

მიო-ინოზიტოლის მოკლე და გრძელვადიანი ეფექტები კაინის მჟავით
გამოწვეული ეპილეპტოგენეზის ბიოქიმიურ და ქცევით ცვლილებებზე

ლია წვერავა

*სადისერტაციო ნაშრომი წარდგენილია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის
საბუნებისმეტყველო მეცნიერებებისა და მედიცინის ფაკულტეტზე, სიცოცხლის
შემსწავლელ მეცნიერებათა დოქტორის აკადემიური ხარისხის მინიჭების მოთხოვნების
შესაბამისად*

სიცოცხლის შემსწავლელ მეცნიერებათა სადოქტორო პროგრამა

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: პროფესორი რევაზ სოლომონია ბმდ

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი

თბილისი, 2019 წელი

1.1. 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.

ლია წვერავა

ლ. წვერავა

12.04.2019

1.2. აბსტრაქტი

ეპილეფსია ერთ-ერთი ყველაზე დამანგრეველი ნეიროლოგიური დაავადებაა და მიუხედავად დიდი ძალისხმევისა, არ არსებობს სამკურნალო საშუალება, რომელიც აღნიშნულ პროცესს შეაფერხებდა. ეპილეფსიის დროს სპონტანურ კრუნჩხვებს წინ უძღვის ტვინში მომხდარი უამრავი ფუნქციური და სტრუქტურული პათოფიზიოლოგიური ცვლილებები-ეს პროცესი არის ეპილეპტოგენეზი. მკურნალობის სტრატეგია მიზნად უნდა ისახავდეს აღნიშნულ პროცესზე მოქმედებით განმეორებადი სპონტანური კრუნჩხვების (გსკ) თავიდან აცილებას ან დაავადების პროგრესირების შეფერხებას.

დღეს-დღეობით უდიდესი მნიშვნელობისაა იმ ბიოქიმიური ნაერთების იდენტიფიკაცია, რომელიც შეაფერხებს ეპილეპტოგენეზის პროცესს და მათი მოქმედების მექანიზმების შესწავლა. ჩვენმა წინა კვლევებმა აჩვენა, რომ ვირთაგვების მიო-ინოზიტოლით ყოველდღიური დამუშავება 28 დღის განმავლობაში, იწვევს იმ ბიოქიმიური პროცესების შეფერხებას, რომლებიც ინდუცირებულია კაინის მჟავით გამოწვეული ეპილეფსიური მდგომარეობით. თუმცა ამ კვლევაში ჩვენ არ შეგვისწავლია მიო-ინოზიტოლის ეფექტები კაინის მჟავით გამოწვეული ეპილეფსიური მდგომარეობიდან 1 დღის შემდეგ.

ჩვენი კვლევის პირველ ნაწილში ყურადღება გავამახვილეთ კაინის მჟავით გამოწვეულ სხვა ადრეულ მოლეკულურ და მორფოლოგიურ ცვლილებებზე და მიო-ინოზიტოლის ეფექტებზე ამ პროცესებზე. კაინის მჟავით დამუშავებულ ვირთაგვების ჰიპოკამპში ადგილი ჰქონდა ვოლტაჟ-დამოკიდებული ანიონური არხი 1-ის (ვდაა-1), მიტოქონდრიალურ-პლაზმურ მემბრანული ცილა კოფილინის რაოდენობის და ასევე კასპაზა-3-ის აქტივობის ზრდას. ამავე დროს მიო-ინოზიტოლის ადმინისტრირება კაინის მჟავის შეყვანიდან 4 საათის შემდეგ აფერხებდა აღნიშნულ ცვლილებებს, მაშინ როდესაც დროის იგივე ინტერვალით დიაზეპამი (გამა-ამინოჰერბოს მჟავას ა-ტიპის რეცეპტორის აგონისტი) ზეგავლენას არ ახდენდა კაინის მჟავით გამოწვეულ

პროცესებზე. ნეირონთა რიცხოვნება ჰიპოკამპის CA1 და CA3 ველებში მცირდებოდა კაინის მჟავით გამოწვეული სტატუს ეპილეპტიკუსის შედეგად და მხოლოდ ინოზიტოლით შემდგომი დამუშავება ასევე სარწმუნოდ აფერხდებდა ამ შემცირებას. არავითარი სარწმუნო ცვლილება არ იქნა ნანახი ნეოკორტექსში. მიღებული შედეგები მიუთითებს, კაინის მჟავით გამოწვეული ეპილეფსიური სტატუსის შემდეგ მხოლოდ ინოზიტოლით დადებითი ზემოქმედების სამიზნეს შესაძლოა წარმოადგენდეს აპოპტოზის პროცესების და უჯრედული კვდომის შემცირება და ეს მოქმედება არ უნდა ხორციელდებოდეს გამა-ამინოჰერბოს მჟავას ა-ტიპის რეცეპტორზე მოქმედებით არამედ უფრო დარღვეული ოსმოსური ბალანსის აღდგენით.

კვლევის მეორე ნაწილში, ჩვენ შევისწავლეთ, ეპილეფსიური მდგომარეობის ჩამოყალიბების შემდეგ, ჰქონდა თუ არა 4 კვირიან მხოლოდ ინოზიტოლის ადმინისტრირებას მოქმედების გრძელვადიანი ეფექტები განმეორებადი სპონტანური კრუნჩხვების (გსკ) რაოდენობასა და ხანგრძლივობაზე მკურნალობის შეწყვეტის შემდეგ და ახლდა თუ არა ამ ყველაფერს ჰიპოკამპში მოლეკულური ცვლილებები.

ჩვენ ვნახეთ რომ, მხოლოდ ინოზიტოლის 28 დღიანი დამუშავება ამცირებდა გსკ-ს რაოდენობასა და ხანგრძლივობას, არა მარტო ინექციების განმავლობაში, არამედ აგრეთვე მხოლოდ ინოზიტოლით დამუშავების შეწყვეტიდან 4 კვირის განმავლობაშიც. უფრო მეტიც, მხოლოდ ინოზიტოლს მნიშვნელოვანი ეფექტები ჰქონდა ჰიპოკამპში მომხდარ მოლეკულურ ცვლილებებზეც, რომელიც მოიცავდა მიკრო-რნმ-ების სპექტრის ცვლილებებს, ასევე ნატრიუმ-მხოლოდ ინოზიტოლ ტრანსპორტერისა და მოცულობით რეგულირებადი ანიონური არხის სუბერთეულის მ-რნმ-ების ექსპრესიას. ეს მონაცემები ცხადყოფს, რომ მხოლოდ ინოზიტოლის მოქმედებით განპირობებული მოლეკულური ცვლილებები ეპილეპტოგენეზის პროცესის საწინააღმდეგო უნდა იყოს.

ამგვარად, ჩვენი მონაცემებიდან გამომდინარე შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ მხოლოდ ინოზიტოლი ანტიეპილეფსიური მოქმედებით ხასითდება, რაც სახავს ახალ პერსპექტივას რომ მხოლოდ ინოზიტოლი როგორც ახალი ანტიეპილეფსიური საშუალება გამოყენებულ იქნას ტრანსლაციურ კვლევებში.

ძირითადი საძიებო სიტყვები: ეპილეპტოგენეზი, მიო-ინოზიტოლი, განმეორებადი სპონტანური კრუნჩხვები, ვოლტაჟ-დამოკიდებული ანიონური არხის ცილა-1. კოფილინი, კასპაზა-3, ნატრიუმ-მიო-ინოზიტოლ ტრანსპორტერი, მრავ, მიკრო-რნმ-ები.

1.3. Abstract

Epilepsy is one of the most devastating neurological diseases and despite significant efforts there is no cure available. Occurrence of spontaneous seizures in epilepsy is preceded by numerous functional and structural pathophysiological reorganizations in the brain—a process called epileptogenesis. Treatment strategies targeting this process may be efficient for preventing spontaneous recurrent seizures (SRS) in epilepsy, or for modification of disease progression.

Identification of compounds preventing or modifying the biochemical changes that underlie the epileptogenesis process and understanding the mechanism of their action are of great importance. We have previously shown that myoinositol (MI) daily treatment for 28 days prevents certain biochemical changes that are triggered by kainic acid (KA) induced status epilepticus (SE). However in these studies we have not detected any effects of MI on the first day after SE. In the first part of our research we focused on other molecular and morphological changes at the early stages of SE induced by KA and effects of MI treatment on these changes. The increase in the amount of voltage-dependent anionic channel-1 (VDAC-1), cofilin, and caspase-3 activity was observed in the hippocampus of KA treated rats. Administration of MI 4 hours later after KA treatment abolishes these changes, whereas diazepam treatment by the same time schedule has no significant influence. The number of neuronal cells in CA1 and CA3 subfields of hippocampus is decreased after KA induced SE and MI post treatment significantly attenuates this reduction. Obtained results indicate that MI post treatment after KA induced SE could successfully target the biochemical processes involved in apoptosis, and reduces cell loss.

In the second part of our research we have investigated whether 4 week post-SE MI administration exerted long-term effects on the frequency and duration of spontaneous recurrent seizures (SRS) after the termination of the treatment, and if this was accompanied by the molecular changes in the hippocampus. We have shown that, in KA-induced post-SE epilepsy model in rats, MI treatment for 28 days reduces frequency and duration of behavioral SRS not only during the treatment, but also after its termination for the following 4 weeks.

Moreover, MI has significant effects on molecular changes in the hippocampus, including mi-RNA expression spectrum, as well as mRNA levels of sodium-MI transporter and LRRC8A subunit of the volume regulated anionic channel. Taken together, these data suggest that molecular changes induced by MI treatment may counteract epileptogenesis.

Thus, here we provide data indicating antiepileptogenic properties of MI, which further supports the idea of developing new antiepileptogenic and disease modifying drug that targets MI system.

Key Words: epileptogenesis, myo-inositol, spontaneous recurrent seizures, voltage-dependent anionic channel-1, cofilin, caspase-3, Sodium-myo-inositol transporter, LRRC8A, miRNAs

1.4.მადლობა

მადლობას ვუხდით ჩემს ხელმძღვანელს-პროფესორ რევაზ სოლომონიას ამ წლების განმავლობაში, სადოქტორო ნაშრომის მომზადებაში გაწეული დახმარებებისათვის და მხარდაჭერისთვის. მადლობას ვუხდით ჩვენი ლაბორატორიის ყველა თანამშრომელს და ასევე ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტს დიდი დახმარებისათვის და მხარდაჭერისათვის.

1.5. სარჩევი

1.5. სარჩევი.....	viii
1.6. სურათების, ცხრილების და სხვა ილუსტრაციების ჩამონათვალი.....	xii
1.7. გამოყენებული შემოკლებები.....	xiv
2.1. შესავალი	1
2.2. სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა.....	4
თავი 1. ეპილეფსიის და ეპილეპტოგენეზის ზოგადი მიმოხილვა.....	4
ქვეთავი 1. ეპილეფსია.....	4
ქვეთავი 2. ეპილეპტოგენეზი.....	8
თავი 2. ინოზიტოლები და ეპილეფსია	10
ქვეთავი 2.1. ინოზიტოლები ჰომეოსტაზი, მეტაბოლიზმი და ფუნქციური მნიშვნელობა.....	12
ქვეთავი 2.2. ინოზიტოლის გავრცელება ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში.....	13
ქვეთავი 2.3. ინოზიტოლის სინთეზი.....	14
ქვეთავი 2.4. ინოზიტოლის გამოყოფა.....	14
ქვეთავი 2.5. ინოზიტოლის ტრანსპორტერები და უჯრედის მოცულობის რეგულირება	
2.5.1. ნატრიუმ/მიო-ინოზიტოლ ტრანსპორტერი.....	15
ქვეთავი 2.6. ინოზიტოლის გავლენა სხვა ნეიროლოგიურ დარღვევებზე.....	20

თავი 3. ნერვულ სისტემაში მოცულობის რეგულაციის დარღვევა.....	21
ქვეთავი 3.1. მოცულებით რეგულირებადი ანაონური არხი: სუბერთეული LRRC822	
თავი 4. არამაკოდირებელი რნმ-ები და ეპილეფსია.....	23
თავი 5. მიკრო-რნმ-ები ფუნქციები და მათი როლი ეპილეფსიაში.....	24
თავი 6. მიტოქონდრიები და ეპილეფსია.....	27
ქვეთავი 6.1. ვოლტაჟ დამოკიდებული ანაონური არხის ცილები.....	28
თავი 7. უჯრედის ციტოქონჩხის ცილები.....	30
ქვეთავი 7.1. კოფილინი.....	31
თავი 8. აპოპტოზი და კასპაზები.....	34
ქვეთავი 8.1. კასპაზა 3.....	34
2.3. სამუშაოს მიზანი	36
2.4. მეთოდოლოგია.....	38
თავი 1. 24 საათიან და 2 თვიან ექსპერიმენტებში გამოყენებული მასალა და მეთოდები	
ქვეთავი 1.1. სტატუს ეპილეპტიკუსის გამოწვევა კაინის მეხვით 24 საათიან ექსპერიმენტებში.....	38
ქვეთავი 1.2. ბიოქიმიური ექსპერიმენტები.....	38
ქვეთავი 1.3. სტატუს ეპილეპტიკუსის გამოწვევა კაინის მეხვით 2 თვიან ექსპერიმენტებში.....	39
ქვეთავი 1.4. ვიდუო-მონიტორინგი.....	41
ქვეთავი 1.5. ელექტროფორეზი და იმუნობლოტინგი.....	41
ქვეთავი 1.6. კასპაზა-3-ის აქტივობის განსაზღვრა.....	43

ქვეთავი 1.7. უჯრედების დათვლა.....	44
ქვეთავი 1.8. რნმ-ის გამოყოფა.....	45
ქვეთავი 1.9. მი-რნმ-ების პროფილირება.....	45
ქვეთავი 1.10. მიკრო-რნმ-ის გაზომვა.....	46
ქვეთავი 1.11. ნმიტ და მრსა სუბერთეულის მ-რნმ-ის გაზომვა.....	46
თავი 2. სტატისტიკური ანალიზი.....	47
ქვეთავი 2.1. 24 საათიანი ექსპერიმენტები: კრუნჩხვების ხარისხისა და ხანგრძლივობის შედარება.....	47
ქვეთავი 2.2. ცილების რაოდენობრივი ცვლილებების და კასპაზა-3 აქტივობის ცვლილებების შედარება.....	47
ქვეთავი 2.3. უჯრედების დათვლა.....	47
ქვეთავი 2.4. 2 თვიანი ექსპერიმენტები. ქვევითი ექსპერიმენტები.....	48
ქვეთავი 2.5. ცილის, მ-რნმ-ისა და მიკრო-რნმ-ის რაოდენობრივი ცვლილებების შესწავლა.....	48
2.5. მიღებული შედეგები.....	49
თავი 1. ცვლილებები ეპილეფსიური მდგომარეობის გამოწვევიდან 24 საათის შემდეგ.....	49
ქვეთავი 1.1. კრუნჩხვების ხარისხი და ხანგრძლივობა.....	49
ქვეთავი 1.2. იმუნობლოტინგი.....	50
ქვეთავი 1.3. უჯრედების რაოდენობა ჰიპოკამპალურ ველებში.....	56
თავი 2. მიო-ინოზიტოლის მოქმედების ხანგრძლივი ეფექტები კაინის მჟავით გამოწვეულ ეპილეპტოგენეზის დროს ბიოქიმიურ და ქვევით ცვლილებებზე.....	58
ქვეთავი 2.1. კრუნჩხვების რაოდენობა.....	58
ქვეთავი 2.2. კრუნჩხვების ხანგრძლივობა.....	60
ქვეთავი 2.3. ნატრიუმ მიო-ინოზიტოლ ტრანსპორტერი (ნმიტ).....	61

ქვეთავი 2.4. მოცულობით რეგულირებადი ანიონური არხის (მრაა) სუბერთეული (LRRC8A).....	62
ქვეთავი 2.5. მიკრო-რნმ-ის პროფილირება.....	63
ქვეთავი 2.6. მაღალი ძვრადობის ჯგუფის ცილა 1 (მძჯ ცილა-1).....	68
2.6. მიღებული შედეგების განხილვა, დისკუსია.....	71
2.7. დასკვნები.....	80
2.8. გამოყენებული ლიტერატურა.....	81
2.9. დანართები.....	91

1.6. ცხრილების გრაფიკების და სხვა ილუსტრაციების ჩამონათვალი

ილუსტრაციების ჩამონათვალი

სურათი 1. კოფილინის აქტივაცია და ფილამენტების გაწყვეტა	31
სურათი 2. ცილა კოფილინის გააქტივებისთვის საჭირო სხვადასხვა ფაქტორები	33
სურათი 3. 24 საათიანი ექსპერიმენტის დიზაინის დიაგრამა	39
სურათი 4. 2 თვიანი ექსპერიმენტის დიზაინის დიაგრამა	41
სურათი 5. კრუნჩხვების ჯამური ხანგრძლივობა (წთ)	50
სურათი 6. შინაგანი სტანდარტების ტიპური ავტორადიოგრაფიის სურათები და შესაბამისი საკალიბრო მრუდები	51
სურათი 7. მიტოქონდრიალურ-მემბრანული ვდაა-1-ის ვესტერნბლოტინგის ავტორადიოგრაფიის სურათი	52
სურათი 8. მიტოქონდრიალ-მემბრანული მ-კოფილინის ვესტერნ ბლოტინგის ავტორადიოგრაფიის სურათი	53
სურათი 9. ფერმენტ კასპაზა-3-ის აქტივობის საშუალო ფარდობითი რაოდენობა სხვადასხვა ჯგუფის ვირთაგვების ჰიპოკამპში	56
სურათი 10. ჰიპოკამპის CA1 და CA3 ველის ნეირონული უჯრედების ფოტომიკროგრაფები და უჯრედების საშუალო რაოდენობა	57
სურათი 11. განმეორებადი სპონტანური კრუნჩხვების (გსკ) საშუალო რაოდენობა	59
სურათი 12. განმეორებადი სპონტანური კრუნჩხვების (გსკ) ხანგრძლივობის საშუალო მაჩვენებელი	61
სურათი 13. ნატრიუმ მიო-ინოზიტოლ ტრანსპორტერის (ნმიტ) მრნმ-ის საშუალო ფარდობითი რაოდენობა	62
სურათი 14. მრეა სუბერთეულის მრნმ-ის საშუალო ფარდობითი რაოდენობა	63
სურათი 15. მიკრო-რნმ-6216 საშუალო ფარდობითი რაოდენობა	68
სურათი 16. მძჯ ცილა 1-ის ავტორადიოგრაფიული სურათი ჰიპოკამპში და შესაბამისი საკალიბრო მრუდი	69

სურათი 17. მძვ ცილა 1-ის აუტორადიოგრამული სურათი პლაზმაში შესაბამისი
საკალიბრო მრუდი

70

ცხრილი 1. მიკრო-რნმ-ების ჩამონათვალი

62

ცხრილი 1ა. მიკრო-რნმ-ების ჩამონათვალი რომელთაც ახასიათებთ ზომიერი ექსპრესია
კმ+ფიზ და კონტ+ფიზ ჯგუფებს შორის

63

ცხრილი 1ბ. მიკრო-რნმ-ების ჩამონათვალი რომელთაც ახასიათებთ ზომიერი ექსპრესია
კმ+მიო და კონტ+ფიზ ჯგუფებს შორის

64

ცხრილი 1გ. მიკრო-რნმ-ების ჩამონათვალი რომელთაც ახასიათებთ ზომიერი ექსპრესია
კმ+მიო და კმ+ფიზ ჯგუფებს შორის

65

1.7. გამოყენებული შემოკლებები

აეპ-ანტიეპილეფსიური პრეპარატები

ამპმ-ალფა-ამინო-3-ჰიდროქსი-5-მეთილ-4-იზოქსაზოლის პროპიონატი

გაემ-გამა-ამინო-ერბოს მჟავა

გსკ-განმეორებადი სპონტანური კრუნჩხვები

დნმ-დეზოქსი-რიბონუკლეინის მჟავა

ვდაა 1,2,3- ვოლტაჟ-დამოკიდებული ანიონური არხის ცილა 1, 2, 3

ვდაა-ვოლტაჟ-დამოკიდებული ანიონური არხი

თხ-თავისუფლების ხარისხი

კმ+დიაზ-კაინის მჟავა+დიაზეპამი

კმ+მიო-კაინის მჟავა+მიო-ინოზიტოლი

კმ+ფიზ-კაინის მჟავა+ფიზიოლოგიური ხსნარი

კმ-კაინის მჟავა

კონტ+დიაზ-საკონტროლო ჯგუფის ცხოველებს+დიაზეპამის ინექცია

კონტ+მიო-საკონტროლო ჯგუფის ცხოველებს+მიო-ინოზიტოლის ინექცია

კონტ+ფიზ-საკონტროლო ჯგუფის ცხოველები

მიო- მიო-ინოზიტოლი

მმოაა-მოცულობა-მგრძნობიარე ორგანული ოსმოლიტების ანიონური არხის

მრაა-მოცულებით-რეგულირებადი ანიონური არხი

მტფა-მიტოქონდრიული ტრანსკრიფციის ფაქტორი ა

მძჯ ცილა 1- მაღალი ძვრადობის ცილა 1

ნმიტ (1,2)-ნატრიუმ/მიო-ინოზიტოლ ტრანსპორტერი (1,2)

პტზ-პენტილენტეტრაზოლი

რნმ-რიბონუკლეინის მჟავა

სე-სტატუს ეპილეპტიკუსი

სქი-სქილო-ინოზიტოლი

ცნს-ცენტრალური ნერვული სისტემა

ცოს 1-ციტოქრომ-ოქსიდაზას სუბერთეული 1

2.1. შესავალი

ეპილეფსია ცენტრალური ნერვული სისტემის ერთ-ერთ ყველაზე ფართოდ გავრცელებულ, ქრონიკულ ნევროლოგიურ დაავადებათა რიცხვს განეკუთვნება, რომლითაც მსოფლიო პოპულაციის დაახლოებით 1%-ია დაავადებული (Hauser 1997). ეს ჰეტეროგენული ნეიროდეგენერაციული დაავადება ასევე დაკავშირებულია სხვა ფსიქიატრიული დაავადებების ზრდის რისკთან.

ეპილეფტოგენეზისას იზრდება ნეირონების აგზნებადობა, ამაგზნებელი სინაფსების საპასუხო რეაქციების გაძლიერების ხარჯზე. ეპილეფტოგენურ და ეპილეფტურ ტვინში ადგილი აქვს მთელ რიგ ბიოქიმიურ და მორფოლოგიურ ცვლილებებს (Jutila et al., 2002). ეპილეფსია ხასიათდება სპონტანური კრუნჩხვების პერიოდული აღმოცენებით თავის ტვინში ნეირონთა ჰიპერაქტიურობის დროს. პაციენტების უმრავლესობაში კრუნჩხვები არის ლოკალური (Pitkänen & Sutula 2002).

დღეისათვის არსებული მონაცემებით, დაავადებულთა ძალიან მცირე ნაწილი ექვემდებარება სრულ მკურნალობას, დაახლოებით 20-30% პაციენტები რეზისტენტულნი არიან ანტიეპილეფსიური მედიკამენტების მიმართ (Loscher & Brandt 2010). აეპ-ით მკურნალობა სიმპტომატურია რაც კრუნჩხვით შეტევების დროებით დათრგუნვას გულისხმობს. თანამედროვე მიდგომის მთავარი ამოცანაა - მკურნალობის სწორი და ეფექტური სტრატეგიის შემუშავება, რომელიც ეპილეფსიის ჩამოყალიბების პროცესზე (ეპილეფტოგენეზზე) იმოქმედებს (Loscher & Brandt 2010;). მითუმეტეს რომ ცნობილია, ანტიეპილეფსიური მედიკამენტების ეფექტი ძირითადად მიიღწევა მათი ანტიკონვულსიური აქტივობის ხარჯზე, ვიდრე იმ მოლეკულური კასკადზე მოქმედებით, რომელიც საფუძვლად უდევს ნეირონულ კვდომას (Loscher, 2002). სამწუხაროდ დღეისთვის ეს პრობლემა დამღეული არაა.

სამკურნალო მცენარეები უძველესი დროიდან გამოიყენებოდა სხვადასხვა მძიმე დაავადებების პრევენციისთვის. გამომდინარე აქედან თანამედროვე ფარმაცოლოგიაში სამკურნალო მცენარეების შემადგენელი ნაერთების იდენტიფიკაციას დიდი

მნიშვნელობა ენიჭება. მცენარე წყალიკრეფიას ექსტრაქტი (*Aquilegia vulgaris*) უძველესი დროიდან გამოიყენება ჩინურ და ტიბეტურ მედიცინაში, როგორც ძილის მომგვრელი და ანტიეპილეფსიური საშუალება (Shreter, 1975).

ჩვენს ლაბორატორიაში ნანახი იქნა რომ, აღნიშნული მცენარის წყლოვანი ექსტრაქტი სრულად აინჰიბირებდა ^3H -მუსციმოლის (გაემ-ა რეცეპტორის აგონისტი) დაკავშირებას და ორჯერ ააქტივებდა ^3H -ფლუნიტრეზამის (გაემ-ა რეცეპტორის ბენზოდიამინების საიტის სპეციფიკური ლიგანდი) დაკავშირებას (Solomon et al., 2004) ინ ვიტრო სისტემაში. მაღალ-ეფექტური თხევადი ქრომატოგრაფიის, გაზ-ქრომატოგრაფიული და მას-სპექტრომეტრული ანალიზის საშუალებით აღნიშნული ფრაქციიდან იდენტიფიცირებული იქნა ორი ნაერთი, რომელიც in vitro სისტემაში გაემ-ა რეცეპტორებთან სპეციფიკური ლიგანდების დაკავშირებას ცვლიდა. ამ ნაერთებს ძილის მომგვრელი ლიპიდი-ოლეამიდი და მიო-ინოზიტოლი წარმოადგენდა (Solomon et al., 2004). მანამდე მიო-ინოზიტოლი არ განიხილებოდა როგორც ანტიეპილეფსიური საშუალება. აღნიშნული კვლევები დაედო საფუძვლად შეგვესწავლა მიო-ინოზიტოლი უფრო დაწვრილებით.

შემდეგი კვლევებით ნანახი იქნა, რომ მიო-ინოზიტოლის შეყვანა მნიშვნელოვნად და სარწმუნოდ ამცირებდა ვირთაგვებში პენტილენტეტრაზოლით და კაინის მჟავით გამოწვეული კრუნჩხვების სიძლიერეს (Solomon et al., 2007, Nozadze et al., 2011). ასევე მიო-ინოზიტოლის ადმინისტრირების შედეგად ადგილი ჰქონდა თავის ტვინის ჰიპოკამპის ფრაქციებში რიგი ცილოვანი მოლეკულების რაოდენობრივ ცვლილებებს. მაგალითად, 28 დღიანი ექსპერიმენტის ცხოველებში ამჟამ ტიპის გლუტამატური GLUR1-ის სუბერთეულის რაოდენობა სარწმუნოდ მცირდებოდა (დაახლოებით 90%-ით) იმ ვირთაგვების ჰიპოკამპში, რომლებიც კაინის მჟავის ადმინისტრირების შემდეგ მუშავდებოდა ფიზიოლოგიური ხსნარით 28 დღის განმავლობაში ორჯერ საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით (კონ+ფიზ და კონ+მიო). ხოლო GLUR1-ის სუბერთეულის რაოდენობის კლება სარწმუნოდ უფრო ნაკლები იყო იმ ვირთაგვებში, რომლებიც კაინის მჟავის ადმინისტრირების შემდგომ მუშავდებოდა მიო-ინოზიტოლით. α კამკII-ის რაოდენობრივი ცვლილებები ძირითადად მსგავსი იყო ამჟამ რეცეპტორის GLUR1-ის

სუბერთეულისთვის მიღებული შედეგებისა (Solomon et al., 2010). ეს შედეგები ნაჩვენებია, კანის მჟავით გამოწვეული სტატუს ეპილეპტიკუსის ჩამოყალიბებიდან 28 დღის შემდეგ, ამ 28 დღის განმავლობაში დღეში ორჯერ ხდებოდა მيو-ინოზიტოლით დამუშავება, თუმცა შესაძლებელია რა თქმა უნდა, მيو-ინოზიტოლის მოქმედება უფრო ადრე იწყებოდეს, სწორედ ამიტომ ჩვენ შევისწავლეთ 24 საათის შემდეგ მომხდარი ბიოქიმიური და მორფოლოგიური ცვლილებები, რომელიც ჩემი სადისერტაციო ნაშრომის ნაწილს წარმოადგენს.

როგორც უკვე აღნიშნული იყო ჩვენს 28 დღიან ცდებში მيو-ინოზიტოლი ყოველდღე შეგვყავდა და ეფექტები მიღებული იყო მيو-ინოზიტოლის ინექციების შეწყვეტიდან მხოლოდ 1 დღის შემდეგ (Solomon et al., 2011, 2013).

რა ხდება ინოზიტოლის ინექციების შეწყვეტიდან კიდევ ერთი თვის განმავლობაში? ნარჩუნდება თუ არა გარკვეული მოლეკულური განსხვავებები? რა ხდება სპონტანური კრუნჩხვების ინტენსივობის და პერიოდების მიხედვით როგორც პირველ ასევე მეორე თვეში? ეს საკითხები ჩვენი სადისერტაციო ნაშრომის მეორე საკითხს წარმოადგენდა.

2.2. სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა

თავი 1. ეპილეფსია და ეპილეფტოგენზის ზოგადი მიმოხილვა

ქვეთავი 1. ეპილეფსია

ეპილეფსია არის ცენტრალური ნერვულის სისტემის ყველაზე მეტად გავრცელებული ნეიროდეგენერაციული დაავადება, რომელიც მსოფლიო მოსახლეობის დაახლოებით 1% ში გვხვდება. ეს არის ნეიროდეგენერაციული დაავადება რომელიც მეცნიერთა ძალიან დიდი ნაწილის ინტერესისა და კვლევის სამიზნეა. იგი ქრონიკული, პოლიეთოლოგიური ჰეტეროგენური დაავადებაა. ეპილეფსიურ ტვინში ადგილი აქვს ხშირ განმეორებით კრუნჩხვით განმუხტვებს. უმთავრესად კრუნჩხვითი აქტივობები ვითარდება ჰიპოკამში, ასევე ამიგდალაში თუმცა შესაძლებელია იყოს ორივეში ერთად, როგორც ჰიპოკამში ასევე ამიგდალაში.

ეპილეფსიური შეტევები არის თავის ტვინის ნეირონული ჯგუფების სინქრონული განმუხტვების შედეგი, რაც უეცარ, უნებლიე სტერეოტიპულ ქცევის ან/და ცნობიერების დარღვევებს იწვევს. ეპილეფტოგენზის უჯრედული მექანიზმები მრავალია და მოიცავს უჯრედულ დაზიანებას, გლიოზს, იცვლება ზრდის ფაქტორები, ნეიროგენეზი, სინაპტოგენეზი, გლუტამატური და გაემ-ერგული რეცეპტორების სიგნალის ცვლილებები, პოტენციალ დამოკიდებული იონური არხების გამტარობა და ა.შ (Gebelin & Blumenfeld 2010).

ეპილეფსიური კრუნჩხვები იყოფა ლოკალურ და გენერალიზირებულ კრუნჩხვებად. ლოკალური კრუნჩხვები მოიცავს მოტორულ, სენსორულ და ფსიქიკურ სიმპტომებს. ლოკალური კრუნჩხვები შეიძლება იყოს მარტივი, რთული და მეორადად გენერალიზირებული. მარტივი კრუნჩხვების დროს არ ხდება ცნობიერების დაკარგვა, რთული კრუნჩხვების დროს კი ადგილი აქვს ცნობიერების დაკარგვას. გენერალიზებული კრუნჩხვები მოიცავს მთლიან ტვინს და მოტორულ სისტემას.

არსებობს ეპილეფსიის 6 კლინიკური ტიპი: აბსენსური, მიოკლონური, კლონური, ტონური, ატონური და ტონურ-კლონური. აბსენს კრუნჩხვა სხვა გენერალიზირებული

კრუნჩხვებისგან განსხვავდება იმით, რომ არ მოიცავს მოტორული სისტემის მონაწილეობას.

ეპილეფსია ეთიოლოგიის მიხედვით შესაძლოა დაიყოს სამ ძირითად კატეგორიად: იდიოპათური, სიმპტომური და სავარაუდოდ სიმპტომური (ე.წ "კრიპტოგენური"). იდიოპათური ეპილეფსია უმთავრესად წარმოიქმნება გენეტიკური დარღვევებით, რომელიც ძირითადად გულისხმობს ნეირონთა ცვლილებებს. სიმპტომური ეპილეფსია უმთავრესად გამოწვეულია შემდეგი ფაქტორებით: ტვინის სიმსივნეებით, ინფექციებით და ისეთი მეტაბოლური დარღვევებით რომელსაც საბოლოოდ მივყავართ ტვინის არანორმულ გარდაქმნამდე. "კრიპტოგენური" ეპილეფსიის გამომწვევად შესაძლოა ჩაითვალოს სხვადასხვა სირთულის დაზიანებები. დაახლოებით 40% ეპილეფსიის ეთიოლოგია ცნობილია: ეს შესაძლოა იყოს: თავის ტვინის ინსულტი, რომელიც გამოწვეულია ტვინის ტრამული დაზიანებით, იშემიური ინსულტი, ინფექციები, სიმსივნეები, რამოდენიმე ნეოროდეგენერაციული დაავადება და ა.შ (Loscher and Brandt 2010).

ეპილეფსია ზოგადად იყოფა გენეტიკურ და შეძენილ ფორმებად. შეძენილი ფორმის ეპილეფსია შესაძლებელია გამოწვეული იყოს თავის ტვინის ინსულტით (ე.წ. სტატუს ეპილეპტიკუსი) და უმთავრესად ვითარდება ლატენტური პერიოდის შემდეგ. შეძენილი ეპილეფსიის ერთ-ერთი გავრცელებული ფორმა არის საფეთქლის წილის ეპილეფსია, რომელის დროსაც პარციალური კრუნჩხვები გადადის გენერალიზირებულ, განმეორებად კრუნჩხვებში.

მიუხედავად იმისა, რომ ბოლო ათწლეულის განმავლობაში ეპილეფსიის წარმოშობის შესახებ ბევრი რამ გახდა ცნობილი, სრულყოფილი და ერთიანი მოსაზრება ჯერ კიდევ არ არსებობს. უმთავრესად განხილულია ის მოსაზრება რომ ეპილეფსია ესაა ნეირონულ ქსელში აგზნებისა და შეკავების პროცესების დისბალანსი, რის საფუძველზეც შესაძლოა განვითარდეს კრუნჩხვითი განმუხტვები. გაძლიერებული აგზნებადობა და შემცირებული შეკავება შესაძლოა განპირობებული იყოს როგორც ნერვული უჯრედების მემბრანული თვისებების შეცვლით, ასევე ნეიროტრანსმიტერით აგზნების

გავრცელებაში მომხდარი ცვლილებების გზით. ასევე შესაძლოა პროცესში ჩართული იყოს სხვადასხვა არხების დეფექტური ფუნქციონა.

განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია, მიტოქონდრიების დისფუნქციებით გამოწვეული ეპილეფსია, რომლის მიზეზები შესაძლებელია იყოს სხვადასხვა დარღვევები, როგორიცაა: სუნთქვითი ჯაჭვისა და ჟანგვითი ფოსფორილირების სისტემის ანომალური ფუნქციონა, მიტოქონდრიულ დნმ-ში მომხდარი მუტაციები და ა.შ., მოტოქონდრიალური სუნთქვითი ჯაჭვი არის იმ გზის დასასრული, სადაც ხორციელდება ენერგიის წარმოქმნა. ამ გზაზე განხორციელებული დეფექტები ძალიან ბევრი დაავადების განვითარების რისკს ზრდის და მათ შორის არის ეპილეფსიაც (Bindoff and Engelsen 2012).

