

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო
უნივერსიტეტი ზუსტ და საბუნებისმეტყველო
მეცნიერებათა ფაკულტეტი

სერგო გეგეჭკორი

სამეცნიერო კვლევითი პროექტი (1)

„ღვიძლის P-450 სისტემის Cyb5r3-კოფაქტორის როლი
ეპილეფსიის პათოგენეზში-ექპერიმენტული მოდელის შექმნა“

დოქტურანტურის პროგრამა-ბიოლოგია (ნეირობიოლოგია)

ხელმძღვანელი: ნანული დორეული, ბ.მ.დ.პროფესორი

თბილისი

2024

სარჩევი

ანოტაცია-----	3
Annotation-----	4
აქტუალობა-----	5
თავი I. ლიტერატურის მიმოხილვა-----	6
I.1.ეპილეფსია-თავის ტვინის ნეიროდეგენერაციული მდგომარეობა-----	6
I.2. აცეტილქოლინი და მისი როლი ჰიპოკამპის ფუნქციონირებაში-----	8
I.3.NADH-Cyb-5-რედუქტაზული სისტემა-----	9
თავი II. ELISA ტესტირების პროცედურები-----	10
II.1-კოფაქტორული ცილა-Cyb5-ის დონის განმსაზღვრელი ELISA კიტის პროცედურა-----	10
II.2- აცეტილქოლინის დონის განსმაზღვრელი ELISA კიტის პროცედურა-----	12
თავი III- მიღებული შედეგები და მათი ანალიზი-----	13
დასკვნა -----	16
გამოყენებული ლიტერატურა-----	17

ანოტაცია

ეპილეფსია თავის ტვინის, ისეთი ქრონიკული ნევროლოგიური მდგომარეობაა, რომელისთვისაც დამახასიათებელია ამაგზნებელ (*გლუტამატერგულ*) და შემაკავებელ (*გაემ-ერგულ*) სისტემებს შორის წონასწორობის დარღვევა. მისი არაერთი ფორმა ხასიათდება რეზისტენტობით სხვადასხვა ტიპის ანტიეპილეფსიური პრეპარატების მიმართ. აღნიშნული პრეპარატებით ამ პათოლოგიის მკურნალობისას გამოვლენილი არასასურველი გვერდითი ეფექტების გამო, კვლავაც აქტუალურ საკითხად რჩება ეპილეფსიის ზუსტი პათოფიზიოლოგიური მექანიზმების დადგენა, რაც სამომავლოდ მკურნალობის ახალი სტრატეგიის შემუშავებისთვის მნიშვნელოვანი წინაპირობა იქნება. თავის ტვინში ამაგზნებელ და შემაკავებელ ნეიროტრანსმიტერულ სისტემებს შორის ურთიერთობების ჩამოყალიბებაში მნიშვნელოვან როლს თამაშობს ქოლინერგული სისტემა. არსებული ლიტერატურის მონაცემებით ირკვევა, გაემ-ის ამაგზნებელი ფუნქციის შესახებ ადრეულ პოსტნატალურ პერიოდში. აქედან გამომდინარე ვივარაუდეთ, რომ ადრეულ პოსტნატალურ პერიოდში აცეტილქოლინის გამოთავისუფლებაში ცვლილებებმა შეიძლება შეცვალოს აგზნებითი პროცესების მიმდინარეობის თავისებურება თავის ტვინში. თავად აცეტილქოლინი ორი ნაერთის: ქოლინისა და აცეტილ-CoA-ს შეკავშირებით მიიღება, რომელთაგან უკანასკნელი (*აცეტილ-CoA*) აერობული გლიკოლიზის პროდუქტს წარმოადგენს. გლიკოლიზში ჩართული უამრავი ფერმენტის ნორმალური ფუნქციონირებისთვის აუცილებელია მათი დაკავშირება შესაფერის სუბსტრატთან, რაც ორგანიზმის მხრიდან მიიღწევა ღვიძლის P450 სისტემის მთავარი უნარის - ერთმანეთისაგან განარჩიოს ეგზო- და ენდოგენური სუბსტრატები- გამოყენებით. ღვიძლის ეს თვისება კი განსაზღვრულია კოფაქტორული ცილა-cyb5r3-ის არსებობით. მოცემულ ეტაპზე განხორციელებული სამეცნიერო კვლევითი პროექტის ფარგლებში შემუშავდა ცილა-cyb5r3-ის აქტივაციისთვის საჭირო ოპტიმალური ექსპერიმენტალური მოდელი და შევისწავლეთ ამ უკანასკნელის (*ცილა-cyb5r3-ის*) აქტივაციის ეფექტები ნეიროტრანსმიტერულ სისტემაზე.

