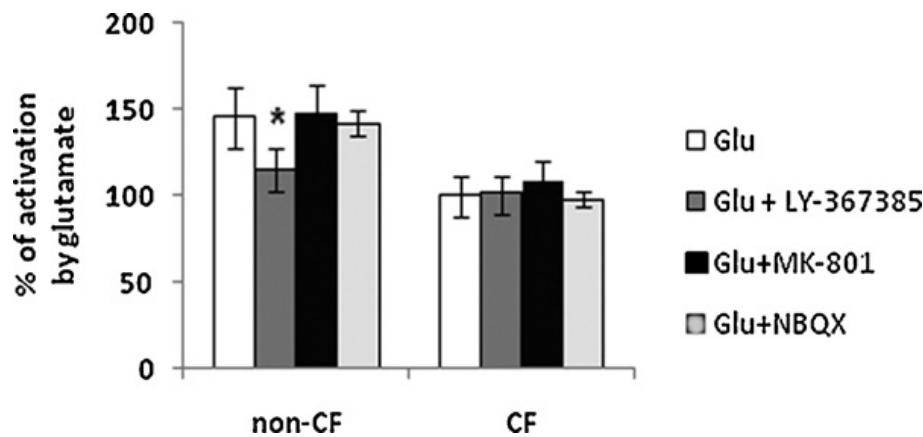


გრაფიკი.1. IL -8 და IL -10 სეკრეციის ცვლილება გლუტამატის და IL -2 გავლენით საკონტროლო და CF ჯგუფის T ლიმფოციტების მიერ.

ციტოკინების სეკრეციის ცვლილება იზომება გლუტამატთან ($10^{-4}M$), 48 სთ-ის ინკუბირების და IL-2 (20 ng/ml) თანაობისას, როგორც აღნიშნულია მეთოდებში. საკონტროლო და CF ჯგუფიდან მიღებული ლიმფოციტები ექვემდებარება ELISA ანალიზს, ციტოკინების რაოდენობრივი განსაზღვრისთვის, როგორც აღწერილია მეთოდებში.

ამასთანავე, გლუტამატი მნიშვნელოვნად იწვევს IL-8-ის რაოდენობის მომატებას, როგორც საკონტროლო პირების, ისე დაავადებული პაციენტების ლიმფოციტების მიერ; ხოლო IL-10 -ის გაზრდილი დონე გლუტამატის ზეგავლენით, ნანახია მხოლოდ ჯანმრთელი პირების ლიმფოციტებში.

როგორც მიღებული მონაცემები აჩვენებს, საკონტროლო პირების პერიფერიული სისხლიდან მიღებული ლიმფოციტებისთვის დამახასიათებელია IL-10-ის გაზრდილი სეკრეცია გლუტამატის საპასუხოდ, CF პაციენტების ლიმფოციტებთან შედარებით. იმის დასადგენად, თუ გლუტამატური რეცეპტორის რომელი სუბტიპი არის დაკავშირებული ციტოკინების სეკრეციასთან, როგორც საკონტროლო ასევე დაავადებული პირების ლიმფოციტების მიერ, ჩვენ შევისწავლეთ გლუტამატური რეცეპტორის ანტაგონისტების გავლენა ინტერლეიკინების სეკრეციის პროცესზე. როგორც ექსპერიმენტის შედეგმა აჩვენა, NMDAR გლუტამატური რეცეპტორის ანტაგონისტი- MK-801 და მეტაბოტროპული გლუტამატური რეცეპტორის - AMPAR ანტაგონისტი-NBQX, არ ცვლის ციტოკინების სეკრეციის დონეს, მხოლოდ LY-367385, რომელიც წარმოადგენს 1 ჯგუფის გლუტამატის მეტაბოტროპული რეცეპტორის - mGluR ანტაგონისტს, მნიშვნელოვნად ამცირებს IL-10 -ის სეკრეციას საკონტროლო პირების ლიმფოციტების მიერ. (გრაფიკი.2).

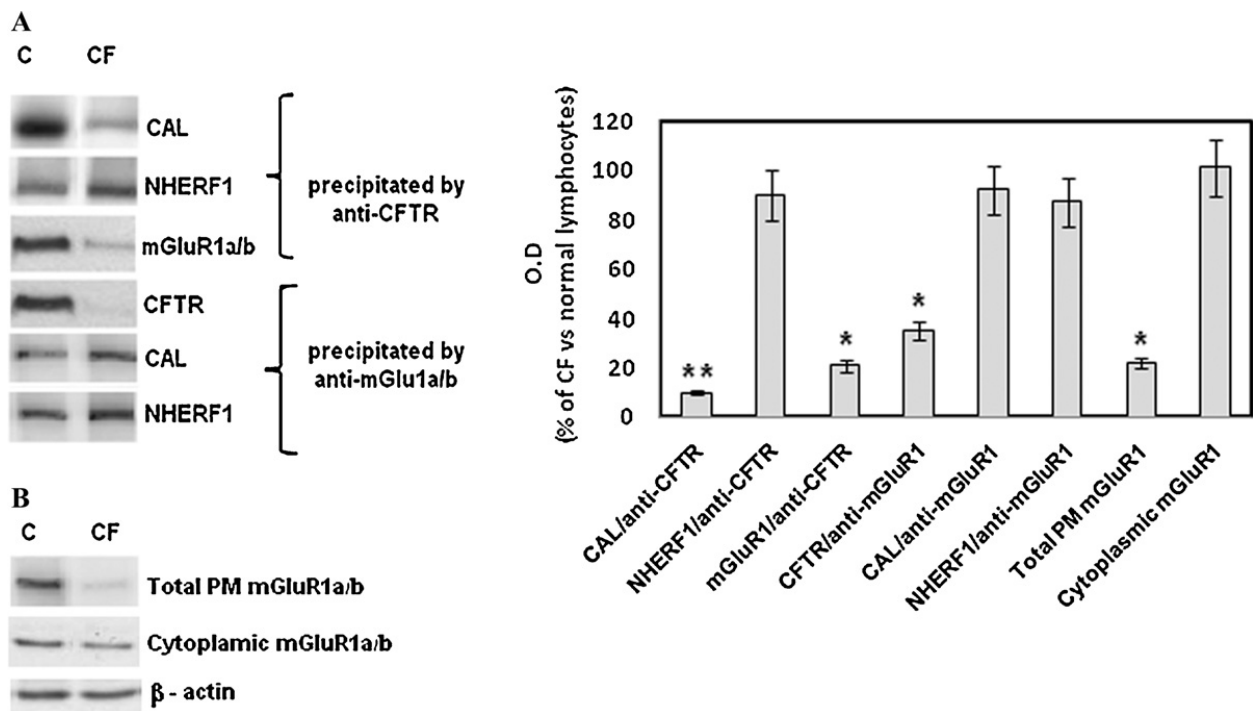


გრაფიკი.2 ციტოკინების სეკრეციის ცვლილება გლუტამატის, IL-2 და გლუტამატური რეცეპტორების ანტაგონისტების - 10^{-6} M MK-801, NBQX და LY 367385 არსებობის და არარსებობის შემთხვევაში.

ციტოკინების სეკრეციის ცვლილება იზომება გლუტამატთან (10^{-4} M), 48სთ-ის ინკუბირების, IL-2(20ng/ml) და გლუტამატის ანტაგონისტების - 10^{-6} M MK-801, NBQX და LY 367385 დამატებით, როგორც აღნიშნულია მეთოდებში. საკონტროლო და CF ჯგუფიდან მიღებული ლიმფოციტები ექვემდებარება ELISA ანალიზს, ციტოკინების რაოდენობრივი განსაზღვრისთვის, როგორც აღწერილია მეთოდებში.

ამგვარად, მიღებული შედეგები აჩვენებს, რომ გლუტამატის გავლენა IL-10 -ის სეკრეციაზე, საკონტროლო პირების ლიმფოციტების მიერ, განპირობებულია მეტაბოტროპული რეცეპტორის - mGluR1 საშუალებით. ჩვენი ჰიპოთეზის დადასტურების მიზნით, იმის თაობაზე, რომ CF პაციენტების ლიმფოციტებში, გლუტამატის ზეგავლენით, ადგილი აქვს მეტაბოტროპული რეცეპტორის - mGluR1 ექსპრესიის შემცირებას, კვლევის შემდგომ ეტაპზე შევისწავლეთ ლიმფოციტების ზედაპირზე მეტაბოტროპული რეცეპტორის - mGluR1 ტოტალური ექსპრესია. ამისათვის პირველ ეტაპზე განვსაზღვრეთ სოლუბილიზირებულ პლაზმურ მემბრანაში mGluR1a/b სუბერთეულის შემცველობა. ჩვენს მიერ მიღებული შედეგი ამყარებს ჰიპოთეზას იმის შესახებ, რომ კისტური ფიბროზის მქონე პაციენტებიდან მიღებული ლიმფოციტების ზედაპირზე ადგილი აქვს mGluR1a/b სუბერთეულის ექსპრესიის შემცირებას საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით, რაც გამოიხატება ლიმფოციტების ზედაპირზე ამ სუბერთეულის down-რეგულაციით. ჩვენს მიერ მიღებული შედეგი ეთანხმება ლიტერატურულ მოსაზრებას იმის თაობაზე, რომ

mGluR1 რეცეპტორული კომპლექსის ექსპრესია პაციენტების ლიმფოციტებში მნიშვნელოვნად დაბალია. (გრაფიკი.3).



გრაფიკი.3. CFTR, CAL, NHERF1, mGluR1 და β-actin ცილების western ბლოტინგი და იმუნოპრეციპიტაცია შესაბამისი ანტისხეულებით საკონტროლო და CF ლიმფოციტებიდან მიღებულ სოლუბილიზებულ მემბრანულ ცილებში.

საკონტროლო და CF ლიმფოციტებიდან მიღებულ სოლუბილიზებული მემბრანულ ცილოვანი ფრაქციები ექვემდებარება SDS-PAGE საშუალებით დაყოფას და იმუნოპრეციპიტაციას შესაბამისი ანტისხეულებით, როგორც ეს აღწერილია მეთოდებში.

ხოლო რაც შეეხება ციტოზოლურ ფრაქციებს, გლუტამატური რეცეპტორის ექსპრესიის რაიმე სახის ცვლილება არ აღინიშნებოდა. იმის აღმოსაჩენად, თუ როგორ არის დაკავშირებული mGluR1 რეცეპტორული კომპლექსის შემცირება ქლორის იონების სატრანსპორტო ტრანსმემბრანული არხის (CFTR) მუტაციურ ცვლილებასთან, ჩავატარეთ იმუნოპრეციპიტაციის ექსპერიმენტი, რის საშუალებითაც განვსაზღვრეთ CFTR-თან დაკავშირებული ცილოვანი კომპლექსები. როგორც სხვადასხვა კვლევებმა აჩვენა, ცილა CFTR-ის სწორი გადაადგილებისთვის საჭიროა ცილა-ცილოვანი ურთიერთქმედების შედეგად მიღებული კომპლექსები,

მათ შორის PDZ დომენის შემცველი ცილები, როგორცაა - PSD-95 (Guggino and Stanton, 2006). ერთ-ერთ ასეთ PDZ დომენის შემცველ ცილას წარმოადგენს CAL პროტეინი. ქლორის იონების სატრანსპორტო ტრანსმემბრანული არხი (CFTR) C ტერმინალური ბოლოს საშუალებით შეიძლება უკავშირდებოდეს სხვადასხვა PDZ დომენის შემცველი ცილებს, მათ შორის, როგორცაა Na^+/H^+ იონების სატრანსპორტო ცილა - (NHERF) ან CFTR-თან ასოცირებული ცილა-CAL (Cheng et al., 2002; Broere et al., 2007;). ჩამოთვლილი ცილებიდან რომელიმე, მაგალითად ცილა - NHERF1 შეიძლება ახდენდეს მუტირებული CFTR-ის ფუნქციის კორექციას (Bossard et al., 2007;), რაც იძლევა ვარაუდის საშუალებას, იმის შესახებ, რომ PDZ დომენის საშუალებით განპირობებული ცილა-ცილოვანი კავშირები, უაღრესად მნიშვნელოვანია ლიმფოციტების ზედაპირზე მუტირებული ცილა- CFTR-ის ექსპრესიის პროცესში. მეორეს მხრივ, სხვადასხვა PDZ დომენის შემცველი ცილები, ასევე უკავშირდებიან გლუტამატის რეცეპტორის სუბტიპს-mGluR1a/b, რაც მნიშვნელოვანია შესაბამისი სივრცული სასიგნალო მექანიზმის ფორმირებისათვის (Kim and Sheng, 2004). იმ ფაქტის შესამოწმებლად თუ როგორ ხდება ლიმფოციტების პლაზმურ მემბრანაში CFTR-თან დაკავშირებული გლუტამატური რეცეპტორის ექსპრესია, ჩვენ შევეცადეთ განგვესაზღვრა mGluR1a/b რეცეპტორული კომპლექსის დეტექცია, როგორც საკონტროლო, ასევე CF პაციენტების ლიმფოციტებში, იმუნოპრეციპიტაციის და ბლოტინგის ექსპერიმენტების შემდგომ. პირველ ეტაპზე ლიმფოციტებიდან მიღებული, სოლუბილიზირებულ მემბრანულ ფრაქციები ინკუბირებულ იქნა ანტი-CFTR ანტისხეულთან, რათა მოგვეხდინა ცილა - CFTR იმუნოპრეციპიტაცია, ხოლო შემდგომ ეტაპზე მიღებული იმუნოპრეციპიტატი შევამოწმეთ როგორც mGluR1a/b რეცეპტორული კომპლექსთან მიმართებაში, ასევე ადაპტორული ცილების CAL და NHERF1 მიმართ, შესაბამისი ანტისხეულების გამოყენებით. როგორც ექსპერიმენტის შედეგებმა აჩვენა საკონტროლო პირების ლიმფოციტებში შეინიშნება ძლიერი დაკავშირება ცილა-CFTR და გლუტამატური რეცეპტორის ამ სუბტიპს -mGluR1a/b შორის, რაც ადასტურებს ამ ორ ცილას შორის ფიზიკურ კავშირს (გრაფიკი.3). საინტერესო აღმოჩნდა ის ფაქტი, რომ CF პაციენტების ლიმფოციტებში შეინიშნებოდა ზემოაღნიშნული ცილოვანი კომპლექსებს შორის კავშირის შესუსტება საკონტროლო პირების ლიმფოციტებთან

შედარებით. აღნიშნული ცილა-ცილოვანი კავშირების არსებობის დასადასტურებლად, ჩავატარეთ ზემოთაღწერილი ექსპერიმენტის შეზღუდული ექსპერიმენტი - სოლუბილიზირებული პლაზმური მემბრანები ვაინკუბირეთ ანტი-mGluR1a/b ანტისხეულთან, ხოლო შემდგომ შევამოწმეთ ცილა-CFTR-თან მიმართებაში. მიღებული შედეგის თანახმად, მხოლოდ საკონტროლო პირების ლიმფოციტებში მოხდა CFTR-ის დეტექცია. ხოლო რაც შეეხება CF პაციენტების ლიმფოციტებს, არ შეინიშნებოდა mGluR1a/b რეცეპტორულ კომპლექსსა და CFTR-ს შორის რაიმე სახის მნიშვნელოვანი ურთიერთქმედება, რაც ადასტურებს მოსაზრებას, CF პაციენტების ლიმფოციტებში ამ ორი ცილოვანი კომპლექსის უჯრედული კავშირის არარსებობის შესახებ.

ადაპტორული ცილა-CAL, ასრულებს მნიშვნელოვან როლს როგორც CFTR-ის ისე mGluR1 ცილების შიდაუჯრედულ გადაადგილებასა და ლოკალიზაციის პროცესებში (Cheng et al., 2002; Wolde et al., 2007;). მეორეს მხრივ mGluR1a/b რეცეპტორული სუბერთეული C ტერმინალური ბოლოს საშუალებით უკავშირდება ცილა CAL-ის PDZ დომენს (Zhang et al., 2008). ამგვარად, CAL ადაპტორულ ცილას, რომელიც მონაწილეობს ორივე - CFTR -ის და mGluR1a/b ცილოვანი მოლეკულების გადაადგილებაში. ჩვენი ექსპერიმენტების შედეგად აღმოჩნდა, რომ საკონტროლო პირების ლიმფოციტების პლაზმურ მემბრანებში ხდება ცილა-CAL-ის მნიშვნელოვანი რაოდენობის ექსპრესია CFTR-თან ერთად. მაშინ როცა არანაირი განსხვავება არ აღმოჩნდა ცილა-CAL-ის და mGluR1 სუბერთეულის დაკავშირების პროცესში, როგორც საკონტროლო, ისე CF პაციენტების ლიმფოციტებში. (Fig. 3). მიღებული შედეგებიდან, გამომდინარე, დავსკვნით, რომ ცილა-CFTR და mGluR1 გლუტამატური რეცეპტორის სუბტიპი, შესაძლოა ერთმანეთის კონკურენტულ ცილებს წარმოადგენენ ცილა-CAL-ის დაკავშირების პროცესში, ხოლო ამ უკანასკნელის ჭარბი ექსპრესია CF პაციენტების ლიმფოციტებზე სავარაუდოდ იწვევდეს mGluR1 გლუტამატური რეცეპტორის გადაადგილების შემცირებას.