დაახლოებით 30% კრუნჩხვები იწყება საფეთქლის წილში (Manford et al., 1992). სწორედ საფეთქლის წილის ეპილეფსია არის ყველაზე გავრცელებული და რეზისტენტული მედიკამენტების მიმართ. წამლისადმი მდგრადი ეპილეფსიის შემთხვევაში 70%-ზე მეტ პაციენტებში სწორედ საფეთქლის წილის დაზიანება შეინიშნება (Engel et al., 1997).

როდისაა მკურნალობა უფრო ეფექტური, ეპილეპტოგენეზის თუ ეპილეფსიის დროს? და რა როლი აკისრიათ ანტიეპილეფსიურ პრეპარატებს (აეპ) ნეიროპროტექტორული მკურნალობის მართვაში? აღსანიშნავია აეპ-ის ნეიროპროტექტორული ეფექტები ეპილეფსიის განვითარების სხვადასხვა ეტაპზე და ტერმინი “ნეიროპროტექცია” გამოიყენება, იმ წამალთა ეფექტის განსასაზღვრად, რომელიც გამოიყენება შეუქცევადი ნეირონული კვდომის პრევენციისთვის (Pitkanen 2002). აეპ-ების დოზები, წამლის ადმინისტრირების დრო და მკურნალობის ხანგრძლივობა იყო და რჩება კვლევის ძირითად საკითხად. გასათვალისწინებელია, რომ უმრავლეს შემთხვევებში ექსპერიმენტის განმავლობაში არ კონტროლდებოდა ცხოველებში ისეთი ფიზიოლოგიური პარამეტრების ცვლილებები, როგორიცაა: უჯრედის pH, ჟანგბადის კონცენტრაცია, ენერგიის დონე, ტემპერატურა ან ელექტროლიტების ბალანსი და ბოლოს გენეტიკური ფონი და ასაკი, რომლებიც გავლენას ახდენენ პასუხის ეფექტურობაზე (Pitkanen 2002).

ნეიროპროტექტორული ეფექტურობა გამოძღვენდა ჰიპოკამპში და ნეოკორტექსში ნაერთთა ადმინისტრირებით ინსულტის დაწყებით სტადიაში. ნაერთთა კლასიფიკაცია კი მოახდინეს სამ კატეგორიად: 1) სტატუს ეპილეპტიკუსის (SE) მკურნალობისთვის; 2) კლასიკური აეპ-ები; 3) ახალი აეპ-ები (Pitkanen 2002).

გაემ-ი, როგორც შემაკავებელი ნეიროტრანსმიტერი ძალიან დიდ როლს თამაშობს ეპილეფსიაში. აეპ-ების უმრავლესობა წარმოადგენს სწორედ გამა ამინო ერბოს მჟავას (გაემ-ის) აგონისტებს. მაგ:

1. მუსციმოლი, პროგაბიდი და ა.შ (გაემ-ის აგონისტები) თრგუნავენ კრუნჩხვების მოქმედებას,
3. ბენზოდიაზეპინები და ბარბიტურატები აძლიერებენ გაემ-დამოკიდებულ შეკავებას და წარმოადგენენ ანტიკონვულსანტებს.
4. ვიგაბატრინი რომელიც გაემ-ის კატაბოლიზმის ინჰიბირებით ზრდის სინაფსში გაემ-ის კონცენტრაციას, და თიაგაბინი, რომელიც გაემ-ის უკუშთანთქმას აინჰიბირებს წარმოადგენენ ანტიკონვულსანტებს (Treiman 2001).

ამავე დროს ანტაგონისტები (ბიკუკულინი და პიკროტოქსინი) გაემ-ის სინთეზის მაინჰიბირებელი პრეპარატები როგორც მოსალოდნელია აძლიერებენ კრუნჩხვებს

ასეთი მედიკამენტების უარყოფითი მხარე ისაა, რომ მათი მოქმედება მხოლოდ სიმპტომურია და ამავდროულად, მათ სამიზნეს წარმოადგენს უშუალოდ ეპილეფსიური შეტევა და არა ეპილეფტოგენეზი. სწორედ ამიტომ, მკურნალობის ისეთი სტრატეგიის შემუშავება რომელიც ზემოქმედებას მოახდენს ეპილეფტოგენეზზე და გამოიწვევს ნაკლებად მწვავე შედეგის ჩამოყალიბებას თანამედროვე ნეირომეცნიერების ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი გამოწვევაა.

ქვეთავი 2. ეპილეპტოგენეზი

ფართოდ აღიარებული ჰიპოთეზის თანახმად, ლატენტური პერიოდის დროს ადგილი აქვს მთელი რიგი მოლეკულური და უჯრედული კასკადების გააქტიურებას რომელიც არაეპილეპტიკურ, ნორმალურ ტვინს გარდაქმნის ეპილეპტიკურ ტვინად. სიმპტომური ან შემენილი ეპილეფსიის გარდა, ეპილეპტოგენეზიც შესაძლოა იყოს მიზეზი კრიპტოგენური ეპილეფსიის განვითარებისა.

უამრავი შესაძლო მექანიზმი არსებობს ეპილეპტოგენეზის დაწყებისა და განვითარებისათვის. შესაძლებელია ეს იყოს სხვადასხვა ტიპის თავის ტვინის ტრამეები, ინფექციები, უმთავრესად კი ეს არის ცენტრალური ნერვული სისტემის ინფექციები, იშემია, ასევე მისი გამომწვევი მოდულატორული ფაქტორები შესაძლოა იყოს გენეტიკური მალფორმაციები, სხვადასხვა დარღვევებით გამოწვეული თავის ტვინის შესაძლო სტრუქტურული და ასაკთან დაკავშირებული ცვლილებები (Herman 2002).

რაც შეეხება ლატენტურ პერიოდს, ეს არის დროის ის მონაკვეთი, როდესაც ტვინის ინსულტი იწვევს მოლეკულურ და უჯრედულ დონეზე ცვლილებებს, რასაც საბოლოოდ მიყვავართ სპონტანურ განმეორებად კრუნჩხვებამდე (Walker et al., 2002). ეპილეპტოგენეზი შესაძლოა დავეოთ ფაზებად, კრუნჩხვითი აქტივობების სიხშირისა და განმეორებითობის მიხედვით. ლატენტური პერიოდის პირველი ფაზა ანუ ადრეული ფაზაა, რომლის დროსაც ადგილი აქვს მცირე ხნიან თუმცა ხშირ კრუნჩხვით აქტივობებს, მეორე ეტაპია - ნელი ზრდის ფაზა ანუ ეპილეპტოგენეზის მეორე საფეხური. ინსულტების შედეგად გამოწვეულია ცვლილებები რომელსაც შემდეგ მიყვავართ განმეორებად კრუნჩხვებთან და ლატენტური პერიოდის დროს ხდება მთელი რიგი ბიოქიმიური ცვლილებები, ტვინში ხშირი კრუნჩხვითი განმუხტვები და აქტივობები, რომლის საბოლოო შედეგიცაა სტატუს ეპილეპტიკუსის ჩამოყალიბება (Williams et al., 2009).

ეპილეფსიის შესწავლისთვის განსხვავებული ტიპის მოდელები გამოიყენება. ზოგი მათგანი ეფუძნება ეპილეფსიური სტატუსის ჩამოყალიბებას ფარმაკოლოგიური ნივთიერებებით. ერთ-ერთი ფარმაკოლოგიური მოდელი კაინის მჟავის ინექციას

მოიცავს და ის ადამიანის საფეთქლის წილის ეპილეფსიის ბევრ ფენომელოგიურ თვისებას იმეორებს.

კაინის მჟავა წარმატებით გამოიყენება, როგორც ეპილეფტოგენეზის ბაზისური მექანიზმების შესასწავლად, ასევე ახალი ანტიეპილეფტოგენური პრეპარატების სკრინინგისათვის (Pitkanen 2002). კაინის მჟავის ლოკალური ან სისტემური შეყვანა იწვევს განმეორებითი შეტევების განვითარებას და ეპილეფსიის სტატუსის ჩამოყალიბებას.

ლიტერატურული მონაცემებიდან ცნობილია რომ ეპილეფსია (კლინიკური თუ ექსპერიმენტული) დაკავშირებულია გაემ-ა რეცეპტორის სუბერთეულების ექსპრესიის ცვლილებებთან.

ადამიანის საფეთქლის წილის ეპილეფსიურ მოდელებში, მაგალითად როგორც არის კაინის მჟავის მოდელი, ჰიპოკამპში გაემ-ა რეცეპტორების სუბერთეულების რაოდენობის შემცირება უჯრედების კარგვაზე მიუთითებს. მაგრამ იმავდროულად ჰიპოკამპის გადარჩენილ უჯრედებში გარკვეული გაემ-ა რეცეპტორების სუბტიპების რეორგანიზაცია ხდება, რაც გაემ-ა სისტემაში სინაფსური პლასტიურობის ჩამოყალიბებას განსაზღვრავს (Brooks-Kayal et al., 1998; Sperk et al., 1998).

თავი 2. ინოზიტოლები და ეპილეფსია

ანტიეპილეფსიური პრეპარატების (აეპ) თერაპიის მიმართ პაციენტების 20-30% მედეგია (Loscher and Brandt 2010). დღეისათვის არსებული აეპ-ით მკურნალობა სიმპტომატურია რაც კრუნჩხვით შეტევების დროებით დათრგუნვას გულისხმობს. თანამედროვე მიდგომის მთავარი ამოცანაა - მკურნალობის სწორი და ეფექტური სტრატეგიის შემუშავება, რომელიც ეპილეფსიის ჩამოყალიბების პროცესზე (ეპილეფტოგენეზზე) იმოქმედებს (Loscher & Brandt 2010;). სამწუხაროდ დღეისთვის ეს პრობლემა დაძლეული არაა.

Aquilegia vulgaris- წყალიკრეფია, ჩინურ და ტიბეტურ ხალხურ მედიცინაში ფართოდ გამოიყენება, როგორც ანტიეპილეფსიური და ძილის მომგვრელი საშუალება (Shreter 1975).

გამოკვლევებმა აჩვენა, რომ წყალიკრეფიას წყლოვანი ექსტრაქტი შეიცავს ნაერთებს, რომლებიც გაემ-ა ტიპის რეცეპტორებზე მოქმედებს. სახელდობრ, სრულად აკავებს 3H-მუსციმოლის (გაემ-ა რეცეპტორის აგონისტი) დაკავშირებას ვირთაგვას თავის ტვინის მემბრანულ ფრაქციასთან და ზრდის 3H-ფლუორეზანტის (გაემ-ა რეცეპტორის ბენზოდიამინების უბნის სპეციფიკური ლიგანდი) დაკავშირებას დაახლოებით ფაქტორი ორით (Solomon et al 1996). როგორც ზემოთ განვიხილეთ, ძუძუმწოვრების ცენტრალური ნერვული სისტემის (ცნს) მთავარი შემაკავებელი ნეიროტრანსმიტერი გაემ-ია და გაემ-ერგული სისტემის ანომალური მოქმედება ხშირად ეპილეფსიასთან არის ასოცირებული. სწორედ ამიტომ ანტიეპილეფსიური პრეპარატების გარკვეული ნაწილი გაემ სისტემაზე მოქმედებს (Stephenson 2001; Blum 1998). ინტრაპერიტონალური სისტემური შეყვანისას, საკუთრივ გაემ-ს, ცერებრონეცეფალური ბარიერის გავლის უნარი არა აქვს და შესაბამისად არც ანტიკონვულსური ზემოქმედება გააჩნია (Laborit 1973). ამიტომაც გამოითქვა ვარაუდი, რომ წყალიკრეფიას წყლოვანი ექსტრაქტი აქტიურ კომპონენტს შეიცავდა, რომელიც საკუთრივ გაემ-ი არ იყო. ექსპერიმენტების შემდეგ სერიაში განხორციელდა იმ ნაერთების იდენტიფიკაცია, რომლებიც ვირთაგვას თავის

ტვინის მემბრანულ ფრაქციასთან 3H-მუსციმოლის დაკავშირებას აინჰიბირებდა და in vitro სისტემაში 3H-ფლუნიტრეზეპამის დაკავშირებას ზრდიდა.

მაღალი გარჩევითობის თხევადი ქრომატოგრაფიის, შემდგომ გაზ-ქრომატოგრაფიისა და მასთან შეუღლებული მას-სპექტრომეტრიის საშუალებით მოხდა ექსტრაქტის ორი მთავარი აქტიური ნაერთის იდენტიფიკაცია: (1) მიო-ინოზიტოლი (მიო) და (2) ოლეამიდი - ძილის მომგვრელი ლიპიდი (Solomon et al 2004). თუმც, ნაკლებად მოსალოდნელი იყო, რომ მი 3H-მუსციმოლის დაკავშირებაზე მოახდენდა გავლენას, ექსპერიმენტულად ნაჩვენები იქნა, რომ სწორედ მი იყო ფრაქციის ის ნაერთი, რომელიც 3H-მუსციმოლის დაკავშირებას აკავებდა (Solomon et al 2004).

შემდეგ, შესწავლილი და ნანახი იქნა, რომ მი-ის წინასწარი ადმინისტრაცია მნიშვნელოვნად ამცირებდა პენტილენტეტრაზოლითა (პტზ) თუ კაინის მჟავით (კმ) გამოწვეული კრუნჩხვების სიძლიერეს (Solomon et al 2007). ექსპერიმენტების შემდეგ სერიაში კი, ჯერ განხორციელდა კაინის მჟავით ეპილეფსიური სტატუსის (ეს) გამოწვევა და შემდეგ მიო-ინოზიტოლით ყოველდღიური დამუშავება. ექსპერიმენტის ასეთი დიზაინი საშუალებას იძლეოდა ნაერთის ანტიეპილეფტოგენური თვისებები შესწავლილიყო (მიმოხილვისთვის იხილეთ Loscher and Brandt 2010). აღმოჩნდა რომ 28 დღის განმავლობაში მიო-თი ყოველდღიური მკურნალობა, ეპილეფტოგენულის პროცესისთვის დამახასიათებელ ბიოქიმიურ ცვლილებებს ამცირებდა. სახელდობრ, ადგილი ჰქონდა კმ-ით გამოწვეული ეპილეფტოგენულისას ჰიპოკამპში ამპა-გლუტამატერგული რეცეპტორის გლურ1 სუბერთეულისა და კალციუმ-კალმოდულინ დამოკიდებული პროტეინკინაზას რაოდენობის მნიშვნელოვან შემცირებას, ხოლო მიო-ით მკურნალობით აღნიშნული შემცირება თითქმის მთლიანად აღდგებოდა (Solomon et al 2010). ბოლოდროინდელი მონაცემები მიუთითებს, რომ ექსპერიმენტის ასეთი დიზაინის პირობებში, მიო-ით მკურნალობა გაემ რეცეპტორის გამა-2 სუბერთეულის რაოდენობას აღადგენს, რომელიც კმ-ით დამუშავებისას ძლიერ მცირდებოდა (Solomon et al 2010). კმ-ით ეპილეფსიური სტატუსის გამოწვევამდე მიო-ის შეყვანა ჰიპოკამპის უჯრედთა კვდომაზე მნიშვნელოვან ნეიროპროტექტორულ ზეგავლენას ახდენს (Solomon et al 2010). ყველაზე უფრო ძლიერი ნეიროპროტექტორული ეფექტი ნანახი

იქნა CA1 ველის პირამიდულ და CA3 ველის რადიალურ და ორიენტალურ შრეებში. მკურნალობიდან 14 დღის შემდეგ CA1 ველში აღწერილი იყო ულტრასტრუქტურული ცვლილებები. ნეირონთა, სინაფსებისა და პოროსომების სტრუქტურა უფრო კარგად იყო შენარჩუნებული მი-ით დამუშავებულ ვირთაგვებში ვიდრე ფიზიოლოგიური ხსნართა და შემდეგ კმ-ით დამუშავებულ ცხოველებში (Kotaria et al., 2013). აღნიშნული შედეგები მიუთითებს, რომ მოლეკულურ და უჯრედულ დონეებზე მიო-ინოზიტოლს შესაძლოა ანტიეპილეფსიური თვისებები ჰქონდეს.

ბოლო დროს ჩატარებული ექსპერიმენტებით ნანახი იქნა, რომ ინოზიტოლების კიდევ ერთი წარმომადგენელი სქილო-ინოზიტოლი (სქი) ასევე მნიშვნელოვნად ამცირებს პენტილენტეტრაზოლით გამოწვეულ კრუნჩხვებს (Nozadze et al., 2011). აღნიშნულ ექსპერიმენტებში მიო-სა და სქი-ს ეფექტები, არის სპეციფიკური ინოზიტოლებისთვის. არავითარი ეფექტი არ იყო ნანახი მანიტოლისთვის - პოლიოლი, რომელსაც იგივე მოლეკულური წონა აქვს რაც მიო-ს და სქი-ს (Nozadze et al., 2011). ყოველივე ამ შედეგების შემდეგ ჩვენ დაწვრილებით უნდა განვიხილოთ ინოზიტოლები.

ქვეთავი 2.1. ინოზიტოლები ჰომეოსტაზი, მეტაბოლიზმი და ფუნქციური მნიშვნელობა

ინოზიტოლფოსფოლიპიდები და ინოზიტოლფოსფატები მონაწილეობენ სიგნალის ტრანდუქციასა და კალციუმის ჰომეოსტაზის შენარჩუნებას ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში.

მიო-ინოზიტოლი ცენტრალურ ნერვული სისტემის მნიშვნელოვანი ოსმოლიტია. მისი ჰექსაკფოსფატური და პიროფოსფორილირებული დერივატები მონაწილეობენ დნმ-ის რეპარაციის პროცესში, ბირთვული რნმ-ის ექსპორტსა და მემბრანული ცილების სინაფსურ ტრეფიკინგში (Fisher et al., 2002). ინოზიტოლის კონცენტრაციის ცვლილებები

იწვევს მთელ რიგ პათოლოგიებს თავის ტვინში და ცერებროსპინალურ სითხეში (Fisher et al; 2002).

ადამიანი საკვებიდან საშუალოდ იღებს ინოზიტოლს 1გ/დღეში (Holub et al; 1986). ღვიძლის მიერ სინთეზირდება 4გ/დღეში. ეს უკანასკნელი წარმოადგენს ძირითად ორგანოს, სადაც ხდება მისი კატაბოლიზმი და სეკრეცია, თუმცა ინოზიტოლი ასევე სინთეზდება ტვინსა და სათესლეებშიც. მის დეგრადაციას განაპირობებს სპეციფიკური ოქსიგენაზა (Clements and Diethelm 1979).

ქვეთავი 2.2. ინოზიტოლის გავრცელება ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში

ძუძუმწოვართა ცენტრალური ნერვული სისტემა ინოზიტოლების მაღალი კონცენტრაციით გამოირჩევა (Wolfson et al; 2000). თუ დავუშვებთ, რომ ტვინის 1გრ. სველი ქსოვილი შეიცავს 100მგ. ცილას და მისი მშრალი წონა სველის 20%-ს შეადგენს, მაშინ ტვინის დიდ რეგიონებში და პერიფერიულ ნერვულ უჯრედებში ინოზიტოლის კონცენტრაცია 2-15 მმოლამდე მერყეობს. საზურგტვინე სითხეში მისი კონცენტრაცია 120 მიკრომოლია, ხოლო პლაზმაში-2 მიკრომოლი. ადამიანის თავის ტვინში წლოვანებასთან ერთად იკლებს ინოზიტოლის რაოდენობა. ინოზიტოლი უმთავრესად მოთავსებულია გლიაში, თუმცა კატას პურკინიეს ნეირონებში არის ინოზიტოლის მაღალი კონცენტრაცია (Fisher et al., 2002).

უჯრედი ინოზიტოლის კონცენტრაციის შენარჩუნებას სამი განსხვავებული მექანიზმით ახდენს: 1. ინოზიტოლის ტრანსპორტირება პლაზმური მემბრანის გასწვრივ სპეციფიკური მოლეკულა გადამტანების საშუალებით. 2. D-ინოზიტოლ-3-ფოსფატის სინთეზი D-გლუკოზო-6-ფოსფატიდან. 3. ინოზიტოლის გამოყოფა, რომელიც რეგულირდება მოცულობა მგრძნობიარე ორგანული ოსმოლიტური არხებით (Fisher et al., 2002).

ქვეთავი 2.3. ინოზიტოლის სინთეზი

ინოზიტოლი სინთეზდება გლუკოზიდან შემდეგ ორგანოებში: თავის ტვინში, საკვერცხეებში, თირკმელებში და ღვიძლში (Hauser and Finelli 1963). D-გლუკოზ 6 ფოსფატიდან D-ინოზიტოლ-3 ფოსფატის წარმოქმნა კატალიზდება ტრიმერული ფერმენტის D-ინოზიტოლ-3 ფოსფატსინთაზას საშუალებით. ამ რეაქციის მიმდინარეობა დამოკიდებულია ნიკოტინამიდ ადენინ დინუკლეოტიდის არსებობაზე, რომელიც სტიმულირდება ამონიუმის იონებით (NH_4^+) და კალიუმის იონებით (K^+) და ინჰიბირდება ლითიუმის იონებით (Li^+). წარმოქმნილი D-ინოზიტოლ-3-ფოსფატი შემდეგ ჰიდროლიზდება მაგნიუმ დამოკიდებული ლითიუმ ინჰიბირებადი ფერმენტით, ინოზიტოლ მონოფოსფატით (Novak et al., 1999).

ქვეთავი 2.4. ინოზიტოლის გამოყოფა

ჰიპოტონური სტრესის საპასუხოდ ინოზიტოლი გამოიყოფა როგორც ნეირონიდან ასევე გლიიდან, დიფუზურად, არასპეციფიკური ქლორის (Cl^-) არხებით. ელექტროფიზიოლოგიური გამოკვლევებით ეს არხი განსაზღვრული იქნა, როგორც მოცულობა-მგრძნობიარე ორგანული ოსმოლიტების ანიონური არხი (volume regulated anionic channel -VRAC) და მისი საშუალებით ინოზიტოლთან ერთად სწრაფად გამოიყოფა ტრიეთილამინები და ამინომჟავები (Goldstein and Davis 1994;).

მოცულობა-მგრძნობიარე ორგანული ოსმოლიტების ანიონური არხის (მმოაა) საშუალებით ინოზიტოლის გამოყოფა ხელს უწყობს ატფ-ის არაჰიდროლიზური დაკავშირება ამ არხთან და რეგულირდება $\text{G}_{\alpha 1}$, პროტეინ კინაზა A და C, თიროზინკინაზათი და ლიპოოქსიგენაზათი (Strange et al., 1993; Novak et al., 2000). მმოაა არხის ბლოკირებას ახდენს ქლორის არხის ბლოკატორები, ნიფლუმის მჟავა (Niflumic acid), დისულფონის მჟავა და ცის-არანაჯერი ცხიმოვანი მჟავები (Strange et al., 1993; Isaacks et al., 1999).

ქვეთავი 2.5. ინოზიტოლის ტრანსპორტერები და უჯრედის მოცულობის რეგულირება

2.5.1. Na^+ /მიო-ინოზიტოლ ტრანსპორტერი

ინოზიტოლის კონცენტრაცია ნეირონულ უჯრედებში აჭარბებს პლაზმაში მის კონცენტრაციას 2-500-ჯერ (Sigal et al., 1993). პოლიოლის კონცენტრაცია დაკავშირებულია Na^+ /მიო-ინოზიტოლის ტრანსპორტერზე, რომელიც მგრძნობიარეა ინოზიტოლის მიმართ MDCK უჯრედებში (Kwon et al., 1992). ცნობილია ორი Na^+ /მიო-ინოზიტოლ ტრანსპორტერი: ნმიტ1 (SMIT1) და ნმიტ2 (SMIT2), რომლებიც არეგულირებენ თავის ტვინში ინოზიტოლების რაოდენობას აქტიური ტრანსპორტით, პერიფერიიდან ტვინის მიმართულებით კონცენტრაციული გრადიენტის გასწვრივ. ინოზიტოლთან ერთად შედის 2Na^+ იონი (Fisher et al., 2002). Na^+ /მიო-ინოზიტოლ ტრანსპორტერის მაკოდირებელი გენი კლონირებული იქნა MDCK უჯრედებიდან (Kwon et al., 1992). ის კოდირებს 718 ამინომჟავისაგან შემდგარ ცილოვან მოლეკულას, რომელსაც აქვს 12 ტრანსმემბრანული დომენი (მოლეკულური წონით 79.5 კდალტონი). ტრანსპორტერების ორივე ამინო- და კარბოქსი- ბოლოები ციტოპლაზმაშია და გააჩნია რამდენიმე ფოსფორილირების საიტი პროტეინკინაზა A-სთვის და ციტოპლაზმური დომენები პროტეინკინაზა C-სთვის. ადამიანის Na^+ /მიო-ინოზიტოლ ტრანსპორტერი ავლენს უმაღლეს ჰომოლოგიას ძაღლის ტრანსპორტერთან (Berry et al., 1995). SMIT-ის მაკოდირებელი გენი (SLC5A3) შედგება 5 ეგზონისგან (Porcellati et al., 1998), რომლის მომატებული ექსპრესია აღინიშნება დაუნის სინდრომის დროს. Na^+ /მიო-ინოზიტოლის ტრანსპორტერის მოქმედების მექანიზმი იქნა გამოკვლეული თირკმელებიდან კლონირებული გენის ექსპრესიით *Xenopus*-ის ოოციტებში (Hager et al., 1995). ინოზიტოლის შთანთქმა არის pH-დამოკიდებული და თითო მოლეკულა ინოზიტოლთან ერთად შედის ორი ნატრიუმის იონი.

ნმიტ-ის მ-რნმ-ი ექსპრესიის მიხედვით ფართოდ არის გავრცელებული ცნს-ში და აღმოჩენილია ნერვულ და არანერვულ უჯრედებში. ნერვული უჯრედებიდან ნმიტ მ-რნმ-ის ექსპრესია განსაკუთრებით მაღალია ჰიპოკამპსა და პურკინიეს უჯრედებში (Fisher et al., 2002). განვითარების მიხედვით, როგორც ტრანსპორტერი, ასევე შესაბამისი ცილოვანი მოლეკულის ექსპრესია მაღალია ჩანასახოვან ტვინში და მცირდება

პოსტნატალურში (Guo et al., 1997). ასეთი მაღალი ექსპრესია მიუთითებს ინოზიტოლის მაღალ კონცენტრაციაზე ჩანასახის საზურგტვინე სითხეში (CSF)-ში (Battaglia et al., 1961). თირკმელებში ნმიტ მ-რნმ-ის ექსპრესია არის დაბალი ემბრიოგენეზის დროს და იმატებს დაბადების შემდეგ, ანუ ტვინი და თირკმელები განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან ტრანსპორტერის ექსპრესიით (Guo et al., 1997).

ნაჩვენები იქნა, *in vivo* და *in vitro* ცდებით ნმიტ-ის ექსპრესია და ატივობის გაზრდა გლიაზე (Strange et al., 1991; Isaacks et al., 1997), ნეირობლასტებზე (Wiese et al., 1996) და ადამიანის NT2N ნეირონებზე (Novak et al., 1999), ოსმოსური სტრესის დროს. ამ დროს ტრანსპორტერის მ-რნმ-ის ექსპრესია იზრდება 7-ჯერ. ვირთაგვებში ნმიტ მ-რნმ-ის რაოდენობა იზრდება სტრესიდან 7 სთ.-ის შემდეგ და წინ უსწრებს ტრანსპორტერის აქტივობის ზრდას (Ibsen and Strange 1996). როდესაც უჯრედი უბრუნდება იზოოსმოსურ მდგომარეობას, ტრანსპორტერის მ-რნმ-ის დონე სწრაფად მცირდება და ინოზიტოლიც ნელ-ნელა იკარგება. Na/მიო-ინოზიტოლ ტრანსპორტერის მ-რნმ-ის ექსპრესიის ზრდა ხდება კაინის მჟავის შეყვანის შემდეგ. კაინის მჟავა იწვევს ნეირონთა სწრაფ განმუხტვებს და ამ დროს ადგილი აქვს ასევე უჯრედშიდა ელექტროლიტების რაოდენობის ზრდას. ნმიტ მ-რნმ-ის მომატება ყველაზე მკვეთრად გამოიხატება ფრონტალურ და პარიეტალურ კორტექსში (Nonaka et al., 1999).

ნმიტ ექსპრესია რეგულირდება თვითონ ინოზიტოლითაც, ასევე ანტიბიპოლარული თერაპიული მედიკამენტებით: ლითიუმის იონები, ვალპროატი ან კარბამაზეპინი, რომლებიც ამცირებენ ტრანსპორტერის აქტივობას (Lubrich et al., 2000). პროტეინკინაზა C ასევე აინჰიბირებს ტრანსპორტერებს ადამიანის ასტროციტებში და NT2-N ნეირონებში (Novak et al., 2000).

ნატრიუმ/მიო-ინოზიტოლ ტრანსპორტერები (ნმიტ 1 და ნმიტ 2) არეგულირებენ ინოზიტოლების რაოდენობას, როგორც თავის ტვინში ასევე პერიფერიაზე. ორივე ტრანსპორტერი ექსპრესირდება თავის ტვინში, თუმცა მათი რეგიონალური გავრცელება განსხვავებულია. თავის ტვინში ნმიტ 1 რაოდენობა უფრო მაღალია ვიდრე ნმიტ 2, რაც რეგიონალური გავრცელების განსხვავებით აიხსნება (Fenili et al., 2011).

სქილო- და მიო-ინოზიტოლის ტრანსპორტერების მოქმედება ითრგუნება მაშინ როდესაც არეში ერთდროულად არის მიო-, სქილო-, D-ქირო-ინოზიტოლი და D-გლუკოზა. ჩამოთვლილები წარმოადგენს ერთმანეთისთვის კონკურენტებს და იწვევენ ტრანსპორტერის მოქმედების დათრგუნვას. მათ შეუძლიათ იმოქმედონ პირდაპირ ტრანსპორტერზე და მოახდინონ ტრანსპორტერის აქტივობის ინჰიბირება (Fenili et al., 2011).

ინოზიტოლის ახალი ტრანსპორტერი იქნა აღმოჩენილი ძუძუმწოვრებში. ეს მოლეკულა არ ატრანსპორტირებს გლუკოზას ან სხვა ჰექსოზებს, ის არის H^+ /მიო-ინოზიტოლ სიმპორტერი (Uldry et al., 2001). ეს სიმპორტერი წარმოადგენს 618 ამინომჟავას ნაშთისგან შემდგარ პოლიპეპტიდს, რომელსაც აქვს 12 ტრანსმემბრანული დომენი. HMIT ექსპრესირდება ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში, უმთავრესადასტროციტებში, თუმცა წარმოდგენილია ასევე სხვა ნეირონულ პოპულაციებშიც.

საინტერესოა ამ ტრანსპორტერების pH დამოკიდებულობა: Na^+ /მიო-ინოზიტოლ ტრანსპორტერის მოქმედება არის შეფერხებული pH-ის შემცირების დროს (Matskevitch et al., 1998), ხოლო H^+ /მიო-ინოზიტოლ სიმპორტერი აქტიურია დაბალი pH დროს. HMIT დამატებით რეგულატორულ როლს ასრულებს ინოზიტოლის ჰომეოსტაზში (Fisher et al., 2002).

ორგანული ოსმოლიტების ტრანსპორტერების როლი ნაკლებ ნათელია ეპილეფსიის დროს, თუმცა ეს ტრანსპორტერები მნიშვნელოვანია უჯრედში ორგანული ოსმოლიტების ბალანსის შესანარჩუნებლად. ორგანული ოსმოლიტების დაგროვება უჯრედში და წყლის შეკავება არღვევს უჯრედის ნორმალურ ფუნქციონირებას (Strange 2004). დეჰიდრატაცია იწვევს ოსმოლიტ ტრანსპორტერების სინთეზის პასუხისმგებელი გენების ან ორგანული ოსმოლიტების ბიომასინთეზებელი ფერმენტების რეგულირებას (Handler and Kwon 2001). უჯრედგარე სივრცის ზომა კონტროლდება უჯრედების ზომით, ასევე ეს დამოკიდებულია ოსმოლიტ ტრანსპორტერებზე. ნეირონთა მეტისმეტად მაღალი აქტივობის დროს, უჯრედები დიდდება და მცირდება უჯრედგარე სივრცე (ECS) (Dietzel et al., 1982). შემცირებული უჯრედგარე სივრცე ზრდის ნეირონთა აგზნებადობას (Dudek et al., 1990).

ოსმოლიტთა ჰომეოსტაზი მნიშვნელოვანია ნეირონთა აგზნებადობის დროს. Na^+ /მიო-ინოზიტოლ კოტრანსპორტერი მნიშვნელოვნად იზრდება სტატუს ეპილეპტიკუსის შემდეგ (Nonaka et al., 1999). ორგანული ოსმოლიტის, ტაურინის რაოდენობა იცვლება კრუნჩხვებით (Baran 2006) და BGT1 ექსპრესია არის გაზრდილი კაინის მჟავით გამოწვეული სტატუს ეპილეპტიკუსის (SE) შემდეგ (Zhu and Ong 2004).

კაინის მჟავით გამოწვეული სტატუს ეპილეპტიკუსის შემდეგ ნმიტ-ის ექსპრესია გაზრდილია და პიკს აღწევს ჰიპოკამპის CA1 ველში ინდუქციიდან 24 საათის შემდეგ (Nonaka et al., 1999). კაინის მჟავით გამოწვეული სტატუს ეპილეპტიკუსი ასევე საფუძველია GAT1 და GAT3 -ის დადმავალი რეგულირების.

ოსმოსური ბალანსი მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ნეირონების აგზნებადობის კონტროლში (Rowley et al., 2011).

კაინის მჟავის სისტემური ადმინისტრაცია იწვევს ადამიანის ტემპორალური წილის ეპილეფსიის მსგავს კონვულსიებს. ასევე მას შეუძლია გამოიწვიოს გამეორებადი ლიმბური ტიპის კრუნჩხვები და შეუქცევადი ნეირონების დაზიანება ტვინის გარკვეულ რეგიონში (Ben-Ari et al., 1981). ელექტროგრაფიკული ანალიზებით, კორტიკალური და სუბკორტიკალური სტრუქტურებიდან, დადგენილი იქნა, რომ ეპილეფსიური აქტივობის სამი ფაზა არსებობს. თავდაპირველად განმუხტვები იწყება ჰიპოკამპში, შემდეგ გადადის სხვა ლიმბურ სტრუქტურებში, როგორცაა ამიგდალა და პირიფორმული კორტექსი, საბოლოოდ ხდება გენერალიზირებული (Ben-Ari et al., 1985).

ინტესიური ნეირონული აგზნების შემთხვევაში Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- მასიური შედინება ხდება წყლის ნაკადით და გამოიწვევს უჯრედის გაჯირჯებას. შიდაუჯრედული ელექტროლიტების აწევა ხელს უშლის სხვადასხვა ფერმენტების ნორმალურ ფუნქციონირებას (Yancey et al., 1993).

ორგანულ ოსმოლიტებს მიეკუთვნება ამინომჟავები (გლუტამინი, გლუტამატი. ტაურინი), მეთილამინები (გლიცეროფოსფორილქოლინი და კრეატინი), პოლიოლები (მიო-ინოზიტოლი). ისინი მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ ძუძუმწოვრების ტვინში, ოსმორეგულაციაში. მიო-ინოზიტოლი გროვდება სხეულის ძალიან ბევრ ორგანოში,

თუმცა განსაკუთრებით მაღალია თავის ტვინში, რეტინაში და თირკმლის ტვინოვან ნაწილში (Hager et al., 1995).