Annotation

Epilepsy is a chronic neurological condition characterized by an imbalance between the excitatory and inhibitory systems in the brain. Some forms of epilepsy are resistant to traditional antiepileptic drugs, making it crucial to understand the underlying pathophysiological mechanisms for the development of new treatment strategies. The cholinergic system has been suggested to play a significant role in the interaction between excitatory and inhibitory neurotransmitter systems in the brain. Research indicates that acetylcholine, which is formed by combining choline and acetyl-CoA, may influence excitatory processes in the brain during the early postnatal period. Acetyl-CoA, a product of aerobic glycolysis, is necessary for the proper functioning of enzymes involved in glycolysis. The liver's P450 system, specifically the protein-cyb5r3, distinguishes between exogenous and endogenous substrates, allowing enzymes to connect with suitable substrates. In our ongoing scientific research project, we have developed an experimental model to activate the protein-cyb5r3 and will investigate its effects on the neurotransmitter system.

აქტუალობა

ეპილეფსია - ქრონიკული ნევროლოგიური მდგომარეობაა, რომელიც ხასიათდება განმეორებითი ტიპის გულყრებით და მსოფლიო მოსახლეობის 1%-ში გვხვდება, თუმცა იმ ადამიანთა რიცხვი, რომელთაც ერთხელ მაინც ქონიათ ეპილეფსიისთვის დამახასიათებელი გულყრა გაცილებით დიდია და 3-5%-ს შეადგენს (Browne et. al., 2001). ორგანიზმში კრუნჩხვითი აქტივობა მნიშვნელოვან უარყოფით ეფექტს იწვევს. ამასთან ეპილეფსიით დაავადებულები ხშირად ხასიათდებიან რიგი ნევროლოგიური, ფსიქოლოგიური და ქცევითი ხასიათის პრობლემებით, როგორიცაა: კოგნიტური დეფიციტი, მეხსიერების დარღვევა და სხვა. ეპილეფსიის გავლენით თავის ტვინში მნიშვნელოვანი სტრუქტურული ცვლილებები ვითარდება. აღნიშნული ცვლილებების სტრუქტურულ კორელატს ჰიპოკამპსა და ახალ ქერქში ერთეული და ხანმოკლე კრუნჩხვების საპასუხოდ განვითარებული ნეირონების დაღუპვა წარმოადგენს. სწორედ საფეთქლის წილის ეპილეფსიის შემთხვევაში ეპილეპტიფორმული განმუხტვებით გამოწვეულ ნეირონულ კვდომასთან არის დაკავშირებული მეხსიერების დეფიციტი (Robert D. G. Blair 2012).

ლიტერატურის მონაცემები ცხადყოფს, რომ ეპილეფსიის პათოგენეზში წამყვანი ადგილი უჭირავს ამაგზნებელ-გლუტამატერგულ და შემაკავებელ-გაემერგულ სისტემებს შორის არსებულ დისბალანსს ამაგზნებელი ნეიროტრანსმიტერული სისტემის სასარგებლოდ. ჭარბი გლუტამატერგული ნეიროტრანსმისია შესაძლებელია განპირობებული იყოს გლუტამატერგულ ნეირონებზე არსებული როგორც იონოტროპული (ნიკოტინური/nAch), ისე მეტაბოტროპული (მუსკარინულ/M1,M3,M5) რეცეპტორების აცეტილქოლინით გააქტივებისას. (Drever et al., 2011); გაზრდილი აცეტილქოლინის პირობებში სავარაუდოა ხსენებული ეფექტების გაძლიერება, მით უფრო იმის გათვალისწინებით, რომ ადრეულ პოსტნატალში შემაკავებელი გაემერგული ნეიროტრანსმიტერული სისტემაც კი ამაგზნებელი თვისებებით გამოირჩევა (Acosta G.B,2017).