ცილა-CFTR და mGluR1 გლუტამატური რეცეპტორის სუბტიპს შორის კავშირი შესაძლოა განპირობებული იყოს შემფუთველ ცილა NHERF1 საშუალებით. ეს ცილა შეიცავს ორ PDZ დომენს, რითაც მას შეუძლია დაუკავშირდეს CFTR-ის COOH ბოლოს პირველი დომენის საშუალებით (Wang et al., 1998); მაშინ როცა მეორე PDZ

დომენი რჩება ხელმისაწვდომი სხვადასხვა პროტეინების დაკავშირებისთვის (Mohler et al., 1999). ამგვარად, კვლევის შემდგომ ექსპერიმენტებში განსაზღვრულ იქნა ადაპტორული ცილა-NHERF1 და CFTR-ის შორის, ასევე NHERF1-სა და mGluR1 შორის შესაძლო ცილოვანი კავშირები. მიღებული შედეგებიდან აღმოჩნდა, რომ ზემოაღნიშნულ ცილოვან კომპლექსებს შორის არ შეინიშნება არანაირი სხვაობა საკონტროლო პირებისა და CF პაციენტების ლიმფოციტებს შორის (ილუსტრ.3). მიღებული მონაცემები საშუალებას გვაძლევს, დავასკვნათ, რომ ადაპტორული ცილა-NHERF1 არ თამაშობს მნიშვნელოვან როლს ცილა -CFTR- ს და mGluR1 ცილოვანი კომპლექსის down -რეგულაციაში.

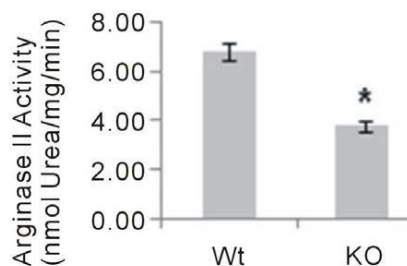
თავი 2. ნორმალური და IL-10 გენის მიხედვით ნოკაუტირებულ(KO)

თაგვების ტვინიდან მიღებულ სინაპტონეიროსომებში IL-10-

ის ნეიროპროტექტორული ეფექტების შესწავლა.

2.1 არგინაზას აქტივობა, პოლიამინების და NO დონე KO და Wt სინაპტონეიროსომებში.

თავის ტვინში არგინაზა I (AI) და არგინაზა II (AII) იზოფერმენტები აღმოჩენილია მხოლოდ ნეირონებში და განსაკუთრებით ძლიერი ექსპრესია ახასიათებთ თავის ტვინის ქერქში (Yu et al., 2001). არგინაზა II, რომელიც უპირატესად მიტოქონდრიული ფერმენტია, ახასიათებს ძლიერი ექსპრესია აღნიშნულ ორგანოიდში და ფუნქციონირებს ძირითადად ორნიტინის წარმოქმნით, რომელიც პროლინის, გლუტამატის და პოლიამინების სინთეზის პრეკურსორია. არგინაზას ორივე ტიპის იზოფორმის ექსპრესია კონტროლდება IL-10-ის მიერ (Lang et al., 2002). ამგვარად, პირველ რიგში, ჩვენს მიერ განსაზღვრული იყო არგინაზა II-ის აქტივობა მიტოქონდრიებში და სინაპტონეიროსომის სოლუბილიზირებულ ფრაქციაში, რომლებიც გამოყოფილი იყო Wt და KO თაგვების ტვინიდან (გრაფიკი.4)

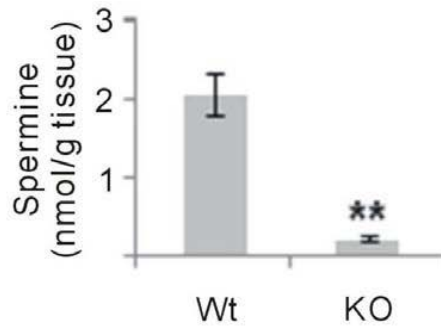


გრაფიკი.4 არგინაზა II განიცდის down-რეგულაციას KO თაგვების ტვინში

არგინაზა II აქტივობა იზომება სინაპტონეიროსომების მიტოქონდრიალურ ფრაქციაში, როგორც აღწერილია გამოყენებულ მეთოდებში.

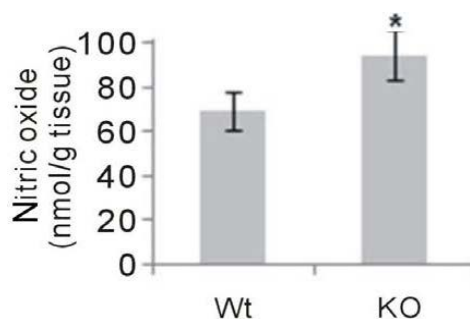
ჩვენს მიერ მიღებული მონაცემების მიხედვით, არგინაზა II-ის აქტივობა უფრო დაბალია IL-10-ის დეფიციტის მქონე თაგვების ტვინში, მაშინ, როდესაც არგინაზა I-ის აქტივობა მნიშვნელოვნად არ იცვლება და მსგავსია ორივე ტიპის თაგვებიდან მიღებულ სინაპტონეიროსომებში.

პოლიამინები L-არგინინის არგინაზათი მეტაბოლიზმის ძირითადი პროდუქტებია. ორნიტინი მოქმედებს, როგორც სასტარტო სუბსტრატი, რომელიც გარდაიქმნება პუტრესცინად, სპერმიდინად და სპერმინად. იმისთვის, რომ გაგვეგო არგინაზა II აქტივობის ცვლილება როგორ აისახება პოლიამინების მეტაბოლიზმზე, ცდების შემდგომ სერიაში, ჩვენ განვსაზღვრეთ პოლიამინების მეტაბოლიზმის საბოლოო პროდუქტის-სპერმინის შემცველობა ციტოპლაზმურ ფრაქციაში და ვნახეთ, რომ სპერმინის შემცველობა Wt თაგვების ტვინში ერთი რიგით მაღალია, ვიდრე KO თაგვებში (გრაფიკი.5).



გრაფიკი.5 სპერმინი განიცდიან დაქვეითებული რეგულაციას KO თაგვების ტვინში KO და Wt თაგვების ტვინიდან მიღებულ ციტოპლაზმურ ფრაქცია ექვემდებარება HPLC ანალიზს სპერმინის განსაზღვრისთვის, როგორც აღწერილია გამოყენებულ მეთოდებში.

ეს მონაცემები მიუთითებს, რომ IL-10-ის დეფიციტი, იწვევს რა არგინაზას აქტივობის შემცირებას, შესაბამისად, განაპირობებს არგინაზას მეტაბოლიზმის პროდუქტების სინთეზის შემცირებას, კონკრეტულად, კი სპერმინის სინთეზის დაქვეითებას. ვინაიდან არგინაზა გარდაქმნის არგინინს ორნიტინად, კონკურენტულად თრგუნავს L-არგინინის NOS და არგინაზა II მნიშვნელოვან როლს ასრულებს აზოტის ოქსიდის სინთეზის down-რეგულაციაში. ცდების შემდგომ სერიაში ჩვენ განვსაზღვრეთ NO-ს შემცველობა სინაპტოპლაზმაში (სოლუბილიზირებული ფრაქცია, რომელიც მიღებულია სინაპტონეიროსომების ცენტრიფუგირების შემდეგ) და ვნახეთ, რომ აზოტის ოქსიდის სინთაზას (NOS) ძირითადი აქტივობა KO თაგვებიდან მიღებულ სინაპტოპლაზმაში უფრო მაღალია Wt თაგვებიდან მიღებულ სინაპტოპლაზმასთან შედარებით. (გრაფიკი.6).

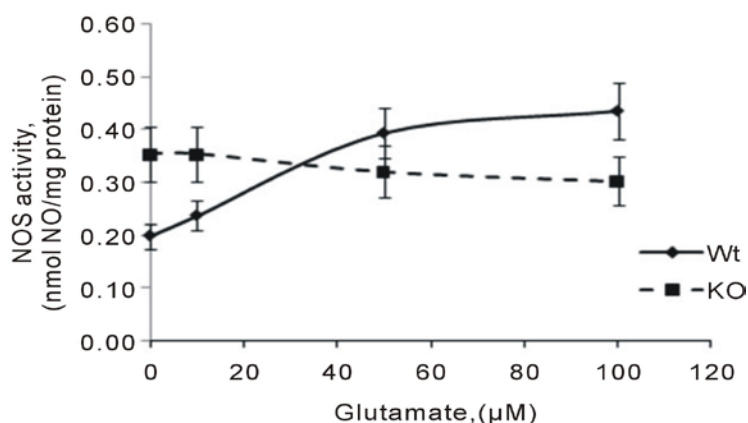


გრაფიკი.6. აზოტის ოქსიდის ცვლილება KO და Wt თაგვების ტვინიდან მიღებულ ციტოპლაზმურ ფრაქციებში.

მიღებული შედეგები მიუთითებს, რომ არგინაზას აქტივობის შემცირება KO თავგებში, შესაძლოა იწვევდეს არგინინის მოხმარების გაძლიერებას NO-ს სინთეზის მიზნით.

2.2 mGluR1-ის როლი გლუტამატ-დამოკიდებულ აზოტის ოქსიდის პროდუქციაზე.

ვინაიდან NO-ს კონცენტრაციის ცვლილება ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში დამოკიდებულია გლუტამატერგული ნეიროტრანსმისიის ინტენსივობაზე, ცდების შემდგომ სერიებში განვსაზღვრეთ NOS აქტივობა გლუტამატის სხვადასხვა კონცენტრაციების თანაობისას. როგორც მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა, გლუტამატი იწვევს NOS სინთეზის ცვლილებას დოზა-დამოკიდებული გზით, მხოლოდ Wt სინაპტონეიროსომებში, მაშინ როცა KO თავგებიდან მიღებულ სინაპტონეიროსომებში აზოტის ოქსიდის სინთეზი მნიშვნელოვნად არ იცვლება. (გრაფიკი.7.)



გრაფიკი.7. აზოტის ოქსიდის გლუტამატ-დამოკიდებული პროდუქცია KO და Wt სინაპტო-ნეიროსომებში.

KO და Wt თავგების ტვინიდან გამოყოფილი სინაპტონეიროსომები ინკუბირებულია გლუტამატის სხვადასხვა კონცენტრაციებთან. აზოტის ოქსიდის პროდუქციის ანალიზი აღწერილია გამოყენებულ მეთოდებში.

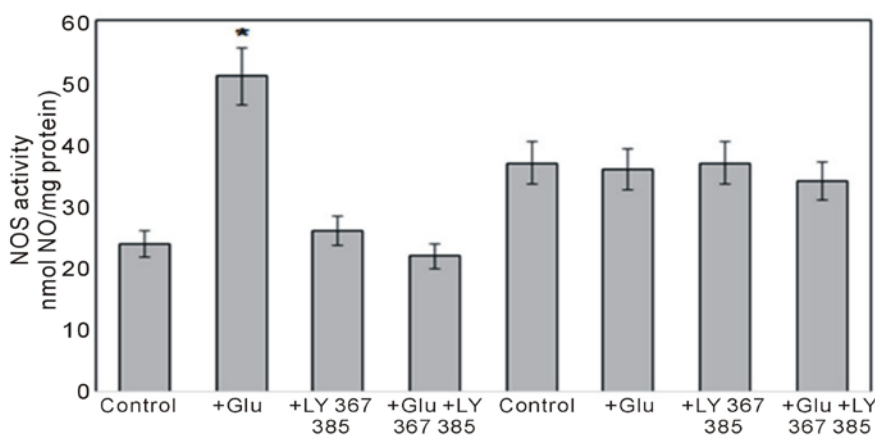
ჩვეულებრივ NOS აქტივობა მაღალია KO თაგვებში, ვიდრე Wt სინაპტონეიროსომებში. ეს მონაცემები აჩვენებს, რომ მიუხედავად NOS აქტივობის მომატებისა KO სინაპტონეიროსომებში, აზოტის ოქსიდის სინთეზი ნაკლებად მგრძნობიარეა გლუტამატის მიმართ KO თაგვებში. დადგენილია, რომ NMDA რეცეპტორის ძლიერ სტიმულაციას შეუძლია გაზარდოს Ca^{2+} ლოკალური კონცენტრაცია, რაც ააქტივებს ნეირონულ აზოტის ოქსიდის სინთაზას (nNOS), მისი დაკავშირებით PSD-95 ცილასთან (Rameu et al., 2003).). გარდა ამისა, ბევრი მონაცემი მიუთითებს, რომ I ჯგუფის გლუტამატის მეტაბოტროპული რეცეპტორი (mGluR 1 და 5) ზრდის NOS-ის აქტივობას ენდოპლაზმური Ca^{2+} დაგროვებით ფოსფოლიპაზა C/ინოზიტოლ-1,4,5-ტრი-ფოსფატური გზით (Nicoletti et al., 2011). გლუტამატ-დამოკიდებული NOS აქტივობის გაუარესება შესაძლებელია გამოწვეული იყოს ან NMDA ტიპის, ან მეტაბოტროპული გლუტამატის რეცეპტორის დაბალი ექსპრესიით KO თაგვებში. ამ მიზნით ცდების შემდგომ სერიაში ჩვენ განვსაზღვრეთ NMDA რეცეპტორის NMDAR2A და NMDAR2B სუბერთეულების და mGluR type 1a/b შემცველობა, ისევე როგორც NMDAR2B-დაკავშირებული nNOS-ის დონე Wt და KO სინაპტონეიროსომებში. როგორც მიღებული შედეგები აჩვენებს, nNOS-ის დონე, ისევე როგორც NMDA რეცეპტორის სუბერთეულების (NR2A და NR2B) დონე KO თაგვებში არ იყო შეცვლილი, Wt თაგვებთან შედარებით. მაშინ როდესაც, mGluR1a/b რეცეპტორის დონე (შემცველობა) მნიშვნელოვნად შემცირდა KO თაგვების სინაპტონეიროსომების პლაზმურ მემბრანაზე (გრაფიკი.8.).



გრაფიკი. 8. nNOS, iNOS, NR2A, NR2B და mGluR1 Western ბლოტი KO და WT თაგვების სინაპტონეიროსომებში.

Wt და *KO* თაგვების სინაპტონეიროსომებიდან მიღებული პლაზმური მემბრანის სოლუბილიზირებული ცილები ინკუბირებულია ანტი-NMDAR-2B ანტისხეულებთან და იმუნოპრეციპიტირებულია ცილა A/G-აგაროზით. ჩატარებულია ნალექის SDS-PAGE ელექტროფორეზი და Western ბლოტი nNOS-თვის, როგორც აღწერილია გამოყენებულ მეთოდებში.

მიღებული მონაცემები აჩვენებს, რომ IL-10 დეფიციტის მქონე თაგვებში, მცირდება მხოლოდ mGluR1a/b-ს ექსპრესია, მაშინ როდესაც NMDA რეცეპტორის სუბერთეულების დონე არ იცვლება. იმისთვის, რომ გაგვერკვია, mGluR-ის შემცირებული ექსპრესია პლაზმურ მემბრანაზე როგორ მოქმედებს NO-ს სინთეზზე, ჩვენ განვსაზღვრეთ აზოტის ოქსიდის სინთეზი სინაპტონეიროსომებში mGluR1a/b-ს ანტაგონისტის - LY367385-ის თანაობისას. მიღებული შედეგები აჩვენებს, რომ სინაპტონეიროსომებზე LY367385-ის დამატება ხსნის გლუტამატის სტიმულატორულ ეფექტს NO-ს სინთეზზე *Wt* სინაპტონეიროსომებში, მაშინ როდესაც *KO* სინაპტონეიროსომებზე ამ ანტაგონისტის თანაობა არ ცვლის აზოტის ოქსიდის პროდუქციას (გრაფიკი.9).



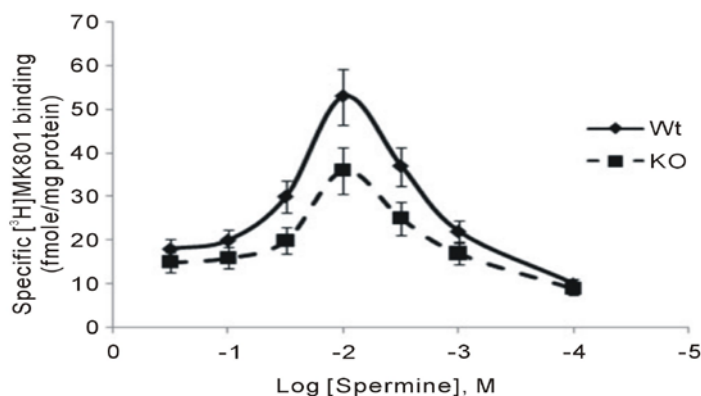
გრაფიკი.9. mGluR-ის ანტაგონისტი LY367385 ბლოკირებს აზოტის ოქსიდის გლუტამატ-დამოკიდებულ პროდუქციას *KO* თაგვების სინაპტონეიროსომებში.

KO და *Wt* თაგვების ტვინიდან მიღებული სინაპტონეიროსომები ინკუბირებულია $100 \mu M$ გლუტამატთან და $10 \mu M$ LY367385. აზოტის ოქსიდის პროდუქციის ანალიზი ჩატარდა როგორც აღწერილია გამოყენებულ მეთოდებში.

ეს მონაცემები მიუთითებს პირველ რიგში იმაზე, რომ Wt სინაპტონერიოსომებში გლუტამატ-დამოკიდებული NO-ს სინთეზი გაიზარდა mGluR რეცეპტორის აქტივაციით და მეორე, NO-სინთეზი შესუსტებულია mGluR რეცეპტორის ექსპრესიის down-რეგულაციით.

2.3 სპერმინი და ნატრიუმის ნიტროპრუსიდი აძლიერებენ $[^3H]$ MK-801-ის დაკავშირებას.