Na⁺/მიო-ინოზიტოლ ტრანსპორტერის დონე ტრანსკრიფციის პროცესზე რეგულირდება შიდაუჯრედული წნევით. ნაჩვენები იქნა, რომ Na⁺/მიო-ინოზიტოლ ტრანსპორტერი ასევე რეგულირდება სხვადასხვა პათოლოგიური შემთხვევების დროს ტვინში, ჰიპერნატრემიის და ტვინის ძლიერი ორგანული დაზიანების დროს (Yamashita et al., 1997).

ნაჩვენები იქნა, რომ კაინის მჟავათი გამოწვეული ლიმბური კრუნჩხვები იწვევს SMIT mRNA-ის ექსპრესიას ტვინის სხვადასხვა უბანში: ჰიპოკამპის პირამიდული უჯრედების CA3 ველში და დაკბილული გრანულარული უჯრედების ველში პირველი 2 სთ-ის განმავლობაში (პირველ ფაზაში), შემდეგ 4-6 სთ-ის განმავლობაში სხვა ლიმბურ სტრუქტურებში: ამიგდალა და პერიფორმკორტექსში (მე-2 ფაზა), მესამე ფაზაში კი CA1 ველის პირამიდულ უჯრედებში და სომატო-სენსორულ კორტექსში (Nonaka et al., 1999). დადგენილია, რომ ნმიტ mRNA ექსპრესიასა და უჯრედების სიკვდილს შორის არის კავშირი. ფაქტორი, რომელიც იწვევს ნმიტ-ის შემცვლელი ოსმორეგულატორული გენების ექსპრესიას არის გარეუჯრედული იონური ძალით გამოწვეული. გარეუჯრედული ოსმოლიტი და ინტესიური ნეირონული ცვლილებები ზრდიან შიდაუჯრედულ ელექტროლიტების რაოდენობას. CA3 ველის პირამიდული უჯრედები, დაკბილული გრანულარული უჯრედები და პერიფორმული კორტექსის უჯრედები ძლიერ ეპილეფსიურ აქტივობას აჩვენებენ.

არ შეიძლება უარყოფა იმის შესაძლებლობისა, რომ Na⁺/მიო-ინოზიტოლ ტრანსპორტერი შესაძლებელია რეგულირდებოდეს სხვა უცნობი ფაქტორებით, რადგან სხვადასხვა ტრანსკრიფციული ფაქტორები უნდა იყოს გააქტივებული კრუნჩხვების შემდეგ. ეს ტრანსკრიფციული ფაქტორები შეიძლება ჩაერთოს ნმიტ mRNA ექსპრესიის რეგულაციაში (Nonaka et al., 1999). ნმიტ-ს შეუძლია გაატაროს მიო-ინოზიტოლი, რომელიც აუცილებელია, როგორც პრეკურსორი მოლეკულა ფოსფოინოზიტიდების სინთეზისთვის. ინოზიტოლ ტრიფოსფატი საგრძნობლად იზრდება კაინის მჟავით გამოწვეული კრუნჩხვების შემდეგ.

ქვეთავი 2.6. ინოზიტოლის გავლენა სხვა ნეიროლოგიურ დარღვევებზე

ინოზიტოლს პირდაპირ თუ არაპირდაპირ გავლენა აქვს ცნს-ის სხვა დარღვევებზე. მაგალითად. დახვეულ კუდიან ვირთაგვებში (ფოლის მჟავის დაუკავშირებლობის, ნერვული მილის დეფექტის გენეტიკური მოდელი) ინოზიტოლის ინტრაპერიტონული შეყვანა ამცირებს დაავადების სინდრომს ჩანასახებში (Greene and Copp 1997). ინოზიტოლის სამკურნალო ეფექტის იმიტირება შეიძლება პროტეინკინაზა C აქტივატორების შეყვანით, ხოლო შეწყვეტა ლითიუმით.

ინოზიტოლის კონცენტაციის ცვლილება დაკავშირებულია ალცჰაიმერის დაავადებასთან (AD). ნაჩვენები იქნა, რომ ინოზიტოლს შეუძლია წარმოქმნას კომპლექსი AB42-თან. სქილო-ინოზიტოლსაც ასევე შეუძლია კომპლექსის ფორმირება. ინოზიტოლების კომპლექსი AB42-თან არ არის ტოქსიკური, არც PC12 და არც ადამიანის ნეირონებში (McLaurin et al 2000).

თავი 3. ნერვულ სისტემაში მოცულობის რეგულაციის დარღვევა

ოსმოლიტების შემცვლელობა მუდმივად რეგულირდება, ეს ასე რომ არ იყოს მაშინ წყლის დიდი რაოდენობით შესვლა გამოიწვევდა უჯრედის მოცულობის მკვეთრ ცვლილებებს და მათ დაზიანებას. უჯრედის მოცულობის რეგულირდება Na^+ -ის, K^+ -ის, H^+ -ის და Cl^- -ის ტრანსპორტით პლაზმური მემბრანის გასწვრივ და ასევე ორგანული ოსმოლიტების, ძირითადად ინოზიტოლის ტრანსპორტით (Strange, 1992).

დაუნის სინდრომის პათოგენეზი ნაწილობრივ შეიძლება დაკავშირებული იყოს ინოზიტოლის ფუნქციონის დარღვევებთან, როგორც ნერვული სისტემის ოსმოლიტთან. ადამიანის 21-ე ქრომოსომის q-22 ზოლი, რომელიც შეიცავს ნატრიუმ/მიო-ინოზიტოლის ტრანსპორტერის მაკოდირებელ გენს, განიცდის ტრიპლიკაციას (Berry et al., 1995) და ინოზიტოლის კონცენტრაცია თავის ტვინში და საზურგტვინე სითხეში არის 30-50% მაღალი ვიდრე კონტროლში (Berry et al., 1999). ჩანასახის საზურგტვინე სითხეში ინოზიტოლის კონცენტრაცია არის 10-ჯერ უფრო მაღალი ვიდრე ზრდასრულში (Battaglia et al., 1961).

ჰიპერნატრემიის დროს ტვინი იმარაგებს ინოზიტოლს რათა წყლის დანაკარგი გააწონასწოროს (Lee et al., 1994). თუ ჰიპერნატრემია გამოსწორდა სწრაფად, უეცარი ოსმოსური გრადიენტი იწვევს ტვინის შეშუპებას, რომელიც თავის მხრივ იწვევს კრუნჩხვებს და სიკვდილსაც, რადგან გაჯირჯვებული ტვინი ვეღარ ეტევა თავის ქალაში (Jackson and Madsen 1997). შესაბამისად ხანგრძლივი ჰიპერნატრემია იწვევს ინოზიტოლის რეზერვუარების ამოწურვას და იზოტონური ხსნარების შეყვანამ შეიძლება გამოიწვიოს ცერებრალური დეჰიდრატაცია და მიელინოლიზი (Videen et al., 1995).

ინოზიტოლის ტრანსპორტი იცვლება აგრეთვე ინსულტის დროს. ფიზიკურმა ტრამვამ შეიძლება დაარღვიოს ჰემატოენცეფალური ბარიერი, რასაც თან სდევს იონებისა და მაკრომოლეკულების გაჟონვა ტვინის უჯრედგარესივრცეში, რაც იწვევს ვაზოგენურ შეშუპებას და SMIT მ-რნმ-ის აღმავალ რეგულაციას და უჯრედში ინოზიტოლის მომატებას (Yamashita et al., 1997).

ქვეთავი 3.1. მოცულობით რეგულირებადი ანიონური არხი: სუბერთეული LRRC8A

უჯრედები თავიანთ მოცულობას არეგულირებენ იონთა მიმოცვლის მუდმივობის შენარჩუნებით. წყლის ნაკადი კონტროლდება ციტოზოლსა და უჯრედგარე სივრცეში იონთა და ოსმოლიტთა მიმოცვლით. ჰიპოტონიურ პირობებში, როდესაც ციტოზოლის ოსმოსური მდგომარეობა უფრო მაღალია ვიდრე უჯრედგარეთ, წყლის ნაკადი შეედინება უჯრედის შიგნით და იწყება უჯრედების გაბერვა, გაჯირჯვება. წყლის შეედინება ამცირებს უჯრედის შიგნით ოსმოსურობას და ზრდის უჯრედის მოცულობას, შესაბამისად უჯრედების ფუნქციონირებაც იცვლება. უჯრედების გაჯირჯვებით ხორციელდება უჯრედების შეშუპების შედეგად გამოწვეული დაზიანების თავიდან აცილება და ეს კონტროლდება მოცულობა რეგულირების შემცირების გააქტივებით. ერთ-ერთი მარეგულირებელი ანიონური არხი ანუ მოცულობით-რეგულირებადი არხი (მრაა), აკონტროლებს ამ პროცესებს. ეს არხი პირველად შესწავლილი იქნა 1980 წელს ლიმფოციტებში, თუმცა მალევე სხვა უჯრედებშიც. იგი ხასიათდება ქლორის იონების გამტარიანობით, თუმცა ასევე სხვა ანიონებისა და ოსმოლიტების, როგორიცაა ბიკარბონატი, ტაურინი და გლუტამატი. ასევე ცნობილია რომ, მრაა აქტივდება აპოპტოზის დროს, როდესაც ადგილი აქვს უჯრედების მოცულობის შემცირებას და რაც გამოწვეულია უჯრედების შეშუპებისა და ოსმოლიტთა მიმოცვლის არარსებობით. მრაა-ს ჰეტერო ჰექსამერები არიან LRRC8A და LRRC8 იზოფორმები (LRRC8B- LRRC8C) (Voss et al.2014). ჰეტერომერები LRRC8A-C ან LRRC8A-E-სი წარმოდგენილები არიან ქლორის არხების მაღალი აქტივობის დროს და ასპარტატის ტრანსპორტირებას განაპირობებენ. LRRC8A-D კი ტაურინის, სერინის და გაემის. ხოლო რაც შეეხება LRRC8A-B ჰეტერომერებს იდენტიფიცირებულია არააა სატრანსპორტო ფუნქციაში მათი ჩართულობა.

ჟანგვითი აგენტები როგორიცაა, ქლორამინ-T და ბუთილ-ჰიდროპეროქსიდი აინჰიბირებს ქლორის არხების სუბერთეულებს LRRC8A-C-ს ან LRRC8A-E-ს , როდესაც აღმდგენელი აგენტები როგორიცაა DTT აძლიერებს მათ ფუნქციობას. ჟანგვითი პროცესების ანტაგონისტური ეფექტები დამოკიდებულია LRRC8 სუბერთეულების

კომბინაციაზე. მოცულებით რეგულირებადი არხები მოდულირდება ჟანგვითი პროცესებით.

თავი 4. არამაკოდირებელი რნმ-ები და ეპილეფსია

არამაკოდირებელი რნმ-ები. არამაკოდირებელი რნმ-ები, მიეკუთვნება რნმ-ის კლასს რომლებიც როგორც სახელწოდება მიგვითითებს ცილოვან მოლეკულებს არ კოდირებენ. ეს ჯგუფი კიდევ ორ ქვეჯგუფად შეიძლება დაიყოს: გრძელი არამაკოდირებელი რნმ-ები (200 ნუკლეოტიდზე მეტი) და მოკლე არამაკოდირებელი რნმ-ები. ისინი თავის მხრივ შეიძლება წარმოდგენილები იყვნენ მიკრო-რნმ-ებით, პატარა ინჰიბიტორული რნმ-ებით და პი-რნმ-ებით. მოკლე არამაკოდირებელი რნმ-ები უმთავრესად ტრანსლიაციის პროცესების რეგულაციაში მონაწილეობენ (Mattick and Makunin 2006).

ცნობილია რომ ძუძუმწოვრების გენომის დაახლოებით 1.2 % აკოდირებს ცილებს და გენომის უდიდესი ნაწილი კი ორივე ჯაჭვზე რთულ ურთიერთ გადამფარავ ტრანსკრიპტებად გადაიწერება, რომელთა ნაწილი მარეგულირებელ რნმ-ებს წარმოქმნის. მათ ჯგუფს მიეკუთვნება ცილის არამაკოდირებელი რნმ-ები. დამამტკიცებელი საბუთების დიდი ნაწილი მიუთითებს, რომ ეს რნმ-ები წარმოქმნიან რთულ ქსელს რომლებიც ტრანსკრიფციის, რნმ-ის მოდიფიკაციის, სპლაისინგის, მრნმ-ის ტრანსლაციის, რნმ-ის სტაბილიზაციის და ქრომატინის მოდიფიკაციის გზით განვითარებისა და დიფერენციაციის ტრაექტორიებს წარმართავენ. ასევე ცხადია, რომ არამაკოდირებელი რნმ-ები დიდი რაოდენობით ექსპრესირდებიან ცენტრალურ და პერიფერიულ ნერვულ სისტემაში (Carninci et al.,2005)

მზარდი რაოდენობით დამამტკიცებელი საბუთები გროვდება იმის შესახებ რომ ნერვული სისტემის განვითარება და ფუნქცია არამაკოდირებელი რნმ-ების (ამრნმ), მათ

შორის მიკრო რნმების (მიკრო-რნმ) და გრძელი არამაკოდირებელი რნმ-ების (გამრნმ) ფართო რეპერტუარის ექსპრესიაზე დამოკიდებული. ამრნმ-ები შესაძლოა წარმოადგენდნენ უმნიშვნელოვანეს იმის განსაზღვრისთვის თუ რა კავშირია ნერვულ განვითარებას, ნერვული სისტემის ფუნქციებსა და ნევროლოგიურ დაავადებებს შორის. და ცხადია მათ უნდა ჰქონდეთ მნიშვნელოვანი როლი ნერვული სისტემის ფუნქციონირებაში. ამრნმ-ები მრავალი განსხვავებული ბიოლოგიური პროცესის წარმმართველები არიან. ცნს-ში ეს ფაქტორები ისეთ კრიტიკულ ფუნქციებს წარმართავენ როგორებიც არის ნეირონული ღეროვანი უჯრედების შენარჩუნება, ნეიროგენეზი და გლიოგენეზი, სტრესზე პასუხი, ჰომეოსტაზი და სინაფსური და ნერვული ქსელების კავშირები და პლასტიკურობა. აქედან გამომდინარე გასაოცარი არ არის რომ ამრნმ-ების ექსპრესიის დარღვევები უკავშირდება ცნს-ის დაავადებების მოლეკულურ პათოფიზიოლოგიას. ეპილეფსიაც ასეთ დაავადებებს მიეკუთვნება. მართლაც, ბოლო დროინდელი მონაცემები მიუთითებს, რომ ამრნმ-ები შესაძლოა ჩართული იყოს ეპილეფტოგენეზის პროცესში (Taft et al., 2010) და მათი მოქმედების ხასიათის უკეთ გარკვევა დაგვეხმარება ეპილეფტოგენეზის მექანიზმის უკეთ გაანალიზებაში.

თავი 5. მიკრო-რნმ-ები ფუნქციები და მათი როლი ეპილეფსიაში

მიკრო-რნმ-ები პატარა არა მაკოდირებელი ენდოგენური რნმ-ებია, რომელთა ფუნქციაა გენთა ექსპრესიის რეგულირება პოსტ ტრანსკრიფციულ დონეზე, მრნმ-თან დაკავშირებით და ცილების ტრანსლიაციის რეგულირებით.

ინ სიტუ ჰიბრიდიზაციისა და სხვა ვიზუალიზაციური ტექნიკის საშუალებით აღმოჩენილი იქნა რამოდენიმე მიკრო რნმ რომლებიც ექსპრესირდებიან დენდრიტებში (მირ 134 და მირ 138) და ნეირონთა დეპოლარიზაცია ან გლუტამატური რეცეპტორების აქტივაცია იწვევს ამ მიკრო რნმ-ების ექსპრესიის ცვლილებებს. RISC ცილის

კომპონენტები წარმოდგენილი არის სინაფტო-დენდრიტულ კომპარტმენტში და აქაც ნაჩვენებია რამოდენიმე მიკრო რნმ-ების ცვლილებები (Cattani et al., 2016).

4 კვლევის შედეგების კომბინირებით დაახლოებით 100 სხვადასხვა მიკრო რნმ-ის ექსპრესია იყო გაზრდილი, ხოლო 200-ამდე მიკრო რნმ-ის შემცირებული სტატუს ეპილეფტიკუსის შემდეგ. გაზრდილი იყო მირ-21, 30c, 125b, 132, 199a 375. 10b. mir 34a, 134 155, 146) და შემცირებული mir9, 125a, 145, 150.

სტატუს ეპილეფტიკუსის შემდეგ Mir132 ექსპრესია იყო გაზრდილი. ასევე საფეთქლის წილის ეპილეფსიის დროსაც. mir 132 ჩართულია სინაპტოგენეზის პროცესში. ასევე მისი ექსპრესია რეგულირდება CREB-ის მიერ, მისი ექსპრესიის გაზრდა დაკავშირებულია ჰიპოკამპალური ნეირონების, ნეირიტებისა და დენდრიტების სპრაუტინგთან.

ზოგიერთები მიკრო-რნმ-ის (mir -21, mir -125b ექსპრესიის გაზრდა, მირ-29b-ს და mir497-ს შემცირება) დაკავშირებულნი არიან bcl2 და p53 ცილებთან. და მათ გააჩნიათ ანტი აპოპტოზური ეფექტი სტატუს ეპილეფტიკუსის დროს.

Mir 181 განაპირობებს უჯრედულ სიკვდილს და აგრეთვე აკონტროლებს bcl2 ოჯახის ცილების ექსპრესიას (Bencurova et al., 2017).

ადამიანებში, მიკრო-რნმ-ების 70% ტრანსკრიფცირდება ინტრონებიდან და ან ეგზონებიდან, დაახლოებით 30% მოთავსებულია გენებს შორის რეგიონში. ადამიანებსა და ცხოველებში მიკრო-რნმ-ები უმთავრესად ტრანსკრიფცირდება რნმ პოლიმერაზა II და იშვიათ შემთხვევაში პოლ III-ის საშუალებით. მი-რნმ-ების ტრანსკრიფციის შედეგად მიიღება ფართო მონოცისტრონული, ბიცისტრონული ან პოლიცისტრონული პირველადი ტრანსკრიპტები (პრი-მირნმ). მონოცისტრონული ან პოლიცისტრონული მიკრო-რნმ-ის მაკოდირებელი გენი ტრანსკრიფცირდება რნმ პოლიმერაზა II (პოლII)-ის საშუალებით და ეს პირველადი ტრანსკრიპტი შეიცავს თმის სარჭისებრ(hairpin) სტრუქტურას. ეს პროცესი მიმდინარეობს ბირთვში, შემდეგ პრე-მირნმ გადაიტანება ციტოპლაზმაში ბირთვული სატრანსპორტო რეცეპტორის (ექსპორტინ-5 და რან-გტფ.) საშუალებით. ამის შემდეგ ციტოპლაზმური რნ-აზა III-ის საშუალებით მიმდინარეობს დახლეჩვა, მიიღება მი-რნმ-ის დუპლექსი და RISC საშუალებით უკავშირდება მ-რნმ-ს.

ზოგი მიკრო-რნმ ცხოველთა სხვადასხვა სახეობაში მაღალი კონსერვაციულობით ხასიათდება. ისინი სხვადასხვა უჯრედულ, და განვითარების პროცესში მოქმედებენ როგორც გენთა ექსპრესიის პოსტ-ტრანსკრიბციული რეგულატორები. ბევრი მი-რნმ-ი სპეციფიკურად ცნს-ში ექსპრესირდება, სადაც ისინი ასრულებენ როლს დიფერენცირებაში, ნეირონულ გადარჩენაში და დასწავლასა და მეხსიერებაში.

ბოლო დროინდელი კვლევებით ნანახი იქნა, მიკრო-რნმ-ებსა და ნეიროდეგენერაციულ პროცესებს შორის კავშირი. ფსიქოლოგიური და პათოლოგიური ნეირონული აქტივობა მიკრო-რნმ-ების ექსპრესიის მოდულაციას განაპირობებს, აგრეთვე ისეთი მიკრო-რნმ-ების ექსპრესიას, რომლებიც არეგულირებენ ნეირონთა სტრუქტურას. მი-რნმ-ების ბიოგენეზის პროცესში ჩართული კომპონენტების დაკარგვა განაპირობებს ნეიროდეგენერაციას, მაგრამ არა ტვინის ყველა რეგიონში. ნანახია, რომ მი-რნმ-ები არეგულირებენ უჯრედულ ციკლსა და უჯრედის სიკვდილს, ამიტომაც მი-რნმ-ების დისფუნქცია უკავშირდება ნეიროდეგენერაციულ პროცესებს. აგრეთვე მწვავე ნეიროლოგიური ინსულტები და სტატუს ეპილეპტიკუსი განაპირობებენ მიკრო-რნმ-ების ექსპრესიის ცვლილებებს თავის ტვინში. ტრანსკრიფციული ფაქტორი p53 არის უჯრედული ციკლის, დნმ-ის რეპარაციისა და აპოპტოზის მნიშვნელოვანი რეგულატორია. კრუნჩხვით გამოწვეული უჯრედული სიკვდილის დროს შესაძლებელია ადგილი ქონდეს ტრანსკრიფციული ფაქტორის მარეგულირებელი მიკრო-რნმ-ების ექსპრესიულ ცვლილებებს.

ეპილეფსიური კრუნჩხვები არის კლინიკური გამოვლინება ნეირონთა დისფუნქციების თავის ტვინში. კვლევებით ნანახი იქნა სხვადასხვა მიკრო-რნმ-ები რომლებიც ექსპრესირდებიან ტვინის სხვადასხვა რეგიონში. ამ განსხვავებულად ექსპრესირებულ მიკრო-რნმ-ებს შეუძლიათ ეპილეფსიური აქტივობის მოდულირება. კაინის მჟავით გამოწვეული კრუნჩხვების დროს ადგილი აქვს მიკრო-რნმ-ების ფართო სპექტრის ცვლილებებს ჰიპოკამპში. ეს ცვლილებები შესწავლილია უმთავრესად 24 სთ-ის, 2 დღის განმავლობაში (Liu et al., 2010).

თავი 6. მიტოქონდრიები და ეპილეფსია

მიტოქონდრია არის რთული მემბრანული სტრუქტურის მქონე ორგანელა, ის უმეტესად ეუკარიოტულ უჯრედებში გვხვდება (Henze et al., 2003). მიტოქონდრიის ძირითად ფუნქციაა უჯრედების უზრუნველყოფა ენერგიით. ასევე მემბრანული პოტენციალის, კალციუმის იონების ბუფერირების, აპოპტოზ-პროგრამირებული უჯრედების სიკვდილის, უჯრედების პროლიფერაციისა და მეტაბოლიზმის რეგულირება (McBride et al., 2006).

მიტოქონდრია არა მარტო ბიოენერგეტიკულ როლს ასრულებს, არამედ სხვა მნიშვნელოვან უჯრედულ პროცესებშიც მონაწილეობს. დღეს საყოველთაოდ აღიარებულია, რომ მიტოქონდრია მნიშვნელოვანია უჯრედის სასიგნალო პროცესებისთვის, ორგანოიდებს შორისი კომუნიკაციებისთვის, დაბერებისთვის, უჯრედის პროლიფერაციისა და კვდომისთვის. ნაჩვენებია, რომ მიტოქონდრიისთვის აპოპტოზური სიგნალის გადაცემა, ციტოზოლში აპოპტოზის რეგულატორების გამოთავისუფლებას განაპირობებს რაც კასპაზას აქტივაციას იწვევს და უჯრედის სიკვდილსა და დაშლას ასტიმულირებს. მოიპოვება მონაცემები იმის შესახებ, რომ ვოლტაჟ-დამოკიდებული ანიონური არხები (ვდაა) ჩართულია მიტოქონდრიის გარეთა მემბრანის მიერ ცილების გამოთავისუფლების პროცესში. მიტოქონდრიის გარეთა მემბრანის ვდაა-ს ძალზედ მიშენელოვანი ადგილი უჭირავს უჯრედში, რამდენადაც ქმნის უჯრედული და მიტოქონდრიული მეტაბოლიზმის მთავარ დამაკავშირებელ კომპონენტს. ჩვენ მასზე ქვემოთ გვექნება დაწვრილებითი საუბარი (Shoshan-Barmatz et al., 2006).

ქვეთავი 6.1. ვოლტაჟ დამოკიდებული ანიონური არხის ცილები

ვოლტაჟ დამოკიდებული ანიონური არხის ცილები განთავსებულნი არიან მიტოქონდრიების გარე მემბრანაზე. აღნიშნული არხის საშუალებით ორმხრივად ტრანსპორტირდება ატფ, ადფ, ნად-ი, იონებისა და მეტაბოლიტების უწყვეტი ნაკადი. მიტოქონდრიის გარეთა მემბრანა განაპირობებს მიტოქონდრიების მთლიანობის შენარჩუნებას. მისმა დაზიანებამ შესაძლოა გამოიწვიოს უჯრედული დისფუნქციები, ატფ-ის სინთეზის შეწყვეტა, Ca^{2+} ჰომეოსტაზის დარღვევა, ციტოქრომ C-ს გამონთავისუფლება და აპოპტოზი (Shoshan-Barmatz et al; 2015).

ამ არხის ცილები არიან მიტოქონდრიის გარე მემბრანის ტრანსპორტერები. ასევე ისინი მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ ენერგიის წარმოქმნის პროცესში, რომელიც მეტაბოლიტების გატარებით კონტროლირდება და აგრეთვე ცნობილია მათი როლი მიტოქონდრიებით გამოწვეულ აპოპტოზში (Van Den Pol et al., 1996)

ვოლტაჟ დამოკიდებული ანიონური არხის ცილების 3 იზოფორმა არსებობს: ვოლტაჟ დამოკიდებული ანიონური არხის ცილა 1,2,3 (ვდაა-1, ვდაა-2 და ვდაა-3). ვდაა-1-ის მაღალი ექსპრესია აპოპტოზური პროცესის დროს ვლინდება (Shoshan-Barmatz et al; 2015), რაც შეეხება ვდაა-2-სა და ვდაა-3, ისინი დადებითი რეგულატორებია ფეროპტოზის და არა აპოპტოზის (Xie et al; 2016).

ერთ-ერთ კვლევაში შესწავლილი იქნა, თუ როგორ იცვლებოდა ატფ-ის დონე ვდაა-1-ის ცვლილებების დროს. როდესაც იზრდებოდა ვდაა-1-ის რაოდენობა მცირდებოდა ატფ-ის გამოყოფა. ატფ-ის შემცირებული რაოდენობა მიტოქონდრიების დისფუნქციას იწვევს, რომელიც ენერგეტიკული დეფიციტათა და უამრავი სხვა უჯრედული ფუნქციების დარღვევებით არის განპირობებული (Jiang et al.2007).

აღნიშნულ კვლევაში ასევე შესწავლილ იქნა ვდაა-1-ის როლი აპოპტოზის დროს ანუ ვდაა-1 მომატებული რაოდენობა იწვევს მიტოქონდრიიდან ციტოქრომ ც-ს გამონთავისუფლებას და უჯრედის აპოპტოზს (Jiang et al.2007).

ვდაა-1 მნიშვნელოვან როლს ასრულებს აგრეთვე დასწავლასა და სინაფსურ პლასტიურობაში, რომელიც შესაძლოა აიხსნას კოგნიტური ფუნქციების დარღვევებით რეფრაქტორული ეპილექსიის დროს.

ვდაა-2 (VDAC-2) წარმოადგენს არხს, რომელიც ატარებს მიტოქონდრიაში მცირე ზომის ჰიდროფილურ ნაწილაკებს დიფუზიის გზით. არხი ღიაა უარყოფითი ან ნულოვანი პოტენციალის შემთხვევაში, ხოლო 30-40 მვ -ს დროს იხურება. ღია მდგომარეობაში ის სუსტად ანიონ სელექტიურია, ხოლო დახურულ მდგომარეობაში კათიონ სელექტიური (Huizing et al. 1998).

ამრიგად ვოლტაჟ დამოკიდებული ანიონური არხის დისფუნქციები ეპილექსიის დროს კრუნჩხვების აქტივობისას იწვევს ენერგიის შემცირებას, აპოპტოზს, სუპეროქსიდ O₂-ის გამოყოფას და სინაპტოგენეზის დარღვევას (Jiang et al. 2007).

საყოველთაოდ აღიარებულია და ზემოთაც ვახსენეთ, რომ ეპილექსია პოლიეთიოლოგიური დაავადებაა, რომლის გამომწვევი შესაძლებელია იყოს მიტოქონდრიების დისფუნქციები, ანომალიები და მიტოქონდრიული დაავადებები. უფრო დაწვრილებითა და ვრცლად განვიხილოთ აღნიშნულ პროცესებში მონაწილე ცილები.

მიტოქონდრიული სუნთქვის ჯაჭვის ანომალიები ენერგიის მეტაბოლიზმის დარღვევებს განაპირობებს. აღნიშნული დარღვევები ძირითადად იმ ქსოვილებს აზიანებს, რომლებსაც მაღალი ენერგეტიკული მოთხოვნები გააჩნიათ, მათ შორის არის თავის ტვინი. შესაბამისად მიტოქონდრიული პათოლოგიები ხშირად კრუნჩხვების აღმოცენებასთან არის დაკავშირებული. მიტოქონდრიული დარღვევებით განპირობებული ეპილექსია ხშირად ძალიან რთული სამართავია. დღესდღეობით მიტოქონდრიული დაავადების განკურნება ვერ ხერხდება და შესაბამისად მიტოქონდრიული ეპილექსიის მქონე პაციენტებს მრავლობითი და განსხვავებული ანტიკონვულსანტებით მკურნალობენ (Rahman 2012). მიტოქონდრიების ფუნქციონირების ერთ-ერთი პირობა არის მისი ტრანსკრიფციული ფაქტორების ნორმალური მოქმედება. აღნიშნული ფაქტორებიდან აღსანიშნავია მიტოქონდრიული ტრანსკრიფციის ფაქტორი ა (მტფა) რომელიც მიტოქონდრიაში მიმდინარე

ტრანსკრიფციის ერთერთი მთავარი აქტივატორია და ასევე მიტოქონდრიის გენომის რეპლიკაციაში მონაწილეობს. კვლევებმა აჩვენა, რომ მტფა არეგულირებს მიტოქონდრიის გენომის კოპირების რიცხვს და ძალზედ მნიშვნელოვანია ემბრიონული განვითარებისთვის (Lezza et al., 2001).

თავი 7. უჯრედის ციტოჩონჩხის ცილები

ციტოჩონჩხის შემადგენელი ელემენტები მჭიდროდ ურთიერთქმედებენ ერთმანეთთან და ხელს უწყობენ უჯრედულ ურთიერთქმედებებს, უჯრედებს შორის ვეზიკულებისა და ორგანელების ტრანსპორტირებას. ასეთი ურთიერთქმედება მნიშვნელოვანია უჯრედული პროცესების ნორმალურად ფუნქციონირებისათვის.

უჯრედები შედგება სამი ძირითადი სახის ციტოჩონჩხის ფილამენტებისგან, ესენია: მიკროფილამენტები, შუალედური ფილამენტები და მიკროტუბულები. ფილამენტებსა და პლაზმურ მემბრანას შორის ურთიერთქმედება დამოკიდებულია ფილამენტების მდებარეობაზე. აქტინი, შუალედური ფილამენტები და მიკროტუბულები მიუხედავად იმისა რომ მჭიდროდ არიან ერთმანეთთან დაკავშირებული, ფუნქციურად განსხვავებული და დამოუკიდებლები არიან. აქტინის დინამიკა რეგულირდება ფოსფოლიპიდების დაკავშირებით და ასევე ბირთვული ფაქტორებით. ციტოჩონჩხი უზრუნველყოფს უჯრედების სტრუქტურის მდგრადობის და ფორმის შენარჩუნებას (Doherty and McMahon 2008).

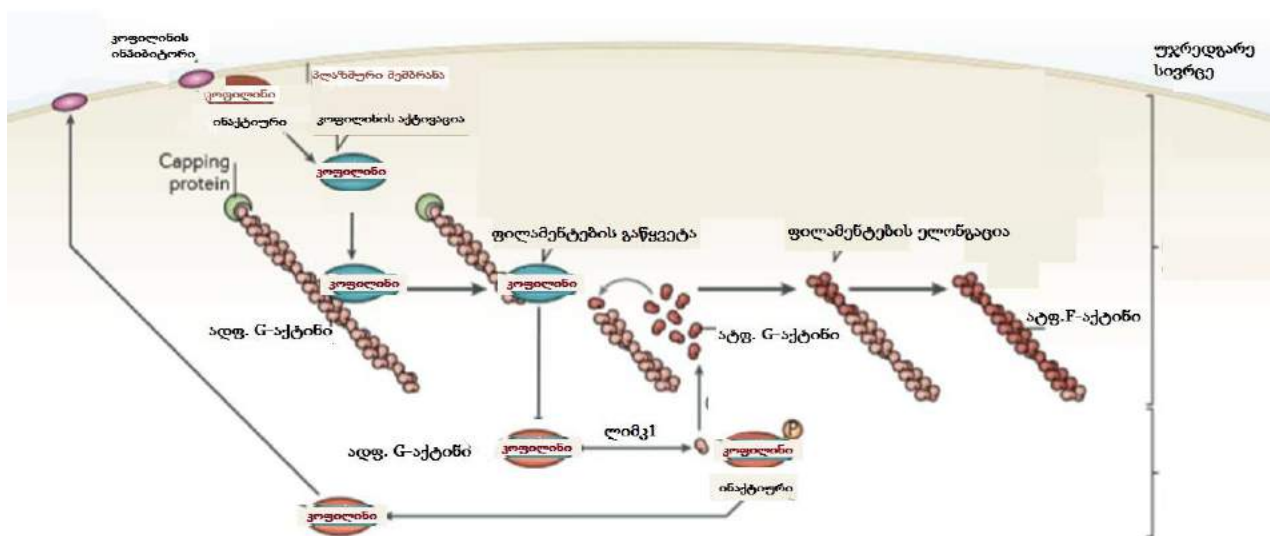
ქვეთავი 7.1. კოფილინი

კოფილინი აქტინ-დაკავშირებული ცილების ოჯახს მიეკუთვნება. ეს არის მცირე ზომის ციტოჩონჩხის ცილა, დაახლოებით-19 კდა. იგი უჯრედის სხვადასხვა კომპარტმენტში გვხვდება: როგორცაა ციტოპლაზმა, ბირთვი და პლაზმური მემბრანა. კოფილინი უკავშირდება მონომერულ G-აქტინს და აქტინის ფილამენტებს F-აქტინს და შლის ფილამენტებს, იგი პასუხისმგებელია აქტინის დინამიკაზე. (Bravo-Cordero et al., 2013, Lin et al., 2010).

იდენტიფიცირებულია კოფილინის ოჯახის სამი გენი:

1. გენი CFL1 აკოდირებს კოფილინ-1-ს (რომელიც არა კუნთოვანია და მას n-კოფილინს უწოდებენ).
2. გენი CFL2 აკოდირებს კოფილინ-2-ს (რომელიც უმეტესად გვხვდება კუნთოვან ქსოვილში და მას m-კოფილინს უწოდებენ).
3. გენი DSTN აკოდირებს დესტრინს, რომელიც ასევე ცნობილია როგორც აქტინის მადეპოლარიზებული ფაქტორი (ADF).

კოფილინის აქტივობა რეგულირდება სამი ძირითადი მექანიზმით: 1. Ser3 დეფოსფორილირებით, 2. ფოსფატიდილინოზიტოლ-4,5-ბიფოსფატის გამოყოფით პლაზმურ მემბრანაში, 3. კორტაქტინის გამოყოფით.