თავი I – ლიტერატურული მიმოხილვა

I.1. ეპილეფსია-თავის ტვინის ნეიროდეგენერაციული მდგომარეობა

ჯანდაცვის მსოფლიო ორგანიზაციის მონაცემებით განვითარებადი ქვეყნებში მცხოვრები ეპილეფსიით დაავადებული ადამიანების დაახლოებით 80-90% საერთოდ ვერ ღებულობს მათთვის საჭირო სამედიცინო სერვისსა და ანტიეპილეფსიურ მედიკამენტებს (Epilepsy in the WHO European region, 2010), ეს კი იმის გათვალისწინებით, რომ პლანეტის მოსახლეობის 80%-ზე მეტი განვითარებადი ქვეყნების მოსახლეობას წარმოადგენს და ეპილეფსიით დაავადებული მოსახლეობის სულ მცირე 80% სწორედ ასეთ ქვეყნებზე მოდის, რომლებთაც არ აქვთ საკმარისად მაღალი სამედიცინო მომსახურება და რომლებთაც არ შეუძლიათ შესაბამისად უზრუნველყონ აღნიშნული პათოლოგიით დაავადებულ პირთა ადექვატური მართვა. დღეის მონაცემებით კი მსოფლიოს მასშტაბით ვღებულობთ ეპილეფსიით დაავადებულ 50 მილიონზე მეტ ადამიანს (www.who.int). საქართველოში ჩატარებული ეპიდემიოლოგიური კვლევების მიხედვით (2008-2011) ყოველი 1000-დან ეპილეფსია აღენიშნება 8.8-ს, რაც ნიშნავს, რომ ქვეყანაში ეპილეფსიით დაავადებულია 35 000-მდე ფიზიკური პირი (www.moh.gov.ge). ეპილეფსიის წინააღმდეგ ბრძოლის საერთაშორისო ლიგისა (ILAE) და ეპილეფსიის საერთაშორისო ლიგის (IBE) განმარტების თანახმად ეპილეფსია წარმოადგენს თავის ტვინის ქრონიკულ ნეიროდეგენერაციულ პათოლოგიას, რომელისთვისაც დამახასიათებელია რეკურენტული მიდრეკილება გულყრებისადმი. ეს უკანასკნელი თავის ტვინში პაროქსიზმული ელექტრული განმუხტვის კლინიკურ გამოვლინებას წარმოადგენს. ეპილეფსიის საერთაშორისო ლიგის (IBE) მიერ დადგენილი დეფინიციების მიხედვით განირჩევა გულყრების ორი ერთმანეთისაგან თვისობრივად განსხვავებული ფორმა: 1) ფოკალური / პარციალური / კეროვანი გულყრა, რომლისთვისაც დამახასიათებელია მიმდინარე პათოლოგიის უბნის შემოსაზღვრულობა და ამასთან მშვნილობა არ აქვს მეორეული გავრცელების (გენერალიზაციის) შედეგად აღნიშნულ პროცესში ჩაერთვება თუ არა ქერქსის სხვა უბნებიც; 2) გენერალიზირებული ფორმის გულყრა, როდესაც ორივე ჰემისფეროში თანადროულად აღმოცენდება ზეუბურბლოვანი განმუხტვები, რაც არ იძლევა საშუალებას იდენტიფიცირდეს

ანატომიურად შემოსაზღვრული ლოკალური ტერიტორია (ILAE: EpilepsyDiagnosis.org).

ეპილეფსიის გამომწვევი მიზეზები ხშირად დაუდგენელია. ვარაუდობენ მრავალი ფაქტორის გავლენას, მათ შორისაა: თავის ტვინის ტრავმა, ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში სისხლის მიმოქცევის მნიშვნელოვანი დარღვევები, თავის ტვინის სიმსივნე, ალკოჰოლის და სხვა ადიქციური ნივთიერებების უკონტროლო მოხმარება და სხვ. რომელთა ზემოქმედებით ვითარდება ზედმეტად მოჭარბებული ან ჰიპერსინქრონული ნეირონული აქტივობები, რომელთა გამოვლენის ძირითად მიზეზად უნდა გვევლინებოდეს წონასწორობის დარღვევა ამაგზნებელ და შემაკავებელ ნეირომედიატორულ სისტემებს შორის. ხშირად განმეორებადი კრუნჩხვების ფონზე დროთა განმავლობაში იზრდება შანსი, რომ თავის ტვინის ეპილეპტოგენურ უბნებში დაიღუპოს დიდი რაოდენობით ნეირონები. ამის მიუხედავად არსებობს ექსპერიმენტული კვლევები რომელთა საფუძველზეც მიიჩნევა, რომ მსგავსი სტრუქტურული ცვლილებები ეპილეფსიის მხოლოდ გარკვეული ფორმის დროს ვითარდება (Guo, D; et al.,2012). ნაჩვენებია, რომ უჯრედების დაღუპვის გამომწვევი მექანიზმების გარდა ეპილეფსიის პათოგენეზში სხვა ისეთი მექანიზმებიც უნდა იყვნენ ჩართულები, რომლებთაც შეუძლიათ გამოიწვიონ ეპილეფსიისთვის დამახასიათებელი კონგტიური ცვლილებები. ნათელია აღნიშნული მექანიზმების ზუსტი ანალიზი სამომავლოდ შესაძლებელს გახდის შექმნილიყო საკუთრივ ანტიეპილეფსიური პრეპარატები.