ინტერლეიკინი (IL)-10 თრგუნავს IL-1 β -ს ინჰიბიტორულ ეფექტს გლუტამატის გამოთავისუფლებაზე და გახანგრძლივებულ პოტენციალიაზე IL-1 β -ს პრო-ოქსიდაციური ეფექტის დათრგუნვით. (Kelly et al., 2001). რადგან არსებული მონაცემებით NMDA რეცეპტორი მონაწილეობს ამ პროცესებში, ჩვენ ცდების შემდგომ სერიაში ჩავატარეთ NMDA რეცეპტორის მოდულატორული საიტების ანალიზი. NMDA რეცეპტორის იმ საიტებს შორის, რომლებიც მოდულირებენ IL-10-ის მოქმედებით, შესაძლებელია იყოს პოლიამინების და ენდოგენური NO-ს დონორების მიმართ მგრძნობიარე საიტი (Traynelis et al., 2010). აქედან გამომდინარე, ჩვენ განვსაზღვრეთ სპერმინის ეფექტი MK-801-ის დაკავშირებაზე პლაზმურ მემბრანაზე, რომელიც გამოყოფილია KO და Wt თაგვების თავის ტვინიდან. გაანალიზებულ იქნა სპერმინის გაზრდილი პროფილი $[^3H]$ MK-801-ის დაკავშირებისას და მრუდის ორი ძირითადი კომპონენტი - აღმავალი ფაზა და ინჰიბიტორული ფაზა. მაღალი კონცენტრაციებისას ნაპოვნია იქნა ორივე ტიპის თაგვებში. მრუდის ანალიზმა აჩვენა, რომ Wt თაგვების ტვინიდან მიღებულ პლაზმურ მემბრანას ჰქონდა უფრო მაღალი მაქსიმუმი, KO თაგვებიდან მიღებულ პლაზმურ მემბრანასთან შედარებით, სხვა სტატისტიკურად სარწმუნო განსხვავება არ აღინიშნა (გრაფიკი.10).



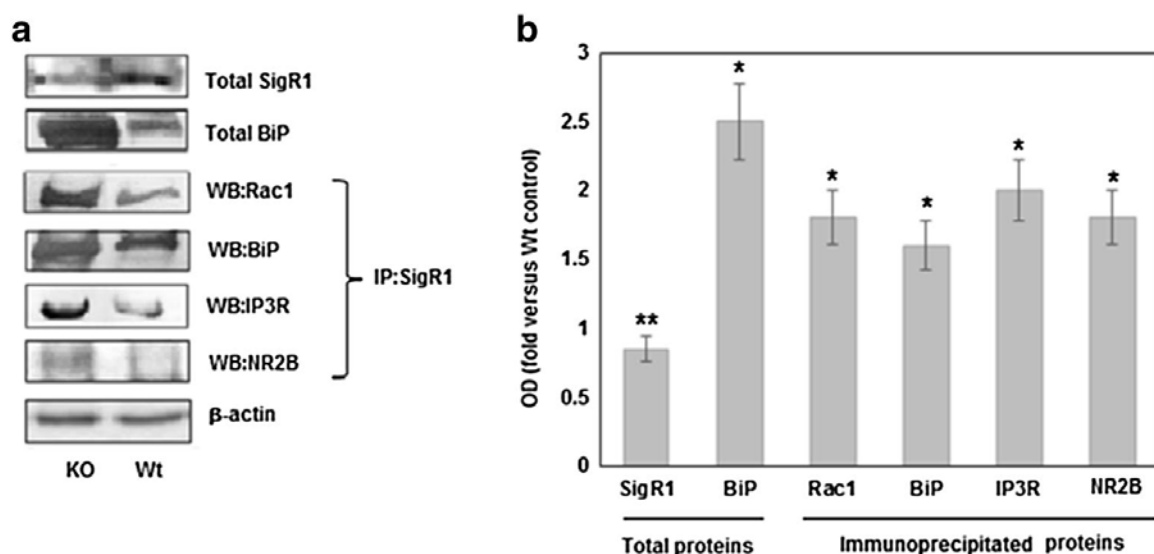
გრაფიკი.10. სპერმინის ეფექტი $[^3\text{H}]\text{MK-801}$ სპეციფიკურ დაკავშირებაზე პლაზმურ მემბრანაზე, რომელიც მიღებულია KO და Wt სინაპტონეიროსომებიდან.

პლაზმური მემბრანები მიღებული KO და Wt სინაპტონეიროსომებიდან $2 \text{ nM } [^3\text{H}] \text{MK-801}$ ინკუბირების შემდგომ და სპერმინის ($1\text{-}10,000 \text{ nM}$) კონცენტრაციის ფარგლებში განსაზღვრულ იქნა აღწერილი მეთოდების შესაბამისად.

ეს მონაცემები მიგვითითებს, რომ NMDA რეცეპტორს KO თავებში დაკარგული აქვს სენსიტიურობა სპერმინის მიმართ. ორივე GluR1 და GluR2 სუბერთეულები ექვემდებარება S-ნიტროზილირებას ცისტეინის SH-ჯგუფზე ენდოგენური NO-ს და ეგზოგენურად S-ნიტროზოთიოლის დამატებით. (Choi et al., 2000). ამიტომ ჩვენ შევეცადეთ დაგვედგინა ნატრიუმის ნიტროპრუსიდის (SNP) ეფექტი, რომელიც ხშირად გამოიყენება როგორც NO-ს დონორი, $[^3\text{H}]\text{MK-801}$ -ის დაკავშირებაზე NMDA რეცეპტორთან სინაპტონეიროსომებში. აღმოჩნდა, რომ IC_{50} ნიტროპრუსიდისთვის Wt და KO სინაპტონეიროსომებში მნიშვნელოვნად არ შეცვლილა. IC_{50} SNP-თვის Wt სინაპტონეიროსომებში იყო $283.6 \pm 20.9 \mu\text{M}$, მაშინ როდესაც, KO სინაპტონეიროსომებში SNP-თვის იყო $254.9 \pm 32.3 \mu\text{M}$. ეს მონაცემები მიგვითითებს, რომ IL-10-ის დეფიციტი არ ცვლის აზოტის ოქსიდის მოდულატორულ უნარს NMDA რეცეპტორის მიმართ.

თავი 3. ნორმალური და IL-10 გენის მიხედვით ნოკაუტირებული (KO) თავგების ტვინიდან მიღებულ სინაპტონერიოსომებში IL-10-ის დეფიციტის მნიშვნელობის შესწავლა ენდოპლაზმური რეტიკულუმის სტრესის განვითარებაში.

ენდოპლაზმურ ბადეზე ცილების გაძლიერებული ძვრადობა და დარღვეული პროცესინგი, ცნობილია, როგორც ენდოპლაზმური რეტიკულუმის სტრესის (ER) სახელწოდებით. იგი წარმოადგენს ძირითად უჯრედულ პროცესს, რომელიც გადამწყვეტ როლს ასრულებს სხვადასხვა ნეიროდეგენერაციული დაავადებების განვითარებაში (Cuervo et al., 2010; Hol and Scheper, 2008; Kundu and Thompson, 2008). ლიტერატურული მონაცემების თანახმად, ეპითელურ უჯრედებში IL-10, NADPH ოქსიდაზასთან (NOX) ერთად, იწვევს ენდოპლაზმური სტრესის შემსუბუქებას, შესაბამისად, ამცირებს ანთებითი პროცესის მიმართ ინტენსივობას (Treton X, Pedruzzi E, Cazals-Hatem D, Grodet A, Panis Y, et al. 2011). იმის გამოსავლენად, თუ როგორ მონაწილეობს IL-10, ნერვულ უჯრედებში მიმდინარე ენდოპლაზმურ სტრესში, განვსაზღვრეთ ორი ჩაპერონული ცილის - BiP და SigR1 შემცველობა KO თავგების ტვინში. მიღებული შედეგების მიხედვით აღმოჩნდა, რომ BiP რაოდენობა მნიშვნელოვნად მომატებულია KO თავგების ტვინში, მაშინ როცა SigR1 შემცველობა არ იცვლება მნიშვნელოვნად.

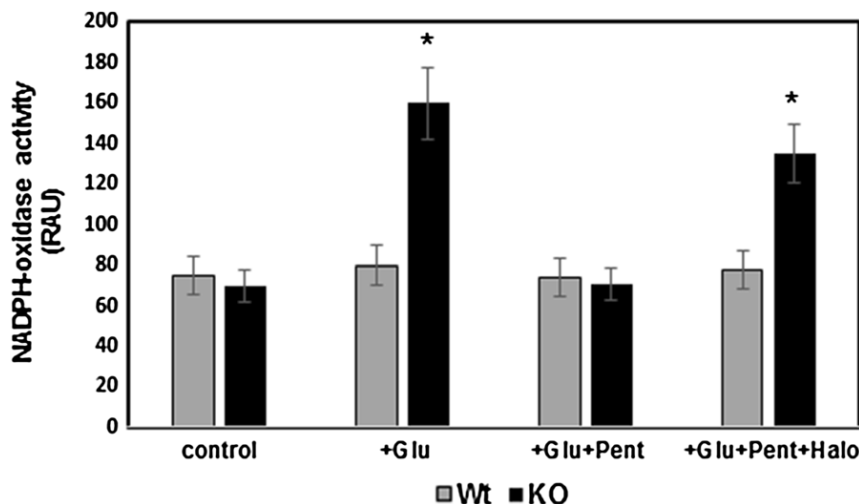


გრაფიკი.11. SigR1, BiP, Rac1, IP3R და NR2B ცილების ანალიზი Western ბლოტინგის საშუალებით KO და Wt თავგების მეშვეობით პრეპარატებში

ცილების *SigR1* და *BiP* რაოდენობა განსაზღვრულ იქნა მემბრანულ პრეპარატებში. იმუნოპრეციპიტაციისთვის გამოყენებულ იქნა ანტი-*Sig1R* ანტისხეული. იმუნოპრეციპიტატების ანალიზი მოხდა *SDS-PAGE* ფორეზის საშუალებით, ისე როგორც აღწერილია მეთოდებში.

იმ ფაქტის შესაფასებლად, თუ როგორ არის სიგმა რეცეპტორი დაკავშირებული ცილა-BiP და ინოზიტოლ-ტრიფოსფატის რეცეპტორთან (IP3R), ჩვენ ჩავატარეთ კოიმუნოპრეციპიტაციის ექსპერიმენტი. მემბრანული პრეპარატები დავლექეთ აგაროზასთან დაკავშირებული სიგმა რეცეპტორის ანტისხეულით, ხოლო შემდეგ ჩავატარეთ ამ ცილების განსაზღვრა ვესტერნ-ბლოტინგის გამოყენებით. მიღებულმა შედეგმა აჩვენა, რომ სიგმა რეცეპტორის დაკავშირება ცილა-BiP და ინოზიტოლ-ტრიფოსფატის რეცეპტორთან (IP3R) არის ძალიან მაღალი IL-10 გენის მიხედვით ნოკაუტირებული (KO) თაგვების ტვინის მემბრანებში, ვიდრე არანოკაუტირებულ (WT) თაგვებში. ჩვენმა კვლევებმა ასევე ცხადყო, რომ სიგმა რეცეპტორს შეეძლო პირდაპირ ურთიერთქმედება Rac1 ცილასთან მულტიცილოვანი კომპლექსის - IP3R/Sig1R/Bcl-2/Rac1 საშუალებით. (Natsvlishvili N, Goguadze N, Zhuravliova E, Mikeladze D. 2015) ექსპერიმენტების მომდევნო სერიებში, ჩვენ განვსაზღვრეთ Rac1 და Sig1R ცილების ურთიერთკავშირი KO თაგვების ტვინში. ჩვენმა შედეგებმა აჩვენა, რომ Rac1 და Sig1R ცილების ურთიერთკავშირი მაღალია თაგვების ამ ჯგუფში (გრაფიკი.11). პლაზმურ მემბრანებთან დაკავშირებული Rac1-NADPH ოქსიდაზას კომპლექსმა შესაძლოა ითამაშოს ძირითადი როლი გლუტამატით ინდუცირებული უჯრედების აპოპტოზურ სიკვდილში ჟანგბადის რეაქტიული სახეობების (ROS) მომატების გზით (Nikolava, Lee YS, Kim JA, 2005). გარდა ამისა, Rac ცილის აქტიურობა დაკავშირებულია უჯრედის ენდოპლაზმურ სტრესთან (ER), ეს პროცესი კი თავის მხრივ იწვევს ცილა-შაპერონების სხვადასხვა სახის ცვლილებებს (Li J, Zhu H, Shen E, Wan L, Arnold JM, Peng T, 2010; Cao SS, Kaufman RJ, 2014). აქედან გამომდინარე, ცდების შემდგომ ეტაპზე განვსაზღვრეთ NADPH ოქსიდაზას აქტივობა გლუტამატის და სიგმა ლიგანდების თანაობისას. როგორც ჩვენს მიერ მიღებული შედეგები აჩვენებს, არც გლუტამატის და არც სიგმა ლიგანდები, როგორც ერთდროულად, ასევე ცალ/ცალკე არ ცვლიან NADPH ოქსიდაზას აქტივობას Wt თაგვებიდან მიღებულ სინაპტონერიოსომულ მემბრანებში, ხოლო რაც შეეხება (KO)

თაგვების სინაპტონერიოსომულ მემბრანებს, ამ შემთხვევაში გლუტამატის გავლენით მნიშვნელოვნად იცვლება NADPH ოქსიდაზას აქტივობა და შესაბამისად იმატებს ჟანგბადის რეაქტიული ფორმების (ROS) ნაერთების პროდუქცია (გრაფიკი. 12).



გრაფიკი.12. NADPH ოქსიდაზას აქტივობის ცვლილება გლუტამატის, (+)-პენტაზოცინის და ჰალოპერიდოლის გავლენით KO და Wt თაგვების ტვინებში.

მემბრანული პრეპარატები ინკუბირებულ იქნა (Glu), (Halo) და (Pent) შესაბამისი კონცენტრაციით, NADPH ოქსიდაზას აქტივობა განსაზღვრულ იქნა აღწერილი მეთოდის შესაბამისად.

გლუტამატიტ განპირობებული NADPH ოქსიდაზას აქტივობა მცირდება სიგმა ლიგანდის – (+) პენტაზოცინის თანაობისას, მაშინ როცა სიგმას ანტაგონისტი–ჰალოპერიდოლი აუქმებს პენტაზოცინის ეფექტს. აღსანიშნავია, რომ იგივე შედეგი იქნა მიღებული ცილა 4-PPBP (სიგმა- 1 აგონისტი) დამატებით და ასევე 1 μ M BD1063 დამატების შემდგომ, რომელიც სიგმა რეცეპტორის ანტაგონისტია.

მიღებული შედეგების განხილვა

Pseudomonas aeruginosa წარმოადგენს ერთ-ერთ მიკროორგანიზმს, რომელიც იწვევს სასუნთქი გზების ქრონიკულ ინფექციას, თანდართული ანთებითი პროცესებით, რაც კისტური ფიბროზის მქონე (CF) პაციენტების ძირითად პრობლემას წარმოადგენს. თუმცა აღსანიშნავია, რომ ბაქტერიული ფაქტორი თავს იჩენს თანდაყოლილი იმუნიტეტის დაქვეითების შემთხვევაში, შედეგად ორგანიზმს აღარ შესწევს ინფექციური აგენტებთან ბრძოლის უნარი თანდაყოლილი იმუნიტეტის საშუალებით, ხოლო შემენილი იმუნიტეტი ვეღარ ახერხებს ბაქტერიული პათოგენის ელიმინაციას რესპირატორული ტრაქტიდან, რადგან აღნიშნული პათოლოგიისთვის დამახასიათებელია შეცვლილი T ჰელპერული უჯრედების იმუნური პასუხი და ციტოკინების პროდუქციის დარღვევა (Hartl et al., 2006; Brazova et al., 2005). უახლესი სამეცნიერო კვლევების თანახმად, ზემოთაღწერილი ცვლილებები განპირობებულია ლიმფოციტების უჯრედულ ზედაპირზე ქლორის იონების სატრანსპორტო ტრანსმემბრანული არხის (CFTR) მუტაციური ცვლილებებით, ხოლო T უჯრედების დისფუნქცია შემდგომ უკვე იწვევს შეცვლილ იმუნურ პასუხს (Mueller et al., 2011). ეს პროცესი თავის მხრივ ართულებს ზოგად მდგომარეობას, იმ თვალსაზრისით, რომ ორგანიზმს აღარ შესწევს მეორადად გამოწვეული ინფექციებთან ბრძოლის უნარი. ასევე საინტერესოა ის ფაქტი, რომ რესპირატორული გზების ანთებითი პროცესების დროს, ფილტვის ქსოვილებში გამოიყოფა დიდი რაოდენობით ენდოგენური წარმოშობის გლუტამატი (Said, 1999; Dickman et al., 2004; Wang et al., 2009), რის გამოც, შიდაუჯრედული გლუტამატის წარმოქმნის ერთ-ერთი წყარო შეიძლება იყოს დაზიანებული ნეიტროფილები (Collard et al., 2002). ხოლო მეორე წყარო გლუტამატის გამონთავისუფლებისა, განიხილება დენდრიტული უჯრედები, რომლებიც წარმოადგენენ ძირითად ანტიგენ-მაპრეზენტირებელ უჯრედებს და ამასთან ერთად მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ იმუნური პასუხის ფორმირებაში, T ლიმფოციტების დიფერენცირების და აქტივაციის გზით (Lanzavecchia and Sallusto, 2001). დენდრიტული უჯრედები გავრცელებულნი არიან მთლიან ფილტვის ქსოვილში, ქმნიან ე.წ. ბრონქიალურ ხეს პარენქიმულ ქსოვილში

და სასიცოცხლო როლს თამაშობენ იმუნური პასუხის კონტროლის მექანიზმებში (Von Garnier et al., 2005). ასევე სტიმულირებენ რა, სხვადასხვა ტიპის ლიმფოციტების წარმოქმნას-Th1 და Th2 უჯრედების ჩათვლით, აქედან გამომდინარე, მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ იმუნური პასუხის ფორმირების დროს სხვადასხვა ტიპის პათოგენების წინააღმდეგ.