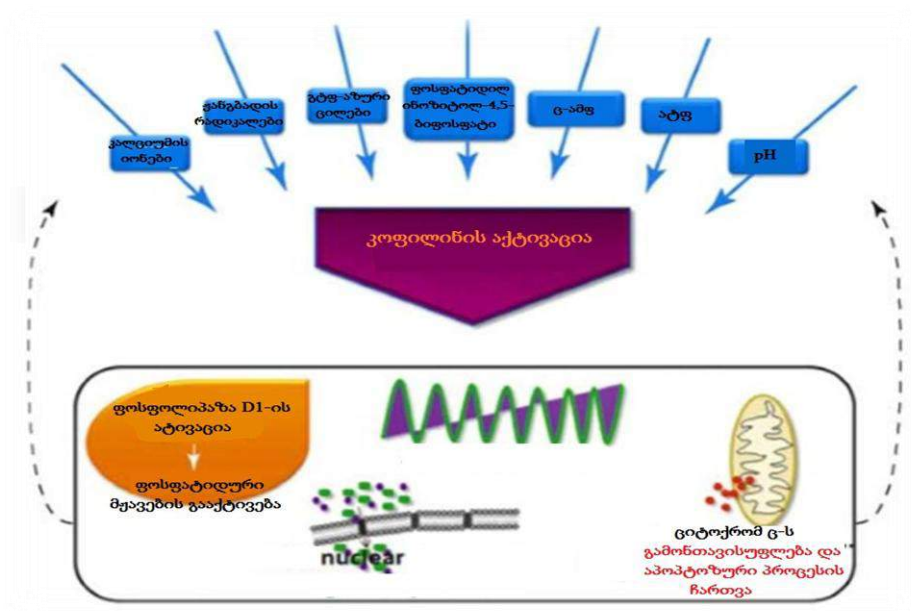


სურათი 1. კოფილინის აქტივაცია და ფილამენტების გაწყვეტა.

კოფილინის მოქმედება ინჰიბირდება LIM-კინაზას მიერ, ეს არის ფერმენტი, რომელიც მონაწილეობს ციტოჩონჩხის დინამიკის რეგულირების პროცესში (Birkenfield et al., 2003).

კოფილინის მეორე მნიშვნელოვანი ფუნქცია არის აპოპტოზურ პროცესში მონაწილეობა. უმეტესი აპოპტოზური სიგნალები მიტოქონდრიიდან ირთვება, აპოპტოზური მიტოქონდრიული ცილების გამოყოფით და გააქტივებით. მაგ. ციტოქრომ C გამოიყოფა ციტოპლაზმაში და Apaf 1 კომპლექსის ჩამოყალიბებით ააქტივებს კასპაზა 9-ს და აქტივდება კასპაზების კასკადიც. ერთ-ერთი ცილა რომელიც მიტოქონდრიით განპირობებულ აპოპტოზს რთავს ესაა კოფილინი, რომელიც ციტოპლაზმიდან ტრანსლოცირდება მიტოქონდრიის მემბრანაზე და იქედან ციტოქრომ C-ს გამონთავისუფლებას უწყობს ხელს (Kim et al., 2010).

თავად კოფილინის აქტივაციას განაპირობებს სხვადასხვა ფაქტორები: ფოსფატიდილინოზიტოლ-4,5-ბიფოსფატის, რეაქტიული ჟანგბადის რადიკალების გამოყოფა (ROS), (რაც მიტოქონდრიის მემბრანის პოტენციალის ცვლილებებითაა განპირობებული), უჯრედში კალციუმის იონებისა და pH-ის ცვლილებები და სხვა. ფოსფოლიპაზა D1-ის აქტივაცია განაპირობებს ფოსფატიდური მჟავების რაოდენობის ზრდას და ეს უკანასკნელი კი ზემოთ ჩამოთვლილი ფაქტორების ცვლილებებს იწვევს (Bernstein et al., 2010).



სურათი 2. ცილა კოფილინის გააქტივებისთვის საჭირო სხვადასხვა ფაქტორები.

ისეთი ნევროლოგიური დაავადებები, როგორებიც არის ალცჰაიმერის დაავადება, დაუნის სინდრომი და ეპილეფსია ხასიათდება დენდრიტული ქაცვების ანომალური სიმჭიდროვითა და მორფოლოგიით. ქაცვების მორფოლოგიისა და სინაფსური ფუნქციონირებისთვის აქტინის ციტოჩონჩხის ქსელის დინამიკა კრიტიკულ ფაქტორს წარმოადგენს. როგორც ცნობილია, მწვავე კრუნჩხვა ან ქრონიკული ეპილეფტოგენეზი კალციუმ დამოკიდებული ფოსფატაზას, კალცინევრინის აქტივაციას იწვევს, რომელიც თავის მხრივ ან უშუალოდ, ან სპეციფიკური შუალედური ფოსფატაზას (slingshot-ის) საშუალებით კოფილინის დეფოსფორილირებას განაპირობებს. კოფილინის აქტივობა ასევე შეიძლება PAK-LIM კინაზური გზითაც დარეგულირდეს. ეპილეფსიურ ჰიპოკამპში ზემოთ ნახსენები სპეციფიკური ფოსფატაზას მომატებული აქტივობა, ან PAK-LIM კინაზას დაქვეითებული მოქმედება კოფილინის ფოსფორილირების შემცირებას იწვევს რაც პოტენციურად ზრდის კოფილინის დაკავშირებას ფიბრილარულ აქტინთან. ეს კი, ამ უკანასკნელის დეპოლიმერიზაციას განაპირობებს რასაც საბოლოოდ ეპილეფსიისთვის დამახასიათებელ სინაფსურ დისფუნქციამდე მივყავართ (Ferhat 2012).

თავი 8. აპოპტოზი და კასპაზები

აპოპტოზი არის მკაცრად რეგულირებადი, ენერგია დამოკიდებული პროცესი. უჯრედთა უმრავლესობის ფიზიოლოგიური სიკვდილი აპოპტოზის გზით მიმდინარეობს. აპოპტოზი ეს არის უჯრედის ნორმალური, "დაპროგრამირებული" სიკვდილი. უმაღლეს ორგანიზმში უჯრედთა უმეტესობამ "იცის" როდის დგება მისი სიკვდილის დრო და რომ ეს კვდომა აუცილებელიცაა მრავალუჯრედიანი ორგანიზმისთვის.

აპოპტოზის დროს ორგანიზმი თავიდან იშორებს იმ უჯრედებს რომლებიც: ინფიცირებულია ვირუსებით, დაზიანებულ დნმ-ს შეიცავენ და საზიანოა ორგანიზმისთვის.

აპოპტოზური მიმოცვლის საკვანძო ელემენტებიდან ყურადღებას გავამახვილებთ პროტეაზულ კასკადებზე, რომელთა წარმომადგენელია კასპაზები.

კასპაზები-ცისტეინ შემცველი ასპარტატ სპეციფიური პროტეაზებია. კასპაზების ოჯახში ლოკაციისა და ფუნქციის შესაბამისად გამოყოფენ ინიციატორ და "ჯალათ" წევრებს.

დღეისათვის 16 სხვადასხვა კასპაზა არის აღმოჩენილი. რა თქმა უნდა ყველა არ მონაწილეობს აპოპტოზის პროცესში. ისინი არსებობენ არააქტიური ციტოპლაზმური ზიმოგენების სახით. ეს სუბერთეულები ააქტივებენ თავის თავს ან კიდევ სხვა კასპაზებს და წარმოიქმნება პროტეოლიზური კასკადი. "ჯალათი" კასპაზების ერთ-ერთი წარმომადგენელი არის კასპაზა 3 (Kumar; 2007).

ქვეთავი 8.1. კასპაზა 3

კასპაზა 3 უჯრედში არსებობს როგორც არააქტიური 32 კდა-იანი პროფერმენტი-პროკასპაზა-3. იგი იხლიჩება აქტიურ 17 და 12 კდა-იან სუბერთეულებად.

კასპაზების მნიშვნელოვან სამიზნეებს წარმოადგენენ ისეთი ციტოპლაზმური და ბირთვული ცილები, როგორებიცაა: კერატინ 18, აქტინი, დნმ-დამოკიდებული

პროტეინკინაზა, მიტოზის აპარატის ბირთვული ცილა (NuMA), ბ-აქტინი, რეტინობლასტომური ცილა (pRb) და სხვა.

კასპაზის გააქტივების ერთ-ერთი გზაა, მიტოქონდრიიდან ციტოქრომ ც-ს გამონთავისუფლება. ეს პროცესი იბლოკება ანტიაპოპტოზური ცილა Bcl-2-ით.

აპოპტოზური პროცესის ჩასართავად ციტოქრომ ც-ს გამონთავისუფლება მხოლოდ არაა საკმარი, გააქტივებული კასპაზა-3 უკავშირდება და ააქტივებს ენდონუკლეაზა კდა-ს და ირთვება პროცესები რომლებიც იწვევენ ბირთვში ქრომატინის დაშლას. ასევე ააქტიურებს კასპაზა 6-ს და ორივე ერთად ააქტივებენ ისეთ ფერმენტებს რომლებიც უჯრედების დაშლის პროცესში მონაწილეობენ (Porter et al; 2000).

არსებობს ლიტერატურულ მონაცემები იმისა რომ, კაინის მჟავით ინდუცირებული სტატუს ეპილეპტიკუსის დროს კასპაზა 3-ის აქტივობა არის გაზრდილი. განსაკუთრებით მისი ექსპრესია იზრდება ტვინის გარკვეულ რეგიონებში, როგორიცაა: ჰიპოკამპი და ამიგდალა (Yang et al; 2016).

2.3. სამუშაოს მიზანი

ჩვენს ლაბორატორიაში უკვე ჩატარებული ექსპერიმენტების შედეგად ნაჩვენები იყო, რომ მيو-ინოზიტოლი უნდა ახდენდეს გავლენას ეპილეფსიურ შეტევებზე (Solomon et al., 2007), კერძოდ დადასტურდა, რომ მيو-ინოზიტოლის ინტრაპერიტონეალური შეყვანა მნიშვნელოვნად ამცირებდა ვირთაგვებში პენტილენ ტეტრაზოლითა და კაინის მჟავით გამოწვეულ კრუნჩხვებს (Solomon et al., 2007)

ასევე ჩვენს ლაბორატორიაში ჩატარებული ექსპერიმენტების შედეგად დადგინდა, რომ ვირთაგვების ჰიპოკამპის ჰომოგენატებში შეიმჩნეოდა რიგი ცილების ცვლილებები კაინის მჟავას ადმინისტრირებით გამოწვეული ეპილეფსიური სტატუსის შემდეგ და მيو-ინოზიტოლი აფერხებდა ამ ცვლილებებს. ამ 28 დღიან ცდებში მيو-ინოზიტოლით ყოველდღე შეგვყავდა და ეფექტები მიღებული იყო მيو-ინოზიტოლის ინექციების შეწყვეტიდან მხოლოდ 1 დღის შემდეგ (Solomon et al., 2011, 2013).

ზემოთ აღწერილ ცდებში ჩვენ ვუყურებდით მيو-ინოზიტოლის მოქმედების საბოლოო შედეგს. ეპილეპტოგენეზი ბიოქიმიურ რეაქციათა გრძელ-ვადიანი კასკადია, რომლის საბოლოო შედეგი შეცვლილი სინაფსური კავშირების და ეპილეფსიური სინაფსური ანსამბლის ჩამოყალიბებაა. ცხადია, მيو-ინოზიტოლის მოქმედება უფრო ადრე იწყება ვიდრე 28 დღის შემდგომი ნანახი შედეგი. ზუსტად ამიტომ არის მნიშვნელოვანი ამ ნაერთის მოქმედების სამიზნეების გარკვევა ეპილეპტოგენეზის ადრეულ ეტაპზე.

აქედან გამომდინარე ჩვენ კვლევის პირველ მიზანია: შეგვესწავლა მيو-ინოზიტოლის მოქმედების ეფექტები კაინის მჟავით გამოწვეული ეპილეფსიური მდგომარეობიდან 1 დღის შემდეგ, მოლეკულური და მორფოლოგიური ცვლილებების დონეზე.

როგორც უკვე აღნიშნული იყო, მيو-ინოზიტოლის მოქმედების შედეგები ერთ-თვიანი ცდების შემთხვევაში აღრიცხული იყო, ინექციების შეწყვეტიდან 1 დღის შემდეგ (Solomon et al., 2011, 2013). შესაძლებელია მيو-ინოზიტოლის მოქმედება ინექციების შეწყვეტის შემდეგაც გრძელდებოდეს. აქედან გამომდინარე ჩვენი სადისერტაციო ნაშრომის მეორე მიზანია: შევისწავლოთ მيو-ინოზიტოლის მოქმედების ხანგრძლივი

ეფექტები. ამის დასადასტურებლად შევისწავლეთ განმეორებადი სპონტანური კრუნჩხვების სიხშირე და ხანგრძლივობა პერიოდების მიხედვით, ინექციების განმავლობაში და ასევე მიო-ინოზიტოლის ადმინისტრირების შეწყვეტის შემდეგაც და ასევე შევისწავლეთ კაინის მჟავით გამოწვეული მოლეკულური ცვლილებები, მიკრო-რნმ-ები-ის სპექტრისა და მ-რნმ-ები-ის დონეზე.

2.4. მეთოდოლოგია

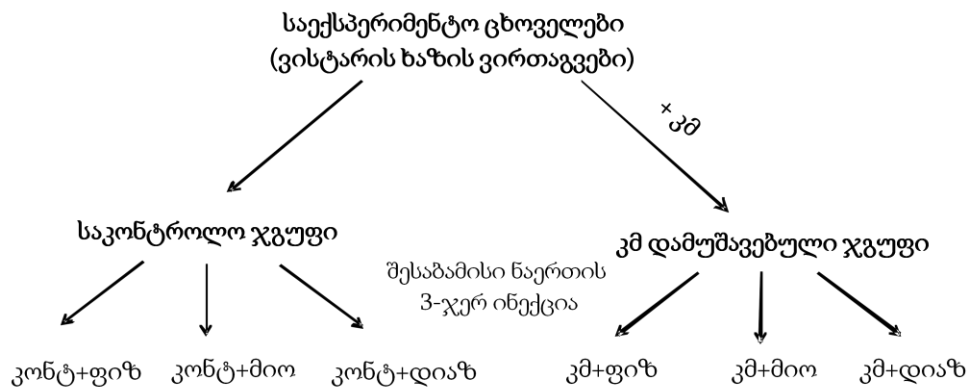
თავი 1. 24 საათიან და 2 თვიან ექსპერიმენტებში გამოყენებული მასალა და მეთოდები

ქვეთავი 1.1. სტატუს ეპილეპტიკუსის გამოწვევა კაინის მჟავით 24 საათიან ექსპერიმენტებში. ცდები ჩატარებული იყო 2.5-3 თვის, ვისტარის ხაზის მამრ ვირთაგვებზე, რომლებშიც მოვახდინეთ ფიზიოლოგიურ ხსნარში გახსნილი კაინის მჟავის (10 მგ/კგ) ინტრაპერიტონიალური ინექცია. თითოეული ცხოველი თავსდებოდა ინდივიდუალურ პლასტმასის კამერებში 4 საათიანი დაკვირვებისთვის. აღირიცხებოდა კრუნჩხვები და კონვულსიები მოდიფიცირებული რესინის შკალის მიხედვით. საბოლოოდ შევარჩიეთ 32 ვირთაგვა, რომელთა კრუნჩხვების ხარისხი 4-5 მაჩვენებლის ფარგალში იყო. კაინის მჟავით დამუშავებული 32 ცხოველიდან პირველივე დღეს 6 ვირთაგვა მოკვდა, ექსპერიმენტი გავაგრძელეთ 26 ვირთაგვაზე, აქედან 8 გამოვიყენეთ მორფოლოგიურ ექსპერიმენტებში და 18 ბიოქიმიურ ანალიზებში.

ექსპერიმენტებში გამოყენებულ იქნა 22 ვირთაგვა რომელიც წარმოადგენდნენ საკონტროლო ჯგუფის ცხოველებს, აქედან 18 ბიოქიმიური ექსპერიმენტებისთვის და 4 მორფოლოგიური ანალიზებისთვის. რომ შევაჯამოთ ვირთაგვების რაოდენობა: ბიოქიმიური ანალიზებისთვის ჯამში გამოყენებული იქნა 36 ვირთაგვა, ხოლო მორფოლოგიურ ექსპერიმენტში-12.

ქვეთავი 1.2. ბიოქიმიური ექსპერიმენტები. კმ-ით დამუშავებული 18 ვირთაგვა დავყავით 3 ჯგუფად, თითოეულ ჯგუფში იყო 6 ვირთაგვა. კმ-ის ადმინისტრირებიდან 6 საათის შემდეგ პირველ ჯგუფში გაერთიანებული ვირთაგვები იღებდნენ ფიზიოლოგიური ხსნარის (0.9% NaCl სტერილური ხსნარი) ინექციას (1მლ/კგ-ზე, კმ+ფიზ.ჯგუფი), მეორე ჯგუფში გაერთიანებული ვირთაგვებს დროის იმავე ინტერვალში უკეთდებოდათ მიო-ინოზიტოლი (30მგ/კგ-ზე, კმ+მიო ჯგუფი), და მესამე ჯგუფის ვირთაგვებს უკეთდებოდათ დიაზეპამი (5მგ/კგ, კმ+დიაზ ჯგუფი). დეკაპიტაციამდე აღნიშნული ნაერთების 3-ჯერადი ინექცია განხორციელდა.

საკონტროლო ჯგუფის ვირთაგვები (18 ვირთაგვა) ასევე დავყავით 3 ჯგუფად: პირველი ჯგუფის ვირთაგვებს ინტრაპერიტონიალურად უკეთდებოდათ ფიზიოლოგიური ხსნარი (1მლ/კგ, კონტ+ფიზ ჯგუფი), მეორე ჯგუფის ცხოველებს მიო-ინოზიტოლი (30მგ/კგ, კონტ+მიო ჯგუფი) და მესამე ჯგუფი ცხოველებს დიაზეპამის ინექცია (5მგ/კგ, კონტ+დიაზ ჯგუფი). აღნიშნული ექსპერიმენტის დიზაინი მოცემულია დიაგრამაზე (სურათი 3).



- ❖ ვირთაგვების დეკაპიტაცია კმ ადმინისტრირებიდან 26-28 საათის შემდეგ
- ❖ მოლეკულური და მორფოლოგიური ანალიზები

სურათი 3. 24 საათიანი ექსპერიმენტის დიზაინის დიაგრამა

ექსპერიმენტის განმავლობაში ვირთაგვები იმყოფებოდნენ სპეციალურ კამერებში ბუნებრივ დღე-ღამურ ციკლში, სადაც თავისუფლად მიეწოდებოდათ წყალი და საკვები. ვირთაგვების დეკაპიტაციას ვახდენდით კმ ადმინისტრირებიდან 26-28 საათის შემდეგ. დეკაპიტაციის შემდეგ ყველა ცხოველის თავის ტვინიდან ვახდენდით ჰიპოკამპისა და ნეოკორტექსის სწრაფ ექსტირპაციას მშრალ ყინულზე და ტვინის ქსოვილები ინახებოდა -70C-ზე დამუშავებამდე.

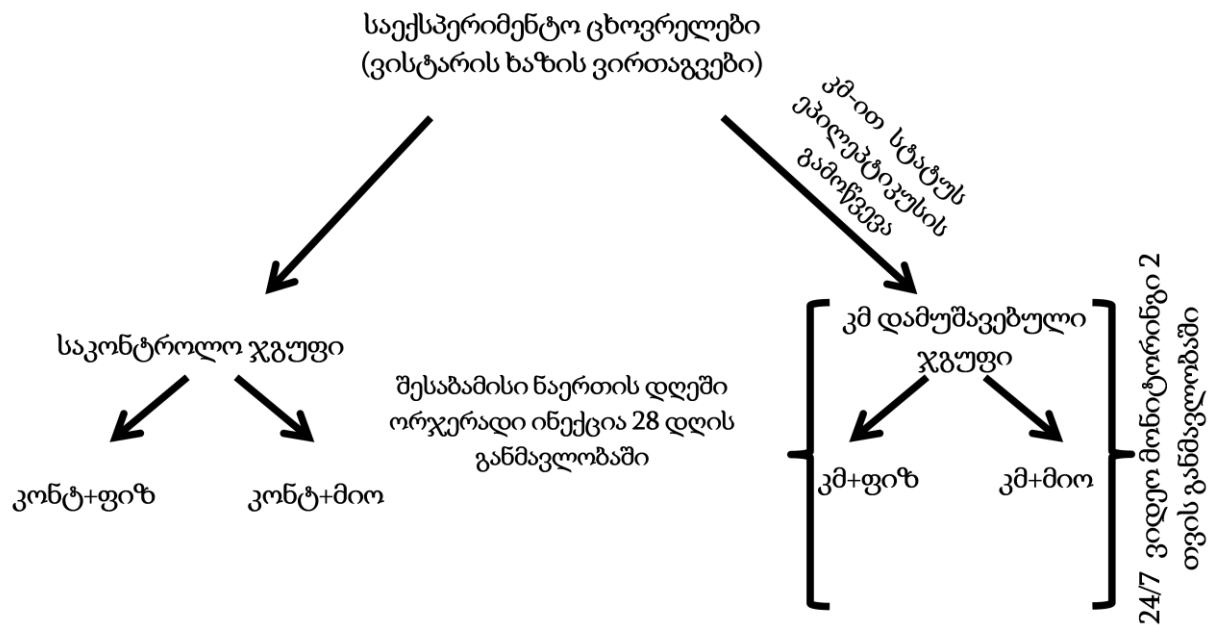
ქვეთავი 1.3. სტატუს ეპილეპტიკუსის გამოწვევა კაინის მჟავით 2 თვიან ექსპერიმენტებში.

აღნიშნული ცდებიც ჩატარებული იყო 2.5-3 თვის, ვისტარის ხაზის მამრ ვირთაგვებზე, რომლებშიც მოვახდინეთ ფიზიოლოგიურ ხსნარში გახსნილი კაინის მჟავის (10 მგ/კგ)

ინტრაპერიტონიალური ინექცია. თითოეული ცხოველი მოვათავსეთ ინდივიდუალურ პლასტმასის კამერებში 4 საათიანი დაკვირვებისთვის. აღვრიცხეთ კრუნჩხვები და კონვულსიები შევაფასეთ მოდიფიცირებული რესინის შკალის მიხედვით 0-დან 6-ამდე: (0)-არანაირი მოტორული აქტივობა; (1)-გაშეშება, უმოძრაობა, პირ-სახის მოძრაობები; (2)-თავის კანკალი ან სახის ძლიერი მიოკლონუსი, რიგიდული პოზა; (3)-ორმხრივი კიდურების კლონუსი; (4)-უკანა ფეხებზე ჯდომა და თავის კანკალი, (5)-კლონური კრუნჩხვები, პოზის დაკარგვა, გვერდზე გადავარდნა და რეფლექსური ხტომები; (6)-გენერალიზირებული ტონური შეტევები, წაქცევა, გაჭიმული მდგომარეობა (Recine 1972; Clement et al., 2003). საბოლოოდ შევარჩიეთ ცხოველები რომელთა კრუნჩხვის ხარისხი იყო 4-6 და 1 საათის განმავლობაში ხასიათდებოდნენ განმეორებადი კრუნჩხვებით.

კმ-ით დამუშავებული ვირთაგვები გავანაწილეთ ორ ჯგუფად: პირველი ჯგუფის ვირთაგვებს ინტრაპერიტონიალურად უკეთებდით ფიზიოლოგიური ხსნარის (0.9% NaCl სტერილური ხსნარი) ინექციას (1მლ/კგ-ზე, კმ+ფიზ.ჯგუფი), მეორე ჯგუფის ცხოველებს დროის იმავე ინტერვალში უკეთდებოდათ მიო-ინოზიტოლი (30მგ/კგ-ზე, კმ+მიო ჯგუფი). საექსპერიმენტო ცხოველებს კმ-ის ადმინისტრირებიდან 28 დღის განმავლობაში დღეში ორჯერ უკეთდებოდათ აღნიშნული ნაერთების 2-ჯერადი ინექცია.

საკონტროლო ჯგუფის ვირთაგვებიც დავყავით 2 ჯგუფად: პირველი ჯგუფის ვირთაგვებს ინტრაპერიტონიალურად უკეთდებოდათ ფიზიოლოგიური ხსნარი (1მლ/კგ, კონტ+ფიზ ჯგუფი), მეორე ჯგუფის ცხოველებს მიო-ინოზიტოლი (30მგ/კგ, კონტ+მიო ჯგუფი), (აღნიშნული ექსპერიმენტის დიზაინი მოცემულია დიაგრამაზე სურათი 4).



- ვირთაგვების დეკაპიტაცია ექსპერიმენტის დაწყებიდან 2 თვის შემდეგ
- ბიოქიმიური და მოლეკულურ ბიოლოგიური ანალიზები

სურათი 4. 2 თვიანი ექსპერიმენტის დიზაინის დიაგრამა

ქვეთავი 1.4. ვიდეო-მონიტორინგი. ცხოველები მოთავსებული იყვნენ ინდივიდუალურ პლასტმასის კამერებში და მიმდინარეობდა 24 საათიანი ვიდეო-მონიტორინგი, რა თქმა უნდა დღე-ღამური ციკლი დაცული იყო. ვიდეო-მონიტორინგი მიმდინარეობდა ინფრაწითელი ვიდეო რეკორდერით (HIK VISION, DS-7316HLS). კრუნჩხვების სიხშირის და ხანგრძლივობის შეფასებას ვახორციელებდით 2 თვის განმავლობაში. და აღვრიცხავდით მხოლოდ 4-6 ხარისხის მქონე კრუნჩხვებს.

ვირთაგვების დეკაპიტაცია განვახორციელეთ 2 თვის შემდეგ, ყველა ცხოველის თავის ტვინიდან ვახდენდით ჰიპოკამპისა და ნეოკორტექსის სწრაფ ექსტირპაციას მშრალ ყინულზე და ტვინის ქსოვილები ინახებოდა -70°C -ზე დამუშავებამდე. ყოველი ცხოველიდან დეკაპიტაციისას ასევე ვახდენდით სისხლის აღებას და EDTA შემცველ ტუბებში ვათავსებდით და ვინახავდით -70°C -ზე.

ქვეთავი 1.5. ელექტროფორეზი და იმუნობლოტინგი. 24 საათიანი ტვინის ქსოვილის შესაბამისი უბნების ნიმუშების ჰომოგენიზაციას ვახდენდით შემდეგი შემადგენლობის

ხსნარით: 20 მმოლი ტრის-HCl (pH=7.5), 0.32 მოლი საქაროზა, 1 მმოლი ეთილენ დიამინტეტრამმარმჟავა და 0.5 მმოლი ეთილენ გლიკოლ-ბის(2-ამინოეთილეთერ)-N,N,N',N'-ტეტრამმარმჟავა, 1 მმოლი ორთოვანდატი, 10მმოლი პიროფოსფატი, 3 მმოლი მაგნიუმის ქლორიდი, პროტეაზების ინჰიბიტორების კოქტეილი (1:400) (Sigma P8340). ჰომოგენატის 1/4 შვეინახეთ კასპაზა 3-ის აქტივობის განსაზღვრისათვის. დარჩენილი ჰომოგენატი დავაცენტრიფუგეთ 1000გ-ზე 10 წუთი, სუპერნატანტი (S1) დავაცენტრიფუგეთ 11000გ 15 წუთი, მივიღეთ ციტოპლაზმური და მემბრანული ფრაქციები. მემბრანულ ფრაქცია (P2) გავხსენით საჰომოგენიზაციო ხსნარში, დავაცენტრიფუგეთ 15000გ 20 წუთი. მივიღეთ პლაზმურ მემბრანულ-მიტოქონდრიული ფრაქცია. ყოველი მიღებული ფრაქციები დავამუშავეთ 5% SDS-ით და ნიმუშები შევინახეთ -70°C-ზე.

მიღებულ ფრაქციებში და სისხლის პლაზმაში ცილის კონცენტრაცია განვსაზღვრეთ 3 პარალელურ სინჯში მიკრო ბიქინინონის მჟავა ცილის განმსაზღვრელი ტესტ-სისტემის საშუალებით (Pierce). 30 მკგ ცილის შემცველ ტოლი მოცულობის ნიმუშებს ვყოფდით ნდს გელელექტროფორეზული მეთოდით და ვახორციელებდით დაყოფილი ცილების გადატანას ნიტროცელულოზის ფილტრზე ვესტერნ იმონუბლოტინგის საშუალებით.

ელექტროფორეზით ფრაქციონირებული პოლიპეპტიდების ვიზუალიზაცია ხდება იმუნოქიმიური შეღებვის მეთოდით. ეს უკანასკნელი ჩვეულებრივ ტარდება ფრაქციონირებული პოლიპეპტიდის გელიდან მემბრანაზე ტრანსფერის შემდეგ. გადატანის ამ მეთოდს "ბლოტინგი" ეწ. მემბრანაზე იმობილიზირებული ცილები ვედარ დიფუზირებენ და ამიტომ ისინი ხელმისაწვდომები არიან სხვადასხვა რეაგენტებისთვის, ან მაღალი მოლეკულური წონის ლიგანდებისთვის, როგორცაა ანტისხეულები.

ნდს-ელექტროფორეზისა და ვესტერნ ბლოტინგის შემდეგ ნიტროცელულოზის ფილტრებზე ცილის გადატანის ეფექტურობა და მათი თანაბარი გადატანა Ponceau S ხსნარით შეღებვის საშუალებით მოწმდებოდა. შემდეგ ფილტრებს ვრეცხავდით ჯერ დისტილირებული წყლით, ხოლო ბოლოს კალიუმ- ფოსფატური ბუფერით, რომელიც 0,1 % ტვინ-20-ს შეიცავდა. გამორეცხვის შემდეგ ფილტრის დაუკავშირებელი საიტების

ბლოკირებას ალბუმინის 3%-იან ხსნარში ინკუბაციით ვახორციელებდით. ფილტრები მუშავდებოდა სტანდარტული იმუნოქიმიური პროცედურებით.

თავდაპირველად ფილტრი მუშავდებოდა პირველადი ანტისხეულებით: ჩვენს ექსპერიმენტებში გამოყენებული იქნა შემდეგი ცილების შესაბამისი პირველადი ანტისხეულები: ვდაა-1-(Abcam, ab15895); ვდაა-2-(Abcam, ab37985); კოფილინი- (Abcam, ab 42824); ცოს-1 (CO-I; Molecular Probes, A6403), მძჯ ცილა 1- (2 თვიანი ექსპერიმენტის სისხლის პლაზმის ნიმუშებისთვის (Abcam, ab18256)).

დაკავშირებული ანტისხეულების მოცილების მიზნით ნიტროცელულოზის ფილტრებს ვრეცხავდით 5-ჯერ კალიუმ -ფოსფატური ბუფერით, რომელიც შეიცავდა 0.1 % ტვინ-20-ს და შემდეგ ვიყენებდით პეროქსიდაზათი მონიშნულ შებამის მეორად ანტისხეულებს, რასაც კვლავ იგივე რეცხვის სტადია მოყვებოდა.

პეროქსიდაზათი მონიშნული ანტისხეულების შემცველი ფილტრები super Signal West pico ქემინოლუმინესცენციური სუბსტრატით მჟღავნდებოდა (Pierce). ფილტრები საინტესიფიკაციო ეკრანზე სპეციალურ ფირებთან ერთად თავსდებოდა, რომლებიც პასუხის ზუსტი რაოდენობრივი ანალიზისათვის წინასწარ განიცდიდნენ ძლიერ მოკლევადიან დასხვივებას ხელსაწყოთი "Sensitise" (Amersham).

პროგრამა LabWorks 4.0(UVP)-ის საშუალებით იზომებოდა შესაბამისი ცილების ხაზების ოპტიკური სიმკვრივები.

ქვეთავი 1.6. კასპაზა-3-ის აქტივობის განსაზღვრა. კასპაზა 3-ის აქტივობა განისაზღვრა ჰომოგენატის ფრაქციაში სპექტროფოტომეტრიული კიტის საშუალებით (SigmaAldrich, Cat. CASP-3-C) რომელიც უზრუნველყოფს კასპაზა 3-ის აქტიურობის სწრაფ და ეფექტურ დეტექციას.

კასპაზა 3 კოლომეტრიული გაზომვა დაფუძნებულია: აცეტილ-ასპ-გლუ-ვალ-ასპ პ-ნიტროანილიდ პეპტიდის კასპაზა 3-ის საშუალებით ჰიდროლიზზე. რაც იწვევს პ-ნიტროანილინის გამონთავისუფლებას. პ-ნიტროანილინს გააჩნია მაღალი შთანთქმის უნარი 405ნმ-ზე. პ-ნიტროანილინის რაოდენობის განსაზღვრა განვახორციელეთ შესაბამისი საკალიბრო მრუდის საშუალებით.

სხვადასხვა ჯგუფის ჰომოგენატური ფრაქციის ცილის რაოდენობა გავზომეთ პარალელურ სინჯში მიკრო ბიქინინონის მჟავა ცილის განსაზღვრელი ტესტ-სისტემის საშუალებით (Pierce) და დავიტანეთ თანაბარი კონცენტრაციის ფარგლებში (10-13 მიკროგრამი). ფერმენტული აქტივობის საბოლოო განსაზღვრისათვის რა თქმა უნდა ხდებოდა გადათვლა ცილის ზუსტ რაოდენობაზე.

96 ველიანი ფირფიტაზე ნიმუშები დავიტანეთ შემდეგი თანმიმდევრობით: 1. თითოეულ ველში შესაბამისი ნიმუში და კასპაზა 3-ის პოზიტიური კონტროლი, რომელიც განსაზღვრავს კიტის კომპონენტების მუშაობას. 2. კასპაზა 3-ის პოზიტიური კონტროლი მზადდება შემდეგნაირად: უშუალოდ გამოყენების წინ 5მკგ /მლ განვაზავეთ 20-ჯერ, ცდის ბუფერში, რომელიც შეიცავს ალბუმინს 1მგ/მლ. 3. შემდეგ ფირფიტაზე დაგვაქვს ერთჯერადი ცდის ბუფერი. 4. ყოველი ნიმუში იყო პარალელურ სინჯებში, რომელიც შეიცავდა ასევე კასპაზა-3-ის ინჰიბიტორს და ნიმუშების მაჩვენებლს შემდეგ ვაკლებდით ინჰიბიტორიანი ნიმუშების მონაცემებს. 4. ბოლოს დაგვქონდა კასპაზა 3-ის სუბსტრატი, ინკუბაცია 37°C-ზე 1 სთ და 30 წთ. შემდეგ წაკითხვა 405ნმ-ზე ელაიზა წამკითხველის საშუალებით.