I.2. აცეტილქოლინი და მისი როლი ჰიპოკამპის ფუნქციონირებაში

ჰიპოკამპის შიგა წრეებში აცეტილქოლინისთვის დამახასიათებელი მრავალფეროვანი ფუნქციები განპირობებულია მის რეცეპტორთა ორი დიდი კლასის აქტივობით: მუსკარინული (mAChRs) და ნიკოტინური ქოლინერგული რეცეპტორებით (nAChR) (Drever et al., 2011). სინაფსურ ნაპრალში გამოთავისუფლების შემდეგ აცეტილქოლინი ზემოქმედებს როგორც მუსკარინულ (mAChRs), ისე ნიკოტინურ (nAChRs) ქოლინერგულ რეცეპტორებზე და მათი აქტივაციის გზით ცვლის უჯრედის აგზნებადობის ხარისხს. nACh რეცეპტორების გააქტიურებით გამოწვეული სწრაფი პასუხისაგან განსხვავებით, G-ცილასთან დაკავშირებული mACh რეცეპტორები გენერირებენ ნელ პასუხებს (Ge, S 2005). M ქოლინერგული რეცეპტორები შვიდი ტრანსმემბრანული დომენის შემცველი მეტაბოტროპული რეცეპტორებია და გააჩნიათ ორ კლასად, ხუთი ფარმაკოლოგიურად განსაზღვრული იზოფორმით - M1-M5. მუსკარინული რეცეპტორები M1, M3, და M5 დაკავშირებული არიან Gq ცილასთან და Gi ცილასთან - M2 და M4. In vitro კვლევებით ნაჩვენებია, რომ აცეტილქოლინს ჰიპოკამპში შეუძლია გლუტამატ-ერგული/გაემ-ერგული ტრანსმისიის როგორც დათრგუნვა, ისე გაადვილება. სინაფსური ტრანსმისიის დათრგუნვა გამოიწვევა პრესინაპსური mACh რეცეპტორების (M2 და M4) აქტივაციით, რაც ამცირებს პრესინაპსური ძაბვა-დამოკიდებული Ca^{2+} არხების განვლადობას. ჰიპოკამპში M1 რეცეპტორები უპირატესად წარმოდგენილია პირამიდული და მარცვალა ნეირონების სხეულსა და დენდრიტებზე. მათი აცეტილქოლინით გააქტივება იწვევს NMDA პასუხების გაძლიერებას; მაშინ როცა Gi შეწყვილებული M2, M4 მუსკარინული რეცეპტორები ბლოკავენ შემაკავებელი გაემ-ერგული ნეირონების აქტივობას (<https://digital.csic.es/handle/10261/220515>; Ge, S 2005).

I.3. NADH-Cyb5-რედუქტაზული სისტემა

Cyb5 არის მცირე ზომის ცილა, რომელიც არაერთი, მათ შორის NADPH-დამოკიდებული ციტქრომ P-450 მონოოქსიგენური სისტემისთვისაც, მნიშვნელოვან კოფაქტორს წარმოადგენს. სპეციფიკური ციტოქრომ P-450-ით კატალიზებული ზოგიერთი ფერმენტული რეაქცია ოპტიმალური აქტივობისთვის სწორედ Cyb5-ს საჭიროებს, რაც სავარაუდოდ იმით არის გამოწვეული, რომ ციტოქრომ b5 ცვლის P-450-ის აფინურობას ენდო- თუ ეგზოგენური სუბსტრატების მიმართ (Plitzko, B; et.al. 2016; Tomas M.Devlin “textbook of Biochemistry with clinical correlations”. Publication-a john and sons INC. page 415). აქედან გამომდინარე ხსენებული სისტემის ბოლიკრებამ შესაძლოა გამოიწვიოს ციტოქრომული სისტემის მგრძნობელობის შემცირება ისეთი ენდოგენური სუბსტრატები მიმართ, როგორცაა: ფერმენტები, ჰორმონები, პროტეინები, ცხ.მჟავები, და სხვ. მათ შორის შესაძლებელია შემცირდეს აფინურობა ისეთი ფერმენტებისა თუ ჰორმონების მიმართ, რომლებიც ჩართულნი არიან გლიკოლიზის პროცესში. რამაც სავარაუდოა შეამციროს აერობული გლიკოლიზის სიხშირე და საბოლოოდ დააქვეითოს აცეტილ-CoA-ს წარმოქმნა. ეს უკანასკნელი მნიშვნელოვან კომპონენტს წარმოადგენს აცეტილქოლინის სინთეზში, ამდენად იქმნება საფუძველი თავისუფალი ქოლინის დაგროვებისთვის.