ერთ-ერთი კვლევის თანახმად (Pacheco et al; 2004, 2006), რომელიც ჩატარებულ იქნა აღნიშნული საკითხის გარშემო, გაირკვა რომ დენდრიტული უჯრედები მომწიფების სტადიაზე და ასევე T ლიმფოციტებთან ურთიერთქმედების დროს, ათავისუფლებენ გლუტამატს ფიზიოლოგიური კონცენტრაციის ფარგლებში და გამოთავისუფლებული გლუტამატის ეს რაოდენობა იწვევს გლუტამატური რეცეპტორის გააქტივებას. როგორც აღმოჩნდა, ახდენს რა მეტაბოტროპული რეცეპტორის - mGluR5 გააქტივებას, იწვევს T ლიმფოციტების აქტივაციის დაქვეითებას. ანტიგენის არსებობის შემთხვევაში, T ლიმფოციტებზე ექსპრესირებული mGluR1 იწვევს T უჯრედების პროლიფერაციას, Th1 და პროანთებითი ციტოკინების სეკრეციას, მათ შორის IL-10-ის წარმოქმნას. ამგვარად, მომატებული გლუტამატის რაოდენობა შეიძლება გახდეს ძირითადი მიზეზი T ლიმფოციტების პოლარიზაციისა, შედეგად, ადგილი აქვს Th1 უჯრედებით განპირობებული იმუნური პასუხის განვითარებას.

ყველა ზემოთ ჩამოყალიბებული მოსაზრება ადასტურებს, რომ გლუტამატი შეიძლება იყოს ერთ-ერთი, ძირითადი რგოლი კისტური ფიბროზის პათოგენეზის პროცესში. ჩვენი შედეგებიდან ირკვევა, რომ IL-2-ის თანაობისას, CF ლიმფოციტები ახდენენ IL-8 და IL-10 ციტოკინების სეკრეციის მომატებას, შედარებით საკონტროლო პირებთან. ასევე უნდა აღინიშნოს, რომ გლუტამატი მნიშვნელოვნად ზრდის ანტი-ანთებითი ციტოკინის - IL-10-ის სეკრეციას მხოლოდ ჯანმრთელი პირების ლიმფოციტების მიერ, მაშინ როცა დაავადებული პირების ლიმფოციტები არ არიან მგრძნობიარე გლუტამატის მიმართ. აღნიშნული მონაცემები გვიჩვენებს, რომ ჯანმრთელი პირების ლიმფოციტები, ხასიათდებიან მაღალი ინტენსივობით გლუტამატის მიმართ და ახდენენ IL-10-ის მომატებულ ექსპრესიას, დაავადებული პირების ლიმფოციტებთან შედარებით. ჩვენმა შედეგებმა აჩვენა, რომ T ლიმფოციტებზე ექსპრესირებულია სხვადასხვა ტიპის იონოტროპული და

მეტაბოტროპული გლუტამატური რეცეპტორი (Lombardi et al., 2001; Ganor et al., 2003; Boldyrev et al., 2004; Miglio et al., 2005; Chiocchetti et al., 2006; Kvaratskhelia et al., 2009). აღნიშნული ორივე ტიპის რეცეპტორი მნიშვნელოვან როლს ასრულებს T ლიმფოციტების ფუნქციურ აქტივობაში, როგორც ნორმულ ასევე პათოლოგიურ მდგომარეობას შორის. როგორც ჩვენს მიერ მიღებული შედეგებიდან ჩანს, მეტაბოტროპული გლუტამატური რეცეპტორი - mGluR1 მონაწილეობს IL-10-ის სეკრეციის გაძლიერებაში საკონტროლო ჯგუფის ლიმფოციტების მიერ. აღნიშნული მოსაზრებას ადასტურებს ის ფაქტი, რომ არც იონოტროპული გლუტამატური NMDAR რეცეპტორის ანტაგონისტი-MK-801, არც მეტაბოტროპული გლუტამატური - AMPAR რეცეპტორის ანტაგონისტი - NBQX, არ ცვლიან გლუტამატის ზეგავლენას. მხოლოდ LY-367385, რომელიც წარმოადგენს 1^oჯგუფის გლუტამატის მეტაბოტროპული რეცეპტორის -mGluR ანტაგონისტს, მნიშვნელოვნად ამცირებს IL-10-ის სეკრეციას ჯანმრთელი პირების ლიმფოციტების მიერ. ჩვენს მიერ მიღებული ეს მონაცემები სრულიად ეთანხმება(Pacheco et al.2004)-ჯგუფის მოსაზრებას იმის თაობაზე, რომ mGluR1 რეცეპტორის ანტაგონისტი ამცირებს IL-10 -ის სეკრეციის დონეს. ყველა ზემოთ მოყვანილი მოსაზრება და მიღებული შედეგი კი ადასტურებს იმ ფაქტს, რომ გლუტამატი, mGluR1 ჯგუფის რეცეპტორის აქტივაციის გზით იწვევს IL-10-ის სეკრეციის გაძლიერებას მხოლოდ საკონტროლო ჯგუფის ლიმფოციტების მიერ და გავლენას არ ახდენს კისტური ფიბროზის (CF) მქონე პაციენტებიდან მიღებულ ლიმფოციტებზე.

T ლიმფოციტებზე ექსპრესირებულია სხვადასხვა ტიპის იონოტროპული და მეტაბოტროპული გლუტამატური რეცეპტორი (Lombardi et al., 2001; Ganor et al., 2003; Boldyrev et al., 2004; Miglio et al., 2005; Chiocchetti et al., 2006; Kvaratskhelia et al., 2009). ჩვენ ასევე განვსაზღვრეთ mGluR1 რეცეპტორული კომპლექსის შემცველობა CFTR-თან მიმართებაში, ვინაიდან აღნიშნული რეცეპტორი ცილა CFTR-თან დაკავშირებული უნდა იყოს PDZ დომენის შემცველი შემფუთველი ცილების საშუალებით. ჩვენმა შედეგებმა აჩვენა, რომ საკონტროლო პირების ლიმფოციტების ზედაპირზე, IL-2 თანაობისას, ექსპრესირდება mGluR1a/b რეცეპტორული კომპლექსი, რომელიც ასოცირებულია CFTR-თან კომპლექსში. ამის საპირისპიროდ, იმ ლიმფოციტებს, რომლებიც მიღებულ იქნა კისტური ფიბროზის მქონე პაციენტების

პერიფერიული სისხლიდან, არ აქვთ უჯრედის ზედაპირზე CFTR და mGluR1a/b შემცველი სუპრამოლეკულური კომპლექსის ფორმირების უნარი. გარდა ამისა, ჩვენ დავადგინეთ, რომ mGluR1a/b სუბერთეულის მთლიანი რაოდენობა ნაკლებია დაავადებული პირების ლიმფოციტების უჯრედის ზედაპირზე. მიღებული მონაცემები გვიჩვენებს, რომ mGluR1a/b სუბერთეული შესაძლოა მონაწილეობდეს CFTR-თან ერთად სუპრამოლეკულური კომპლექსის ფორმირებაში, რომელიც მნიშვნელოვნად არის შემცირებული კისტური ფიბროზის მქონე პაციენტებში. შესაძლებელია ვივარაუდოთ, რომ mGluR1a/b რეცეპტორული კომპლექსის ექსპრესიის დაქვეითება იწვევს დაავადებული პირების ლიმფოციტების სენსიტიურობის დაქვეითებას გლუტამატის მიმართ, შესაბამისად, მცირდება IL-10 -ის სეკრეცია და ვითარდება იმუნური პასუხი სხვადასხვა ანტიგენის მიმართ. არსებობს ორი მოსაზრება CF ლიმფოციტების ზედაპირზე mGluR1 რეცეპტორული კომპლექსის შემცირების ფაქტის ასახსნელად:

1. mGluR1 რეცეპტორული კომპლექსი არ სინთეზირდება T ლიმფოციტების მიერ, IL-2 და გლუტამატის აქტივაციის საშუალებით ;
2. კისტური ფიბროზის მქონე პაციენტების ლიმფოციტების ზედაპირზე mGluR1 რეცეპტორის პოსტსინთეზური გადაადგილება და შეფუთვა არის შეზღუდული.

აღნიშნული მოსაზრების დადასტურება საჭიროებს შემდგომ კვლევებს, მაგრამ ვინაიდან ციტოზოლურ ფრაქციაში mGluR1 რეცეპტორული კომპლექსის შემცველობა არ იცვლება დაავადებული პირების ლიმფოციტებში, შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ პოსტსინთეზური გადაადგილება არის დარღვეული. ასევე საინტერესო და მნიშვნელოვანია იმ ცილების იდენტიფიკაცია, რომლებიც ღებულობენ მონაწილეობას mGluR1-სა და CFTR-ს შორის რეცეპტორული კომპლექსის ჩამოყალიბებაში. ამისათვის ჩვენ ჩავატარეთ იმუნოპრეციპიტაციის ექსპერიმენტი NHERF1 ცილის მიმართ. ცილა-NHERF1 წარმოადგენს მულტივალენტურ ცილას. აღნიშნული თვისების გამო მას შეუძლია წარმოქმნას მაკრომოლეკულური კომპლექსი, რომელიც წარმოადგენს „ლუზას“ სხვადასხვა მემბრანული ცილებისთვის. მეტაბოტროპული გლუტამატური რეცეპტორის mGluR1 COOH ჯგუფი უკავშირდება NHERF1 ცილას PDZ2 დომენის საშუალებით (Paquet et al.,

2006). მაშინ როცა CFTR -ის COOH ჯგუფი უკავშირდება NHERF-1 -ს ცილას, PDZ1 დომენის საშუალებით (Wang et al., 1998). ამგვარად, მულტივალენტურ ცილა-NHERF-1-ს შეუძლია დააკავშიროს mGluR1 და CFTR-ს პროტეინული კომპლექსი. ჩვენს მიერ ჩატარებული კვლევების დროს ვერ ვნახეთ, რაიმე დამამტკიცებელი ფაქტი, იმის შესახებ, რომ მეტაბოტროპული გლუტამატური რეცეპტორი mGluR1, ტრანსმემბრანული ცილა-CFTR და NHERF1, შეიძლება ქმნიდნენ სუპრამოლეკულური კომპლექსს, რადგან არ არის არანაირი განსხვავება NHERF1 და CFTR ცილებს, ან NHERF1 და mGluR1 ცილოვან კომპლექსებს შორის, როგორც საკონტროლო ჯგუფის, ასევე დაავადებული პირების ლიმფოციტების ზედაპირზე. შესაძლებელია დავასკვნათ, რომ სხვა PDZ ცილა, როგორიცაა მაგალითად shank ცილა (Lee et al., 2007), შეიძლება იყოს შემზღუდველი ამ კომპლექსის ფორმირებისთვის. გოლჯის კომპლექსთან ასოცირებული PDZ დომენის შემცველი ცილა-CAL, წარმოადგენს ადაპტორულ ცილას, რომელიც განაპირობებს როგორც CFTR-ის (Cheng et al., 2002), ისე ასევე mGluR1a/b რეცეპტორული კომპლექსის (Zhang et al., 2008) პოსტტინტეზური გადაადგილების მოდულირებას. CAL წარმოადგენს შემფუთველ ცილას, რომელიც თავისი სპირალური დომენებით და ერთი PDZ დომენით, შესაძლებელია დაუკავშირდეს სხვადასხვა მემბრანული პროტეინების, მათ შორის CFTR-ს და mGluR1a/b ცილების COOH ჯგუფს. უჯრედის ზედაპირზე CAL ცილის ჭარბი ექსპრესია განაპირობებს პლაზმურ მემბრანაში როგორც ნორმალური, ასევე $\Delta F508$ -CFTR მუტანტური ცილის ძლიერ შემცირებას (Cheng et al., 2002; Wolde et al., 2007). ჩატარებული კვლევების საშუალებით დავადგინეთ, რომ უჯრედის ზედაპირზე ექსპრესირებული CFTR-CAL ცილოვანი კომპლექსი მნიშვნელოვნად შემცირებულია დაავადებული პირების ლიმფოციტების ზედაპირზე, რაც გვაძლევს იმ ვარაუდის საფუძველს, რომ CAL-ის მაღალი ექსპრესია დაკავშირებულია CFTR-ის გადაადგილებასთან. ცილა CFTR და mGluR1a/b სუბერთეული ერთმანეთის კონკურენტებს წარმოადგენენ CAL ცილის დაკავშირების პროცესში, რომელიც თავის მხრივ არეგულირებს ამ ორი ცილის ექსპრესიას. მსგავსი კონკურენცია შეინიშნება CAL ცილის დაკავშირების გამო, CFTR და MUC3 ცილებს შორის ენტეროციტებში (Pelaseyed and Hansson, 2011).

CAL ცილის ჭარბი ექსპრესია ნანახია კისტური ფიბროზის მქონე პაციენტებში, რაც განაპირობებს როგორც მუტირებული, ისე ნორმალური CFTR-ის დრამატულ შემცირებას პლაზმურ მემბრანაზე (Cheng et al., 2002; Wolde et al., 2007). მეორეს მხრივ, mGluR1a/b სუბერთეული, ტერმინალური C ბოლოს საშუალებით ურთიერთქმედებს CAL-ის PDZ დომენტთან (Zhang et al., 2008).

ჩვენი შედეგებიდან გამომდინარე, შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ გლუტამატი, IL-2-ის თანაობისას, იწვევს IL-10 სეკრეციას მატებას ნორმალურ ლიმფოციტებში, მაშინ როცა, დაავადებული პირებიდან მიღებული ლიმფოციტები ვერ ახერხებენ IL-10 მომატებულ სეკრეციას გლუტამატის ზემოქმედების ქვეშ. mGluR1 გლუტამატური რეცეპტორი, რომელიც ინტეგრირებულია CFTR-ის სუპრამოლეკულურ კომპლექსთან, შესაძლოა მონაწილეობდეს IL-10 გენის აქტივაციის პროცესში. როგორც ჩანს, კონკურენცია CFTR -სა და mGluR1a/b სუბერთეულს შორის CAL ცილის დაკავშირების გამო, დაავადებული პირების ლიმფოციტებზე იწვევს mGluR1a/b გადაადგილების დაქვეითებულ რეგულაციას, რომელიც მიმდინარეობს ნორმალურ ლიმფოციტებში მათი აქტივაციის შემდგომ. ამგვარად, შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ mGluR1a/b-ის გადაადგილება და შეფუთვა დაავადებული პირების ლიმფოციტებში, შეზღუდულია CAL ცილის საშუალებით, სადაც ამ უკანსკნელის მაღალი ექსპრესია განაპირობებს CFTR-ის დეგრადაციას. mGluR1a/b სუბერთეული, ასევე IL-10, იწვევს Th1 უჯრედებით გაშუალებულ იმუნურ პასუხს, რაც გამოიხატება პროანთებითი ციტოკინების სეკრეციაში; შესაბამისად, ამ რეცეპტორის დაქვეითებული რეგულაცია შესაძლოა იყოს მიზეზი კისტური ფიბროზის მქონე პაციენტებში იმუნური პასუხის დაქვეითებისა. ჩვენს მიერ ჩატარებულმა კვლევებმა გამოავლინა ახალი დამაკავშირებელი პარტნიორი, ცილა CFTR-სთვის, რაც თავის მხრივ იძლევა T ლიმფოციტების აქტივობის რეგულაციაში - mGluR1a/b რეცეპტორის საშუალებით, გარკვევის შესაძლებლობებს, კისტური ფიბროზის მქონე პაციენტებში.

ცნობილია, რომ ინტერლეიკინი-10 აუმჯობესებს ნევროლოგიური ტიპის დარღვევებს ცენტრალური ნერვული სისტემის დაზიანების შემდგომ, განაპირობებს ნეირონების მდგრადობას დამაზიანებელი ფაქტორების მიმართ (Grilli, M., Barbieri, I., Basudev, H., Brusa, R., Casati, C., Lozza, G. and Ongini, E. 2000); (Boyd, Z.S., Kriatchko, A., Yang, J., Agarwal, N., Wax, M.B. and Patil, R.V. 2003); (Knoblach, S.M. and Faden, A.I.

1998); (Thompson, C.D., Zurko, J.C., Hanna, B.F., Hellenbrand, D.J. and Hanna, A. 2013). ეს ციტოკინი მოქმედებს, როგორც ზრდის ფაქტორი (Perez-Asensio, F.J., Perpiñá, U., Planas, A.M. and Pozas, E. 2013), მონაწილეობს ნეიროგენერაციულ პროცესებში, იწვევს აქსონების ზრდას, სტიმულირებს ნეიროგენერაციულ პროცესებს (Vidal, P.M., Lemmens, E., Dooley, D. and Hendrix, S. 2013) და უზრუნველყოფს ტროფიკულ და დამცველობით ეფექტს, გლუტამატიტ გამოწვეული ციტოტოქსიურობის მიმართ (Zhou, Z., Peng, X., Insolera, R., Fink, D.J. and Mata, M. 2009). ინტერლეიკინი-10 ასევე იწვევს ხანგრძლივი პოტენციაციის ცვლილებას, რაც იძლევა ვარაუდის შესაძლებლობას, რომ აღნიშნული ციტოკინის მოქმედების სამიზნეს წარმოადგენს გლუტამატერგულ ნეიროტრანსმისიულ პროცესებში მონაწილე სისტემა (Kelly, A., Lynch, A., Vereker, E., Nolan, Y., Queenan, P., Whittaker, E., O'Neill, L.A. and Lynch, M.A. 2001).