ქვეთავი 1.7. უჯრედების დათვლა. მორფოლოგიური ექსპერიმენტებისათვის გამოყენებული იქნა კმ-ით დამუშავებული 12 ვირთაგვა, რომელიც გავანაწილეთ ორ ჯგუფად: კმ+ფიზ და კმ+მიო, რომელიც ზემოთ დაწვრილებით აღვწერეთ. ასევე საკონტროლო ჯგუფი ცხოველებიც. თითოეულ ჯგუფში იყო 4-4 ცხოველი. აღნიშნული ცხოველების ანესთეზიას ვაკეთებდით კეტამინით (100მგ/კგ), ანესთეზირებული ცხოველების პერფუზია 4% პარაფორმალდეჰიდში. ფიქსაციის ხსნარში აღნიშნული ტვინის ქსოვილები ჯერ 4°C-ზე ინახებოდა 24 საათის განმავლობაში, შემდეგ კი 30% საქაროზას ხსნარში. ნისლის შეღებვისთვის ტვინის ქსოვილების დაჭრა განხორციელდა კრიოსტატით (Microm HM 500 M) დაახლოებით 15μm ზომით. ყოველი მე-6 სექცია შეგროვდა და დაფიქსირდა პოლი-ლ-ლიზინის შემცველ მინის სლაიდებზე. აღნიშნული სლაიდები დავტოვეთ გასაშრობად და შემდეგ რეჰიდრირება ჯერ 100% სპირტით, შემდეგ 95%-იანით და დისტილირებული წყლით, ბოლოს 0.1% Cresyl violet (Sigma-Aldrich, Cat.number C504) ხსნარში მოვათავსეთ. უჯრედები დათვლილი იქნა

სინათლის მიკროსკოპის საშუალებით (Leica DM LB). დავითვალეთ ჰიპოკამპის CA1, CA3 ველში და დაკბილული ფასციაში უჯრედების რაოდენობა (უჯრედების რაოდენობა დათვლილია $(250 \times 250 \mu\text{m}^2)$ ფართობზე).

ქვეთავი 1.8. რნმ-ის გამოყოფა. რნმ გამოვყავით ტვინის ქსოვილებიდან miRNeasy Mini Kit (Qiagen, 217004) საშუალებით. აღნიშნული კიტით გამოყოფილი იქნა მთლიანი რნმ, რომელიც შეიცავდა როგორც რნმ-ს ასევე მიკრო-რნმსაც. რნმ-ების კონცენტრაცია გაზომილი იქნა ნანოდროფის საშუალებით, 280/260 ტალღის სიგრძეზე.

ქვეთავი 1.9. მი-რნმ-ების პროფილირება. მი-რნმ-ების პროფილირების ექსპერიმენტები ჩატარებული იყო ვირთაგვების სამი ჯგუფის ჰიპოკამპებზე. კონ+ფიზ, კმ+ფიზ და კმ+მიო. მი-რნმ-ების პროფილირება ჩატარებული იყო კომპანიაში „LC Sciences“. გამოყენებული იყო 1 მკგ ჯამური რნმ-ის ფრაქცია. რნმ-ის ნიმუშებს 3'-ბოლოზე ემატებოდა პოლი-ა კუდი პოლი(ა)-პოლიმერაზას საშუალებით. ფლუორესცენტული საღებავით მონიშვნისათვის პოლი(ა)-კუდს შემდეგში ემატებოდა სპეციალური ოლიგონუკლეოტიდი. ჰიბრიდიზაცია ტარდებოდა მთელი ღამის განმავლობაში $\mu\text{Paraflo}$ მიკროფლუიდურ ჩიპებზე მიკროცირკულაციური ტუმბოს გამოყენებით. მიკროფლუიდურ ჩიპებზე თვითოეული ნიმუში შედგებოდა ქიმიურად მოდიფიცირებული ნუკლეოტიდური მაკოდირებელი სეგმენტისაგან, რომელიც კომპლემენტარული იყო სამიზნე მი-რნმ-ის 991 წარმომადგენლისათვის (იხ. miRBase version 21, <http://mirbase.org>) და ასევე პოლიეთილენგლიკოლის სპეისერული სეგმენტისაგან (მაკოდირებელი სეგმენტის სპეისერისაგან მოშორებისათვის). თითოეული ნიმუში სამ-სამ პარალელში იზომებოდა. ჰიბრიდიზაციის ღაობის ტემპერატურა ბალანსდებოდა სადექტაციო ნიმუშების ქიმიური მოდიფიკაციით. ჰიბრიდიზაციის დროს გამოყენებული იყო 100 მკლ შემდეგი ბუფერი: 0.90 M NaCl, 60 mM Na_2HPO_4 , 6 mM EDTA, pH 6.8 (6xSSPE) რომელიც შეიცავდა 25% ფორმამიდს და მიმდინარეობდა 34°C -ზე. რნმ-ის ჰიბრიდიზაციის შემდეგ ზონდ-კონიუგირებული Cy3 საღებავი ცირკულირებდა მიკროფლუიდურ ჩიპზე. ფლუორესცენციის გაზომვისათვის ვიყენებდით ლაზერულ სკანერს (GenePix 4000B, Molecular Device) და გამოსახულების დიგიტალიზაციისათვის პროგრამას -Array-Pro image analysis software (Media

Cybernetics). მონაცემთა ანალიზისათვის მიღებულ შედეგებს ჯერ ვაკლებდით ფონს და შემდეგ ნორმალიზებისათვის ვიყენებდით LOWESS (Locally-weighted Regression) ფილტრს.

ქვეთავი 1.10. მიკრო-რნმ-ის გაზომვა. შერჩეული მიკრო-რნმ-ის 6216 რაოდენობა იზომებოდა ვირთაგვების 4 ჯგუფში: კონ+ფიზ, კონ+მიო, კმ+ფიზ და კმ+მიო. ჰიპოკამპიდან და ნეოკორტექსიდან მიღებული რნმ-ის ფრაქციები განიცდიდნენ უკუტრანსკრიფციას ტაქმანის მიკრო-რნმ უკუტრანსკრიპტაზული კიტიტ (Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit Thermo Fisher Scientific 4366596). მი-რნმ 6216-ის რაოდენობა იზომებოდა ტაქმანის კიტიტ (Assay ID-471281_mat, Thermo Fisher Scientific) და ვიყენებდით Step One Real-Time PCR ხელსაწყოს (Applied Biosystems). გასაზომი მიკრო-რნმ-ის რაოდენობის ნორმალიზებას ვახორციელებდით შემდეგი 2 მიკრო-რნმ-ის რაოდენობაზე: მიკრო-რნმ-23b-3p (Assay ID 245306_mat, Thermo Fisher Scientific) და მიკრო-რნმ miR-361-5p (Assay ID 000554, Thermo Fisher Scientific). მოურავი მიკრო-რნმ-ების შერჩევა განხილულია თავში „შედეგები“. შედარებითი CT ($\Delta\Delta CT$) მეთოდი იყო გამოყენებული სამიზმე მი-რნმ-ის ფარდობითი რაოდენობების განსაზღვრისათვის საკვლევ ნიმუშებში. ჰიპოკამპური რნმ-ის ერთიდაიგივე ფრაქცია, რომელიც გამოყოფილი იყო არა-საექსპერიმენტო ნიმუშებისაგან გამოიყენებოდა როგორც რეფერენსი. ყოველი რეაქცია სამ-სამი პარალელით ტარდებოდა.

ქვეთავი 1.11. ნმიტ და მრაა სუბერთეულის მ-რნმ-ის გაზომვა. ჰიპოკამპიდან და ნეოკორტექსიდან გამოყოფილ ჯამური რნმ-ის ფრაქცია გამოიყენებოდა კომპლემენტარული დნმ-ის მისაღებად. ვიყენებდით RETRO სკრიპტ უკუტრანსკრიფციის კიტს რეალური დროის პოლიმერაზულ ჯაჭვური რეაქციისათვის (Thermo Fisher Scientific AM 1710). ნმიტ და მრაა სუბერთეულის-ს კომპლემენტარული დნმ-ის ასლების რიცხვი იზომებოდა SYBR მწვანე ფლუორესცენტული საღებავის და Step One Real-Time PCR ხელსაწყოს (Applied Biosystems) საშუალებით. ნორმალიზება ხორციელდებოდა ბეტა-აქტინის ექსპრესიაზე. გამოიყენებოდა შემდეგი პრაიმერები

1. LRRC8A: Forward primer - GCACCAACAGCCAACACAAAG ,

Reverse primer - GGAGTCGTTGCAGGAGTCTT

2. SMIT: Forward primer TGG TGA CGA AGG AGA GTT GC

Reverse primer - AGG TTG GAG CCC CTT AAT GC

3. β -actin: Forward primer 5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGG-3'

Reverse primer 5'-CTCCGGAGTCCATCACAATG-3

თავი 2. სტატისტიკური ანალიზი.

ქვეთავი 2.1. 24 საათიანი ექსპერიმენტები:

კრუნჩხვების ხარისხისა და ხანგრძლივობის შედარება. ბიოქიმიურ და მორფოლოგიურ ექსპერიმენტებში გამოყენებული სხვადასხვა ჯგუფის ვირთაგვების (კაინის მჟავით დამუშავებული ვირთაგვების სამი ჯგუფი ბიოქიმიურ ექსპერიმენტებში და ორი ჯგუფი მორფოლოგიურ ექსპერიმენტებში) კრუნჩხვის სიძლიერის შედარებას ვახორციელებდით მან-უიტნის ტესტის მიხედვით. ვირთაგვების იგივე ჯგუფებში კრუნჩხვების ჯამური ხანგრძლივობის შედარებას ვახორციელებდით სტუდენტის t ტესტის საშუალებით.

ქვეთავი 2.2. ცილების რაოდენობრივი ცვლილებების და კასპაზა-3 აქტივობის ცვლილებების შედარება.

24 საათიან ექსპერიმენტებში თვითოეული ცილის რაოდენობრივი ცვლილებების შესასწავლად გამოყენებული იქნა ორფაქტორიანი ცვლადთა ანალიზი (ANOVA), ფაქტორები: ექსპერიმენტული დამუშავების (კონ+ფიზ, კონტ+მიო, კონტ+დიაზ, კმ+ფიზ, კმ+მიო და კმ+დიაზ) და ტვინის უბნის მიხედვით (ჰიპოკამპი და ნეიკორტექსი).

ქვეთავი 2.3. უჯრედების დათვლა. მონაცემები უჯრედების რაოდენობის შესახებ ასევე გაანალიზებული იყო 2-ფაქტორიანი ცვლადთა ანალიზით შემდეგი ფაქტორებით: ექსპერიმენტული დამუშავების (კონ+ფიზ, კმ+ფიზ და კმ+მი) და ჰიპოკამპის ველები

(CA1, CA3 და დაკბილული ფასცია). დაგეგმილი შედარებები ჩატარებული იქნა ამ ჯგუფებს შორის და ჰიპოკამპის განსაზღვრულ ველზე (მაგ. CA1).

ქვეთავი 2.4. 2 თვიანი ექსპერიმენტები. ქცევითი ექსპერიმენტები. 2 თვიან ექსპერიმენტებში ქცევითი დაკვირვებების შედეგების ანალიზი განავახორციელეთ ერთფაქტორიან ცვლადთა ანალიზით (ANOVA). ფაქტორს წარმოადგენდა-ექსპერიმენტული დამუშავება (კმ+ფიზ, კმ+მიო). ანალიზის დროს 2 თვიანი ექსპერიმენტი დაყოფილი იყო კვირებად, მონაცემები დათვლილი და გაანალიზებული იყო როგორც 8 კვირის განმავლობაში ასევე პირველი 4 კვირისა და მომდევნო 5-8 კვირის განმავლობაში. სადაც სტატისტიკურად სარწმუნოდ განსხვავება იყო ერთფაქტორიან ცვლადთა ანალიზით, საბოლოო დადასტურებისთვის ჯგუფებს შორის შედარება განხორციელდა ორკუდიანი t ტესტის საშუალებითაც.

ქვეთავი 2.5. ცილის, მ-რნმ-ისა და მიკრო-რნმ-ის რაოდენობრივი ცვლილებების შესწავლა. მიკრო-რნმ-6216, ნმიტ და მრაა მრნმ-ები-ის ცვლილებები შევისწავლეთ ერთფაქტორიან ცვლადთა ანალიზით (ANOVA). ფაქტორს წარმოადგენდა-ექსპერიმენტული დამუშავება (კონტ+ფიზ, კონტ+მიო, კმ+ფიზ და კმ+მიო). აღნიშნულ სერიაში გამოყენებული იყო 36 ცხოველი (თითოეულ ჯგუფში იყო 9 ვირთაგვა).

მძჯ ცილა 1-ის რაოდენობრივი ცვლილებების შესწავლაც ერთფაქტორიან ცვლადთა ანალიზით (ANOVA) განავახორციელეთ, ფაქტორი-ექსპერიმენტული დამუშავება (კონტ+ფიზ, კონტ+მიო, კმ+ფიზ და კმ+მიო). ამ შემთხვევაში თითოეულ ჯგუფში იყო 5-5 ცხოველი. ყველა ზემოთ ჩამოთვლილ ჯგუფებს შორის შედარებისთვის გამოყენებული იქნა ორკუდიანი t ტესტი.

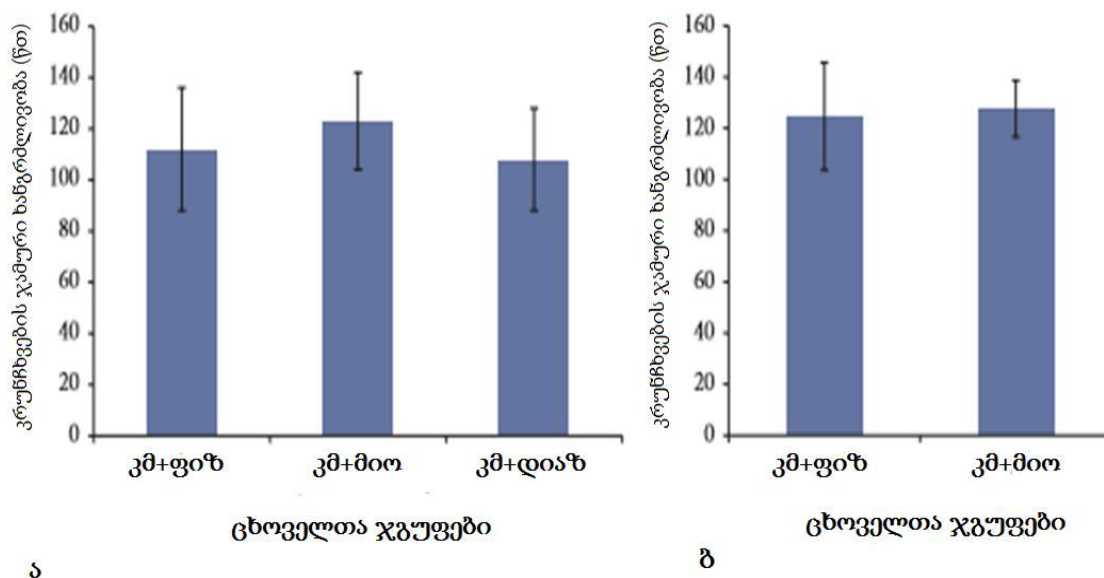
2.5. მიღებული შედეგები

თავი 1. ცვლილებები ეპილეფსიური მდგომარეობის გამოწვევიდან 24 საათის შემდეგ

ქვეთავი 1.1. კრუნჩხვების ხარისხი და ხანგრძლივობა. ბიოქიმიურ ექსპერიმენტებში გამოყენებული კაინის მჟავით დამუშავებულ ვირთაგვების სამი ჯგუფი ერთმანეთთან შევადარეთ კრუნჩხვების ხარისხის მიხედვით და მათ შორის სხვაობა სტატისტიკურად არასარწმუნო იყო (მან-უიტნის ტესტი- კმ+ფიზ და კმ+მიო $W=39.0$, $p=1.0$; კმ+ფიზ და კმ+დიაზ $W=42.0$, $p=0.64$; და კმ+მიო და კმ+დიაზ $W=42.0$, $p=0.64$). მედიანა კმ+ფიზ და კმ+მიო ჯგუფისათვის არის 5.0 და კმ+დიაზ ჯგუფისათვის 4.5.

მორფოლოგიური ექსპერიმენტებში გამოყენებული იქნა 2 ჯგუფი, თითოეულ ჯგუფში იყო 4 ცხოველი, ამ ჯგუფებს შორის კრუნჩხვების ხარისხის მიხედვით ასევე არ იყო სარწმუნო განსხვავება (მან-უიტნის ტესტი-კმ+ფიზ და კმ+მიო $W=16.0$, $p=0.61$). მედიანა კმ+ფიზ იყო 4.5 და კმ+მიო 5.0.

კრუნჩხვების ხანგრძლივობის მიხედვით ბიოქიმიურ და მორფოლოგიურ ექსპერიმენტებში გამოყენებული სხვადასხვა ჯგუფის ვირთაგვები სარწმუნოდ არ განსხვავდებოდნენ ერთმანეთისაგან (სურათი 5).

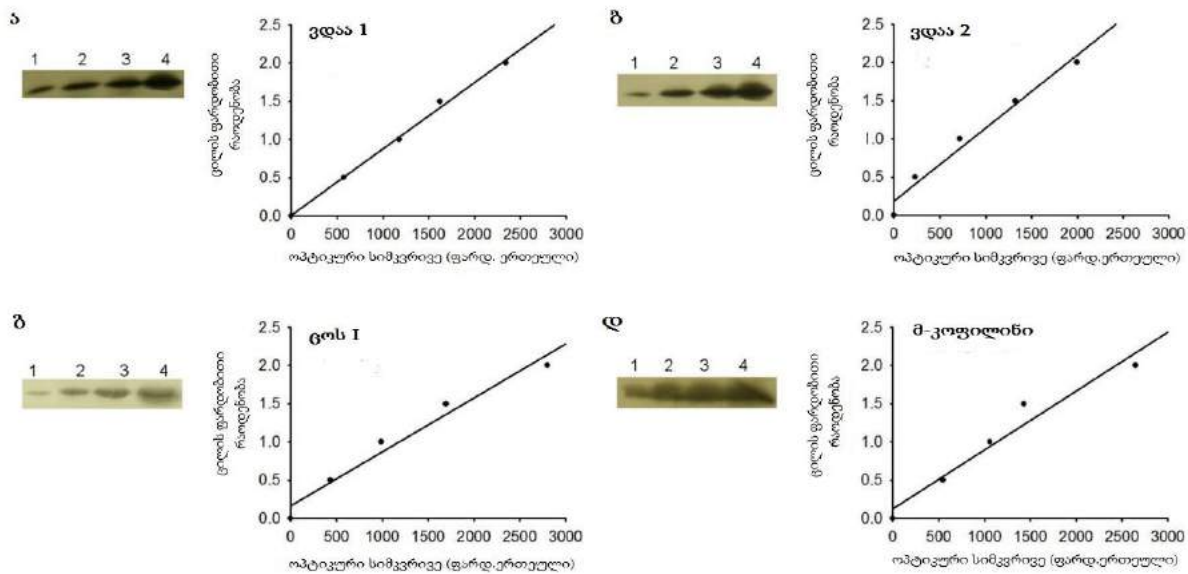


სურათი 5. კრუნჩხვების ჯამური ხანგრძლივობა (წთ) სხვადასხვა ჯგუფის ცხოველებში. თითოეული ბარი შეესაბამება თითო ჯგუფს. ა სურათზე წარმოდგენილია ცხოველთა ჯგუფები, რომლებიც გამოყენებულ იქნა ბიოქიმიურ ექსპერიმენტებში; ბ სურათზე - ცხოველთა ჯგუფები, რომლებიც გამოვიყენეთ მორფოლოგიურ ექსპერიმენტებში. ჯგუფებს შორის შედარება განხორციელდა t ტესტის საშუალებით, სტატისტიკურად სარწმუნო ცვლილებებს ადგილი არ ჰქონია ($p > 0.6$ თითოეული შედარებისთვის).

კმ მჟავის ინექციიდან დაახლოებით 4.5 საათის შემდეგ თითოეულ ჯგუფის ცხოველებზე ხორციელდებოდა ვიდეო მონიტორინგი ინფრაწითელი კამერების საშუალებით დეკაპიტაციამდე.

ქვეთავი 1.2. იმუნობლოტინგი. ანტისხეულები ვდაა-1-ის წინააღმდეგ მოქმედებენ 30 კდა მოლეკულური წონის მქონე ცილოვან მოლეკულასთან. ვდაა-2-ის წინააღმდეგ 31 კდა მოლეკულური წონის მქონე ცილოვან მოლეკულასთან, ციტოქრომ c ოქსიდაზას I სუბერთეულის (ცოს-1) წინააღმდეგ 57 კდა-ის და კოფილინის წინააღმდეგ 17 კდა მოლეკულური წონის მქონე ცილოვან მოლეკულასთან. აუტორადიოგრამების სტანდარტიზაციისათვის გამოიყენებოდა 4 სტანდარტი (15, 30, 45 და 60 მკგ ცილის ოდენობით). სტანდარტების ოპტიკური სიმკვრივე სწორხაზოვან სარწმუნო

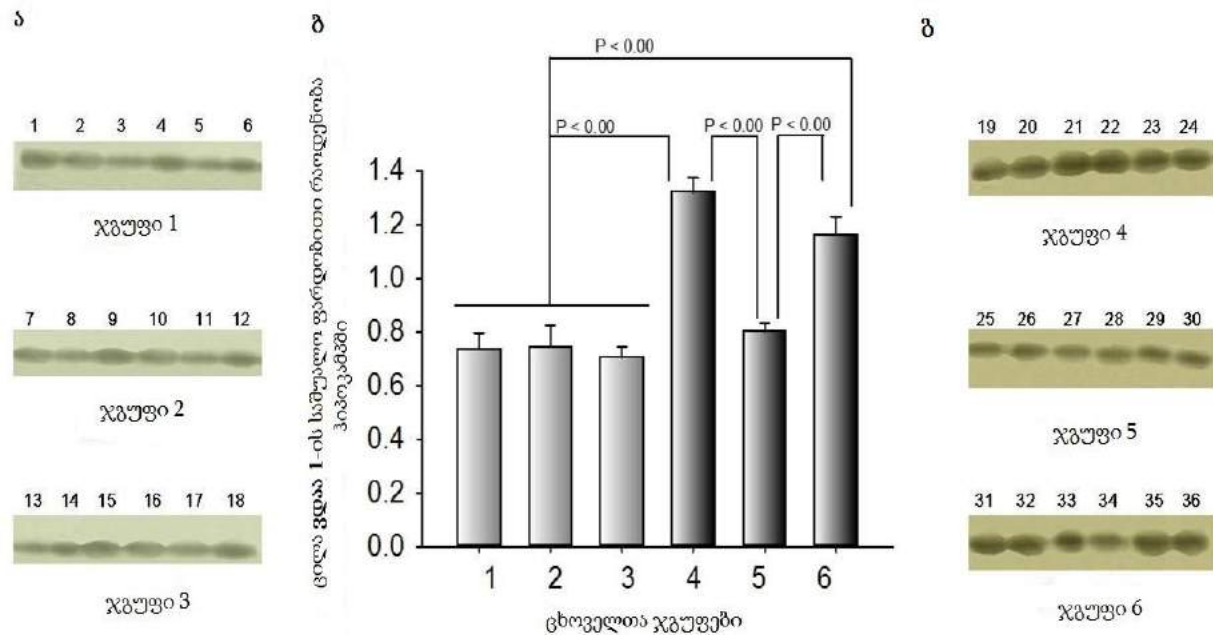
დამოკიდებულებაშია იმუნოშეღებილი ხაზების (ვდაა-1, ვდაა-2, ცოს 1 და მ-კოფილინი) რაოდენობასთან (იხ. სურ. 6).



სურათი 6. შინაგანი სტანდარტების ტიპური ავტორადიოგრაფიის სურათები და შესაბამისი საკალიბრო მრუდები (ა) ვდაა-1; (ბ) ვდაა-2; (გ) ცოს-I და (დ) მ-კოფილინი; სურათზე ნაჩვენებია რომ, სტანდარტების ოპტიკური სიმკვრივე სწორხაზოვან სარწმუნო დამოკიდებულებაშია იმუნოშეღებილი ხაზების (ვდაა-1, ვდაა-2, ცოს-I და მ-კოფილინი) რაოდენობასთან.

ვდაა 1. ორ ფაქტორიანი ცვლადთა ანალიზით, ვდაა1-ის რაოდენობის ცვლილებები ექსპერიმენტული დამუშავების ფაქტორის მიხედვით სარწმუნო იყო ($F_{5.71}=5.42$; $p < 0.0001$). ტვინის უბნის ფაქტორის მიხედვით სხვაობა სარწმუნო არ იყო, თუმცა ამ ორ ფაქტორს შორის ურთიერთქმედება იყო სარწმუნო ($F_{5.71}=7.75$; $p < 0.0001$). სხვადასხვა ჯგუფის ცხოველებს შორის სარწმუნო განსხვავებები ნანახი იქნა მხოლოდ ჰიპოკამპში. ვდაა 1-ის საშუალო რაოდენობა კმ+ფიზ ჯგუფში იყო სტატისტიკურად სარწმუნოდ უფრო მაღალი არის საკონტროლო ჯგუფებთან შედარებით (კმ+ფიზ კონტ+ფიზ ჯგუფების შედარება $t=7.24$, $p<0.0001$; კმ+ფიზ კონტ+მიო ჯგუფების შედარება $t=5.95$, $p<0.0001$; და კმ+ფიზ კონტ+დიაზ ჯგუფების შედარება $t=9.40$, $p<0.0001$; $tb=10$) და ასევე სტატისტიკურად სარწმუნოდ მაღალი კმ+მიო ჯგუფთან შედარებით ($t=8.47$, $p<0.0001$; $tb=10$). კმ+დიაზ ჯგუფი არ განსხვავდებოდა კმ+ფიზ ჯგუფისაგან და ვდაა 1-ის

საშუალო რაოდენობა სარწმუნოდ მაღალი იყო საკონტროლო ჯგუფებთან შედარებით (კმ+დიაზ კონტ+ფიზ ჯგუფების შედარება $t=4.59$, $p<0.001$; კმ+დიაზ და კონტ+მიო ჯგუფების შედარება $t=3.90$, $p<0.003$; და კმ+დიაზ და კონტ+დიაზ ჯგუფების შედარება $t=5.71$, $p<0.0001$; ყველა შედარებისათვის $tb=10$) და ასევე სტატისტიკურად სარწმუნოდ მაღალი კმ+მიო ჯგუფთან შედარებით ($t=4.71$, $p<0.001$; $tb=10$). ვდაა 1-ის საშუალო რაოდენობა კმ+მიო და საკონტროლო ჯგუფებს შორის სტატისტიკურად სარწმუნოდ არ განსხვავდებოდა. ამრიგად კმ იწვევს ვდაა 1-ის რაოდენობის ზრდას, მიო-ინოზიტოლი ამცირებს ამ ზრდას, ხოლო დიაზეპამი არ განსხვავდება კმ ჯგუფისაგან. ნეოკორტექსში არანაირ სარწმუნო სტატისტიკურ ცვლილებებს ადგილი არ ჰქონია (იხ. სურ.7).



სურათი 7. ა, გ ვესტერნიმუნობლოტინგის აუტორადიოგრაფიის სურათი, მიტოქონდრიალურ-მემბრანული ვდაა-1-ისათვის, ბ ვდაა-1-ის საშუალო ფარდობითი რაოდენობები ვირთაგვების ჰიპოკამპის 6 სხვადასხვა ჯგუფში. ა, გ-სურათზე თითოეული ხაზი შეესაბამება თითო ნიმუშს. 1-6 ხაზები შეესაბამება კონტ+ფიზ ცხოველთა ჯგუფს; 7-12 ხაზები კონტ+მიო ჯგუფს; 13-18 კონტ+დიაზ; 19-24 კმ+ფიზ; 25-30 კმ+მიო და 31-36 ხაზები კმ+დიაზ ჯგუფს. ბ. კმ+ფიზ და კმ+დიაზ ჯგუფები

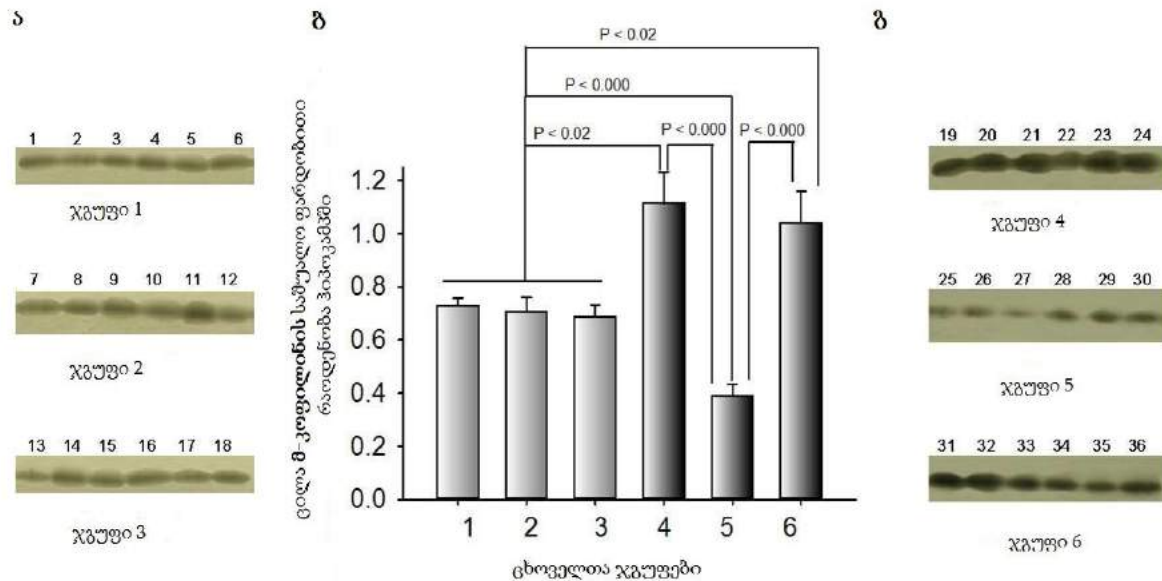
სტატისტიკურად სარწმუნოდ განსხვავდება საკონტროლო ჯგუფებისაგან და ასევე კმ+მით ჯგუფისგან ($p < 0.000$). ვადა 1-ის საშუალო ფარდობითი რაოდენობა სტატისტიკურად სარწმუნოდ არ განსხვავდებოდა კმ+მით-სა და საკონტროლო ჯგუფებში და საკონტროლო ჯგუფების საშუალო რაოდენობა ყველა სხვა დანარჩენი ჯგუფისაგან სტატისტიკურად სარწმუნოდ განსხვავდებოდა. ცხოველთა ჯგუფები: 1 ჯგუფი -კონტ+ფიზ; 2 ჯგუფი -კონტ+მით; 3 ჯგუფი -კონტ+დიაზ; 4 ჯგუფი - კმ+ფიზ; 5 ჯგუფი -კმ+მით და 6 ჯგუფი - კმ+დიაზ

ვადა 2. ორ ფაქტორიანი ცვლადთა ანალიზით არცერთი ფაქტორის მიხედვით სარწმუნო ეფექტი არ შეიმჩნეოდა. ასევე ჯგუფებს შორის სხვაობა სტატისტიკურად სარწმუნო არ იყო.

ციტოქრომ ოქსიდაზას I სუბერთეული (ცოს-1). ექსპერიმენტული დამუშავების და ტვინის უბნის ფაქტორების მიხედვით აღნიშნული ცილის რაოდენობა სტატისტიკურად სარწმუნოდ არ იცვლებოდა ჯგუფებს შორის.

მ-კოფილინი. მ-კოფილინის ცვლილებები ორივე ფაქტორის (ექსპერიმენტული დამუშავება და ტვინის უბანი) მიხედვით სტატისტიკურად სარწმუნო იყო ($F_{5,71}=4.84$; $p < 0.001$ და $F_{1,71}=25.06$; $p < 0.0001$) და ფაქტორებს შორის ურთიერთქმედებაც სარწმუნო იყო ($F_{5,71}=4.80$; $p < 0.001$). აღნიშნული ეფექტი ნანახი იქნა მხოლოდ ჰიპოკამპში. მ-კოფილინის საშუალო რაოდენობა კმ+ფიზ ჯგუფის ცხოველებში სტატისტიკურად სარწმუნოდ მაღალი იყო ყველა სხვა ჯგუფთან შედარებით (კმ+ფიზ კონტ+ფიზ ჯგუფების შედარება $t=3.02$ $p=0.013$; კმ+ფიზ კონტ+მით ჯგუფების შედარება $t=3.00$, $p=0.013$; კმ+ფიზ კონტ+დიაზ ჯგუფების შედარება $t=3.24$, $p=0.009$ და კმ+ფიზ კმ+მით ჯგუფების შედარება $t=5.49$, $p < 0.0001$; ყველა შედარებისათვის $tb=10$) და არ განსხვავდებოდა კმ+დიაზ ჯგუფისაგან, მაგრამ კმ+დიაზ ჯგუფი სხვა ჯგუფებისაგან სტატისტიკურად სარწმუნოდ განსხვავდებოდა (კმ+დიაზ კონტ+ფიზ ჯგუფების შედარება $t=2.63$, $p=0.025$; კმ+დიაზ კონტ+მით ჯგუფების შედარება $t=2.62$, $p=0.026$; კმ+დიაზ კონტ+დიაზ ჯგუფების შედარება $t=2.86$, $p=0.017$ და კმ+დიაზ კმ+მით ჯგუფების შედარება $t=5.25$, $p < 0.0001$; ყველა შედარებისათვის $tb=10$). მით-ის შეყვანა კმ მჟავით დამუშავებული ჯგუფის ცხოველებში მ-კოფილინის გაზრდილ რაოდენობას ამცირებდა

და ასევე დაბალი იყო ვიდრე საკონტროლო ჯგუფებში (კმ+მიო კონტ+ფიზ ჯგუფების შედარება, $t=6.08$, $p<0.0001$; კმ+მიო კონტ+მიო ჯგუფების შედარება $t=4.36$, $p=0.001$; და კმ+მიო კონტ+დიაზ ჯგუფების შედარება $t=4.69$, $p=0.001$; ყველა შედარებისათვის $t_{(10)}$ (სურათი 8). ნეოკორტექსში სტატისტიკურად სარწმუნო ცვლილებებს ადგილი არ ჰქონია.