თავი II. ELISA ტესტირება, პროცედურები

II.1. კოფაქტორული ცილა-Cyb5-ის დონის განმსაზღვრელი ELISA კიტის პროცედურა

ღვიძლის NADH-Cyb5 რედუქტაზული სისტემის დონის დასადგენად გამოვიყენეთ შესბამისი ELISA კიტი (Cyb5r3 elisa kit: Rat NADH-cytochrome b5 reductase 3 ELISA Kit). საკვლევ მასალად გამოვიყენეთ ცდის ჯგუფის ცხოველების სისხლი, რომელიც სწრაფი დეკაპიტაციის შემდეგ შედედების თავიდან აცილების მიზნით შევავროვეთ ჰეპარინიან სინჯარაში და შემდეგ დავაცენტრიფუგეთ 15 წუთით 1000 rpm-ზე. პროცედურის დაწყებამდე ELISA კიტი 30 წუთის მანძილზე გადაგვქონდა -20 გრადუსიდან ოთახის ტემპერატურაზე, იმავე პერიოდში კიტის შემადგენლობაში არსებული washing buffer-ის გამოყენებით მზადდებოდა გამრეცხი ხსნარი: 375 მლ გამოხდილი წყალში ვამატებთ 15 მლ wash buffer-ს. კვლევისთვის მომზადა ექვსი „სინჯარა“ სხვადასხვა კონცენტრაციის ხსნარებისთვის: 5.00, 2.50, 1.25, 0.62, 0.31, 0.15 ng/ml. პროცედურის დაწყებამდე წინასწარ მომზადებული wash buffer-ის გამოყენებით ELISA plate გავრეცხეთ 2-ჯერ.

1- თითოეული სინჯარა წინასწარ შევავსეთ 300-300 მკლ simple diluent-ი. ამის შემდეგ ამავე ოდენობის (300 მკლ) simple diluent-ი დავამატეთ stanrad-ს, რომელიც კიტს მოყვებოდა. შემდეგ ამ უკანასკნელიდან ამოვიღეთ 300 მკლ ხსნარი და დავამატეთ პირველ „სინჯარას, ნომინალით-5.00 ng/ml, შემდეგ ამ უკანასკნელიდან (პირველი სინჯარიდან) ამოვიღეთ კვლავ 300 მკლ ხსნარი და დავამატეთ მომდევნო სინჯარას, ნომინალით-2.50 და ა.შ. ბოლო სინჯარამდე - 0.15 ng/ml.

2- ELISA plate-ის თითოეულ ფოსოში საკონტროლო და ჯანმრთელი ცხოველების ნიმუშების 3-3 ასლი (თითო, თითო ფოსოში) სქემის მიხედვით, დავამატეთ უკვე მომზადებული სტანდარტი 100-100 მკლ-ი. ამის შემდეგ პროტოკოლის შესაბამისად

თერმოსტატში მოვათავსეთ 37°C-ზე, 90 წუთით.

3- ინკუბაციიდან 60 წუთის შემდეგ დამზადდა Biotin-labeled Antibody, რომელიც გაიხსნა 1:100 პროპორციით Antibody Dilution Buffer-ში

4- ინკუბაციის დასრულების (90წუთი) შემდეგ ELISA plate-ი გავრეცხეთ ორჯერ 220 მლ

გამრეცხი ხსნარის (Wash buffr-375 მლ გამოხდილი წყალი დამატებული 15 მლ wash buffer-ი) დამატებით.

5- გარეცხვის პროცედურის გარეშე plate-ზე თითოეულ ფოსოში დავამატეთ უკვე გამზადებული Biotin-labeled Antibody და კვლავ დავაბრუნეთ თერმოსტატში 37°C-ზე, 1 საათით

6- ინკუბაციის დაწყებიდან 30 წუთის შემდეგ დამზადდა HRP-Streptavidin Conjugate (SABC) 1:100 პროპორციით SABC Dilution Buffer

7- თერმოსტატში 1 საათიანი დაყოვნების შემდეგ გამოვიტანეთ და გავრეცხეთ 3-ჯერ, 2

წუთიანი დაყოვნებით. 220 მლ გამრეცხი ხსნარის (Wash buffr-375 მლ გამოხდილი წყალი დამატებული 15 მლ wash buffer-ი) დამატებით.

8- დავამატეთ უკვე წინასწარ მომზადებული HRP-Streptavidin Conjugate (SABC) 100-100

მკლ თითოეულ ფოსოში. Plate დავხურეთ ჰერმეტიულად და დავაბრუნეთ თერმოსტატში 30 წუთით.

9- თერმოსტატში 30 წუთიანი დაყოვნების შემდეგ გამოვიტანეთ და გავრეცხეთ 5-ჯერ (Wash buffr-375 მლ გამოხდილი წყალი დამატებული 15 მლ wash buffer-ი 220 მლ კონცენტრაციით). ყოველ ჯერზე 2 წუთიანი დაყოვნებით.