აზოტის ოქსიდი-(NO) წარმოადგენს მნიშვნელოვან სასიგნალო მოლეკულას, რომელიც ფართოდ მონაწილეობს ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში მიმდინარე სასიცოცხლო პროცესებში. არსებობს მრავალი მონაცემი იმის შესახებ, რომ ნიტროერგული სასიგნალო მექანიზმი მოდულირებს ნეირონულ ჰომეოსტაზს ფიზიოლოგიური ნორმის პირობებში (Steinert, J.R., Chernova, T., Forsythe, I.D. 2010). გლუტამატის მეტაბოტროპული და იონოტროპული რეცეპტორი განაპირობებენ NO პროდუქციის რეგულირებას Ca^{2+} იონებით ინდუცირებული ნეირონული აზოტის ოქსიდის სინთაზას- nNOS აქტივაციის გზით (Bhardwaj, A., Northington, F.J., Martin, L.J., Hanley, D.F., Traystma, R.J. and Koehler, R.C. 1997), (Llansola, M. and Felipe, V. 2010). ჩვენი მონაცემები მიუთითებს, რომ სინაპტონეიროსომებში, რომლებიც მიღებულია IL-10 KO თაგვებიდან, გლუტამატ-დამოკიდებული NOS-ის აქტივობა შემცირებულია Wt თაგვებიდან მიღებულ სინაპტონეიროსომებთან შედარებით. გარდა ამისა, დავადგინეთ, რომ რომ KO თაგვებისგან განსხვავებით Wt თაგვებიდან გამოყოფილ სინაპტონეიროსომებში NO-ს სინთეზის გლუტამატ-დამოკიდებული აქსელერაცია ინჰიბირდება mGluR1-ის ანტაგონისტის - LY367385 საშუალებით, მაშინ როცა ეს სენსიტიურობა მთლიანად დაკარგულია KO თაგვებში. ამასთანავე, ჩვენი ექსპერიმენტების შედეგად, ნაჩვენები იქნა, რომ mGluR1-ის ექსპრესია მნიშვნელოვნად არის შემცირებული მხოლოდ KO თაგვებში, მაშინ როცა, NMDA

რეცეპტორის სუბერთეულების (NR2A და NR2B) რაოდენობა არ იცვლება. ეს მონაცემები მიუთითებს, რომ Wt სინაპტონეიროსომებში NO-ს სინთეზი იზრდება mGluR რეცეპტორის აქტივაციის გზით და KO თაგვებში mGluR შემცირებული ექსპრესია იწვევს გლუტამატ-დამოკიდებული NO-ს სინთეზის შემცირებას. ჩვენს კვლევებში ასევე გავაანალიზეთ სპერმინის ეფექტი NMDA რეცეპტორთან [³H]MK-801-ის დაკავშირების პროცესში. პოლიამინები წარმოადგენენ NMDA რეცეპტორის ალოსტერულ მოდულატორებს (Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J. and Dingledine, R. 2010). პოლიამინები მცირე კონცენტრაციით (3-100M) აძლიერებენ NMDA რეცეპტორთან [³H]MK-801-ის დაკავშირებას, ხოლო სპერმინი მაღალი კონცენტრაციით (>100μM) აინჰიბირებს დაკავშირებას (Reynolds, I.J. and Miller, R.J. 1989). აღნიშნული მონაცემები ადასტურებს, რომ პოლიამინები ახდენენ NMDA რეცეპტორის მოდულირებას ზემოთაღწერილი გზის საშუალებით. ჩვენი შედეგებით გაირკვა, რომ KO თაგვების ქერქოვანი ნაწილიდან მიღებული NMDA რეცეპტორი ამჟღავნებს სუსტ აფინურობას სპერმინის მიმართ, ვიდრე Wt თაგვებიდან მიღებული NMDA რეცეპტორი. ვინაიდან მხოლოდ NMDA რეცეპტორის NR1A/NR2B სუბერთეულები შეიცავენ პოლიამინების როგორც სტიმულატორულ ისე ინჰიბიტორულ უბნებს (Sharma, T.A. and Reynolds, I.J. 1999). ჩვენი მონაცემები ცხადყოფს, რომ KO თაგვები შესაძლოა მოიცავდეს NMDA რეცეპტორის სპლაისინგურ ფორმას, რომელსაც ახასიათებს დაბალი აფინურობა სპერმინის მიმართ, მაგალითად, NR1A სუბერთეულის შემცველს, რომელსაც არ გააჩნია N ტერმინალური ნაშთი (Traynelis, S.F., Hartley, M. and Heinemann, S.F. 1995).

ჩვენი მონაცემების თანახმად, IL-10-ის დეფიციტი იწვევს მიტოქონდრიული არგინაზა II ექსპრესიის შემცირებას, ხოლო არგინაზა I ექსპრესიის დონე უცვლელი რჩება. არსებობს მონაცემები, იმის შესახებ, რომ IL-10 იწვევს არგინაზას ორივე ფორმის მაკოდირებელი გენის ექსპრესიის რეგულაციას. ნაჩვენებია, რომ არგინაზა II ინდუცირდება IL-10 საშუალებით, მაშინ როცა ეს ციტოკინი იწვევს არგინაზა I ექსპრესიის გაძლიერებას, მხოლოდ IL-4 თანაობისას (Lang, R., Patel, D., Morris, J.J., Rutschman, R.L. and Murray, P.J. 2002). ორივე ციტოკინი IL-10 და IL-4 მოქმედებენ STAT3 და STAT6 ტრანსკრიპციული ფაქტორების საშუალებით (O'Shea, J.J., Pesu, M.,

Borie, D.C. and Changelian, P.S. 2004), Sica, A. and Bronte, V. 2007). ექსპრესიის პროცესში ერთდროულად მონაწილეობენ სხვადასხვა ტრანსკრიპციული ფაქტორები, მათ შორის CCAAT/ დამაკავშირებელ გამაძლიერებელი პროტეინი b(C/EBP) (Gotoh, T., Chowdhury, S., Takiguchi, M. and Mori, M. (1997), Oliva Jr., A.A., Kang, Y., Sanchez-Molano, J., Furones, C. and Atkins, C.M. 2012). CCAAT/ დამაკავშირებელ გამაძლიერებელი პროტეინი წარმოადგენს C/EBP ტრანსკრიპციული ფაქტორების ოჯახის წევრს, რომელიც რეგულირდება სხვადასხვა დონეზე როგორც ფიზიოლოგიური ისე პათოლოგიური მდგომარეობის დროს სხვადასხვა ჰორმონების და ციტოკინების საშუალებით (Ramji, D.P. and Foka, P. 2002). C/EBP იწვევს მრავალი სხვადასხვა გენის ტრანსკრიპციის პროცესის ინიცირებას, მათ შორის გლუტამატის მეტაბოტროპული რეცეპტორის mGluR1 გენის (Crepaldi, L., Lackner, C., Corti, C. and Ferraguti, F. 2007), Kfoury, N. and Kapatos, G. 2009). დამატებით, C/EBP თავისთავად რეგულირდება IL-10 გავლენით (Lang, R., Patel, D., Morris, J.J., Rutschman, R.L. and Murray, P.J. 2002). ამგვარად, IL-10-ის დეფიციტი იწვევს C/EBP ცილის და მასთან დაკავშირებული სხვადასხვა გენების, მათ შორის STAT3 და mGluR1-ის გენების ექსპრესიის შესუსტებას (Crepaldi, L., Lackner, C., Corti, C. and Ferraguti, F. 2007), Kfoury, N. and Kapatos, G. 2009). ჩვენმა დაკვირვებებმა ცხადყო, რომ IL-10-ის დეფიციტი იწვევს mGluR1a/b რეცეპტორული კომპლექსის დადმავალ რეგულაციას თავგებში, რაც ადასტურებს იმ მოსაზრებას, რომ IL-10 შესაძლოა მოქმედებდეს C/EBP საშუალებით. შესაბამისად, არგინაზა II აქტივობა და mGluR1-ის შემცველობა შემცირებულია KO თავგებში, რაც შეიძლება იყოს პირველადი შედეგი თუმცა IL-10-ის დეფიციტის და შესაბამისად, გენების ექსპრესიის შესუსტებით. არნიშნული მეცნიერული ვარაუდი საჭიროებს შემდგომ ექსპერიმენტულ დადასტურებას. ამგვარად, მიღებული შედეგებიდან ცხადი ხდება, რომ KO თავგებში შემცირებულია mGluR1-ის და არგინაზა II ექსპრესია. აღნიშნული ცვლილებები იწვევენ მთელი რიგი ბიოქიმიური მოვლენების კასკადს, შედეგად მცირდება პოლიამინების სინთეზი და mGluR-დამოკიდებული აზოტის ოქსიდის პროდუქცია. შემცირებული პოლიამინები, თავის მხრივ, იწვევენ NMDA რეცეპტორის აფინურობის შემცირებას სპერმინის მიმართ, მაშინ როცა mGluR down რეგულაცია ამცირებს NO მოდულატორულ ეფექტს. mGluR1 ჩართულია სინაპსურ ნეიროგენეზში, ნეირონების

დიფერენცირებაში, სინაპსურ გადაცემასა და ნეიროპლასტიურობაში Ferraguti, F., Crepaldi, L. and Nicoletti, F. 2008), ხოლო პოლიამინები წარმოადგენენ მნიშვნელოვან ნაერთებს ნეირონების რეგენერაციასა და განვითარებაში (Chu, P.J., Saito, H. and Abe, K. 1995). ეს შედეგები აჩვენებს, რომ IL-10-ს შესაძლოა ჰქონდეს დადებითი ეფექტი თავის ტვინის რეგენერაციულ და კოგნიტურ ფუნქციებზე. გარდა ამისა, IL-10 იწვევს იმუნური უჯრედების მოდულირებას, განაპირობებს ნეიროპროტექციას, რასაც აქვს პირდაპირი დადებითი კავშირი ნევროლოგიური დარღვევების შემთხვევაში ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში.

ენდოპლაზმურ რეტikulumში ცილების გაძლიერებული ძვრადობა, რომელიც მიმდინარეობს ენდოპლაზმური რეტikulumის სტრესის (ER) დროს, წარმოადგენს ძირითად უჯრედულ პროცესს, რომელიც გადამწყვეტ როლს ასრულებს სხვადასხვა ნეიროდეგენერაციული დაავადებების განვითარებაში (Mittal S, Ganesh S, 2010).

ნაჩვენებია, რომ ეპითელურ უჯრედებში, ინტერლეიკინი-10(IL-10), ფერმენტ NADPH-ოქსიდაზასთან ერთად უზრუნველყოფს უჯრედისთვის ამ სტრესის შემცირებას და ასევე უჯრედების სენსიტიურობის შემცირებას ანთებითი პროცესების მიმართ (Treton X, Pedruzi E, Guichard C, Ladeiro Y, Sedghi S, et al; 2014). მაგალითად, ნაწლავების ეპითელიუმში, კონკრეტულად კი მსხვილი ნაწლავის ეპითელურ უჯრედების ჰომეოსტაზის დარღვევა წარმოადგენს ძირითად მიზეზს, მსხვილი ნაწლავის ქრონიკული ანთებითი პროცესების განვითარებაში, რაც საბოლოოდ შეიძლება დასრულდეს სიმსივნური პროცესის ჩამოყალიბებით. ნაჩვენებია, რომ ზემოთნახსენებ ეპითელურ უჯრედებში ჰომეოსტაზის დარღვევის მიზეზი ხდება გაძლიერებული ენდოპლაზმურ ბადეზე მიმდინარე (ER) სტრესი და შედეგად განვითარებული ანთებითი პროცესი. არსებობს თანამედროვე მონაცემები იმის თაობაზე, რომ მსხვილი ნაწლავის თასისებურ უჯრედებში ინტენსიური ხასიათის (ER) სტრესი დაკავშირებულია არასწორი კონფორმაციის მქონე ცილების დაგროვებასთან. როგორც ახალი მონაცემებით ირკვევა, ინტერლეიკინ-10(IL-10) აქვს ცენტრალური როლი თასისებურ უჯრედების ჰომეოსტაზში (ER) სტრესის დათრგუნვის გზით და ასევე იწვევს ნაწლავური ლორწოს წარმოქმნის პროცესს. ამასთანავე, IL-10 ის გენის პოლიმორფიზმი და იშვიათი ფორმის მუტაცია, რომელსაც ადგილი აქვს როგორც ამ ციტოკინის, ისე მისი რეცეპტორის მათქმურესირებელ

გენებში, დაკავშირებულია ნაწლავების ანთებით დაავადებებთან, ხოლო ბავშვებში მწვავე ენტეროკოლიტის განვითარებასთან. უკანასკნელი მონაცემების თანახმად, IL-10 წარმოადგენს ცენტრალურ რეგულატორს ეპითელური უჯრედების ჰომეოსტაზში. იმის გამოსაკვლევად, თუ როგორ არის ჩართული IL-10 ნეირონებში მიმდინარე ER სტრესის პროცესში, ჩვენ შევამოწმეთ ორი ჩაპერონული ფუნქციის მქონე ცილა - BiP და SigR1 შემცველობა ნოკაუტირებული თაგვების ტვინებიდან მიღებულ სინაპტონეიროსომებში. მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა, რომ BiP შემცველობა მნიშვნელოვნად მომატებულია იმ სინაპტონეიროსომებში, რომელ ჯგუფსაც ციტოკინის გენი ნოკაუტირებული ქონდათ, მაშინ როდესაც SigR1 რაოდენობა მნიშვნელოვნად არ იცვლება.

სიგმა-1 რეცეპტორი(Sig-1R) მემბრანებთან ასოცირებულ, ენდოპლაზმური რეტიკულუმის ერთ -ერთ მნიშვნელოვან პროტეინს წარმოადგენს, რომელიც ნაწილობრივ მდებარეობს ნერვულ სისტემაში და პერიფერიულ ქსოვილებში -იმუნური და ენდოკრინული სისტემების ჩათვლით. ეს რეცეპტორი მონაწილეობს უჯრედში მიმდინარე, როგორც ფიზიოლოგიურ ასევე პათოლოგიურ მოვლენებში, როგორიცაა: ნეიროპროტექტორული პროცესები, კარცინოგენეზი და ნეიროპლასტიურობა. ასევე არსებობს მონაცემები იმის შესახებ, რომ სიგმა-1 რეცეპტორი (Sig-1R) შესაძლოა მონაწილეობდეს ცენტრალური ნერვული სისტემის ისეთ დარღვევებში, როგორიცაა- ალცჰეიმერის, შიზოფრენიის, დეპრესიის, ალცჰეიმერის დაავადება და ასევე სხვადასხვა სახის პრეპარატების მიმართ დამოკიდებულების განვითარებაში. ცენტრალურ ნერვულ სისტემაზე მოქმედი რამოდენიმე ფარმაკოლოგიური საშუალება მათ შორის -ანტიფსიქოზური,ოპოიდური, ანტიდეპრესანტული საშუალებები, ავლენს საშუალოზე მაღალ აფინურობას ამ რეცეპტორის მიმართ; ასევე მუსკარინული, D2-დოფამინის და NMDA გლუტამატური რეცეპტორის ანტაგონისტები, მონომინური ტრანსპორტერებისა და ოქსიდაზების ინჰიბიტორები და სეროტონინის სელექტიური უკუშეწოვის ინჰიბიტორები. ამ რეცეპტორის ლიგანდები ავლენენ ანტი-ალცჰეიმერულ და ნეიროპროტექციულ ეფექტს მრავალი, სხვადასხვა სახის ცხოველურ მოდელებში. განაპირობებენ ნეიროდეგენერაციული პროცესების ბლოკირებას და სტიმულირებენ ნეიროგენეზის წარმოქმნის პროცესს. Sig-1R რეცეპტორი მოთავსებულია მემბრანებზე, რომლებიც წარმოადგენენ მიტოქონდრიული ბიოენერგეტიკის სარეგულაციო

საიტებს. ეს რეცეპტორი რეგულირდება მრავალი შიდაუჯრედული სიგნალის გარდაქმნის და ცილა-ცილოვანი ურთიერთობის საშუალებით. თავის მხრივ, დაკავშირებულია სხვადასხვა სასიგნალო ცილებთან, მათ შორის- ინოზიტოლ-ტრიფოსფატის რეცეპტორთან (IP3R), IRE, ცილა- BiP-თან, ანკირინთან და სხვ. სიგმა რეცეპტორთან დაკავშირებული ეს ფაქტი კიდევ ერთხელ ადასტურებს, რომ ცილა-ცილოვანი ურთიერთობები მნიშვნელოვანია სიგმა რეცეპტორის ფუნქციურ აქტივობაში. ჩვეულებრივ, მოსვენებულ მდგომარეობაში, სიგმა რეცეპტორი, მიტოქონდრიათა ასოცირებულ ცილოვან მემბრანებზე ქმნის კომპლექსს ისეთ შაპერონთან, როგორიცაა ცილა-BiP (Hayashi T, Su TP, 2007). უჯრედის ენდოპლაზმურ ბადეზე მიმდინარე (ER) სტრესის, ასევე სხვადასხვა სტიმულების საპასუხოდ, მას შეუძლია დისოცირება ცილა-BiP კომპლექსიდან, დაკავშირება ინოზიტოლ-ტრიფოსფატის რეცეპტორთან (IP3R), რაც იწვევს კალციუმის იონების შესვლას მიტოქონდრიაში. კალციუმის სპაიკები იწვევს რედოქს რეაქციებს და ატფ-ის პროდუქციას კალციუმ-დამოკიდებული ფერმენტების რეგულირების გზით, კრებსის ციკლში (Hayashi T, Rizzuto R, Hajnoczky G, Su TP, 2009); მაშინ როცა კალციუმის იონების დიდი რაოდენობით შესვლა იწვევს აპოპტოზს. ნათელია, რომ სიგმა რეცეპტორი უზრუნველყოფს ინოზიტოლ-ტრიფოსფატის რეცეპტორის (IP3R) სტაბილიზაციას, რაც თავის მხრივ განაპირობებს მიტოქონდრიაში კალციუმის იონების შესაბამისი კონცენტრაციით შესვლას და ATP წარმოქმნის გაძლიერებას. ცნობილია, რომ ენდოპლაზმურ ბადეზე მიმდინარე ER სტრესი და მიტოქონდრია წარმოადგენენ ძირითად რეგულატორებს უჯრედში კალციუმის იონების ჰომეოსტაზში და მათი ურთიერთქმედება ძირითადია უჯრედის ფიზიოლოგიაში. იმ ფაქტის შესაფასებლად, თუ როგორ არის სიგმა რეცეპტორი დაკავშირებული ცილა-BiP და ინოზიტოლ-ტრიფოსფატის რეცეპტორთან (IP3R), ჩვენ შევასრულეთ კოიმუნოპრეციპიტაციის ექსპერიმენტი. მემბრანული პრეპარატები დავლექეთ აგაროზასთან დაკავშირებული სიგმა რეცეპტორის ანტისხეულით, ხოლო შემდეგ ჩავატარეთ ამ ცილების რაოდენობრივი ანალიზი. მიღებულმა შედეგმა აჩვენა, რომ სიგმა რეცეპტორის დაკავშირება ცილა-BiP და ინოზიტოლ-ტრიფოსფატის რეცეპტორთან (IP3R) არის ძალიან მაღალი IL-10 გენის მიხედვით ნოკაუტირებულ (KO) თაგვების ტვინის მემბრანებში, ვიდრე არანოკაუტირებულ (WT) თაგვებში.