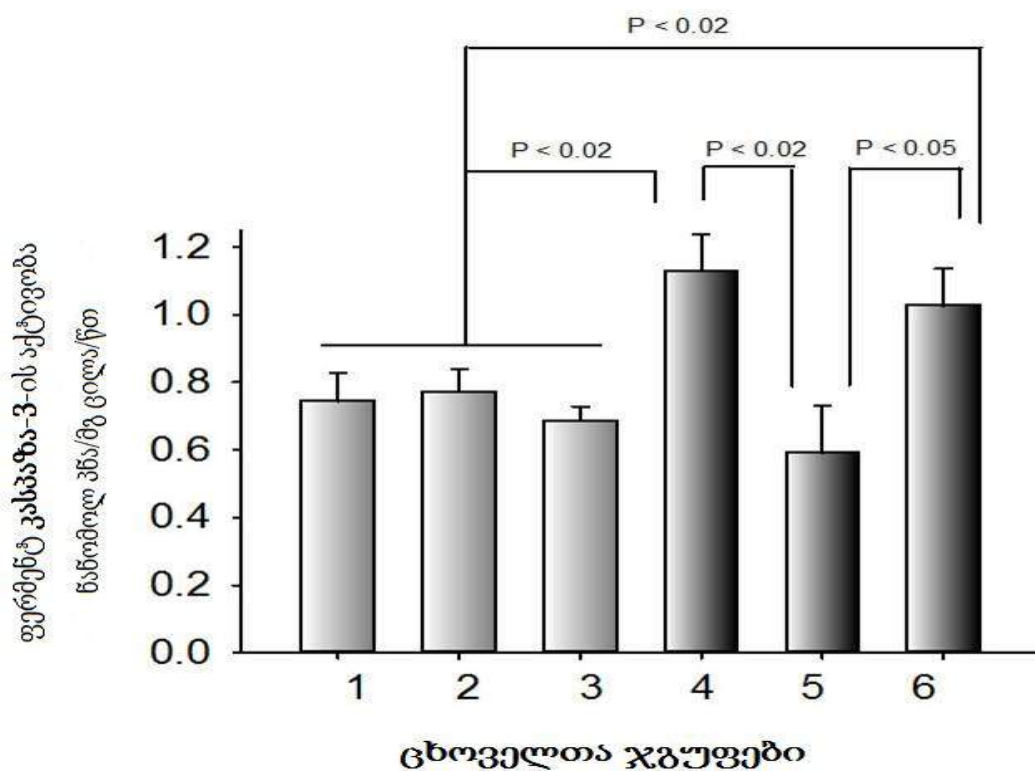


სურათი 8. მიტოქონდრიულ-მემბრანული მ-კოფილინის ვესტერნ იმუნობლოტინგის აუტორადიოგრაფიის სურათი (ა,გ), და ბ- მ-კოფილინის საშუალო ფარდობითი რაოდენობა ჰიპოკამპში 6 სხვადასხვა ჯგუფის ცხოველებში. ა,გ-სურათზე თითოეული ხაზი შეესაბამება თითო ნიმუშს. 1-6 ხაზები შეესაბამება კონტ+ფიზ ცხოველთა ჯგუფს; 7-12 ხაზები კონტ+მიო ჯგუფს; 13-18 კონტ+დიაზ; 19-24 კმ+ფიზ; 25-30 კმ+მიო და 31-36 ხაზები კმ+დიაზ ჯგუფს. ბ სურათზე თითოეული ბარი წარმოადგენს თითო ჯგუფს, კმ+ფიზ და კმ+დიაზ ჯგუფები სტატისტიკურად სარწმუნოდ განსხვავდება საკონტროლო ჯგუფებისაგან ($p<0.000$) და ასევე კმ+მიო ჯგუფისგან ($p<0.000$). მ-კოფილინის საშუალო ფარდობითი რაოდენობა კმ+მიო ჯგუფში სტატისტიკურად სარწმუნოდ დაბალია საკონტროლო ჯგუფებთან შედარებითაც ($p<0.000$). საკონტროლო ჯგუფების საშუალო რაოდენობა ყველა სხვა დანარჩენი ჯგუფისაგან სტატისტიკურად სარწმუნოდ განსხვავდება. ცხოველთა ჯგუფები: 1 ჯგუფი -კონტ+ფიზ; 2 ჯგუფი -

კონტ+მიო; 3 ჯგუფი -კონტ+დიაზ; 4 ჯგუფი - კმ+ფიზ; 5 ჯგუფი -კმ+მიო და 6 ჯგუფი - კმ+დიაზ

კასპაზა-3. ორცვლადიან ანალიზმა, აჩვენა რომ, კასპაზა 3-ის აქტივობის ცვლილებები სტატისტიკურად სარწმუნო იყო ექსპერიმენტული და ტვინის უბნის ფაქტორების მიხედვით (შესაბამისად $F_{5,71}=3.55$, $p=0.007$ და $F_{1,71}=9.53$, $p=0.003$) და ასევე ამ ფაქტორებს შორისაც ურთიერთქმედება სარწმუნო იყო ($F_{5,71}=4.79$, $p=0.001$). კასპაზა-3-ის რაოდენობრივი ცვლილებები ანალოგიურია მ-კოფილინისა და ვდაა 1-ის ცვლილებებისა. ფერმენტის ყველაზე მაღალი აქტივობა გამოხატული იყო კმ+ფიზ და კმ+დიაზ ჯგუფის ცხოველების ჰიპოკამპში. კმ+ფიზ ჯგუფი სტატისტიკურად სარწმუნოდ განსხვავდებოდა საკონტროლო ჯგუფებისაგან და ასევე კმ+მიო ჯგუფისაგან (კმ+ფიზ კონტ+ფიზ ჯგუფების შედარება $t=2.72$, $p=0.021$; კმ+ფიზ კონტ+მიო ჯგუფების შედარება $t = 2.73$, $p=0.021$; კა+ფიზ კონტ+დიაზ ჯგუფების შედარება $t=3.70$, $p = 0.004$; და კმ+ფიზ კმ+მიო ჯგუფების შედარება $t = 3.03$, $p = 0.013$; ყველა შემთხვევაში $თხ=10$) კასპაზა-3-ის ფერმენტული აქტივობის საშუალო მაჩვენებელი კმ+დიაზ ჯგუფში სტატისტიკურად სარწმუნოდ მაღალია კონტ+დიაზ ჯგუფსა ($t=2.93$ $p=0.015$ $თხ=10$) და კმ+მიო-სთან შედარებით ($t=2.49$, $p=0.032$, $თხ=10$), ხოლო სხვაობები კონტ+ფიზ და კონტ+მიო ჯგუფებთან სარწმუნოა მხოლოდ ერთ-კუდიან ტესტზე ($t= 2.04$ $p = 0.035$; $t= 2.00$ $p= 0.037$) ყველა ზემოთ ჩამოთვლილი შედარებებისათვის თავისუფლების ხარისხი 10-ის ტოლია (სურათი 9).

არანაირ სარწმუნო ცვლილებებს ადგილი არ ჰქონია ნეოკორტექსში.



სურათი 9. ფერმენტ კასპაზა-3-ის აქტივობის საშუალო ფარდობითი რაოდენობა სხვადასხვა ჯგუფის ვირთაგვების ჰიპოკამპში. სვეტებზე გადახრები წარმოადგენს საშუალო მნიშვნელობების სტანდარტულ ცდომილებას. კმ+ფიზ და კმ+დიაზ ჯგუფები სტატისტიკურად სარწმუნოდ განსხვავდება ყველა საკონტროლო ჯგუფებისგან ($P < 0.002$) და ასევე კმ+მიო ჯგუფისგან ($p < 0.002$ და $p < 0.005$). ფერმენტული აქტივობის საშუალო ფარდობითი რაოდენობა კმ+მიო დამუშავებულ ჯგუფსა და საკონტროლო ჯგუფებს შორის სტატისტიკურად სარწმუნოდ არ განსხვავდება ერთმანეთისაგან. ცხოველთა ჯგუფები: 1 ჯგუფი - კონტ+ფიზ; 2 ჯგუფი - კონტ+მიო; 3 ჯგუფი - კონტ+დიაზ; 4 ჯგუფი - კმ+ფიზ; 5 ჯგუფი - კმ+მიო და 6 ჯგუფი - კმ+დიაზ

ქვეთავი 1.3. უჯრედების რაოდენობა ჰიპოკამპალურ ველებში. ჰიპოკამპში უჯრედების რაოდენობა ექსპერიმენტული დამუშავების და ველის ფაქტორების მიხედვით სტატისტიკურად სარწმუნოდ იცვლებოდა (ექსპერიმენტული დამუშავების ფაქტორი $F_{2,35} = 142.76$, $p < 0.0001$; ველის ფაქტორი $F_{2,35} = 67.84$, $p < 0.0001$).

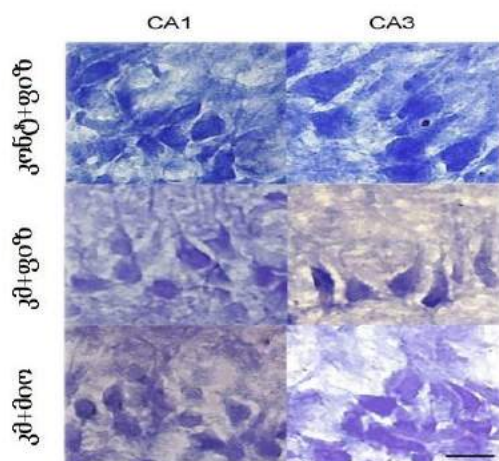
CA 1 ველი. კაინის მჟავას მოქმედება ჰიპოკამპის ამ ველში ნეირონების რაოდენობას მნიშვნელოვნად ამცირებს საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით და ეს შემცირება არის

დაახლოებით 30%-ამდე ($t=17.90$ $p=0.000$; $tb=10$). კმ+მხო ჯგუფში ნეირონების რაოდენობის შემცირება 20%-ზე ნაკლებია, თუმცა სტატისტიკურად სარწმუნოდ ისევ უფრო ნაკლებია საკონტროლო ჯგუფისაგან ($t=6.58$ $p=0.001$, $tb=10$). კმ+ფიზ და კმ+მხო ჯგუფებიც სტატისტიკურად სარწმუნოდ განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან ($t=5.43$, $p=0.002$, $tb=10$). ამრიგად, მხო-ინოზიტოლი მნიშვნელოვნად ამცირებს კაინის მჟავით გამოწვეულ ნეირონთა კვდომას ჰიპოკამპის CA 1 ველში (სურათი 10).

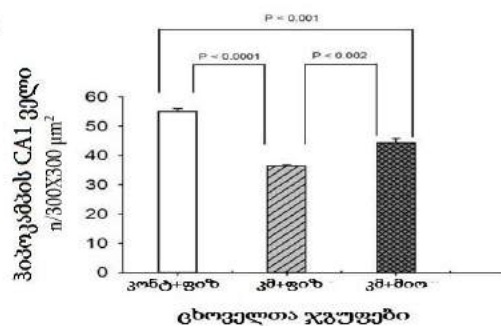
CA 3 ველი. კაინის მჟავით ინდუცირებული სტატუს ეპილეპტიკუსის დროს ნეირონთა რაოდენობა მნიშვნელოვნად შემცირებულია საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით ასევე ჰიპოკამპის CA 3 ველში ($>20\%$, $t=21.41$, $p<0.001$ და $tb=10$). კმ+მხო ჯგუფში ეს შემცირება ასევე სტატისტიკურად სარწმუნოა, თუმცა ნაკლები 15%-ზე. კმ+ფიზ და კმ+მხო ჯგუფებს შორის განსხვავება ასევე სტატისტიკურად სარწმუნოა ($t=5.33$, $p=0.002$; $tb=10$), რაც მიუთითებს მხო-ინოზიტოლის ნეიროპროტექტიულ ეფექტზე ჰიპოკამპში (სურათი 10).

დაკბილული ფასცია. აღნიშნულ ველში არანაირ სტატისტიკურ ცვლილებებს არ ჰქონია ადგილი.

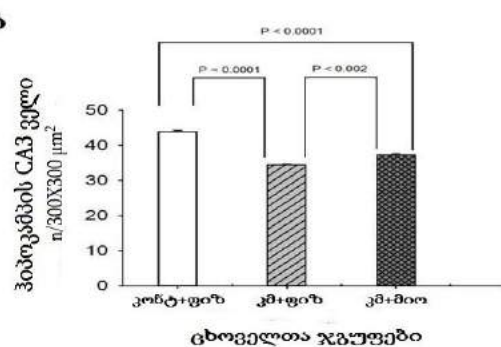
ა



ბ



გ



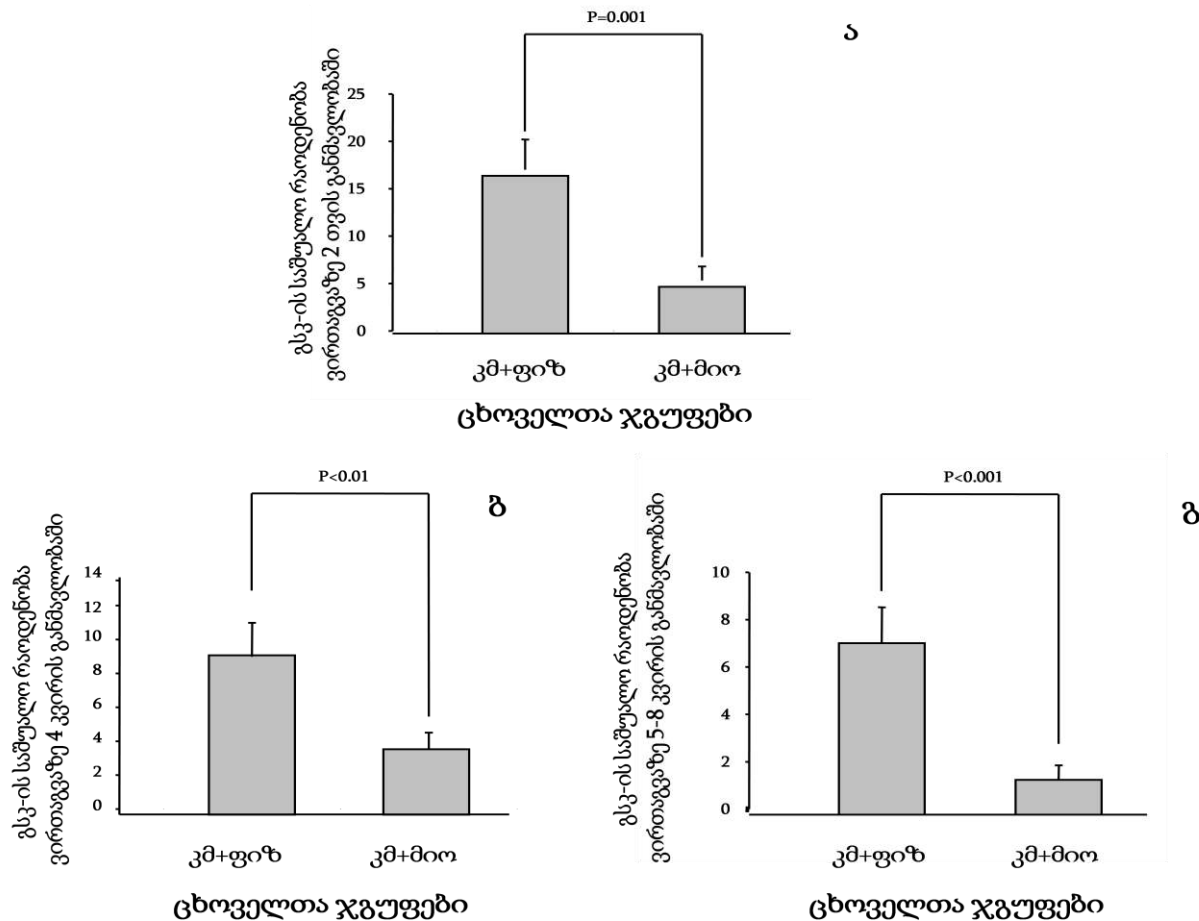
სურათი 10. კონტ+ფიზ, კმ+ფიზ და კმ+მიო ჯგუფის ცხოველების ჰიპოკამპის CA1 (მარცხნივ) და CA3 (მარჯვნივ) ველის ნეირონული უჯრედების ფოტომიკროგრაფები (ა), და უჯრედების საშუალო რაოდენობა ჰიპოკამპის CA1 (ბ) და CA3 (გ) ველში სამ სხვადასხვა ჯგუფს შორის. ა - ფოტომიკროგრაფი აჩვენებს რომ, უჯრედების რიცხვი შემცირებულია ჰიპოკამპის CA1 (ა) და CA3 (ბ) ველში, კმ+ფიზ და კმ+მიო დამუშავებულ ცხოველების ჯგუფში, თუმცა ამ უკანასკნელში უჯრედების კლება შედარებით მცირეა. ბ,გ- ჰიპოკამპის CA1 და CA3 ველში უჯრედების საშუალო რაოდენობა (უჯრედების რაოდენობა დათვლილია $(280 \times 280 \mu m^2)$ ფართობზე). სვეტებზე გადახრები წარმოადგენს საშუალო მნიშვნელობების სტანდარტულ ცდომილებას. CA1 ველში უჯრედების საშუალო რაოდენობა კმ+ფიზ დამუშავებული ჯგუფის ცხოველებში სტატისტიკურად სარწმუნოდ მცირეა კონტ+ფიზ ჯგუფის ცხოველებთან შედარებით ($p < 0.0001$), ასევე კმ+მიო დამუშავებულ ჯგუფშიც მცირეა ($p = 0.001$). ასევე კმ+ფიზ და კმ+მიო ჯგუფები ერთმანეთისაგან სტატისტიკურად სარწმუნოდ განსხვავდება ($p = 0.002$). ჰიპოკამპის CA3 ველში უჯრედების საშუალო რაოდენობა კონტ+ფიზ ჯგუფში სტატისტიკურად სარწმუნოდ მაღალია კმ+ფიზ და კმ+მიო დამუშავებულ ჯგუფებთან შედარებით (ორივე შემთხვევაში შედარება $p < 0.0001$). კმ+მიო და კმ+ფიზ ჯგუფებიც სტატისტიკურად სარწმუნოდ განსხვავდება ($p = 0.002$).

თავი 2. მიო-ინოზიტოლის მოქმედების ხანგრძლივი ეფექტები კაინის მჟავით გამოწვეულ ეპილეტოგენიზის დროს ბიოქიმიურ და ქცევით ცვლილებებზე

ქვეთავი 2.1. კრუნჩხვების რაოდენობა. ერთფაქტორიან ცვლადთა ანალიზმა, აჩვენა რომ მიო-ინოზიტოლის მოქმედებას სტატისტიკურად სარწმუნო ეფექტი ჰქონდა განმეორებადი სპონტანური კრუნჩხვების (გსკ-ს) საშუალო რაოდენობაზე თითოეულ ცხოველში 8 კვირის განმავლობაში ($F_{1,86} = 12.25$, $P = 0.001$). მიო-ინოზიტოლით დამუშავებულ ცხოველებში გსკ-ს საშუალო რაოდენობა დაახლოებით სამჯერ უფრო ნაკლები იყო კაინის მჟავით დამუშავებულ ცხოველებთან შედარებით ($T = 3.50$ $P = 0.001$ თხ=85, სურათი 11ა.)

ცვლადთა ანალიზის მიხედვით მიო-ინოზიტოლის ეფექტი პირველი 4 კვირის განმავლობაშიც სარწმუნოა ($F_{1,86}=7.16$, $P=0.009$) და ასევე მეორე 4 კვირის განმავლობაშიც როდესაც მიო-ინოზიტოლის შეყვანა შეწყვეტილია ($F_{1,86}=14.59$, $P<0.0001$).

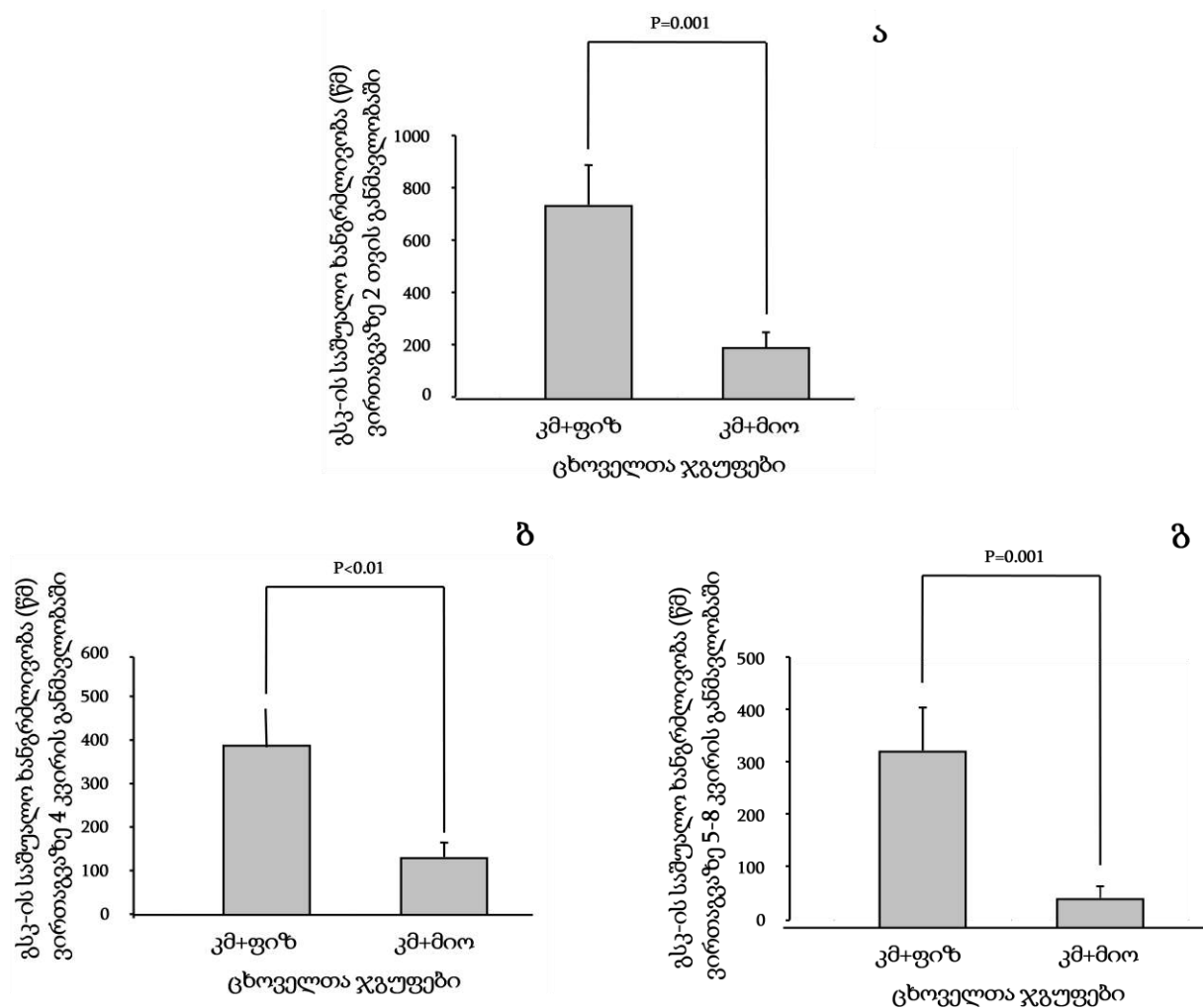
მიო-ინოზიტოლით დამუშავებულ ცხოველებში კრუნჩხვების რაოდენობა შემცირებულია დროის ორივე წერტილზე ($T = -2.68$ $P = 0.009$ თხ=85 და $T = 3.82$ თხ=85, $P<0.0001$). V-VIII კვირაზე ეს სხვაობები უფრო გამოხატულია (სურათი 11 ბ, და სურათი 11 გ). ამრიგად, მიო-ინოზიტოლის მოქმედებას ხანგრძლივი ეფექტი აქვს გსკ-ს საშუალო რაოდენობაზე კაინის მჟავით გამოწვეული ეპილეფსიის დროს.



სურათი 11. განმეორებადი სპონტანური კრუნჩხვების (გსკ) საშუალო რაოდენობა კმ+ფიზ და კმ+მიო ჯგუფებში. ა-თითოეულ ცხოველში 8 კვირის განმავლობაში, ბ- პირველი 4 კვირის განმავლობაში, გ - V-VIII კვირის განმავლობაში

ქვეთავი 2.2. კრუნჩხვების ხანგრძლივობა. მიო-ინოზიტოლის 4 კვირიან დამუშავებას ცვლადთა ანალიზის მიხედვით სარწმუნო ეფექტი გააჩნია განმეორებადი სპონტანური კრუნჩხვების (გსკ) ხანგრძლივობაზე 8 კვირის განმავლობაშიც (ერთ ფაქტორიანი ცვლადთა ანალიზი, $F_{1,86}=13.41$ $P<0.0001$). საერთო ჯამში გსკ-ს ხანგრძლივობა მიო-ინოზიტოლით დამუშავებულ ვირთაგვებში სტატისტიკურად სარწმუნოდ დაბალია კაინის მჟავით დამუშავებულ ჯგუფთან შედარებით ($T=3.66$ თხ 85 $P<0.0001$, სურათი 12ა).

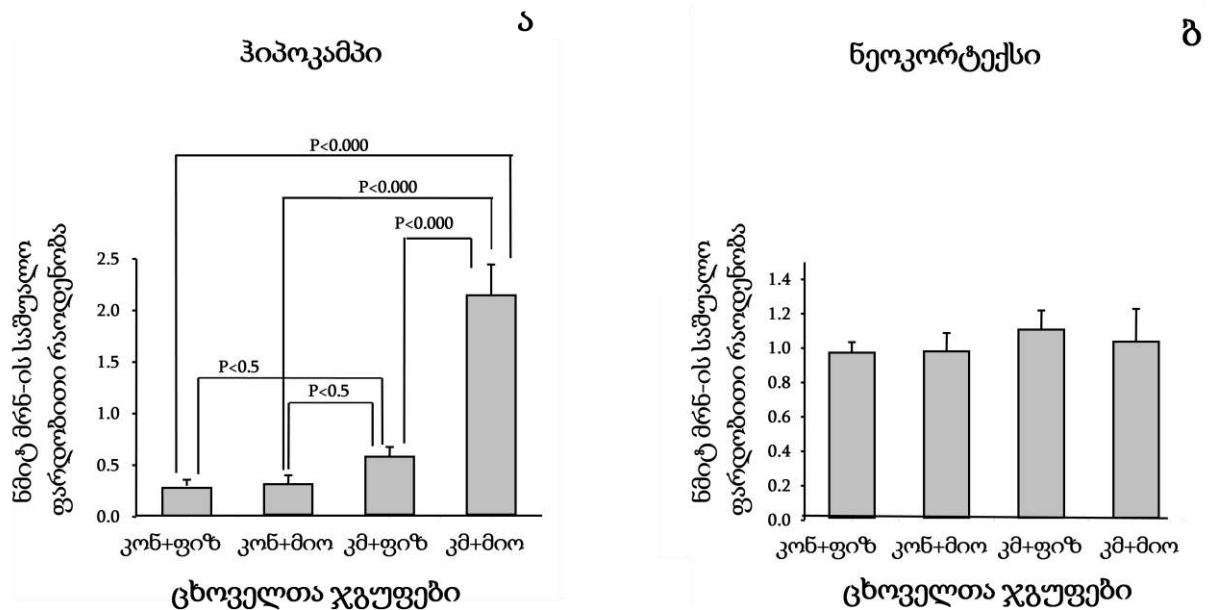
მონაცემები გაყოფილი იყო 4 კვირიანი ინტერვალით და გაანალიზებული ცალცალკე. მიო-ინოზიტოლის მოქმედების ეფექტი დროის ორივე წერტილზე სტატისტიკურად სარწმუნო იყო ($F_{1,85}=7.26$ $P=0.009$ და $F_{1,85}=13.36$, $P<0.0001$). დროის ორივე წერტილზე გსკ-ს ხანგრძლივობის საშუალო მაჩვენებელი სტატისტიკურად სარწმუნოდ დაბალია კმ+მიო ჯგუფში კმ+ფიზ დამუშავებულ ჯგუფთან შედარებით (1-4 კვირის განმავლობაში $T=2.69$ თხ=85, $P=0.009$ და 5-8 კვირის განმავლობაში $T=3.65$ თხ=85 $P=0.000$ სურათი 12 ბ და გ). ეს სხვაობები მკვეთრად გამოხატულია 5-8 კვირაზე. ამრიგად, მიო-ინოზიტოლის მოქმედებას ხანგრძლივი ეფექტი აქვს როგორც გსკ-ს რაოდენობაზე ასევე გსკ-ს ხანგრძლივობაზე.



სურათი 12. განმეორებადი სპონტანური კრუნჩხვების (გსკ) ხანგრძლივობის საშუალო მაჩვენებელი კმ+ფიზ და კმ+მი ჯგუფებში. ა-თითოეულ ცხოველში 2 თვის განმავლობაში, ბ- პირველი 4 კვირის განმავლობაში, გ- V-VIII კვირის განმავლობაში

ქვეთავი 2.3. ნატრიუმ მიო-ინოზიტოლ ტრანსპორტერი (ნმიტ). ჯგუფების ფაქტორის მიხედვით სტატისტიკურად სარწმუნო ცვლილებებს ადგილი ჰქონდა ჰიპოკამპში ($F_{3,35}=30.11$ $P<0.0001$). ყველაზე მაღალი რაოდენობა ნმიტ-ის კმ+მიო ჯგუფში იყო და სტატისტიკურად სარწმუნოდ განსხვავდებოდა დანარჩენი სამი ჯგუფისაგან (კმ+მიო და კმ+ფიზ ჯგუფებს შორის შედარება $T = 5.09$ $თხ=16$ $P = 0.000$; კმ+მიო და კონტ+ფიზ ჯგუფები $T = 6.00$ $თხ =16$ $P= 0.000$; კმ+მიო და კონტ+მიო ჯგუფები $T = 6.17$ $თხ=16$ $P=$

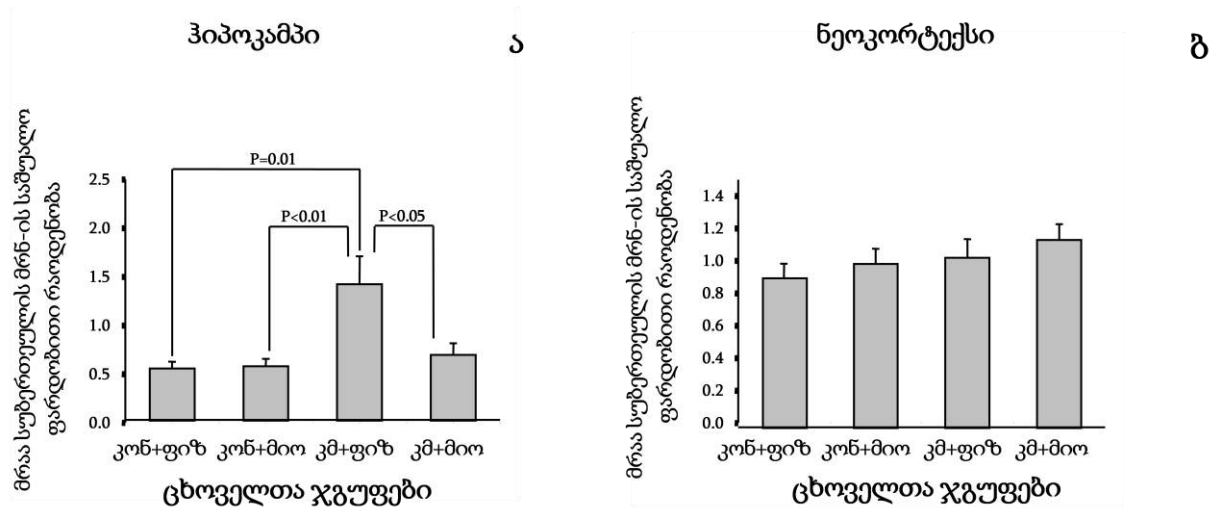
0.000). ნმიტ-ის საშუალო რაოდენობა კმ+ფიზ ჯგუფში სტატისტიკურად სარწმუნოდ მაღალია კონტ+ფიზ და კონტ+მიო ჯგუფებთან შედარებით ($T= 2.30$, $თხ=16$ $P= 0.035$), ($T = 2.80$ $თხ=16$ $P = 0.013$), (იხ. სურათი 13). ნეოკორტექსში არანაირ სარწმუნო სტატისტიკურ ცვლილებებს ადგილი არ ჰქონია.



სურათი 13. ნატრიუმ მიო-ინოზიტოლ ტრანსპორტერის (ნმიტ) მრნმ-ის საშუალო ფარდობითი რაოდენობა ცხოველთა სხვადასხვა ჯგუფებში. ა-ჰიპოკამპში და ბ-ნეოკორტექსში.

ქვეთავი 2.4. მოცულობით რეგულირებადი ანიონური არხის (მრაა) სუბერთეული (LRRC8A). ერთ ფაქტორიან ცვლადთა ანალიზმა მიო-ინოზიტოლის მოქმედების სტატისტიკურად სარწმუნო ეფექტი აჩვენა ჰიპოკამპში ($F_{3,35}= 6.92$ $P=0.001$). მრაა სუბერთეულის მ-რნმ-ის საშუალო რაოდენობა სტატისტიკურად სარწმუნოდ მაღალი იყო კმ+ფიზ ჯგუფში სხვა ჯგუფებთან შედარებით (კმ+ფიზ და კმ+მიო ჯგუფების შედარება $T= 2.43$ $თხ 16$ $P =0.027$; კმ+ფიზ და კონტ+ფიზ ჯგუფების შედარება $T= 3.06$ $თხ 16$ $P= 0.007$ და კმ+ფიზ და კონტ+მიო $T=2.96$ $თხ=16$ $P = 0.009$, იხ.სურათი 14). კონტ+ფიზ, კონტ+მიო და კმ+მიო ჯგუფებს შორის სარწმუნო ცვლილებები არ

აღინიშნებოდა. ასევე ნეოკორტექსში სტატისტიკურად სარწმუნო ცვლილებებს ადგილი არ ჰქონია.



სურათი 14. მრავალჯერადი ფარდობითი რაოდენობა ცხოველთა სხვადასხვა ჯგუფებში. ა-ჰიპოკამპში და ბ-ნეოკორტექსში.

ქვეთავი 2.5. მიკრო-რნმ-ის პროფილირება. მიკრო-რნმ-ის სპექტრის შესწავლით ნანახი იქნა ცვლილებები კონტ+ფიზ, კმ+ფიზ და კმ+ფიზ+ფიზ ცხოველთა ჯგუფებს შორის ჰიპოკამპში. დაახლოებით 70-ამდე მიკრო-რნმ იცვლება სტატისტიკურად სარწმუნოდ ცხოველთა ჯგუფებს შორის (მონაცემთა მთლიანი ანალიზისათვის იხ. დამატებითი ცხრილი). ჯგუფებს შორის მიკრო-რნმ-ების ექსპრესიის შედარებამ გამოავლინა სარწმუნოდ განსხვავებული მიკრო-რნმ-ები (იხილეთ ცხრილი-1), რომლებსაც ახასიათებდათ ქსოვილში ზომიერი ექსპრესია. ასევე გამოვლენილი იქნა მიკრო-რნმ-ები რომელთა ექსპრესია ასევე სარწმუნოდ განსხვავდებოდნენ ჯგუფებს შორის, მაგრამ მათი ექსპრესია შესწავლილ ქსოვილებში იყო დაბალი.

ცხრილი-1. მიკრო-რნმ-ების ჩამონათვალი (რომელთაც ახასიათებთ ზომიერი ექსპრესია) რომელიც განსხვავებულად ექსპრესირდება: კმ+ფიზ და კონტ+ფიზ ჯგუფებს შორის (ცხრილი 1ა); კმ+ფიზ და კონტ+ფიზ ჯგუფებს შორის (ცხრილი 1ბ) და კმ+ფიზ და კმ+ფიზ+ფიზ ჯგუფებს შორის (ცხრილი 1გ).

* წარმოდგენილი მიკრო-რნმ-ები სტატისტიკურად სარწმუნოდ განსხვავდება კმ+ფიზ და კონტ+ფიზ ჯგუფებსა და ასევე კმ+მიო და კონტ+ფიზ ჯგუფებს შორის; ** წარმოდგენილი მიკრო-რნმ-ები სტატისტიკურად სარწმუნოდ განსხვავდება კმ+ფიზ და კონტ+ფიზ ჯგუფებს შორის და ასევე კმ+მიო და კმ+ფიზ ჯგუფებს შორის; ***წარმოდგენილი მიკრო-რნმ-ები სტატისტიკურად სარწმუნოდ განსხვავდება კმ+მიო და კონტ+ფიზ ჯგუფებს შორის და ასევე კმ+მიო და კმ+ფიზ ჯგუფებს შორის.