10- ამ ეტაპზე დავამატეთ წინასწარ, მზა ფორმით მოწოდებული TMB Substrate 90ul

თითოეულ ფოსოში და კვლავ თერმოსტატში 10-20 წუთის განმავლობაში. თერმოსტატში ყოფნის დრო დამოკიდებულია ფერის შეცვლის სიჩქარეზე.

11- ბოლო ეტაპზე თერმოსტატიდან გამოტანის შემდეგ გარეცხვის პროცედურის

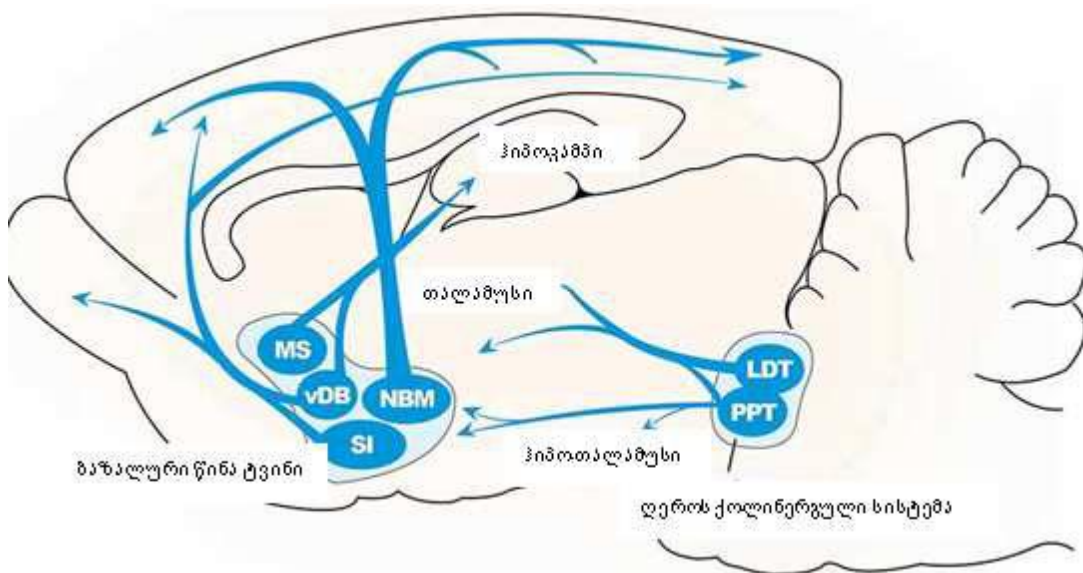
ჩატარების გარეშე, მაშინათვე თითოეულ ფოსოში დავამატეთ 50ul Stop Solution.

აღნიშნულის ზემოქმედებით ფერი იცვალა და მყისიერად გახდა ყვითელი შეფერილობის.

12- მომდევნო 10 წუთი მანძილზე მოხდა ELISA plate-ის წაკითხვა O.D. 450nm ტალღის სიგრძეზე.

II.2. აცეტილქოლინის დონის განსმარდგნული ELISA კიტის პროცედურა

აცეტილქოლინის დონის დასადგენად გამოვიყენეთ შესბამისი ELISA კიტი, ხოლო საკვლევ მასალად გამოვიყენეთ ცხოველთა თავის ტვინი, რომელიც სწრაფი დეკაპიტაციის მერე ამოვიღეთ თავის ქალადან და დავყავით წინა და უკანა ნაწილებად ქვემოთ მოცემული სქემის მიხედვით (იხ.სურ 1).



სურათი 1: ქოლინერგული პროექციები ტვინის წინა და უკანა ნაწილებში

პროცედურის დაწყებამდე ELISA კიტი 30 წუთის მანძილზე გადაგვქონდა -20 გრადუსიდან ოთახის ტემპერატურაზე, იმავე პერიოდში კიტის შემადგენლობაში არსებული washing buffer-ის გამოყენებით მზადდებოდა გამრეცხი ხსნარი. ამსონა32

დამზადდა შესაფერისი სტანდარტები წესების დაცვით.