უჯრედული სტრესის სასიგნალო მექანიზმებში ასევე ჩართულია Rac1 სასიგნალო გზა რის შედეგადაც უჯრედში წარმოიქმნება ჟანგბადის რეაქტიული ნაერთები (ROS) (Ozaki M, Deshpande SS, Angkeow P, Suzuki S, Irani K, 2000).

Rac1 ცილა მიეკუთვნება მცირე ზომის GTP დამაკავშირებელ ცილებს და მისი ფუნქციაა ჟანგბადის რეაქტიული ნაერთების (ROS) წარმოქმნა ფაგოციტური უნარის მქონე უჯრედებში - ნეიტროფილებში. Rac ცილები მნიშვნელოვანია ასევე მემბრანული NADPH ოქსიდაზას ფუნქციონირების თვალსაზრისით, რომლის ფუნქციაა თავის მხრივ ელექტრონების გადატანა მოლეკულურ ჟანგბადზე და შედეგად სუპეროქსიდ ანიონური რადიკალის წარმოქმნა. გარდა ამისა, Rac1 ცილა მონაწილეობს უჯრედების ზრდის, მიგრაციის და უჯრედული ტრანსფორმირების პროცესებში, რომელიც კონტროლირდება უჯრედში წარმოქმნილი ჟანგბადის რეაქტიული სახეობების (ROS) საშუალებით. ჩვენმა კვლევებმა ცხადყო, რომ სიგმა რეცეპტორს შეეძლო პირდაპირ ურთიერთქმედება Rac1 ცილასთან მულტიცილოვანი კომპლექსის - IP3R/Sig1R/Bcl-2/Rac1 საშუალებით. (Natsvlishvili N, Gogvadze N, Zhuravliova E, Mikeladze D. 2015) ექსპერიმენტების მომდევნო სერიებში, ჩვენ განვსაზღვრეთ Rac1 და Sig1R ცილების ურთიერთკავშირი KO თაგვების ტვინში. ჩვენმა შედეგებმა აჩვენა, რომ Rac1 და Sig1R ცილების ურთიერთკავშირი მაღალია თაგვების ამ ჯგუფში (გრაფიკი.11). ეს მონაცემები მიგვითითებს, რომ ნოკაუტირებული თაგვების ჯგუფში Sig1R რეცეპტორის კავშირი Rac1 და IP3R, შესაძლოა დაკავშირებული იყოს IL-10 დეფიციტით განპირობებულ დამცველობით და ადაპტაციურ პასუხთან თაგვების ამ ჯგუფში. ასევე აღსანიშნავია, რომ გლუტამატმა შესაძლოა გამოიწვიოს კალციუმის იონების ჭარბი რაოდენობით შესვლა ნეირონებში, შედეგად ოქსიდაციური პროცესების სტიმულირება და ნიტროზონაერთების ჭარბი წარმოქმნა, რაც საბოლოოდ მთავრდება უჯრედის დაზიანებით (Nicholls DG, 2008). გარდა მიტოქონდრიისა, უჯრედში ოქსიდაციური პროდუქტების მნიშვნელოვან წყაროს წარმოადგენს NADPH ოქსიდაზა (Droge W, 2002), რომელიც თავის მხრივ რეგულირდება Rac1 საშუალებით (Hordijk PL, 2006). პლაზმურ მემბრანებთან დაკავშირებული Rac1-NADPH ოქსიდაზას კომპლექსმა შესაძლოა ითამაშოს ძირითადი როლი გლუტამატით ინდუცირებული უჯრედების აპოპტოზურ სიკვდილში ჟანგბადის რეაქტიული სახეობების (ROS) მომატების

გზით (Nikolava , Lee YS, Kim JA, 2005). გარდა ამისა Rac ცილის აქტიურობა დაკავშირებულია უჯრედის ენდოპლაზმურ სტრესთან (ER), ეს პროცესი კი თავის მხრივ იწვევს ცილა-შაპერონების სხვადასხვა სახის ცვლილებებს (Li J, Zhu H, Shen E, Wan L, Arnold JM, Peng T, 2010; Cao SS, Kaufman RJ, 2014). აქედან გამომდინარე, ცდების შემდგომ ეტაპზე განვსაზღვრეთ NADPH ოქსიდაზას აქტივობა გლუტამატის და სიგმა ლიგანდების თანაობისას. როგორც ჩვენს მიერ მიღებული შედეგები აჩვენებს, რომ არც გლუტამატის და არც სიგმა რეცეპტორის ლიგანდები, როგორც ერთდროულად, ასევე ცალ-ცალკე არ ცვლიან NADPH ოქსიდაზას აქტივობას Wt თავგებიდან მიღებულ სინაპტონეიროსომულ მემბრანებში, ხოლო რაც შეეხება (KO) თავგების სინაპტონეიროსომულ მემბრანებს, ამ შემთხვევაში გლუტამატის გავლენით მნიშვნელოვნად იცვლება NADPH ოქსიდაზას აქტივობა და შესაბამისად იმატებს ჟანგბადის რეაქტიული ფორმების (ROS) წაერთების პროდუქცია. გლუტამატიტ განპირობებული NADPH ოქსიდაზას აქტივობა მცირდება სიგმა ლიგანდის – (+)-პენტაზოცინის თანაობისას, მაშინ როცა სიგმას ანტაგონისტი –ჰალოპერიდოლი ამცირებს პენტაზოცინის ეფექტს.

აღსანიშნავია, რომ იგივე შედეგი იქნა მიღებული ცილა 4-PPBP (სიგმა-1 აგონისტი) დამატებით და BD1063 (სიგმა-ანტაგონისტი) დამატების შემდგომ. მიღებული შედეგები საშუალებას გვაძლევს დავასკვნათ, რომ IL-10 გენით ნოკაუტირებულ KO თავგების ჯგუფში, გლუტამატს შეუძლია მოახდინოს ჟანგბადის რეაქტიული ფორმების (ROS) წაერთების გენერირება NADPH ოქსიდაზას აქტივობის გაძლიერებით თავის ტვინში, ხოლო სიგმა აგონისტები ამცირებენ გლუტამატის ამ ეფექტს. საინტერესოა აღინიშნოს, რომ ხარის ტვინის მიტოქონდრიებში სიგმას აგონისტები იწვევენ NOX აქტივობის მომატებას (Natsvlshvili N, Gogvadze N, Zhuravliova E, Mikeladze D. 2015), რაც, სავარაუდოდ, გამოწვეულია სიგმა რეცეპტორთან დაკავშირებული მაკრომოლეკულური კომპლექსის განსხვავებული შიდაუჯრედული ორგანიზაციით. იმის გამო, რომ ენდოპლაზმურ რეტიკულუმში SigR1 რეცეპტორის აქტივაცია იწვევს თავად ამ რეცეპტორის ტრანსლოკაციას რეტიკულუმის მემბრანებიდან პლაზმური მემბრანისაკენ, ჩვენ ვივარაუდეთ რომ გლუტამატის მეტაბოტროპულ რეცეპტორთან (NMDAR) ასოცირებულმა სიგმა რეცეპტორმა SigR1, შესაძლოა გააშუალოს სიგმა ლიგანდების ანტი-ოქსიდაციური

ეფექტი. სიგმა -1 რეცეპტორის (SigR1) ტრანსლოკაცია და გაძლიერებული ურთიერთობა Sig1Rs და გლუტამატის მეტაბოტროპული რეცეპტორის (NMDARs) ერთ/ერთ სუბერთეულთან (GluN2B), შეინიშნება SigR1 რეცეპტორის აქტივაციის შემდგომ (Pabba M, Wong AY, Ahlskog N, Hristova E, Biscaro D, Nassrallah W, Ngsee JK, Snider M, Beique JC, Bergeron R, 2014). ამ რელოკაციებმა შეიძლება დაარღვიოს ცილა/ცილოვანი ურთიერთობა NMDARs და nNOS შორის, რაც გამოიწვევს NO შემცირებას (Pabba M, Sibille E, 2015). nNOS მიერ წარმოქმნილი NO წარმოადგენს სასიგნალო მოლეკულას დაკავშირებულს NMDA რეცეპტორთან, იწვევს NOX აქტივობის მომატებას და NMDA და nNOS დაკავშირებას PSD95 დომენის საშუალებით, რაც წარმოადგენს აუცილებელ პირობას ROS ნაერთების წარმოქმნის პროცესში (Girouard H, Wang G, Gallo EF, Anrather Z, Zhou P, Pickel VM, 2009). ამგვარად, SigR1 რეცეპტორი NMDAR/PSD95/nNOS კომპლექსის საშუალებით შესაძლოა იწვევდეს გლუტამატ-დამოკიდებული ჟანგბადის რეაქტიული ნაერთების (ROS) წარმოქმნის შემცირებას. ამ ჰიპოთეზის შესამოწმებლად, ჩვენ განვსაზღვრეთ გლუტამატის იონოტროპული NMDA რეცეპტორის შემცველობა სიგმა რეცეპტორთან (SigR1) იმუნოპრეციპიტატში და აღმოჩნდა, რომ GluN2B სუბერთეულის უდიდესი რაოდენობა დაკავშირებულია SigR1 რეცეპტორთან, ნოკაუტირებული თაგვების KO თავის ტვინში. ეს მონაცემები მიუთითებს, რომ ციტოკინი IL-10 ნაკლებობა შეიძლება ცვლიდეს SigR1-დამოკიდებულ NMDAR რეცეპტორის განაწილებას ენდოპლაზმური რეტიკულუმის მემბრანებსა და პლაზმურ მემბრანებს შორის, რაც თავის მხრივ იწვევს SigR1-სენსიტიური ფორმის მატებას NMDAR რეცეპტორის მიმართ. IL-10 მნიშვნელოვნად იწვევს განვითარების ადრეულ ეტაპზე წერტილოვანი სინაფსების ფორმირებას (Lim SH, Park E, You B, Jung Y, Park A-R, et al; 2013). შესაბამისად აღნიშნული ციტოკინის დეფიციტმა შესაძლოა გამოიწვიოს, როგორც შიდა, ისე გარესინაპსური კომპლექსების ანომალური ფორმირება. ჩვენს მიერ შესრულებულ კვლევებში ნაჩვენებია, რომ გლუტამატის იონოტროპული რეცეპტორის (NMDAR) ტოტალური შემადგენლობა (GluN2A და GluN2B), ისევე როგორც ამ რეცეპტორთან დაკავშირებული nNOS რაოდენობა არ იცვლება ნოკაუტირებული თაგვების (KO) სინაპტონეიროსომებში. აღნიშნულის მიუხედავად, ნოკაუტირებული თაგვების (KO) სინაპტონეიროსომების

გლუტამატური იონოტროპული (NMDAR) რეცეპტორი ავლენდა განსხვავებულ ლიგანდ/დამაკავშირებელ თვისებებს და ამასთანავე მნიშვნელოვნად ჰქონდა შემცირებული სენსიტიურობა პოლიამინების მიმართ (Koriauli S, Barbakadze T, Natsvlshvili N, Dabrundashvili N, Kvaratskhelia E, Mikeladze D, 2014). მიღებული შედეგები მიუთითებს, რომ ნოკაუტირებული თაგვების (KO) ჯგუფში არსებობს NMDAR რეცეპტორის სპლაისინგური იზოფორმა, რომელსაც შეიძლება ჰქონდეს მაღალი სენსიტიურობა სიგმა/1 რეცეპტორის (SigR1) მიმართ.

დასკვნები

1. გლუტამატი, IL-2-ს თანაობისას ზრდის IL-10-ის სეკრეციას ნორმალურ ლიმფოციტებში, ხოლო კისტური ფიბროზის მქონე პაციენტების ლიმფოციტებს, გლუტამატის ზეგავლენით არ აქვთ IL-10-ის დიდი რაოდენობით წარმოქმნის უნარი.

2. CFTR და mGluR1 კონკურირებენ CAL-თან დაკავშირებისთვის, რაც შესაბამისად ამცირებს mGluR1-ს სინთეზის შემდგომ გადაადგილებას და ამცირებს ინტერლეიკინი-10-ის სინთეზს. ინტერლეიკინი-10-ის ნეიროპროტექციული და ნეირორეგენერაციული თვისებები, მისი NMDAR-ის სპერმინ-დამოკიდებული მოდულაციის უნართან და პოლიამინების მეტაბოლიზმზე ეფექტებთან ერთად, შესაძლოა ჩართული იყოს mGluR1a/b-ს ექსპრესიის რეგულაციაში.

3. თავგებში IL-10-ის გენის გათიშვა იწვევს mGluR1a/b და არგინაზა II-ის ექსპრესიის შემცირებას, რაც საბოლოოდ რთავს ბიოქიმიური მოვლენების კასკადს, რომელსაც მივყავართ პოლიამინების სინთეზის შემცირებამდე და mGluR-დამოკიდებულ აზოტის ოქსიდის წარმოქმნის დაქვეითებამდე. პოლიამინების დონის შემცირება აქვეითებს NMDA რეცეპტორის პასუხს სპერმინზე, ხოლო mGluR შემცირებული რეგულაცია აქვეითებს აზოტის ოქსიდის მოდულატორულ ეფექტებს.

4. ინტერლეიკინი-10-ის ნეიროპროტექციული და ნეირორეგენერაციული თვისებები, მისი NMDAR-ის სპერმინ-დამოკიდებული მოდულაციის უნართან და პოლიამინების მეტაბოლიზმზე ეფექტებთან ერთად, შესაძლოა ჩართული იყოს mGluR1a/b-ს ექსპრესიის რეგულაციაში.

5. IL-10-ის დეპრივაციამ შეიძლება გამოიწვიოს ER სტრესი, რომელიც იწვევს BiP-ის ექსპრესიას და SigR1-ის გადანაწილებას ენდოპლაზმურ მემბრანასა და პლაზმურ მემბრანას შორის.

6. IL-10-ის ნაკლებობამ შეიძლება შეცვალოს NMDAR-ის სპეციფიკური ორგანიზაცია, SigR1-მგრძნობიარე, NR2B-შემცველი-NMDAR ზედაპირული ექსპრესია. ხოლო SigR1- მგრძნობიარე NR2B-შემცველი -NMDAR ზედაპირული ექსპრესიის და ER სტრესის პირობებში, იზრდება გლუტამატ-დამოკიდებული ROS წარმოქმნა, რომელიც იწვევს აპოპტოზის ჩართვას.

7. ჩატარებული კვლევების და მიღებული შედეგების გათვალისწინებით, შეიძლება დავასკვნათ, რომ IL-10-ის დეპრეზაციის პირობებში, სიგმა-ლიგანდებმა შესაძლოა მნიშვნელოვანი პრევენციული როლი ითამაშონ NMDA რეცეპტორით გაშუალებული ექსციტოტოქსიკურობის წინააღმდეგ.