ცხრილი 1ა

მიკრო-რნმ-ები	Log2 (კმ+ფიზ/კონტ+ფიზ)	P-ს მნიშვნელობა
rno-miR-494-3p*	1.03	0.0053
rno-miR-100-5p	0.29	0.0083
rno-miR-582-5p*	0.41	0.012
rno-miR-181a-5p**	-0.41	0.020
rno-miR-652-3p*	-0.56	0.024
rno-miR-28-5p	0.70	0.032
rno-miR-129-1-3p*	0.99	0.037
rno-miR-664-3p**	0.83	0.039
rno-miR-150-5p*	0.27	0.0485

ცხრილი 1ბ

მიკრო-რნმ-ები	Log2 (კმ+მიო/კონტ+ფიზ)	P value
rno-miR-27a-3p***	0.8	0.0012
rno-miR-135a-5p	2.28	0.0014
rno-miR-582-5p*	0.61	0.0023
rno-miR-341***	1.49	0.0033
rno-miR-329-3p***	-0.7	0.0072
rno-miR-494-3p*	1.16	0.0080

rno-miR-181d-5p	0.96	0.0134
rno-miR-543-3p	-0.43	0.0168
rno-miR-137-3p	0.70	0.0185
rno-miR-27b-3p***	0.26	0.0197
rno-miR-434-3p	-0.53	0.0218
rno-miR-384-3p	0.51	0.0250
rno-miR-30a-5p***	0.37	0.0287
rno-miR-195-5p	0.60	0.0297
rno-miR-376b-5p	-0.4	0.0338
rno-miR-433-3p	-0.57	0.0373
rno-miR-187-3p	-0.82	0.0379
rno-miR-138-5p	-0.68	0.0383
rno-miR-652-3p*	-0.48	0.0410
rno-let-7a-1-3p***	0.85	0.0412
rno-miR-485-5p ***	-0.84	0.0438

ცხრილი 1გ

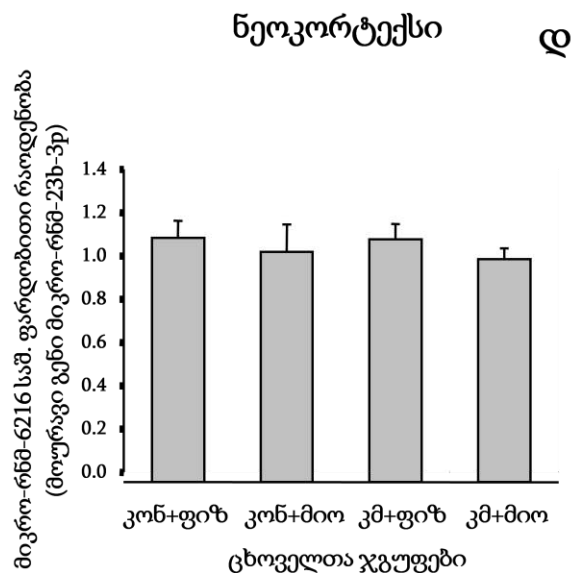
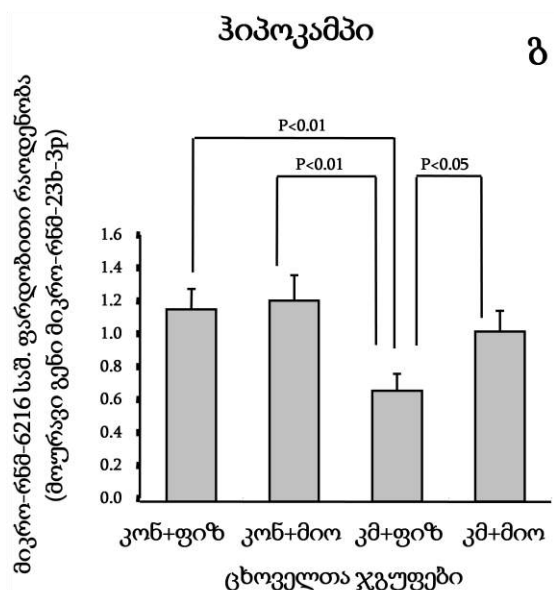
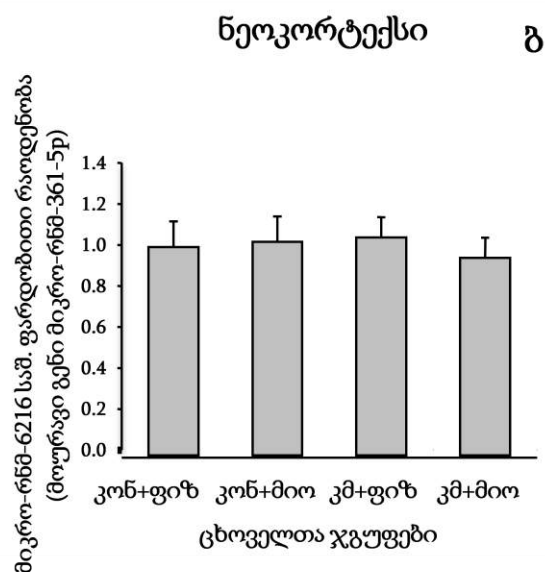
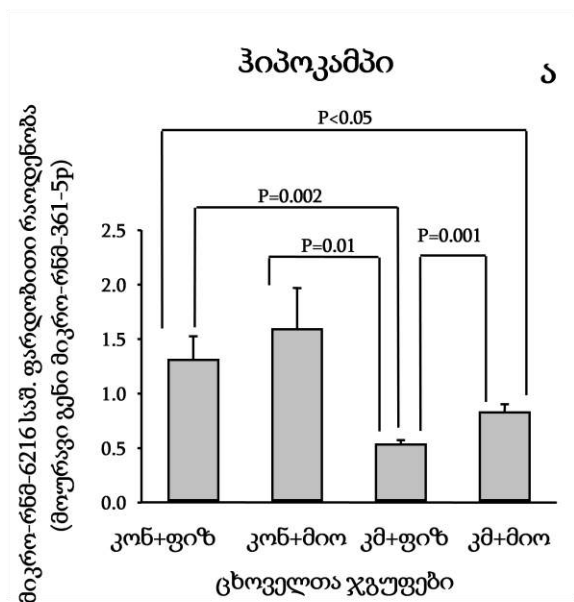
მიკრო-რნმ-ები	Log2 (კმ+მოლ/კმ+ფიზ)	P value
rno-miR-329-3p***	-0.89	0.0015
rno-miR-341***	1.52	0.0028
rno-miR-352	-0.64	0.0055
rno-miR-434-5p	-0.42	0.0068
rno-let-7e-5p	-0.71	0.0071
rno-miR-181a-5p**	0.29	0.0078
rno-miR-126a-3p	0.33	0.0106
rno-let-7d-5p	-0.57	0.0157
rno-miR-30a-5p***	0.32	0.0165
rno-miR-485-5p***	-0.73	0.0178

rno-miR-494-5p	1.32	0.020
rno-miR-27b-3p***	0.33	0.0267
rno-miR-3596a	3.27	0.0290
rno-miR-27a-3p***	0.51	0.0381
rno-miR-6216	2.95	0.0357
rno-miR-664-3p**	-0.69	0.0373
rno-miR-181c-5p	1.44	0.0388
rno-miR-185-5p	-0.29	0.0442
rno-let-7a-1-3p***	0.78	0.0452
rno-miR-129-2-3p	-0.90	0.0453
rno-miR-129-1-3p**	-1.19	0.0468
rno-miR-150-5p**	-0.33	0.0491

ექსპერიმენტთა ვალიდაციისათვის რეკომენდირებულია ფოკუსირება მოვახდინოთ იმ მიკრო რნმ-ებზე, რომლებიც აჩვენებენ მინიმალურ ინტენსივობას 500-ს მაინც (იხილეთ ბროშურა მიკრო რნმ-თა მიკროარეების შედეგების ვალიდაცია რეალური დროის რაოდენობრივი პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციით <http://www.lcsciences.com/discovery/technical-bulletin-validation-of-mirna-microarray-results-with-real-time-qpcr/>). ჩვენს მიერ შერჩეული იყო ერთ-ერთი მიკრო-რნმ რომელსაც გააჩნდა ზომიერი ექსპრესია (მიკრო-რნმ-6216) და ყველაზე უფრო განსხვავებულად ექსპრესირდებოდა კმ+ფიზ და კმ+მიო ჯგუფებს შორის. მიკრო-რნმ-ების რაოდენობრივი შესწავლების შემთხვევაში არ არსებობს უნივერსალური ‘მოურავი’ მიკრო-რნმ-ები. ყველა მკვლევარი თვითონ არჩევს ასეთ მიკრო-რნმ-ებს. ჩვენს შემთხვევაში შერჩეული იქნა ასეთი 2 მიკრო-რნმ, რომელთაც აღენიშნებოდათ დაბალი დისპერსიულობა (>0.75) და გამოირჩეოდნენ სტაბილური ექსპრესიულობით ჯგუფებს შორის (მიკრო-რნმ-23b-3p და მიკრო-რნმ-361-5p). ვალიდაციის შესწავლისათვის ჩვენ გამოვყავით რნმ-ები ჰიპოკამპიდან და ნეოკორტექსიდან, ვირთაგვების 4 ჯგუფიდან: კონტ+ფიზ, კონტ+მიო, ჯმ+ფიზ და კმ+მიო.

ჰიპოკამპი. ერთ ფაქტორიანი ცვლადთა ანალიზით მიო-ინოზიტოლის ეფექტი აღნიშნულ მიკრო-რნმ-ზე ნანახი იქნა ჰიპოკამპში ორივე "მოურავ გენზე" (მიკრო-რნმ-361-5p-ის შემთხვევაში $F_{3,35}=4.85$, $P=0.007$ და მიკრო-რნმ-23b-3p-ის შემთხვევაში $F_{3,35}=4.04$, $P=0.015$).

დაგეგმილი შედარებების ანალიზმა აჩვენა რომ მიკრო-რნმ-6216 საშუალო რაოდენობა ჰიპოკამპში კმ+მიო ჯგუფის ცხოველებში სტატისტიკურად სარწმუნოდ მაღალი იყო კმ+ფიზ ჯგუფთან შედარებით ორივე "მოურავ გენზე" (იხ. სურათი 15 მიკრო-რნმ-361-5p $T = 3.93$ თხ 16 $P= 0.001$ და მიკრო-რნმ-23b-3p $T =2.36$, თხ 16 $P= 0.032$). ეს მონაცემები ემთხვევა მიკრო-რნმ-ის პროფილირების მონაცემებს. მიკრო-რნმ-6216 საშუალო რაოდენობა კონტ+ფიზ და კონტ+მიო ჯგუფებს შორის სტატისტიკურად სარწმუნოდ მაღალია კმ+ფიზ ჯგუფთან შედარებით (იხ. სურათი 15ა და 15ბ), (კონტ+ფიზ და კმ+მიო შედარება მიკრო-რნმ-361-5p-ის შემთხვევაში $T= 3.70$ თხ 16 $P= 0.002$ და მიკრო-რნმ-23b-3p-ის შემთხვევაში $T= 2.84$ თხ 16 $P= 0.012$; კონტ+მიო და კმ+მიო შედარება მიკრო-რნმ-361-5p-ის შემთხვევაში $T = 3.16$ $P = 0.006$ თხ = 16 და მიკრო-რნმ-23b-3p-ის შემთხვევაში $T = 3.09$ $P= 0.007$ თხ =16). მიკრო-რნმ-6216 საშუალო რაოდენობა კონტ+ფიზ ჯგუფში სტატისტიკურად სარწმუნოდ მაღალია კმ+მიო ჯგუფთან შედარებით (მიკრო-რნმ-361-5p-ის შემთხვევაში $T= 2.21$ $P= 0.042$ თხ = 16). კონტ+მიო და კმ+მიო ჯგუფებს შორის სტატისტიკურად სარწმუნო ცვლილებები იყო მხოლოდ ერთ კუდიან ტესტზე (მიკრო-რნმ-361-5p-ის შემთხვევაში $T=2.03$ $P = 0.03$ თხ = 16). მიკრო-რნმ-23b-3p-ის მოურავ გენზე სტატისტიკურად სარწმუნო ცვლილებებს ადგილი არ ქონდა კონტ+ფიზ, კონტ+მიო და კმ+მიო ჯგუფებს შორის.



სურათი 15. მიკრო-რნმ-6216 საშუალო ფარდობითი რაოდენობა ცხოველთა სხვადასხვა ჯგუფებში, ჰიპოკამპსა და ნეოკორტექსში ა და ბ მოუწავი გენი - მიკრო-რნმ-361-5p; გ და დ მოუწავი გენი - მიკრო-რნმ-23b-3p.

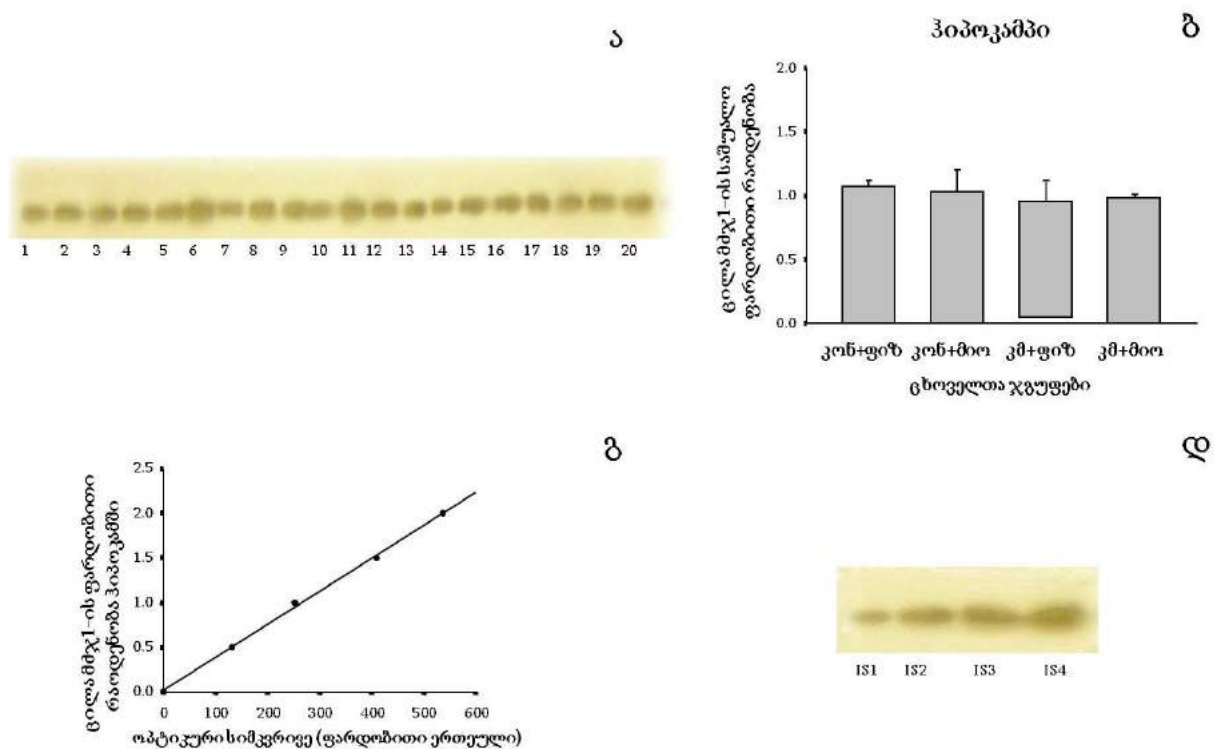
ნეოკორტექსი. ერთ ფაქტორიანი ცვლადთა ანალიზით და ჯგუფებს შორის შედარებით არანაირი სარწმუნო ცვლილებებს არ ჰქონია ადგილი.

ქვეთავი 2.6. მაღალი ძვრადობის ჯგუფის ცილა 1 (მბჯ ცილა-1). ანტისხეულები მაღალი ძვრადობის ჯგუფის ცილა 1-ის წინააღმდეგ რეაგირებენ 25 კდა მოლეკულური წონის

მქონე ცილოვან მოლეკულასთან, რაც შეესაბამება მძჷ ცილა-1 მოლეკულურ წონას (იხ. სურათი 16ა და სურათი 17ა).

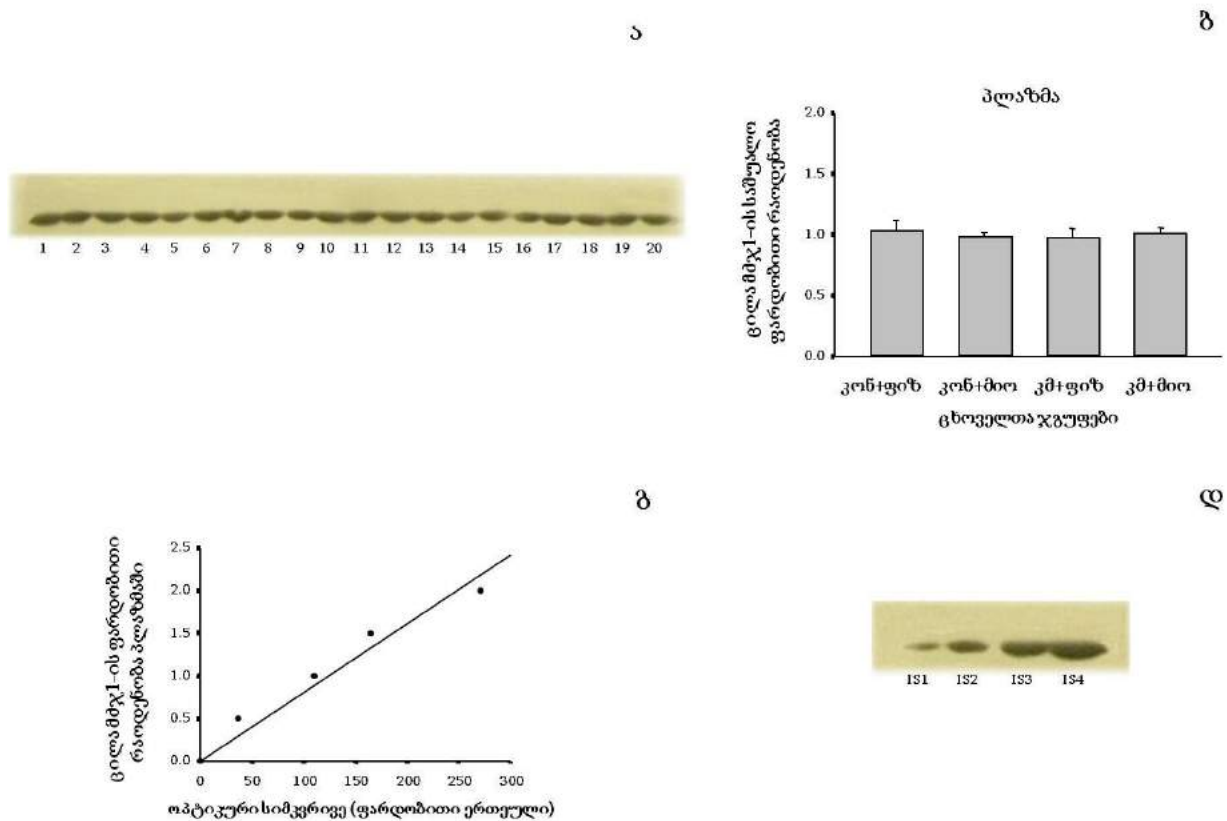
აუტორადიოგრამების სტანდარტიზაციისათვის გამოიყენებოდა 4 სტანდარტი (15, 30, 45 და 60 მკგ ცილის ოდენობით). სტანდარტების ოპტიკური სიმკვრივე სწორხაზოვან სარწმუნო დამოკიდებულებაშია იმუნოშედებილი ხაზების მაღალი ძვრადობის ჯგუფის ცილა 1-ის რაოდენობასთან (სურათი 16 გ და 17გ).

ერთ ფაქტორიანი ანალიზით მაღალი ძვრადობის ჯგუფის ცილა 1-ის რაოდენობა სტატისტიკურად სარწმუნოდ არ იცვლებოდა ჰიპოკამპში, ნეოკორტექსსა და სისხლის პლაზმაში. სხვადასხვა ჯგუფებს შორის ჩატარებულმა შედარებებმა ასევე არ გამოავლინა სარწმუნო სხვაობები ჯგუფებს შორის (იხ.სურათი 16ბ და 17ბ).



სურათი 16. მძჷ ცილა 1-ის აუტორადიოგრამული სურათი ა ჰიპოკამპში და შესაბამისი საკალიბრო მრუდი გ. მძჷ ცილა 1-ის რაოდენობრივი ცვლილებები ჰიპოკამპში სხვადასხვა ჯგუფებს შორის სურათი ბ, შინაგანი სტანდარტების ნიმუშთა რადიოგრამა

(15, 30, 45, 60მკგ შესაბამისი ცილის ოდენობით ჰიპოკამპში) დ; ა სურათზე - 1-5 კონტ+ფიზ; 6-10 კონტ+მიო; 11-15 კმ+ფიზ; 16-20 კმ+მიო.



სურათი 17. მძე ცილა 1-ის ავტორადიოგრაფული სურათი ა პლაზმაში - 1-5 ხაზები შეესაბამება კონტ+ფიზ ჯგუფს; 6-10 კონტ+მიო; 11-15 კმ+ფიზ; 16-20 კმ+მიო და სურათი გ შესაბამისი საკალიბრო მრუდი. მძე ცილა 1-ის რაოდენობრივი ცვლილებები პლაზმაში სხვადასხვა ჯგუფებს შორის სურათი ბ, შინაგანი სტანდარტების ნიმუშთა რადიოგრამა (15, 30, 45, 60მკგ შესაბამისი ცილის ოდენობით) დ.

2.6. მიღებული შედეგების განხილვა, დისკუსია

ჩვენს ადრეულ კვლევებში ნანახი იქნა, რომ კმ-ით გამოწვეული სტატუს ეპილეპტიკუსის დროს, მيو-ინოზიტოლის ყოველდღიური ორჯერადი ინექციას მნიშვნელოვანი და დადებითი ეფექტი ქონდა, ეპილეპტოგენეზის დროს მომხდარ ბიოქიმიურ ცვლილებებზე (Solomon et al., 2010, Solomon et al., 2013). აღნიშნული ბიოქიმიური ცვლილებები ეხებოდა: ამჰმ ტიპის გლუტამატური **GLUR1**-ის სუბერთეულის, **αკამკII**-ისა და გაემ-ა რეცეპტორების სუბერთეულების რაოდენობრივ ცვლილებებს. ამ 28 დღიან ცდებში მيو-ინოზიტოლი ყოველდღე შეგვყავდა და ეფექტები მიღებული იყო მيو-ინოზიტოლის ინექციების შეწყვეტიდან მხოლოდ 1 დღის შემდეგ (Solomon et al., 2010, Solomon et al., 2013).

შემდგომ ექსპერიმენტებში კმ-ით ეპილეფსიური სტატუსის გამოწვევამდე მيو-ის შეყვანა ჰიპოკამპის უჯრედთა კვდომაზე მნიშვნელოვან ნეიროპროტექტორულ ზეგავლენას ახდენდა (Kotaria et al., 2013). აღნიშნული შედეგები მიუთითებს, რომ მოლეკულურ და უჯრედულ დონეებზე მيو-ს შესაძლოა ანტიეპილეფსიური თვისებები ჰქონდეს.

ლოგიკურია ვარაუდი იმის შესახებ, რომ მيو-ინოზიტოლი მოქმედებს იწყებს უფრო ადრეულ საფეხურებზეც. აქედან გამომდინარე ჩვენ გადაწყვიტეთ შეგვესწავლა ცვლილებები სტატუს ეპილეპტიკუსის ჩამოყალიბებიდან 24 საათის შემდეგ. ექსპერიმენტში ვიყენებდით ისეთ ცხოველებს რომელთაც 4 საათიანი დაკვირვების დროს 1 საათის განმავლობაში უფიქსირდებოდათ განმეორებადი კრუნჩხვები, რადგან შემდეგ დაახლოებით 90%-ში ადგილი აქვს განმეორებადი სპონტანური კრუნჩხვების ჩამოყალიბებას, ანუ იწყება ეპილეპტოგენეზი და ყალიბდება ეპილეფსია (Loscher et al., 2010). ჩვენ კვლევაში ნანახი მოლეკულური ცვლილებები ასოცირდება უჯრედების კარგვასა და აპოპტოზურ პროცესთან. შესაძლებელია ეს იყოს ისეთი ცვლილებები რომლებიც ეპილეპტოგენეზთან ასოცირდება?

ვდაა ცილები. ლიტერატურულ მიმოხილვაში ეს ცილები დაწვრილებით განვიხილეთ, ისინი მიტოქონდრიის გარეთა მემბრანის ცილებია და სხვადასხვა ბიოლოგიურ პროცესებში იღებენ მონაწილეობას. რაც შეეხება კონკრეტულად ვდაა 1-ს ცნობილია რომ მისი რაოდენობის ზრდა დაკავშირებულია აპოპტოზთან და ვდაა 2-ის კი ფეროპტოზთან (Shoshan-Barmatz et al., 2006). ამიტომ გადავწყვიტეთ შეგვესწავლა აღნიშნული არხის ცილები კაინის მჟავით გამოწვეული ეპილეფსიური მდგომარეობიდან 24 საათის შემდეგ.

კმ დამუშავებული და კმ+დიაზ ჯგუფის ვირთაგვების ჰიპოკამპებში მართლაც სტატისტიკურად სარწმუნოდ მაღალი იყო მისი რაოდენობა სხვა ჯგუფებთან შედარებით, ხოლო მიო-ინოზიტოლით დამუშავებული ჯგუფი და საკონტროლო ჯგუფი ერთმანეთისაგან სტატისტიკურად სარწმუნოდ არ განსხვავდებოდნენ. რაც შეეხება ვდაა 2-ს მის ცვლილებებს ადგილი არ ქონია. ჩვენი აზრით ვდაა 1-ის მომატებული რაოდენობა კაინის მჟავით ინდუცირებული ეპილეპტოგენეზის თანმდევი აპოპტოზური პროცესის ინდიკატორია და მიო-ინოზიტოლი კი უნდა ამცირებდეს მას ანუ დადებითად უნდა მოქმედებდეს აღნიშნულ პროცესზე.

ცოს 1. ციტოქრომ ოქსიდაზა არის მიტოქონდრიული კომპლექსი IV-ის მარკერი და ცოს 1 მიტოქონდრიულ დნმ-ით კოდირებული ცილაა. ცნობილია რომ, კმ-ით გამოწვეული სტატუს ეპილეპტიკუსის ჩამოყალიბებიდან 3 საათის შემდეგ, კმ-ის ადმინისტრირება იწვევდა სუნქვითი კომპლექსი I-ის აქტივობის შემცირებას, და არა კომპლექსი IV-ის (Chuang et al., 2004). ჩვენ შევისწავლეთ ცოს 1-ის რაოდენობრივი ცვლილებები და არანაირ სტატისტიკურ ცვლილებებს ადგილი არ ჰქონდა.

მ-კოფილინი. ლიტერატურულ მიმოხილვაში ჩვენ დაწვრილებით განვიხილეთ კოფილინი, მისი ერთერთი ფუნქცია არის აქტინის ფილამენტების წარმოქმნის პროცესში მონაწილეობა, მეორე რაც ცნობილია, ეს არის კოფილინის ტრანსლოცირება ციტოპლაზმიდან მიტოქონდრიაში და აპოპტოზის ინდუქცია, ანუ აპოპტოზურ პროცესში მონაწილეობა.

ჩვენ სადისერტაციო კვლევაში შევისწავლეთ მ-კოფილინის რაოდენობრივი ცვლილებები პლაზმურ-მემბრანულ მიტოქონდრიულ ფრაქციაში. რატომ აღნიშნულ

ფრაქციაში? ჩვენ ლაბორატორიაში ჩატარებულ წინა კვლევებში 2D ელექტროფორეზული ანალიზით აღნიშნული ცილა იდენტიფიცირდა კმ დამუშავებული ჯგუფის ვირთაგვების ტვინის პლაზმურ-მიტოქონდრიულ ფრაქციაში ანუ კმ დამუშავებული ჯგუფში კოფილინის მომატებული რაოდენობა აღინიშნებოდა სხვა ჯგუფებთან შედარებით. რა თქმა უნდა აღნიშნულ ცილაზე კვლევის გაგრძელება საჭიროდ და საინტერესოდ ჩავთვალეთ. მ-კოფილინის რაოდენობა სტატისტიკურად სარწმუნოდ იზრდებოდა კმ დამუშავებულ და კმ+დიაზ ჯგუფებში სხვა ჯგუფებთან შედარებით და მიო-ინოზიტოლით დამუშავება არა მარტო ამცირებდა ამ ზრდას, არამედ ასევე საკონტროლო ჯგუფებთან შედარებითაც კი დაბალი იყო.

ჩვენი აზრით მიო-ინოზიტოლით განპირობებული კოფილინის რაოდენობის შემცირება მიტოქონდრიულ ფრაქციაში უნდა ასუსტებდეს კმ-ით გამოწვეული აპოპტოზურ პროცესს.

კასპაზა 3 აქტივობის შესწავლა. ჩვენ ასევე შევისწავლეთ კასპაზა-3-ის აქტივობა, როგორც აპოპტოზური პროცესის ერთ-ერთი მარკერი. მსგავსად ვდაა 1-ისა და მ-კოფილინის აღნიშნული ფერმენტის აქტივობის ზრდას ჰქონდა ადგილი კმ+ფიზ და კმ+დიაზ ჯგუფებში, ხოლო კმ+მიო ჯგუფში საკონტროლო ჯგუფების მსგავსად იყო. ანუ მიო-ინოზიტოლით დამუშავება ამ ზრდას ამცირებდა. რაზე მიუთითებს ეს? ჩვენი აზრით, დამოკიდებულება ზემოთ ჩამოთვლილ ცილებს შორის რა თქმა უნდა არის, კმ დამუშავება ზრდის ვდაა 1-ის, კასპაზა 3-ის და მ-კოფილინის რაოდენობას მაგრამ არ იცვლება ცოს 1. როდესაც იზრდება ვდაა 1 და მ-კოფილინის რაოდენობა იცვლება მიტოქონდრიების ფორმების შეღწევადობაც, ციტოქრომ ც გამოიყოფა ციტოპლაზმაში და გააქტივდება კასპაზების კასკადი, მათ შორისაა კასპაზა 3-იც. ჩაირთვება აპოპტოზური პროცესი, ხოლო რაც შეეხება მიო-ინოზიტოლით დამუშავების შემდეგ ზრდის შემცირებას, ჩვენი აზრით ეს კიდევ ერთხელ მიუთითებს მოცემულ პირობებში (კმ-ით გამოწვეული ეპილეპტოგენეზი) მიო-ის აპოპტოზურ პროცესებზე მაინჰიბირებელი ეფექტის არსებობას.

უჯრედთა რაოდენობის ცვლილებები. ზემოთ ჩამოთვლილი ყველა ცილოვანი მოლეკულების რაოდენობრივი ცვლილება არის ჰიპოკამპისათვის დამახასიათებელი.

ჩვენ ასევე შევისწავლეთ ნეოკორტექსიც მაგრამ იქ არანაირ სტატისტიკურად სარწმუნო ცვლილებებს ადგილი არ ქონია. გარდა ამ კვლევისა ადრეც ჩატარებულ კვლევებში ცვლილებებს ადგილი ჰქონდა ჰიპოკამპში და არა ნეოქორტექსში. ვინაიდან კმ+ფიზ და კმ+დიაზ ჯგუფი ერთმანეთისაგან არ განსხვავდებოდნენ და მსგავსი ცვლილებებით ხასიათდებოდნენ, უჯრედთა დათვლა განვახორციელეთ ჰიპოკამპში და ავიღეთ მხოლოდ სამი ჯგუფი კონტ+ფიზ, კმ+ფიზ და კმ+მიო.

უჯრედების რაოდენობა მნიშვნელოვნად შემცირებული იყო ჰიპოკამპის CA3 და CA1 ველებში, კმ+ფიზ, კმ+მიო ჯგუფებსა და საკონტროლო ჯგუფს შორის სხვაობა სტატისტიკურად სარწმუნო იყო, კმ+მიო ჯგუფშიც შემცირება შენარჩუნებული იყო თუმცა კმ ჯგუფისაგან განსხვავდებოდა და მასში შემცირება სარწმუნოდ უფრო ნაკლები იყო. დაკბილულ ფასციაში არანაირი ცვლილებები არ აღინიშნებოდა. ამავე დროს ტენდეცია უჯრედების რაოდენობის მიხედვით ანალოგიური იყო (კონ+ფიზ>კმ+მი>კმ+ფიზ). შესაძლებელია, რომ ჩვენს მიერ გამოყენებული მიდგომა არ იყო საკმარისად მგრძნობიარე ცვლილებების სარწმუნოდ დაფიქსირებისათვის.

როგორც უკვე მრავალჯერ იყო აღნიშნული მიო-ინოზიტოლს ანტიკონვულსიური თვისებები ახასიათებს (Solomon et al., 2007, Nozadze et al., 2011) და შესაძლებელია დავუშვათ, რომ ინოზიტოლის მოქმედება ზემოთჩამოთვლილ მოლეკულურ ცვლილებებზე განპირობებული იყოს მისი ანტიკონვულსიური აქტივობებით. ასევე შესაძლებელია რომ ეს ეფექტები განპირობებულია მიო-ინოზიტოლის უნარით გაემ-ა რეცეპტორებთან ურთიერთქმედებისა (იხ. Solomon et al., 2004). ამ შესაძლებლობის შესწავლისათვის ჩვენს ექსპერიმენტულ დიზაინში ჩავრთეთ ორი დამატებითი ჯგუფი, რომლებიც იღებდნენ გაემ-ა რეცეპტორის აგონისტის და ანტიკონვულსანტის დიაზეპამის ინექციებს. თუ დიაზეპამი გამოამჟღავნებდა მიო-ინოზიტოლის მსგავს ეფექტებს მაშინ უფრო სავარაუდო იქნებოდა რომ ინოზიტოლის გავლენა მხოლოდ მისი გაემ-ა და/ან ანტი-კონვულსიური მოქმედებით არის განპირობებული. კმ+დიაზ ჯგუფი იდენტურია კმ+ფიზ ჯგუფის შედეგებისა და ჩვენ ვვარაუდობთ რომ ექსპერიმენტების მოცემულ სერიაში მიო-ინოზიტოლის მოქმედება სხვა მექანიზმებით უნდა იყოს განპირობებული, რომლებზედაც დისკუსიის ბოლოს გვექნება საუბარი. აუცილებლად

უნდა აღინიშნოს, რომ მيو-ინოზიტოლის შეყვანა ვირთაგვების იმ ჯგუფში, რომლებიც კმ-ით არ მუშავდებოდნენ არ იწვევს არანაირ სარწმუნო ეფექტს. ამრიგად, მيو-ინოზიტოლის ეფექტები სპეციფიკური უნდა იყოს კმ-ით ინდუცირებულ ბიოქიმიური ცვლილებების კასკადზე.

ჩვენი ექსპერიმენტების პირველი სერიის შედეგების მიხედვით ვაკეთებთ დასკვნას, რომ მيو-ინოზიტოლით შემდგომი დამუშავება აფერხებს კმ-ით გამოწვეულ უჯრედების აპოპტოზურ სიგნალს და მასთან დაკავშირებულ მოლეკულურ პროცესებს ვირთაგვების ჰიპოკამპში. ისევე როგორც ჩვენს სხვა ცდებში (Solomon et al., 2011, 2013) მيو-ინოზიტოლის ეფექტები ჰიპოკამპში აღირიცხებოდა და ამრიგად ამ ლიპიდის მოქმედება ჰიპოკამპისათვის უნდა იყოს სპეციფიკური.

როგორც უკვე აღნიშნული იყო, მيو-ინოზიტოლის მოქმედების შედეგები ერთ-თვიანი ცდების შემთხვევაში აღრიცხული იყო, ინექციების შეწყვეტიდან 1 დღის შემდეგ (Solomon et al., 2011, 2013). დასაშვებია რომ ეს ზეგავლენა ნიველირდებოდეს მيو-ინოზიტოლის ინექციების შეწყვეტიდან უფრო დიდი ხნის შემდეგ. ლოგიკურად საინტერესოა შენარჩუნდება თუ არა ეს ეფექტები მيو-ინოზიტოლის ინექციების შეწყვეტიდან 1 თვის შემდეგ, რისთვისაც სპეციალური ექსპერიმენტული დიზაინი დავამუშავეთ.