კიტის მომზადების ეტაპები თანმიმდევრობით:

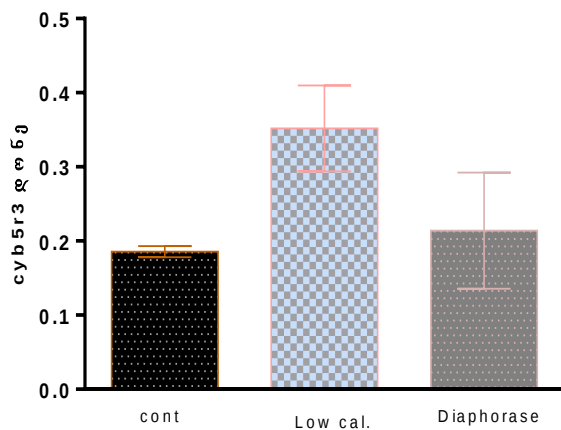
1. ცხრილის მიხედვით შესაბამის ფოსოებში დაემატა სტანდარტების შესაფერისი კონცენტრაციები - თითოეულში 50 მკლ-ის ოდენობით.
2. საკვლევი ნიმუშები შევიტანეთ მათთვის განკუთვნილ ფოსოებში **40 მკლ** ოდენობით და შემდეგ დავამატეთ ნიმუშების ფოსოებში **10 მკლ anti-ACH antibody**, შემდეგ კი დავამატეთ **50 მკლ streptavidin-HRP** ნიმუშისა და სტანდარტის ფოსოებსაც, მაგრამ არა ე.წ. BLANK- ისთვის განკუთვნილ ფოსოებს.
3. ჰერმეტიკულად დახურვის მერე შევინახე თთერმოსტატში 60 წუთით 37 გრადუსზე;
4. საფარიც მოცილების შემდეგ გაირეცხა 5-ჯერ wash biffer-ით. თითოეულ ფოსოში 300 მკლ wash buffer-ი 30 წამით ან *1 წუთით*;
5. გარეცხვა გამშრალების პროცედურების შემდეგ თითოეულ ფოსოს დაემატა **50 მკლ substrate solution A** ამის შემდეგ დაემატა **50 მკლ substrate solution B** თითოეულ ფოსოს.
6. გამზადდა ინკუბაციისთვის 10 წუთის მანძილზე;
7. ბოლოს თითოეულს ფოსოში დაემატა **50 მკლ** ოდენობით **Stop Solution** , რომლის შემდეგაც ფერი შეიცვალა-გაყვითლდდა;
8. ამის შემდეგ კი დაუყოვნებლივ გავუშვი წასაკითხად მომდევნო 10 წუთის მანძილზე, O.D. 450nm ტალღის სიგრძეზე;

თვი III. მიღებული შედეგები და მათი ანალიზი

ექსპერიმენტის მიმდინარეობისას კოფაქტორული ცილის გასააქტივებლად გამოვიყენეთ ორი განსხვავებული მიდგომა: Diaphorase-ს ინტრაპერიტონეალური ინექცია და დაბალკალორიული ტიპის კვება.

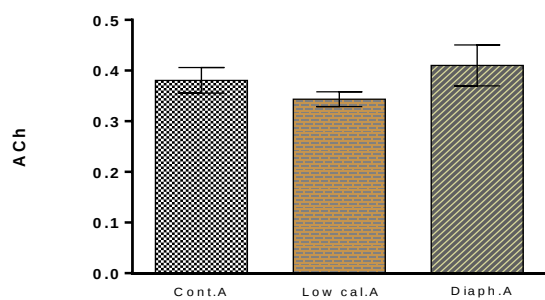
კონტროლის, Diaphorase ინექცირებულ და დაბალ კალორიულ კვებაზე მყოფი ცხოველების ცხოველების სისხლის პლაზმაში შესაბამის ELISA კიტის (Cyb5r3 elisa

kit: Rat NADH-cytochrome b5 reductase 3 ELISA Kit). გამოყენებით განისაზღვრა NADH-Cyb5 რედუქტაზული სისტემის აქტივობა. მონაცემების დამუშავების შედეგად აიგო სტანდარტული მრუდი. ცდის ჯგუფებში მიღებული მონაცემების საშუალო მნიშვნელობები + საშუალო სტანდარტული გადახრები წარმოდგენილია ჰისტოგრამების სახით (სურათზე 2).

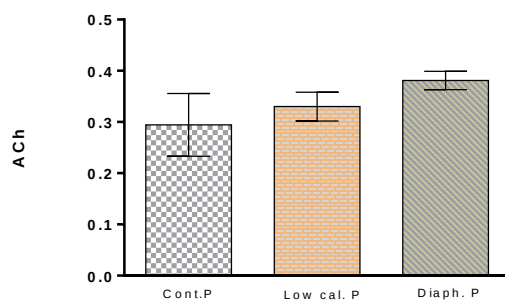


სურ 2: ჰისტოგრამზე წარმოდგენილია *cyb5r3* ცილის საშუალო მაჩვენებლები + ს.შ. სტანდარტული გადახრით