ბიბლიოგრაფია

1. Aarts, M., Liu, Y., Liu, L., Besshoh, S., Arundine, M., Gurd, J.W., Wang, Y.T., Salter, M.W. and Tymianski, M. „Treatment of Ischemic Brain Damage by Perturbing NMDA Receptor-PSD-95 Protein Interactions’’. *Science* 298(2002): 846- 850.
2. Barnard E. „Will the real NMDA receptor please stand up?’’ *Trends Pharmacol Sci* (1) 1992: 11-2.
3. Benavides, J., Claustre, Y. and Scatton, B. „L-Glutamate Increases Internal Free Calcium Levels in Synaptoneurosomes from Immature Rat Brain via Quisqualate Receptors’’. *Journal of Neuroscience* 8(1988): 3607-3615.
4. Bhardwaj, A., Northington, F.J., Martin, L.J., Hanley, D.F., Traystma, R.J. and Koehler, R.C. „Characterization of Metabotropic Glutamate Receptor-Mediated Nitric Oxide Production in Vivo’’. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 17(1997): 153-160.
5. Boldyrev, A.A., Carpenter, D.O., Johnson, P., „Emerging evidence for a similar role of glutamate receptors in the nervous and immune systems.’’ *J. Neurochem.* 95(2005): 913–918.
6. Boldyrev, A.A., Kazey, V.I., Leinsoo, T.A., Mashkina, A.P., Tyulina, O.V., Johnson, P., et al., „Rodent lymphocytes express functionally active glutamate receptors’’. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324(2004): 133–139.
7. Bossard, F., Robay, A., Toumaniantz, G., Dahimene, S., Becq, F., Merot, J., Gauthier, C., „NHE-RF1 protein rescues _F508-CFTR function’’. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 292(2007): 1085–1094
8. Boyd ZS, Kriatchko A, Yang J, Agarwal N, Wax MB, Patil RV. „Interleukin-10 receptor signaling through STAT-3 regulates the apoptosis of retinal ganglion cells in response to stress.’’ *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 (2003): 5206–5211.
9. Boyd, Z.S., Kriatchko, A., Yang, J., Agarwal, N., Wax, M.B. and Patil, R.V. ”Interleukin-10 Receptor Signaling through STAT-3 Regulates the Apoptosis of Retinal Ganglion Cells in Response to Stress”. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44 (2003): 5206-5211.
10. Brazova, J., Sediva, A., Pospisilova, D., Vavrova, V., Pohunek, P., Macek Jr., M., Bartunkova, J., Lauschmann, H., „Differential cytokine profile in children with cystic fibrosis’’. *Clin. Immunol.* 115(2005): 210–215.

11. Brennan AM, Suh SW, Won SJ, Narasimhan P, Kauppinen TM, Lee H, Edling Y, Chan PH, Swanson RA. „NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation.” *Nat. Neurosci.* 12(2009): 857–863.
12. Broere, N., Hillesheim, J., Tuo, B., et al., „Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activation is reduced in the small intestine of Na⁺/H⁺ exchanger 3 regulatory factor 1 (NHERF-1)- but not NHERF-2-deficient mice”. *J. Biol. Chem.* 282 (52) (2007): 37575–37584.
13. Brone B & Eggermont J; „PDZ proteins retain and regulate membrane transporters in polarized epithelial cell membranes.” *Am J Physiol Cell* 288 (2005): C20–C29.
14. Byrnes, K.R., Loane, D.J. and Faden, A.I. „Metabotropic Glutamate Receptors as Targets for Multipotential Treatment of Neurological Disorders”. *Neurotherapeutics* 6(2009) : 94-107.
15. Cao SS, Kaufman RJ. „Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease.” *Antioxid. Redox Signal.* 21(3) (2014):1-18.
16. Chen, T., Cao, L., Dong, W., Luo, P., Liu, W., Qu, Y. and Fei, Z. „Protective Effects of mGluR5 Positive Modulators against Traumatic Neuronal Injury through PKC-Dependent Activation of MEK/ERK Pathway”. *Neurochemical Research* 37(2012): 983-990.
17. Cheng, J., Moyer, B.D., Milewski, M., Loffing, J., Ikeda, M., Mickle, J.E., Cutting, G.R., Li, M., Stanton, B.A., Guggino, W.B., „A Golgi-associated PDZ domain protein modulates cystic fibrosis transmembrane regulator plasma membrane expression.” *J. Biol. Chem.* 277(2002): 3520–3529.
18. Chiocchetti, A., Miglio, G., Mesturini, R., Varsaldi, F., Mocellin, M., Orilieri, E., et al., „Group I mGlu receptor stimulation inhibits activation-induced cell death of human T lymphocytes”. *Br. J. Pharmacol.* 148 (2006): 760–768.
19. Chmiel, J.F., Berger, M., Konstan, M.W., „The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease”. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 23(2002): 5–27
20. Choi, Y.B., Tanneti, L., Le, D.A., Ortiz, J., Bai, G., Chen, H.S. and Lipton, S.A. „Molecular Basis of NMDA Receptor-Coupled Ion Channel Modulation by S-Nitrosylation”. *Nature Neuroscience* 3(2000): 15-21.
21. Chu, P.J., Saito, H. and Abe, K. „Polyamines Promote Regeneration of Injured Axons of Cultured Rat Hippocampal Neurons”. *Brain Research* 673(1995): 233-241.

22. Collard, C.D., Park, K.A., Montalto, M.C., Alapati, S., Buras, J.A., Stahl, G.L., Colgan, S.P., „Neutrophil-derived glutamate regulates vascular endothelial barrier function”. *J. Biol. Chem.* 277(2002): 14801–14811
23. Crepaldi, L., Lackner, C., Corti, C. and Ferraguti, F. „Transcriptional Activators and Repressors for the Neuronspecific Expression of a Metabotropic Glutamate Receptor”. *The Journal of Biological Chemistry* 282 (2007): 17877-17889.
24. Cuadra, A.E., Kuo, S.-H., Kawasaki, Y., Brecht, D.S., Chetkovich, D.M., „AMPA receptor synaptic targeting regulated by stargazin interactions with the Golgiresident PDZ protein nPIST.” *J. Neurosci.* 24 (34) (2004): 7491–7502.
25. Dickman, K.G., Youssef, G., Mathew, S.M., Said, S.L., „Ionotropic glutamate receptors in lungs and airways molecular basis for glutamate toxicity.” *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30 (2004): 139–144
26. Donowitz Mark, Boyoung Cha, Nicholas C. Zachos, Christopher L. Brett, Annu Sharma, C. Ming Tse and Xuhang Li. „NHERF family and NHE3 regulation.” *J Physiol* 567.1 (2005): 3–11
27. Droge W. „Free radicals in the physiological control of cell function.” *Physiol Rev* 82(2002): 47–95.
28. Droge, W., Eck, H.P., Betzler, M., Schlag, P., Drings, P., Ebert, W., „Plasma glutamate concentration and lymphocyte activity.” *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 114(1988): 124–128.
29. Dreyer et al., Transcriptional or translational inhibition blocks low dose NMDA-mediated cell death.” *Neuroreport* 6:942–944/7612888 (1995).
30. Eck, H.-P., Frey, H., Droge, W., „Elevated plasma glutamate concentrations in HIV-1-infected patients may contribute to loss of macrophage and lymphocyte functions”. *Int. Immunol.* 1 (4) (1989): 367–372.
31. Estévez, A.G., Sahawneh, M.A., Lange, P.S., Bae, N., Egea, M. and Ratan, R.R. „Arginase 1 Regulation of Nitric Oxide Production Is Key to Survival of Trophic Factor-Deprived Motor Neurons”. *The Journal of Neuroscience* 26(2006): 8512-8516.
32. Ferraguti, F., Crepaldi, L. and Nicoletti, F. „Metabotropic Glutamate 1 Receptor: Current Concepts and Perspectives.” *Pharmacological Reviews* 60(2008): 536-581.
33. Ganor, Y., Besser, M., Ben-Zakay, N., Unger, T., Levite, M., „Human T cells express a functional ionotropic glutamate receptor, GluR3, and glutamate by itself triggers integrin-mediated adhesion to laminin and fibronectin and chemotactic migration.” *J. Immunol.* 170(2003): 4362–4372

34. Girouard, H., Wang, G., Gallo, E. F., Anrather, J., Zhou, P., Pickel, V. M., et al. „NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2.” *J Neurosci.* 29(8) (2009):2545–2552
35. Gotoh, T., Chowdhury, S., Takiguchi, M. and Mori, M. „The Glucocorticoid-Responsive Gene Cascade. Activation of the Rat Arginase Gene through Induction of C/EBP β ”. *The Journal of Biological Chemistry* 272(1997): 3694-3698.
36. Grilli, M., Barbieri, I., Basudev, H., Brusa, R., Casati, C., Lozza, G. and Ongini, E. ”Interleukin-10 Modulates Neuronal Threshold of Vulnerability to Ischaemic Damage”. *European Journal of Neuroscience* 12 (2000): 2265-2272.
37. Guggino, W.B., Banks-Schlegel, S.P., „Macromolecular interactions and ion transport in cystic fibrosis.” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 170(2004): 815–820.
38. Guggino, W.B., Stanton, B.A., „New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR.” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (6) (2006): 426–436.
39. Hartl, D., Griesse, M., Kappler, M., Zissel, G., Reinhardt, D., Rebhan, C., Schendel, D.J., Krauss-Etschmann, S. „Pulmonary T(H)2 response in *Pseudomonas aeruginosa*-infected patients with cystic fibrosis.” *J. Allergy Clin. Immunol.* 117(2006): 204–211.
40. Hayashi T, Su TP. „Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca²⁺ signaling and cell survival.” *Cell.* 131(2007): 596-610.
41. Hayashi T, Rizzuto R, Hajnoczky G, Su TP. MAM: „more than just a housekeeper.” *Trends Cell Biol.* 19(2) 2009: 81–88.
42. Hollingsworth, E.B., McNeal, E.T., Burton, J.L., Williams, R.J., Daly, J.W. and Creveling, C.R. „Biochemical Characterization of a Filtered Synaptoneurosome Preparation from Guinea Pig Cerebral Cortex: Cyclic Adenosine 3': 5'-Monophosphate-Generating Systems, Receptors, and Enzymes.” *Journal of Neuroscience* 5(1985): 2240-2253.
43. Hordijk PL. „Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins.” *Circ Res.* 98(2006):453–62.
44. Houamed KM, Kuijper JL, Gilbert TL, Haldeman BA, O'Hara PJ, Mulvihill ER, Almers W, Hagen FS. „Cloning, expression, and gene structure of a G protein-coupled glutamate receptor from rat brain.” *Science (New York, N.Y.)*. 252(1991): 1318-21.

45. Hubeau, C., Lorenzato, M., Couetil, J.P., Hubert, D., Dusser, D., Puchelle, E., Gaillard, D., „Quantitative analysis of inflammatory cells infiltrating the cystic fibrosis airway mucosa.” *Clin. Exp. Immunol.* 124(2001): 69–76.
46. Hung AY & ShengM „PDZ domains: structural modules for protein complex assembly.” *J Biol Chem* 277 (2002) : 5699–5702.
47. Jones et al., „The Molecular Basis of IL-10 Function: From Receptor Structure to the Onset of Signaling.” *Curr Top Microbiol Immunol.* 380 (2002): 191–212.
48. Kelly A, Lynch A, Vereker E, Nolan Y, Queenan P, Whittaker E, O'Neill LA, Lynch MA. „The anti-inflammatory cytokine, interleukin (IL)-10, blocks the inhibitory effect of IL-1 beta on long term potentiation.” *A role for JNK.J Biol Chem.* 276(49) 2001: 45564-72.
49. Kelly, A., Lynch, A., Vereker, E., Nolan, Y., Queenan, P., Whittaker, E., O'Neill, L.A. and Lynch, M.A. „The Anti-Inflammatory Cytokine, Interleukin (IL)-10, Blocks the Inhibitory Effect of IL-1 β on Long Term Potentiation. A Role for JNK.” *The Journal of Biological Chemistry* 276 (2001): 45564-45572.
50. Kerem B., Rommens J.M., Buchanan J. A. et al. „Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis.” *Science.* V. 245. (1989): P. 1073-1080.
51. Kfoury, N. and Kapatos, G. „Identification of Neuronal Target Genes for CCAAT/Enhancer Binding Proteins.” *Molecular and Cellular Neuroscience* 40(2009): 313-327.
52. Kim, E., Sheng, M., „PDZ domain proteins of synapses.” *Nat. Rev.Neurosci.*5, (2004):771–781.
53. Kim, S.H., Fraser, P.E., Westaway, D., St. George-Hyslop, P.H., Ehrlich, M.E. and Gandy, S. „Group II Metabotropic Glutamate Receptor Stimulation Triggers Production and Release of Alzheimer's Amyloid β 42 from Isolated Intact Nerve Terminals.” *Journal of Neuroscience* 30 (2010): 3870-3875.
54. Knobloch, S.M. and Faden, A.I. „Interleukin-10 Improves Outcome and Alters Proinflammatory Cytokine Expression after Experimental Traumatic Brain Injury.” *Experimental Neurology* 153(1998): 143-151.
55. Koriauli S, Barbakadze T, Natsvlishvili N, Dabrundashvili N, Kvaratskhelia E, Mikeladze D. „IL-10 Gene Knockout Reduces the Expression of mGlu Receptor 1a/b and Decreases the Glutamate-Dependent Production of Nitric Oxide.” *J. Biomedical Science and Engineering.* 7(2014): 1019-1029

56. Kvaratskhelia, E., Maisuradze, E., Dabrundashvili, N.G., Natsvlishvili, N., Zhuravliova, E., Mikeladze, D.G., „N-Methyl-d-aspartate and sigma-ligands change the production of interleukins 8 and 10 in lymphocytes through modulation of the NMDA glutamate receptor.” *Neuroimmunomodulation* 16(2009): 201–207.
57. Kunishima et al., „Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor” *Nature* 407(6807), 2000: 971-7.
58. Lang, R., Patel, D., Morris, J.J., Rutschman, R.L. and Murray, P.J. „Shaping Gene Expression in Activated and Resting Primary Macrophages by IL-10.” *The Journal of Immunology* 169(2002): 2253-2263.
59. Lange, P.S., Langley, B., Lu, P. and Ratan, R.R. „Novel Roles for Arginase in Cell Survival, Regeneration, and Translation in the Central Nervous System.” *Journal of Nutrition* 134 (2004): 2812S-2817S.
60. Lanzavecchia, A., Sallusto, F., „Regulation of T cell immunity by dendritic cells.” *Cell* 106(2001): 263–266.
61. Lee, J.H., Richter, W., Namkung, W., Hwan Kim, K.H., Kim, E., Conti, M., Lee, M.G., „Dynamic regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by competitive interactions of molecular adaptors.” *J. Biol. Chem.* 282 (14) 2007:10414–10422
62. Li J, Zhu H, Shen E, Wan L, Arnold JM, Peng T. „Deficiency of Rac1 Blocks NADPH Oxidase Activation, Inhibits Endoplasmic Reticulum Stress, and Reduces Myocardial Remodeling in a Mouse Model of Type 1 Diabetes.” *’59*(2010): 2033–2042.
63. Lim SH, Park E, You B, Jung Y, Park A-R, et al. „Neuronal synapse formation induced by microglia and interleukin10.” *PLoS ONE* 8(11)(2013): 812-18.
64. Liu, P., Gupta, N., Jing, Y. and Zhang, H. „Age-Related Changes in Polyamines in Memory-Associated Brain Structures in Rats.” *Neuroscience* 155(2008): 789-796.
65. Llansola, M. and Felipo, V. „Metabotropic Glutamate Receptor 5, but Not 1, Modulates NMDA Receptor-Mediated Activation of Neuronal Nitric Oxide Synthase.” *Neurochemistry International* 56(2010): 535-554.
66. Lombardi, G., Dianzani, C., Miglio, G., Canonico, P.L., Fantozzi, R., „Characterization of ionotropic glutamate receptors in human lymphocytes.” *Br. J. Pharmacol.* 133(2001): 936–944.
67. Lyczak, J.B., Cannon, C.L., Pier, G.B., „Lung infections associated with cystic fibrosis.” *Clin. Microbiol. Rev.* 15 (2) 2002: 194–222.