გსკ საშუალო რაოდენობა კმ+მيو ჯგუფში კმ+ფიზ შედარებით სარწმუნოდ უფრო დაბალი იყო, როგორც მთლიანად 8 კვირის განმავლობაში, ასევე მონაცემების 4 კვირიანი ინტერვალით დაყოფის დროსაც: რატომ 4 კვირიანი დაყოფა? რადგან ჩვენ მხოლოდ პირველი 4 კვირის განმავლობაში შეგვყავდა მيو-ინოზიტოლი და შემდეგ მხოლოდ ქცევით დაკვირვებებს ვახორციელებდით. შეკითხვა შემდეგში მდებარეობდა: აქვს მيو-ინოზიტოლს ეფექტები მხოლოდ ინექციის დროს თუ შეწყვეტის შემდეგაც? ამიტომ დავყავით ორ პერიოდად: 4 კვირა და 5-8 კვირა. დროის ორივე წერტილზე, როგორც გსკ საშუალო რაოდენობა ასევე გსკ-ის ხანგრძლივობა მيو-ინოზიტოლით დამუშავებულ ჯგუფში შემცირებული იყო კმ დამუშავებულ ჯგუფთან შედარებით. რაც მيو-ინოზიტოლის მოქმედების ხანგრძლივი ეფექტებით უნდა იყოს განპირობებული.

რაც შეეხება კმ გამოწვეულ მოლეკულურ ცვლილებებს: აქაც მიო-ინოზიტოლით 4 კვირიან დამუშავებას მნიშვნელოვანი ეფექტები ქონდა, რნმ-ის ექსპრესიის (ნმიტ მ-რნმ, მრეა სუბერთეული) ასევე მიკრო-რნმ-ის სპექტრის ცვლილებების დონეზე.

ნმიტ მ-რნმ-ის საშუალო რაოდენობა სტატისტიკურად სარწმუნოდ იზრდებოდა საკონტროლო ჯგუფებთან შედარებით როგორც კმ+ფიზ ჯგუფში ასევე კმ+მიო დამუშავებულ ჯგუფში. თუმცა კმ+ფიზ ჯგუფში ნმიტ მრნ-ის რაოდენობა დაახლოებით 2-ჯერ იზრდებოდა საკონტროლოებთან შედარებით, ხოლო კმ+მიო-ში კიდევ უფრო მაღალი ექსპრესიით ხასიათდებოდა. რა თქმა უნდა ეს ცვლილებები ნანახი იქნა ჰიპოკამპში. ნმიტ მ-რნმ-ის მომატებული ექსპრესია ასევე ნანახი იყო კმ-ით გამოწვეული სე-ის დროს, მოკლენიან ცდებშიც (Nonaka et al., 1999). ჩვენი აზრით, აღნიშნული ტრანსპორტერის მომატებული ექსპრესია სავარაუდოდ სასარგებლოდ მოქმედებს გსკ სიხშირის შემცირებაზე.

ასევე სტატისტიკურად სარწმუნოდ იცვლებოდა მრეა მ-რნმ სუბერთეულის საშუალო რაოდენობა, კმ+ფიზ ჯგუფში, ჰიპოკამპში. როგორც ვიცით მრეა არის მოცულებით რეგულირებადი ანიონური არხის ერთ-ერთი სუბერთეული (მრეა სუბერთეული 8ა) და ეს არხი მნიშვნელოვანი რეგულატორია უჯრედების ზომის შენარჩუნებაში, რომელსაც აკონტროლებს სხვადასხვა ორგანული ოსმოლიტების და ქლორის იონების ტრანსპორტირებით. ნეირონთა მაღალი აღზნებადობის დროს, რომელიც დამახასიათებელია ეპილეფსიური მდგომარეობისათვის, უჯრედის შიგნით მასიურად შეედინება ნატრიუმის, კალციუმის და ქლორის იონები, ასევე წყალი შეედინება, რაც იწვევს უჯრედების გაჯირჯებას და უჯრედგარე სივრცის შევიწროებას. უჯრედგარე სივრცის შემცირება აძლიერებს ნეირონთა აღზნებადობას (Schwartzkroin et al., 1998). რა თქმა უნდა მოცულებით რეგულირებადი ანიონური არხის გააქტივებაც ძლიერდება, იმისათვის რომ დაარეგულიროს უჯრედგარე სივრცის მოცულობა. აღნიშნული არხის მომატებული რაოდენობა აღინიშნება კმ გამოწვეული ეპილეფსიური მდგომარეობის დროს.

უჯრედების გაჯირჯება არღვევს სხვადასხვა ფერმენტების ნორმულ აქტივობას. ოსმოპროტექციული გენების ექსპრესიას და მცირე ორგანული ოსმოლიტების

აღმავალი რეგულაციას, რომელშიც შედის მيو-ინოზიტოლიც, შეუძლია უჯრედების გაჯირჯვებაზე კომპესაციურად იმოქმედოს. ტაურინ-ტრანსპორტერი, ალდოლ-რედუქტაზა, ნმიტ ოსმოპროტექციულ გენებს მიეკუთვნება, რომელთა ექსპრესიის ცვლილებებს ადგილი აქვს კმ გამოწვეული ეპილეფსიური მდგომარეობიდან 24 საათის შემდეგ (Rowley et al., 2011).

ერთ-ერთი შესაძლო ჰიპოთეზაა რომ კმ+ფიზ ჯგუფის ცხოველების ჰიპოკამპში უფრო ხშირია კრუნჩხვები ვიდრე კმ+მიო ჯგუფში, შესაბამისად კმ+ფიზ ჯგუფის ცხოველების ჰიპოკამპის უჯრედები გაჯირჯვებულია უფრო ხშირად, გამომდინარე აქედან უჯრედის მოცულების დასარეგულირებლად აღნიშნული არხი აქტიურია და მრავალ სუბერთეულის რაოდენობაც იზრდება, რომელიც ჩვენი აზრით, აღნიშნული პროცესის ნორმული მდგომარეობის დაბრუნებისათვის არის მიმართული.

მიკრო-რნმ-ების სპექტრი. ჩვენ კვლევაში ასევე ნანახი იქნა, რომ მيو-ინოზიტოლით 4 კვირიან დამუშავებას ხანგრძლივი ეფექტები ჰქონდა მიკრო-რნმ-ების სპექტრზე ვირთაგვების ჰიპოკამპში. მიკრო-რნმ სპექტრის შესწავლისას კმ+ფიზ და კმ+მიო ჯგუფების ერთმანეთთან შედარებით ნანახი იქნა დაახლოებით 22 მიკრო-რნმ რომელიც ხასიათდებოდა ნორმული ექსპრესიით და ხოლო 28 მიკრო-რნმ დაბალი ექსპრესიით (იხ. ცხრილი 1), რომელთა ექსპრესია სარწმუნოდ განსხვავდებოდა შესწავლილ ჯგუფებს შორის. კონტ+ფიზ ჯგუფისა და კმ დამუშავებული ორივე ჯგუფის შედარებისას: ნორმალური ექსპრესიის მქონე 9 მიკრო-რნმ კონტ+ფიზ და კმ+ფიზ ჯგუფების ერთმანეთთან შედარებით ხასიათდებოდა სარწმუნოდ განსხვავებული ექსპრესიით და 21 მიკრო-რნმ კონტ+ფიზ და კმ+მიო შედარებისას (იხ.ცხრილი 1, 1ა-1დ). 4 მიკრო-რნმ (მიკრო-რნმ-181a-5, მიკრო-რნმ-129-1-3p, მიკრო-რნმ-664-3p და მიკრო-რნმ-150-5p,) არ იცვლებოდა კონტ+ფიზ და კმ+მიო ჯგუფების ერთმანეთთან შედარებისას, თუმცა კონტ+ფიზ და კმ+ფიზ, და კმ+მიო და კმ+ფიზ ჯგუფების შედარებისას ისინი სარწმუნოდ იცვლებოდა. მიღებული მონაცემების შემდგომი დადასტურებისათვის/ვალიდაციისათვის ჩვენს ასევე შევისწავლეთ მიკრო-რნმ-6216 რაოდენობრივი ცვლილებები 2 ენდოგენურ "მოურავ გენზე". აღნიშნული მიკრო-რნმ-ის

ექსპრესია კმ+ფიზ და კმ+მიო ჯგუფებს შორის სარწმუნოდ განსხვავდებოდა და როგორც პროფილირების შედეგებით იყო მოსალოდნელი კმ+მიო ჯგუფში ის უფრო მაღალი იყო. მიკრო-რნმ-6216-ის სამიზნე ცილებია: ცილა თიროზინ ფოსფატაზას R ტიპის რეცეპტორი, მიტოგენ-აქტივირებული კინაზა 8 და სხვა ბევრი (იხ. <http://www.mirdb.org/>). აღნიშნულ კვლევაში ჩვენ არ შეგვისწავლია მათი სამიზნე ცილები და რა თქმა უნდა შემდეგ კვლევებში იქნება შესწავლილი.

ლიტერატურული მონაცემებიდან ცნობილია რომ კმ-ით გამოწვეული კრუნჩხვების და ეპილეპტოგენეზის დროს იცვლება რიგი მიკრო-რნმ-ის ექსპრესია (Jimenez-Mateos et al., 2011, Sano et al., 2012). მაგ. კრუნჩხვებს თან სდევს 25-მდე მიკრო-რნმ-ის დონის მომატება თავის ჰიპოკამპის CA3 ველში და მათგან ყველაზე ძლიერი მომატება მიკრო-რნმ-184-სათვის აღინიშნება. მიკრო-რნმ-134-ის გაჩუმება ასოცირებულია ნეიროპროტექციულ და კრუნჩხვების სუპრესიულ ეფექტებთან (Jimenez-Mateos et al., 2012). ამავე დროს მ კრუნჩხვებით გამოწვეულ ნეირონების სიკვდილს თან სდევს მიკრო-რნმ 34a-ს დონის მატება (Sano et al., 2012). ამ და ჩვენი მონაცემების პირდაპირი შედარება სწორი არ იქნებოდა, რადგან ექსპერიმენტებში შესწავლილია განსხვავებული დროის წერტილები და კმ-ც სხვადასხვა გზიტ არის შეყვანილი. საბოლოო ჯამში ჩვენი შედეგები მიუთითებს, რომ მიო-ინოზიტოლით დამუშავება ცვლის კმ-ით გამოწვეული ეპილეპტოგენეზისას მიკრო-რნმ-ის ექსპრესიას, რომელიც წარმოადგენს გენთა პოსტრანსკრიფციულ ექსპრესიის მნიშვნელოვან რეგულატორებს. არანაირი სტატისტიკურად სარწმუნო ცვლილებები არ გვინახავს მძჟ ცილა 1-ის შესწავლისას. შესწავლილი იყო: ჰიპოკამპი, ნეოკორტექსი და სისხლის პლაზმა ცხოველთა სხვადასხვა ჯგუფებში. უნდა აღინიშნოს, რომ ჩვენს მიერ შესწავლილი იყო ამ ცილის საერთო რაოდენობის ცვლილებები. ამავე დროს ნაჩვენებია მათი გარკვეული იზოფორმების ცვლილებების პათოლოგიური მდგომარეობის მიხედვით. მაგალითად მძჟ ცილა 1-ის დისულფიდური იზოფორმა წარმოიქმნება ტვინში ოქსიდაციური სტრესის დროს და მონაწილეობას უნდა ღებულობდეს კრუნჩხვებში, უჯრედული კარგვებში და კოგნიტიურ დისფუნქციებში (Ravizza et al., 2018). მიუხედავად იმისა, რომ ჩვენს ცდებში

არ იცვლებოდა ცილის საერთო რაოდენობა ჩვენ არ შეგვიძლია გამოვრიცხოთ მისი ზოგიერთი იზოფორმის სპეციფიკური ცვლილებები.

2.7. დასკვნები

1. კაინის მჟავით გამოწვეულ ეპილეფსიურ სტატუსზე მიო-ინოზიტოლის პოსტ-დამუშავება ხასიათდება ადრეული ეფექტებით და სარწმუნოდ ამცირებს აპოპტოზის პროცესში მონაწილე ბიოქიმიური პროცესების ინტენსივობას და უჯრედების კარგვას
2. მიო-ინოზიტოლის ერთ თვიან დამუშავებას კაინის მჟავით გამოწვეულ ეპილეპტოგენეზზე გააჩნია გრძელ-ვადიანი ეფექტები მისი აპლიკაციის შეწყვეტის შემდეგაც, კერძოდ ექსპერიმენტის დაწყებიდან 56-ე დღეზე:
 - 2.1. სარწმუნოდ გაზრდილია ნატრიუმ-მიო-ინოზიტოლის კოტრანსპორტერის დონე
 - 2.2. არ აქვს ადგილი მოცულობით-რეგულირებადი ანიონური არხის მთავარი სუბერთეულის მომატებას, რომელიც შეიმჩნევა მხოლოდ კაინის მჟავით დამუშავებულ ვირთაგვებში
 - 2.3. სარწმუნოდ იცვლება მიკრო-რნმ-ებს ექსპრესიის პროფილი.
3. განმეორებადი სპონტანური კრუნჩხვების ხანგძლივობა როგორც პირველი 28 დღის ასევე შემდეგი 4 კვირის განმავლობაშიც სარწმუნოდ არის შემცირებული
4. მიღებული მონაცემები წარმოადგენს პერსპექტიულ საფუძველს ეპილეპტოგენეზის კურსის შეცვლისათვის და ეპილეფსიის ჩამოყალიბების პრევენციული სტრატეგიისათვის და მიო-ინოზიტოლის შემდგომი შესწავლისათვის ტრანსლიაციურ კვლევებში.

2.8. გამოყენებული ლიტერატურა

1. Baran H. Alterations of taurine in the brain of chronic kainic acid epilepsy model. *Amino Acids* 31, 303–307 (2006).
2. Battaglia F. C. Meschia G. Blechner J. N. and Barron D. H. The free myo-inositol concentration of adult and fetal tissues of several species. *Quart. J. Exp. Physiol.* 46, 188–193 (1961).
3. Ben-Ari Y, Tremblay E. Riche D. Ghilini G. Naquet R. Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy, *Neuroscience* 6 1361–1391 (1981).
4. Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy, *Neuroscience* 14 375–403 (1985).
5. Bernstein B.W. and Bamburg J. R. ADF/Cofilin: a functional node in cell Biology. *ELSEVIER* doi:10.1016/j.tcb.2010.01.001 (2010).
6. Berry G.T., Mallee J.J., Kwon H.M., Rim J.S., Mulla W.R., Muenke M. & Spinner N.B. The human osmoregulatory Na⁺/myoinositol cotransporter gene (SLC5A3): molecular cloning and localization to chromosome 21. *Genomics* 25, 507–513 (1995)
7. Bindoff Laurence A. and Engelsen Bernt A. Mitochondrial diseases and epilepsy. *Epilepsia*, 53(Suppl. 4):92–97, (2012).
8. Birkenfield J, Betz H, Roth D. Identification of cofilin and LIM-domain containing protein kinase 1 as novel interaction partners of 14-3-3 zeta. *Biochem. J* 369:4554 (2003).
9. Blum, D.E. New drugs for persons with epilepsies. *Adv. Neurol.* 760, 57–87 (1998).
10. Bravo-Cordero Jose Javier, Magalhaes Marco A. O, Robert J. Eddy¹, Louis Hodgson and John Condeelis. Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, doi:10.1038/nrm3609 (2013).

11. Brooks-Kayal Amy R, Shumate Melissa D, Jin Hong, Rikhters Tatiana Y and Coulter Souglas A. Selective changes in single cell GABAA receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *Nature Medicine*, volume 4, number 10, 1166-72 (1998).
12. Bushati N. & Cohen S.M. (2008) microRNAs in neurodegeneration *Current Opinion in Neurobiology*, 18, 292–296.
13. Carninci P., Kasukawa T., Katayama S., Gough J., Frith MC, Maeda N. et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309, 1559–1563 (2005).
14. Cattani Adriano A., Camille Allene, Volker Seifert, Felix Rosenow, David C. Henshall, and Thomas M. Freiman Involvement of microRNAs in epileptogenesis. *Epilepsia*, 57(7):1015–1026, doi:10.1111/epi.13404 (2016).
15. Chuang Y.-C, Chang A. Y. W., Lin J.-W., Hsu S.-P., and Chan S. H. H., “Mitochondrial dysfunction and ultrastructural damage in the hippocampus during kainic acid–induced status epilepticus in the rat,” *Epilepsia*, vol. 45, no. 10, pp. 1202–1209, (2004).
16. Clements R.S.Jr & Diethelm A.G. The metabolism of myo-inositol by the human kidney. *J. Laboratory Clin. Med.* 93, 210–219 (1979).
17. Dietzel I., Heinemann U., Hofmeier G. and Lux H. D. Stimulus-induced changes in extracellular Na⁺ and Cl⁻ concentration in relation to changes in the size of the extracellular space. *Exp. Brain Res.* 46, 73–84 (1982).
18. Doherty GJ and McMahon HT. "Mediation, Modulation and Consequences of Membrane-Cytoskeleton Interactions". *Annual Review of Biophysics* 37: 65–95 (2008).
19. Dudek F. E., Obenaus A. and Tasker J. G. Osmolality-induced changes in extracellular volume alter epileptiform bursts independent of chemical synapses in the rat: importance of non-synaptic mechanisms in hippocampal epileptogenesis. *Neurosci. Lett.* 120, 267–270 (1990).
20. Engel J, Williamson P & Wieser H. Mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*, 2417-2426 (1997).
21. Fenili D, Weng Y-Q, Aubert I, Nitz M, McLaurin J Sodium/myo-Inositol Transporters: Substrate Transport Requirements and Regional Brain Expression in the TgCRND8 Mouse Model of Amyloid pathology. *PLoS ONE* 6(8): e24032. doi:10.1371/journal.pone.0024032 (2011).

22. Ferhat L. Potential role of drebrin a, an f-actin binding protein, in reactive synaptic plasticity after pilocarpine-induced seizures: functional implications in epilepsy. *Int J Cell Biol.* doi: 10.1155/2012/474351 (2012).
23. Fisher K.S., Novak J.E. & Agranoff B.W. Inositol and higher inositol phosphates in neuronal tissues: homeostasis, metabolism and functional significance. *J. Neurochem.* 82, 736–754 (2002).
24. Giblin Kathryn A. and Blumenfeld Hal. Is Epilepsy a Preventable Disorder? New Evidence from Animal Models. *Neuroscientist.*; 16(3): 253–275, (2010).
25. Goldstein L. and Davis E. Taurine, betaine, and inositol share volume-sensitive transporter in skate erythrocyte cell membrane. *Am. J. Physiol.* 267, R426–R431 (1994).
26. Greene N. D. and Copp A. J. Inositol prevents folate-resistant neural tube defects in the mouse. *Nat. Med.* 3, 60–66 (1997).
27. Guo W., Shimada S., Tajiri H., Yamauchi A., Yamashita T., Okada S. & Tohyama M. Developmental regulation of Na⁺/myo-inositol cotransporter gene expression. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 51, 91–96 (1997).
28. Hager K., Hazama A., Kwon H. M., Loo D. D., Handler J. S. & Wright E. M. Kinetics and specificity of the renal Na⁺/myo-inositol cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Membr. Biol.* 143, 103–113 (1995)
29. Handler J. S. and Kwon H. M. Cell and molecular biology of organic osmolyte accumulation in hypertonic renal cells. *Nephron* 87, 106–110 (2001).
30. Hauser G. & Finelli V.N. The biosynthesis of free and phosphatide myo-inositol from glucose in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.* 238, 3224–3228 (1963).
31. Henze K, Martin W. "Evolutionary biology: essence of mitochondria". *Nature* 426 (6963): 127–8 (2003).
32. Herman ST. Epilepsy after brain insult: targeting epileptogenesis. *Neurology* 59:S21–S26 (2002).
33. Holub B.J. Metabolism and function of myo-inositol and inositol phospholipids. *Annu. Rev. Nutr.* 6, 563–597 (1986).

34. Ibsen L. & Strange K. In situ localization and osmotic regulation of the Na⁺-myo-inositol cotransporter in rat brain. *Am. J. Physiol.* 271, 877–885 (1996).
35. Isaacks R. E., Bender A. S., Kim C. Y., Shi Y. F. and Norenberg M. D. Effect of osmolality and anion channel inhibitors on myo-inositol ef.ux in cultured astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 57, 866–871 (1999a).
36. Isaacks R.E., Bender A.S., Kim C.Y. & Norenberg M.D. Effect of osmolality and myo-inositol deprivation on the transport properties of myo-inositol in primary astrocyte cultures. *Neurochem. Res.* 22, 1461–1469 (1997).
37. Jackson P. S. and Madsen J. R. Identi.cation of the volumesensitive organic osmolyte/anion channel in human glial cells. *Pediatr. Neurosurg.* 27, 286–291 (1997).
38. Jiang WenJing, BinFeng Du, ZhaoFu Chi, Lin Ma, ShengJun Wang, XuHua Zhang, Wei Wu, XiaoHua Wang, GuangRun Xu, and ChunNi Guo. Preliminary Explorations of the Role of Mitochondrial Proteins in Refractory Epilepsy: Some Findings From Comparative Proteomics. *Journal of Neuroscience Research* 85:3160–3170 (2007).
39. Jimenez-Mateos E, M, I. Bray, A. Sanz-Rodriguez et al.,“MiRNA expression profile after status epilepticus and hippocampalneuroprotectionbytargetingmiR-132,”*TheAmerican JournalofPathology*,vol.179,no.5,pp.2519–2532 (2011).
40. Jimenez-Mateos E.M, T.Engel,P.Merino-Serraisetal.,“Silencing microRNA-134 produces neuroprotective and prolonged seizure-suppressiveeffects,”*Nature Medicine*, vol.18, no.7, pp. 1087–1094 (2012).
41. Kim J.E, Ryu H.J, Kim M.J, Kim D.W, Kwon O.S, Choi S.Y, Kang T.C. Pyridoxal-5'-phosphate phosphatase/chronophin induces astroglial apoptosis via actindepolymerizing factor/cofilin system in the rat brain following status epilepticus. *Glia J.* 58(16):1937-48 (2010).
42. Kotaria N., Kiladze M., Zhvania M.G., Japaridze N.J., Bikashvili T., Solomonias R.O., Bolkvadze TThe Protective effect of myo-inositol on hippocamal cell loss and structural alterations in neurons and synapses triggered by kainic acid-induced status epilepticus. *Cell. Mol. Neurobiology*, 33:659–671 (2013).

43. Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death and Differentiation* 14, 32–43 (2007).
44. Kwon H.M., Yamauchi A., Uchida S., Preston A.S., Garcia-Perez A., Burg M.B. & Handler J.S. Cloning of the cDNA for a Na⁺/myo-inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein. *J. Biol. Chem.* 267, 6297–6301 (1992).
45. Laborit, H. Gamma-hydroxybutyrate succinic semialdehyde and sleep. In: *Prog. Neurobiol.* (eds Kerkut, G.A. & Phillis, S.W.), vol.1, part 4, 255–274 (1973).
46. Lee J.H., Arcinue E. & Ross B.D. Brief report: organic osmolytes in the brain of an infant with hypernatremia. *N. Engl. J. Med.* 331, 439–442 (1994).
47. Lezza AM, Pesce V, Cormio A, et al. "Increased expression of mitochondrial transcription factor A and nuclear respiratory factor-1 in skeletal muscle from aged human subjects.". *FEBS Lett.* 501 (1): 74–8 (2001).
48. Lin M, Galetta B, Sept D, Cooper J. Overlapping and distinct functions for cofilin, coronin and Aip1 in actin dynamics in vivo. *J Cell Sci.* 123; 1329–1342 (2010).
49. Liu D-Z., Tian Y., Ander, B.P., Xu H., Stamova S., Zhan X., Turner R.J., Jickling G. and Sharp F.R Brain and blood microRNA expression profiling of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, and kainate seizures. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 30, 92–101 (2010).
50. Loscher Wolfgang and Brandt Claudia. Prevention or Modification of Epileptogenesis after Brain Insults: Experimental Approaches and Translational Research. *Pharmacol Rev* 62:668–700. (2010)
51. Lubrich B, Spleiss O, Gebicke-Haerter P. J. & van Calcar D. Differential expression, activity and regulation of the sodium/myo-inositol cotransporter in astrocyte cultures from different regions of the rat brain. *Neuropharmacology.* 39, 680–690 (2000).
52. Manford M, Hart YM, Sander JW & Shorvon SD. The National General Practice Study of Epilepsy. The syndromic classification of the International League Against Epilepsy applied to epilepsy in a general population. *Arch Neurol.*; 49(8), 801–808 (1992).

53. Matskevitch J., Wagner C. A., Risler T., Kwon H. M., Handler J. S., Waldegger S., Busch A. E. & Lang F. Effect of extracellular pH on the myo-inositol transporter SMIT expressed in *Xenopus* oocytes. *Pflügers Arch.* 436, 854–857 (1998).
54. Mattick JS & Makunin IV. Non-coding RNA. *Hum Mol Genet* 15, R17–R29 (2006).
55. McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. "Mitochondria: more than just a powerhouse". *Curr Biol.* 16 (14): R551–60 (2006 July).
56. McLaurin J., Golomb R., Jurewicz A., Antel J.P. & Fraser P.E. Inositol stereoisomers stabilize an oligomeric aggregate of Alzheimer amyloid β peptide and inhibit A β -induced toxicity. *J. Biol. Chem.* 275, 18495–18502 (2000).
57. Nonaka M., Kohmura E., Yamashita T., Yamauchi A., Fujinaka T., Yoshimine T., Tohyama M. & Hayakawa T. Kainic acid-induced seizure upregulates Na⁺/myo-inositol cotransporter mRNA in rat brain. *Mol. Brain Res.* 70, 179–186 (1999).
58. Novak J.E., Turner R.S., Agranoff B.W. & Fisher S.K. Differentiated human NT2-N neurons possess a high intracellular content of myo-inositol. *J. Neurochem.* 72, 1431–1440 (1999).
59. Novak J.E. Agranoff B.W. and Fisher S.K. Regulation of myoinositol homeostasis in differentiated human NT2-N neurons. *Neurochem. Res.* 25, 561–566 (2000).
60. Nozadze M. Mikautadze E. Lepsveridze E. Mikeladze E. Kuchiashvili N. Kiguradze T., Kikvidze M. & Solomon R. Anticonvulsant activities of myo-Inositol and scyllo-Inositol on pentylenetetrazol induced seizures. *Seizure:European Journal of Epilepsy*, 20, 173–176 (2011).
61. Pitkanen A. Efficacy of current antiepileptics to prevent neurodegeneration in epilepsy models. *Epilepsy Research*, 50, 141–160 (2002)
62. Porcellati F., Hlaing T., Togawa M., Stevens M.J., Larkin D.D., Hosaka Y., Glover T.W., Henry D.N., Greene D.A. & Killen P.D. Human Na⁺-myo-inositol cotransporter gene: alternate splicing generates diverse transcripts. *Am. J. Physiol.* 274, 1215–1225 (1998)
63. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II: motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32:281–294. [PubMed: 4110397] (1972).

64. Rahman S. Mitochondrial diseases and epilepsy. *Developmental Medicine & Child Neurology* 54: 397–406 (2012)
65. Ravizza T, Terrone G, Salamone et al. A., (2018) “High Mobility Group Box 1 is a novel pathogenic factor and a mechanistic biomarker for epilepsy,” *Brain, Behavior, and Immunity*, vol. 72, pp. 14–21.
66. Rowley N. M., Smith M. D., Lamb J. G., Schousboe A. and White H.S. “Hippocampal betaine/GABA transporter mRNA expression is not regulated by inflammation or dehydration post-status epilepticus,” *Journal of Neurochemistry*, vol. 117, no. 1, pp. 82–90, (2011).
67. Sano T, Reynolds J. P., E. M. Jimenez-Mateos, S. Matsushima, W. Taki, and D. C. Henshall, (2012) “MicroRNA-34a upregulation during seizure-induced neuronal death,” *Cell Death & Disease*, vol. 3, no. 3, article e287.
68. Schwartzkroin P. A, Baraban S. C, and Hochman D. W., “Osmolarity, ionic flux, and changes in brain excitability,” *Epilepsy Research*, vol. 32, no. 1–2, pp. 275–285, (1998).
69. Shoshan-Barmatz V, A. Israelson, D. Brdiczka and S.S. Sheu (2006) “The Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death,” *Current Pharmaceutical Design*, vol. 12, no. 18, pp. 2249–2270.
70. Shoshan-Barmatz V, Ben-Hail D, Admoni L, Krelin Y, and Tripathi S. S, “The mitochondrial voltage-dependent anion channel 1 in tumor cells,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)— Biomembranes*, vol. 1848, no. 10, Article ID 81730, pp. 2547– 2475 (2006).
71. Shoshan-Barmatz V, Israelson A, Brdiczka D and Sheu S.S, “The Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death,” *Current Pharmaceutical Design*, vol. 12, no. 18, pp. 2249–2270 (2015).
72. Shreter A.I. *Medicinal Herbs of Soviet Far East*. Moscow: Medicina, 105–106 (1975).
73. Sigal S.H., Yandrasitz J.R. & Berry G.T. Kinetic evidence for compartmentalization of myo-inositol in hepatocytes. *Metabolism* 42, 395–401 (1993)
74. Solomon R, Mchedlishvili Z. and Dalakishvili N. Anticonvulsant effect of water extract of *Aquilegia vulgaris* on audiogenically evoked seizures in Kroushinsky-Molodkina epileptic rats. *Bull. Georgian Acad. Sci.* 153, 270–272, (1996).

75. Solomonias R., Kuchiasvili N., Berulava A., Pkhakadze V., Trapaidze N., Zhvania M., Abesadze I., Kojima H. & Dalakishvili N. Purification and identification of components of the *Aquilegia vulgaris* extract fraction exhibiting anti-epileptic activity. *J. Biol. Phys. Chem.*, 4, 185-192 (2004).
76. Solomonias R., Mikautadze E., Nozadze M., Kuchiasvili N., Lepsveridze E., Kiguradze T. "Myo-Inositol treatment prevents biochemical changes triggered by kainate-induced status epilepticus" *Neuroscience Letters*, 468, 277-281 (2010).
77. Solomonias R., Nozadze M., Kuchiasvili N., Bolkvadze T., Kiladze M., Zhvania M., Kiguradze T. & Pkhakadze V. Effect of myo-inositol on convulsions induced by pentylenetetrazole and kainic acid in rats. *Bull Exp Biol Med.*, 143(1), 58-60 (2007).
78. Solomonias Revaz, Lepsveridze, E, Nozadze, M, Kiguradze. T. *Inositols and Epilepsy* . Nova Science Publishers. ISBN:978-1-62808-520-4, (2013)
79. Solomonias, R., Gogichaishvili, N., Nozadze, M., Lepsveridze, E., Dzeladze, D., Kiguradze. T. Myo-inositol treatment and GABA-A receptor subunit changes after kainate-induced status epilepticus. *Cell Mol Neurobiol.* 33, 119-127 (2013).
80. Stephenson F.A. GABAA receptors. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. London: Nature publishing Group (2001).
81. Strange K. Cellular volume homeostasis. *Adv. Physiol. Educ.* 28, 155–159 (2004).
82. Strange K., Morrison R., Heilig C.W., DiPietro S. and Gullans S.R. Upregulation of inositol transport mediates inositol accumulation in hyperosmolar brain cells. *Am. J. Physiol.* 260, C784–C790 (1991).
83. Strange K., Morrison R., Shrode L. and Putnam R. Mechanism and regulation of swelling-activated inositol efflux in brain glial cells. *Am. J. Physiol.* 265, C244–C256 (1993).
84. Sperk G, Schwarzer C, Tsunashima K, Kandlhofer S. Expression of GABA(A) receptor subunits in the hippocampus of the rat after kainic acid-induced seizures. *Seizure*;32(1-2):129-39 (1998).
85. Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M, Mattick JS. Non-coding RNAs: regulators of disease. *J Pathol.* 220(2), 126-39 (2010).

86. Treiman D.M. GABAergic Mechanisms in epilepsy. *Epilepsia* 42 (Suppl 3) 8-12 (2002).
87. Uldry M., Ibberson M., Horisberger J.D., Chatton J.Y., Riederer B.M. & Thorens B. Identification of a mammalian H (+)-myoinositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J.* 20, 4467–4477 (2001).
88. Videen J. S., Michaelis T., Pinto P. and Ross B. D. Human cerebral osmolytes during chronic hyponatremia. A proton magnetic resonance spectroscopy study. *J. Clin. Invest.* 95, 788–793 (1995).
89. Walker MC, White HS, Sander JW. Disease modification in partial epilepsy. *Brain* 125:1937–1950 (2002).
90. Wiese T.J., Dunlap J.A., Conner C.E., Grzybowski J.A., Lowe W.L. & Yorek M.A. Osmotic regulation of Na-myoinositol cotransporter mRNA level and activity in endothelial and neural cells. *Am. J. Physiol.* 270, C990–C997 (1996).
91. Williams Philip A., White Andrew M., Clark Suzanne, Ferraro Damien J., Waldemar Swiercz, KevinJ.Staley, and F.Edward Dudek. Development of Spontaneous Recurrent Seizures after Kainate-Induced Status Epilepticus. *J.Neurosci.*, 29(7):2103–2112 (2009).
92. Wolfson M., Bersudsky Y., Hertz E., Berkin V., Zinger E. & Hertz L. A model of inositol compartmentation in astrocytes based upon efflux kinetics and slow inositol depletion after uptake inhibition. *Neurochem. Res.* 5, 977–982 (2000).
93. Xie Y., Hou W., Song X et al., “Ferroptosis: process and function,”*Cell Death and Differentiation*, vol.23, no.3, pp.369– 379 (2016).
94. Yamashita T., Shimada S., Yamauchi A., Guo W., Kohmura E., Hayakawa T. & Tohyama M. Induction of Na⁺/myoinositol co-transporter mRNA after rat cryogenic injury. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 46, 236–242 (1997).
95. Yancey P.H. Clark M.E, Hand S.C, Bowlus R.D.Somero. G.NLiving with water stress: evolution of osmolyte systems, *Science J.* 217 1214–1222 (1993).
96. Yang Jixue, Fang He, Qiang Meng, Yang Sun, Weiwen Wang, Chao Wang. Inhibiting HIF-1@ Decreases Expression of TNF- α and Caspase-3 in Specific Brain Regions Exposed Kainic Acid-Induced Status Epilepticus. *Cell Physiol Biochem* 2016; 38; 75-82 (2016).

97. Zhu X. M. and Ong W. Y. Changes in GABA transporters in the rat hippocampus after kainate-induced neuronal injury: decrease in GAT-1 and GAT-3 but upregulation of betaine/GABA transporter BGT-1. *J. Neurosci. Res.* 77, 402–409 (2004).

2.9. ღანწართეზი

1. Tsverava L. Lordkipanidze T. Lepsveridze E., Nozadze M. Kikvidze M. Solomonias R (2016) Myoinositol Attenuates the Cell Loss and Biochemical Changes Induced by Kainic Acid Status Epilepticus," BioMed Research International, vol. Article ID 2794096, 14 pages, 2016. doi:10.1155/2016/2794096
2. Tsverava L. Kandashvili M., Margvelani G., Lordkipanidze T., Gamkrelidze G., Lepsveridze E., Kokaia M. Solomonias R. (2019) Long-Term Effects of Myoinositol on Behavioural Seizures and Biochemical Changes Evoked by Kainic Acid Induced Epileptogenesis. BioMed Research International, Volume 2019, Article ID 4518160, 14 pages, <https://doi.org/10.1155/2019/4518160>.