მიღებულმა შედეგმა აჩვენა, რომ Diaphorase ინექცირებულ ცხოველებში ($mean=0.214$) კონტროლის ჯგუფის ცხოველებთან ($mean=0.185$) შედარებით უმნიშვნელოდ გაიზარდა კოფაქტორული ცილის საშუალო მნიშვნელობა ($Mean_{(კონტრ.)}=0.185$; $Mean_{(Diaph)}=0.214$); მეტად თვალსაჩინო ცვლილება იქნა ნანახი დაბალკალორიულ კვებაზე მყოფი ჯგუფის ცხოველებისა და კონტროლის ჯგუფის ცხოველების კოფაქტორული ცილის საშუალო მაჩვენებლებებს შორის ($Mean_{(კონტრ.)}=0.185$; $Mean_{(Low cal)}=0.325$); კოფაქტორული ცილის დონის ცვლილების პარალელურად შეიცვალა თავის ტვინის წინა და უკანა ნაწილებში აცეტილქოლინის საშუალო მაჩვენებლები როგორც დაბალ კალორიულ კვებაზე მოფ ცხოველებში, ისე Diaphorase-ინექცირებულ ცხოველებში (სურ 3; სურ 4).



სურ 3: აცეტილქოლინის საშუალო მაჩვენებლები, საშუალო სტანდარული გადახრით თავის ტვინის ქინა ნაწილში.



სურ 4: აცეტილქოლინის საშუალო მაჩვენებლები, საშუალო სტანდარული გადახრით თავის ტვინის უკანა ნაწილში.

დასკვნა

მიღებული მონაცემების საფუძველზე შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ ციტოქრომული სისტემის აქტივაცია როგორც დიაგნოზი, ასევე დაბალკალორიული კვებით იწვევს აცეტილქოლინის დონის მატებას და შესაძლებელია აღნიშნული მიდგომა გამოყენებულ იქნას შემდგომი კვლევებისთვის ეპილეფსიის პათოგენეზის მექანიზმების შესასწავლად. ამასთან, საჭიროა ამ მიმართულებით კვლევების გაგრძელება.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. Gabriela Beatriz Acosta. Early Life Experience, Maternal Separation, and Involvement of GABA and Glutamate Transporters Published: December 20th, 2017 DOI: 10.5772/intechopen.70868;
2. [Luis V Colom](#) 1, [Maria T Castaneda](#), [Tania Reyna](#), [Sofia Hernandez](#), [Emilio Garrido-Sanabria](#) Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus Synapse. 2005 Dec 1;58(3):151-64. DOI: [10.1002/syn.20184](#);
3. Muro VM, Connolly MB. 2014. Classifying epileptic seizures and epilepsies. In Epilepsy (ed. Miller JW, Goodkin HP), pp. 10–14. Wiley, Chichester, UK. [[Google Scholar](#)]
4. [Anne T Berg](#) 1, [Samuel F Berkovic](#), [Martin J Brodie](#), [Jeffrey Buchhalter](#), [J Helen Cross](#), [Walter van Emde Boas](#), [Jerome Engel](#), [Jacqueline French](#), [Tracy A Glauser](#), [Gary W Mathern](#), [Solomon L Moshé](#), [Douglas Nordli](#), [Perrine Plouin](#), [Ingrid E Scheffer](#) Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009 Epilepsia. 2010 Apr;51(4):676-85. PMID: 20196795 DOI: [10.1111/j.1528-1167.2010.02522.x](#)
5. [Dongjun Guo](#), [Sarah Arnsperger](#), [Nicholas R. Rensing](#), and [Michael Wong](#) Brief Seizures Cause Dendritic Injury Neurobiol Dis. 2012 Jan; 45(1): 348–355. DOI: [10.1016/j.nbd.2011.08.020](#)
6. [Benjamin D Drever](#) 1, [Gernot Riedel](#), [Bettina Platt](#). The cholinergic system and hippocampal plasticity. Behav Brain Res. 2011 Aug 10;221(2):505-14. DOI: [10.1016/j.bbr.2010.11.037](#)
7. [Robert D. G. Blair](#) Temporal Lobe Epilepsy Semiology [Epilepsy Res Treat](#). 2012; 2012: 751510. DOI: [10.1155/2012/751510](#)
8. Löscher W. Strategies for antiepileptogenesis: Antiepileptic drugs versus novel approaches evaluated in post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. In: Noebels J.L., Avoli M., Rogawski M.A., Olsen R.W., Delgado-Escueta A.V., editors. Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. 4th ed. National Center for Biotechnology Information; Bethesda, MD, USA: 2012. [[Google Scholar](#)]
9. [Linda Kalilani](#), [Xuezheng Sun](#) 1, [Barbara Pelgrims](#), [Matthia Noack-Rink](#), [Vicente Villanueva](#) The epidemiology of drug-resistant epilepsy: A systematic review and metaanalysis Epilepsia 2018 Dec;59(12):2179-2193. DOI: [10.1111/epi.14596](#)