68. Maiese, K., Chong, Z.Z. and Li, F. „Driving Cellular Plasticity and Survival through the Signal Transduction Pathways of Metabotropic Glutamate Receptors.” *Current Neurovascular Research* 2(2005): 425-446.
69. Maiese, K., Chong, Z.Z. and Li, F. „Driving Cellular Plasticity and Survival through the Signal Transduction Pathways of Metabotropic Glutamate Receptors.” *Current Neurovascular Research*, 2(2005): 425-446.
70. Maiese, K., Vincent, A., Lin, S.H. and Shaw, T. „Group I and Group III Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes Provide Enhanced Neuroprotection.” *Journal of Neuroscience Research* 62(2000): 257-272.
71. Maiese, K., Vincent, A., Lin, S.H. and Shaw, T. „Group I and Group III Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes Provide Enhanced Neuroprotection.” *Journal of Neuroscience Research*, 62(2000): 257-272.
72. Martin et al., „Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation.” *J Cell Biol* 106:829–844/2450099–844/2450099 (1988).
73. Maurice and Su., „The pharmacology of sigma-1 receptors.” *Pharmacol ther* 124. (2009): 195-206.
74. MacDonald, T.V., Nghiem, P.T., Gardner, P., Martens, C.L., „Human lymphocytes transcribe the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene and exhibit CF-defective cAMP regulated chloride current.” *J. Biol. Chem.* 267 (5) 1992: 3242–3245.
75. Mesquita, A.R., Correia-Neves, M., Castroa, A.G.R., Vieira, P., Pedrosaa, J., Palhaa, J.A. and Sousaa, N. „IL-10 Modulates Depressive-Like Behavior.” *Journal of Psychiatric Research* 43 (2008): 89-97.
76. Miglio, G., Varsaldi, F., Lombardi, G., „Human T lymphocytes express Nmethyl- d-aspartate receptors functionally active in controlling T cell activation.” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, (2005): 1875–1883.
77. Mittal S and Ganesh S. „Protein quality control mechanisms and neurodegenerative disorders: checks, balances and deadlocks.” *Neuroscience Research*. 68(3) 2010: 159–166.
78. Mohler, P.J., Kreda, S.M., Boucher, R.C., Sudol, M., Stutts, M.J., Milgram, S.L., „Yes-associated protein 65 localizes p62(c-Yes) to the apical compartment of airway epithelia by association with EBP.” *J. Cell Biol* 147 50(1999): 879–890

79. Mori, M. and Gotoh, T. „Regulation of Nitric Oxide Production by Arginine Metabolic Enzymes.’’ *Biochemical and Biophysical Research Communications* 275(2000): 715-719.
80. Moore et al., „Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.’’*Annu RevImmunol.* 19 (2001): 683-765.
81. Morris Jr et al., „ Enzymes of Arginine Metabolism’’. *J. Nutr.* vol. 134 . 10 **2743S-2747S.** (2002).
82. Moss, R.B., Hsu, Y.-P., Olds, L., „Cytokine dysregulation in activated cystic fibrosis (CF) peripheral lymphocyte.’’ *Clin. Exp. Immunol.* 120(2000): 518–525.
83. Mott et al., „Phenylethanolamines inhibit NMDA receptors by enhancing proton inhibition.’’ *Nat Neurosci.*(8) (1998):659-67.
84. Muddashetty, R.S., Kelić, S., Gross, C., Xu, M. and Bassell, G.J., „Dysregulated Metabotropic Glutamate Receptor- Dependent Translation of AMPA Receptor and Postsynaptic Density-95 mRNAs at Synapses in a Mouse Model of Fragile X Syndrome.’’ *Journal of Neuroscience* 27(2007): 5338-5348.
85. Mueller, C., Braag, S.A., Keeler, A., Hodges, C., Drumm, M., Flotte, T.R., „Lack of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in CD3+ lymphocytes leads to aberrant cytokine secretion and hyperinflammatory adaptive immune responses.’’ *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44 (2011): 922–929.
86. Muhlebach, M.S., Noah, T.L., „Endotoxin activity and inflammatory markers in the airways of young patients with cystic fibrosis.’’ *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165(2002): 911–915.
87. Munder, M., Eichmann, K., Morán, J.M., Centeno, F., Soler, G. and Modolell, M. „Th1/Th2-Regulated Expression of Arginase Isoforms in Murine Macrophages and Dendritic Cells.’’ *The Journal of Immunology* 163(1999): 3771-3777.
88. Natsvlishvili N., Gogvadze N., Zhuravliova E., Mikeladze D. „Sigma-1 receptor directly interacts with Rac1-GTPase in the brain mitochondria.’’ *BMC Biochemistry.* doi: 10.1186/s12858, (2015)-015-0040
89. Nicholls, D.G., „Oxidative stress and energy crises in neuronal dysfunction.’’ *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1147(2008): 53–60
90. Nicoletti, F., Bockaert, J., Collingridge, G.L., Conn, P.J., Ferraguti, F., Schoepp, D.D., Wroblewski, J.T. and Pin, J.P. „Metabotropic Glutamate Receptors: From the Workbench to the Bedside.’’ *Neuropharmacology* 60 (2011): 1017-1041.

91. Nikolova S, Lee YS, and Kim JA. „Rac1-NADPH oxidase regulated generation of reactive oxygen species mediates glutamate-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells.” *Free Radic Res.* 39(2005): 1295–1304.
92. O’Shea, Pesu,M., Borie, D.C. and Changelian, P.S. „A New Modality for Immunosuppression: Targeting the JAK/STAT Pathway.” *Nature Reviews Drug Discovery* 3(2004):555-564.
93. O'Brien WJ, Heimann T, Rizvi F. „NADPH oxidase expression and production of superoxide by human corneal stromal cells.” *Molecular Vision.* 15(2009):2535-2543.
94. Oliva Jr., A.A., Kang, Y., Sanchez-Molano, J., Furones, C. and Atkins, C.M. „STAT3 Signaling after Brain Injury.” *Journal of Neurochemistry* 120(2012): 710-720.
95. Ozaki M, Deshpande SS, Angkeow P, Suzuki S, Irani K. „Rac1 regulates stress-induced, redox-dependent heat shock factor activation.” *J. Biol. Chem.* 275(2000):35377-35383.
96. Pabba M, Sibille E. „Sigma-1 and N-Methyl-D-Aspartate Receptors: A Partnership with Beneficial Outcomes.” *Mol Neuropsychiatry.* 1(2015):47–51.
97. Pabba M, Wong AY, Ahlskog N, Hristova E, Biscaro D, Nassrallah W, Ngsee JK, Snyder M, Beique JC, Bergeron R. „NMDA receptors are upregulated and trafficked to the plasma membrane after sigma-1 receptor activation in the rat hippocampus.” *The Journal of Neuroscience.* 34(2014):11325–11338.
98. Pacheco, R., Ciruela, F., Casado, V., Mallol, J., Gallart, T., Lluís, C., Franco, R., „Group I metabotropic glutamate receptors mediate a dual role of glutamate in T cell activation.” *J. Biol. Chem.* 279(2004): 33352–33358.
99. Pacheco, R., Oliva, H., Martínez-Navio, J.M., Climent, N., Ciruela, F., Gatell, J.M., Gallart, T., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R., „Glutamate released by dendritic cells as a novel modulator of T cell activation.” *J. Immunol.* 177(2006): 6695–6704.
100. Pamela, B., Davis, P.D. „Cystic fibrosis since.” „*Am. J. Respir. Crit. Care* . 173(2006) 475–482
101. Paquet, M., Asay, M.J., Fam, S.R., Inuzuka, H., Castleberry, A.M., Oller, H., Smith, Y., Yun, C.C., Traynelis, S.F., Hall, R.A. „The PDZ scaffold NHERF-2 interacts with mGluR5 and regulates receptor activity” *J. Biol. Chem.* 281 (40), 2006: 29949–29961.

102. Park KW, Lee HG, Jin BK, Lee YB. „Interleukin-10 endogenously expressed in microglia prevents lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in the rat cerebral cortex *in vivo*.” *Exp Mol Med*. 39(6) 2007: 812-9.
103. Pelaseyed, T., Hansson, G.C. „CFTR anion channel modulates expression of human transmembrane mucin MUC3 through the PDZ protein.” *GOPC. J. Cell Sci*. 124 (18) 2011: 3074–3083.
104. Pellegrini-Giampietro, D.E. „An Activity-Dependent Spermine-Mediated Mechanism That Modulates Glutamate Transmission.” *Trends in Neurosciences* 26(2003): 9-11.
105. Perez-Asensio FJ, Perpiñá U, Planas AM, Pozas E. „Interleukin-10 regulates progenitor differentiation and modulates neurogenesis in adult brain.” *J Cell Sci*. 126(Pt 18) 2013:4 208-19.
106. Perez-Asensio, F.J., Perpiñá, U., Planas, A.M. and Pozas, E. „Interleukin-10 Regulates Progenitor Differentiation and Modulates Neurogenesis in Adult Brain.” *Journal of Cell Science* 126(2013): 4208-4219.
107. Pin JP, Duvoisin R. „The metabotropic glutamate receptors: structure and functions.” *Neuropharmacology*. 34(1) 1995: 1-26.
108. Pouloupoulou, C., Markakis, I., Davaki, P., Nikolaou, C., Pouloupoulos, A., Raptis, E., et al., „Modulation of voltage-gated potassium channels in human T lymphocytes by extracellular glutamate.” *Mol. Pharmacol*. 67(2005): 856–867.
109. Rameau, G.A., Chiu, L.Y. and Ziff, E.B. „NMDA Receptor Regulation of nNOS Phosphorylation and Induction of Neuron Death.” *Neurobiology of Aging* 24(2003): 1123-1133
110. Ramji, D.P. and Foka, P. „CCAAT/Enhancer-Binding Proteins: Structure, Function and Regulation.” *Biochemical Journal* 365(2002): 561-575.
111. Ratan et al., „Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons.” *J Neurochem* 62:376–379/903353 (1994a,b).
112. Reddy M., Quinton P., Haws C. et al. Failure of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to conduct ATP “. *Science*. V. 271. (1996): P. 1876-1879
113. Reynolds, I.J. and Miller, R.J. „Ifenprodil Is a Novel Type of NMDA Receptor Antagonist: Interaction with Polyamines.” *Molecular Pharmacology* 36(1989): 758-765

114. Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., et al., „Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA.” *Science* 245 (1989): 1066–1073.
115. Riley JK et al., „Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action.” *J Biol Chem.* 274(23),(1999): 16513-21.
116. Robb et al., „Interleukin-10 activates the transcription factor C/EBP and the interleukin-6 gene promoter in human intestinal epithelial cells.” *Surgery* 132(2)(2002): 226-31
117. Ruiz A, Matute C, Alberdi E. „Endoplasmic reticulum Ca²⁺ release through ryanodine and IP₃ receptors contributes to neuronal excitotoxicity.” *Cell Calcium.* 46(2009): 273–281.
118. Said, S.I. „Glutamate receptors and asthmatic airway disease.” *Trends Pharmacol. Sci.* 20 (1999): 132–135.
119. Serghini et al., „Cycloheximide and actinomycin D block the toxic effect of glutamic acid on PC12 cells” *Neuroreport* 6:29 (1994):–327703422
120. Sethi, R., Chava, R.S., Bashir, S. and Castro, E.M. „An Improved High Performance Liquid Chromatographic Method for Identification and Quantization of Polyamines as Benzoylated Derivatives.” *American Journal of Analytical Chemistry* 2(2011): 456-469.
121. Shankar Subramanian Iyer et al., „Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease.” *Crit Rev Immunol.* 32(1) 2012: 23–63.
122. Sharma, S., Yang, B., Xi, X., Grotta, J.C., Aronowski, J. and Savitz, S.I. „IL-10 Directly Protects Cortical Neurons by Activating PI-3 Kinase and STAT-3 Pathways.” *Brain Research* 1373(2011): 189-194.
123. Sharma, T.A. and Reynolds, I.J. „Characterization of the Effects of Polyamines on [125I]MK-801 Binding to Recombinant N-Methyl-D-Aspartate Receptors.” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 289(1999): 1041-1047.
124. Shankar Subramanian Lye., „Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease” *Crit Rev Immunol.* 32(1) (2012): 23–63.
125. Sheppard, D.N., Welsh, M.J., „Structure and function of the CFTR chloride channel.” *Phys. Rev.* 79 (1) 1999: 23–45.
126. Sica, A. and Bronte, V. „Altered Macrophage Differentiation and Immune Dysfunction in Tumor Development.” *Journal of Clinical Investigation* 117(2007): 1155-1166.

127. Simone M. et al., „Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. “ *Journal of Leukocyte Biology* vol. 78/5/ (2005). 1043- 1051
128. Soltys, J., Bonfield, T., Chmiel, J., Berger, M., „Functional IL-10 deficiency in the lung of cystic fibrosis (cftr^{-/-}) and IL-10 knockout mice causes increased expression and function of B7 costimulatory molecules on alveolar macrophages.” *J. Immunol.* 168(2002): 1903–1910.
129. Sobolevsky and Koshelev., „Interaction of memantine and amantadine with agonist-unbound NMDA-receptor channels in acutely isolated rat hippocampal neurons” *J Physiol.* 1; 512(Pt 1) 1998: 47-60.
130. Steinert, J.R., Chernova, T. and Forsythe, I.D. „Nitric Oxide Signaling in Brain Function, Dysfunction, and Dementia.” *The Neuroscientist* 16(2010): 435-452.
131. Stein et al., „Transcription factors NF-IL6 and NF-KB synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8.” *Immunology* vol.90 (1993): 10193-10197.
132. Thompson, C.D., Zurko, J.C., Hanna, B.F., Hellenbrand, D.J. and Hanna, A. „The Therapeutic Role of Interleukin-10 after Spinal Cord Injury.” *Journal of Neurotrauma* 30 (2013): 1311-1324.
133. Traynelis, S.F., Hartley, M. and Heinemann, S.F. „Control of Proton Sensitivity of the NMDA Receptor by RNA Splicing and Polyamines.” *Science* 268 (1995): 873-876.
134. Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J. and Dingledine, R. „Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function.” *Pharmacological Reviews* 62 (2010): 405-496.
135. Treton X, Pedruzzi E, Guichard C, Ladeiro Y, Sedghi S, et al. „Combined NADPH Oxidase 1 and Interleukin 10 Deficiency Induces Chronic Endoplasmic Reticulum Stress and Causes Ulcerative Colitis-Like Disease in Mice.” *PLoS One.* 9(7) 2014: 101669
136. Turovskaya MV, Turovsky EA, Zinchenko VP, Levin SG, Godukhin OV. „Interleukin-10 modulates [Ca²⁺]_i response induced by repeated NMDA receptor activation with brief hypoxia through inhibition of InsP3-sensitive internal stores in hippocampal neurons.” *Neurosci. Lett.* 516. (2012); 151–155.

137. Vidal, P.M., Lemmens, E., Dooley, D. and Hendrix, S. „The Role of “Anti-Inflammatory” Cytokines in Axon Regeneration.” *Cytokine & Growth Factor Reviews* 24 (2013): 1-12.
138. Villacampa N, Almolda B, Vilella A, Campbell IL, Gonzalez B, Castellano B. „Astrocyte-targeted production of IL-10 induces changes in microglial reactivity and reduces motor neuron death after facial nerve axotomy.” *Glia*. 63(7) 2015:1166–84.
139. Villacampa N, B. Almolda, A. Vilella, I. L. Campbell, B. Gonzalez, B. Castellano. „Astrocyte-Targeted Production of IL-10 Induces Changes in Microglial Reactivity and Reduces Motor Neuron Death After Facial Nerve Axotomy.” *Glia*. 63(72015):1166–1184.
140. Von Garnier, C., Filgueira, L., Wikstrom, M., Smith, M., Thomas, J.A., Strickland, D.H., Holt, P.G., Stumbles, P.A., „Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract.” *J. Immunol.* 175(2005):1609–1618.
141. Vyklicky V., „Structure, Function, and Pharmacology of NMDA Receptor Channels” *Physiol. Res.* 63 (Suppl. 1) 1993: S191-S203.
142. Wang, H. and Zhuo, M. „Group I Metabotropic Glutamate Receptor-Mediated Gene Transcription and Implications for Synaptic Plasticity and Diseases.” *Frontiers in Pharmacology* 3(2012): 189.
143. Wang, M., Luo, Z., Liu, S., Li, L., Deng, X., Huang, F., Shang, L., Jian, C., Yue, S., “Glutamate mediates hyperoxia-induced newborn rat lung injury through N-methyl-D-aspartate receptors.” *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40(2009): 260–267.
144. Wang, S., Raab, R.W., Schatz, P.J., Guggino, W.B., Li, M. “Peptide binding consensus of the NHE-RF1-PDZ1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR).” *FEBS Lett.* 427(1998):103–108.
145. Weaver C E., „Neuroprotective activity of a new class of steroidal inhibitors of the N-methyl-D-aspartate receptor.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 1997:10450–10454.
146. Weiler, I.J., Spangler, C.C., Klintsova, A.Y., Grossman, A.W., Kim, S.H., Bertaina-Anglade, V., Khaliq, H., de Vries, F.E., Lambers, F.A., Hatia, F., Base, C.K. and Greenough, W.T. „Fragile X Mental Retardation Protein Is Necessary for Neurotransmitter-Activated Protein Translation at Synapses.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(2004): 17504-17509.

147. Wiesinger, H. „Arginine Metabolism and the Synthesis of Nitric Oxide in the Nervous System.” *Progress in Neurobiology* 64(2001): 365-391.
148. Williams, K. „Interactions of Polyamines with Ion Channels.” *Biochemical Journal*, 325(1997): 289-297.
149. Winder DG, Smith T, Conn PJ. „Pharmacological differentiation of metabotropic glutamate receptors coupled to potentiation of cyclic adenosine monophosphate responses and phosphoinositide hydrolysis.” *Pharmacol Exp Ther.* 266(2) 1993: 518-25.
150. Wolde, M., Fellows, A., Cheng, J., Kivenson, A., Coutermarsh, B., Talebian, L., et al., „Targeting CAL as a negative regulator of Δ F508-CFTR cell-surface expression.” *J. Biol. Chem.* 282 (11) 2007: 8099–8109.
151. Xin J, Wainwright DA, Mesnard NA, Serpe CJ, Sanders VM, Jones KJ. „IL-10 within the CNS Is Necessary for CD4⁺ T Cells to Mediate Neuroprotection.” *Brain, Behavior, and Immunity.* 25(2001): 820-829.
152. Xin, J., Wainwright, D.A., Mesnard, N.A., Serpe, C.J., Sanders, V.M. and Jones, K.J. „IL-10 within the CNS Is Necessary for CD4⁺ T Cells to Mediate Neuroprotection.” *Brain, Behavior, and Immunity* 25 (2011): 820-829.
153. Yu, H., Iyer, R.K., Kern, R.M., Rodriguez, W.I., Grody, W.W. and Cederbaum, S.D. „Expression of Arginase Isozymes in Mouse Brain.” *Journal of Neuroscience Research*, 66 (2001): 406-422.
154. Zdanov et al., „The Molecular Basis of IL-10 Function: „From Receptor Structure to the Onset of Signaling.” *Curr Top Microbiol Immunol.* 380 (1995):191–212.
155. Zhang, J.Q., Cheng, S., Xiong, Y., Ma, Y.M., Luo, D.L., Jeromin, A., Zhang, H., He, J.Q., „A novel association of mGluR1a with the PDZ scaffold protein CAL modulates receptor activity.” *FEBS Lett.* 582(2008): 4117–4124.
156. Zhou S., „Peripheral administration of NMDA, AMPA or KA results in pain behaviors in rats” *Neuroreport*, 7 (4) 1996:895-900.
157. Zhou, Z., Peng, X., Insolera, R., Fink, D.J. and Mata, M. „IL-10 Promotes Neuronal Survival Following Spinal Cord Injury.” *Experimental Neurology* 220 (2009): 183-190.
158. Zhou, Z., Peng, X., Insolera, R., Fink, D.J. and Mata, M. „Interleukin-10 Provides Direct Trophic Support to Neurons.” *Journal of Neurochemistry* 110 (2009): 1617-1627.