

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი
ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი

სერგო გეგეჭკორი

„NADH-Cyb5-რედუქტაზას ინჰიბირების გავლენა ქოლინერგული
სისტემის ფუნქციონირებასა და ჰიპოკამპში ეპილეფტიფორმულ
აქტივობაზე“

სამაგისტრო პროგრამა - ბიოლოგია (ნეირობიოლოგია)

სამაგისტრო ნაშრომი შესრულებულია ბიოლოგიის მაგისტრის აკადემიური
ხარისხის მოსაპოვებლად

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

თბილისი

2022

სარჩევი

სარჩევი	2
Error! Bookmark not defined. ანოტაცია	4
Annotation	6
შესავალი	7
თავი I. ლიტერატურის მიმოხილვა.....	9
I.1 ეპილეფსია-თავის ტვინის ნეიროდეგენერაციული მდგომარეობა	9
I.2 ჰიპოკამპი მისი როლი თავის ტვინის აქტივობაში	10
I.3. ჰიპოკამპის ინტერნეირონები	12
I.4. ჰიპოკამპის შიდა და გარე პროექციები	13
I.5. ჰიპოკამპის შიდა კავშირები.....	15
I.6. აცეტილქონი და მისი როლი ჰიპოკამპის ფუნქციონირებაში	16
I.7. NADH-Cyb5-რედუქტაზული სისტემა	17
თავი II. მეთოდика	18
II.1. ცდის ობიექტი.....	18
II.2. ქცევითი ექსპერიმენტი - ღია ველის ტესტი	19
II.3. ელექტროფიზიოლოგიური ექსპერიმენტი.....	20
II.4. ELISA ტესტირება, პროცედურები	21
II.4.1. NADH-Cyb5 რედუქტაზული სისტემის ELISA ტესტირების პროცედურა	21
II.4.2. GABA ELISA Kit ტესტირების პროცედურა	22
II.4.3. ქოლინისა და აცეტილქოლინის დონის განსაზღვრის პროცედურა.....	24
თავი III. შედეგები და მათი ანალიზი	25
III.1. პტუ-ს გავლენა NADH-Cyb5 რედუქტაზული სისტემის ინჰიბირებაზე და ELISA ანალიზი	25
III.2. NADH-Cyb5 რედუქტაზული სისტემის ინჰიბირებით განპირობებული ცვლილებები გაემ-ერგულ სისტემაში. გაემ-ELISA Kit-ის ტესტირების შედეგები	26
III.3. NADH-Cyb5 რედუქტაზული სისტემის ინჰიბირების გავლენა ქოლინისა და აცეტილქოლინის დონეზე.	27
III.4. NADH-Cyb5 რედუქტაზული სისტემის ინჰიბირების გავლენა ქცევით მახასიათებლებზე.	

„ღია ველის“ მონაცემები	29
III.5. NADH-Cy5 რედუქტაზული სისტემის ინჰიბირების გავლენა ელექტროფიზიოლოგიურ მონაცემებზე.....	31
თავი IV -----	39
დასკვნა	40
გამოყენებული ლიტერატურა -----	41

ანოტაცია

ეპილეფსია გულყრებისადმი რეკურენტული მიდრეკილების მქონე ქრონიკული, პროგრესირებადი დაავადებაა. მისთვის დამახსიათებლმა გახშირებულმა კრუნჩხვითმა აქტივობებმა შესაძლოა თვის ტვინის ისეთ მაღალეპილეფტოგენურ სტრუქტურაში, როგორც ჰიპოკამპია, ნეირონული კვდომით განპირობებული სტრუქტურულ/ფუნქციური ცვლილებები გამოიწვიოს. ჰიპოკამპში უხვად არის წარმოდგენილი როგორც გლუტამატერგული, ისე ქოლინერგული პროექციები. აცეტილქოლინი, რომელიც ქოლინისა და აეროზული გლიკოლიზის შედეგად მიღებული - აცეტილ-CoA-ს დაკავშირებით წარმოიქმნება, ნერვულ სისტემაში თავისი ფუნქციების რეალიზაციას ანხორციელებს ნიკოტინური იონოტროპული და მუსკარინული, G-ცილა შეჭიდული რეცეპტორების აქტივაციის გზით. ნანახია, რომ პირამიდულ ნეირონებში აცეტილქოლინით M1 მუსკარინული რეცეპტორის გააქტივებამ, შეიძლება განაპირობოს ჰიპოკამპისა და ზოგადად ქერქის პირამიდული ნეირონების ჭარბი აგზნება და გამოიწვიოს ეპილეფსიური განმუხტვების გენერაცია. გაზრდილი აცეტილქოლინის პირობებში სავარაუდოა ხსენებული ეფექტების გაძლიერება, მით უფრო იმის გათვალისწინებით, რომ შემაკავებელი ნეიროტრანსმიტერული სისტემა განვითარების ადრეულ ეტაპზე ამაგზნებელი თვისებით ხასიათდება.

მოცემული კვლევის მიზანს წარმოადგენდა დაგვედგინა ადრეულ პოსტნატალურ პერიოდში NADH-Cyb5 რედუქტაზას შემცირებული აქტივობის გავლენა ქოლინერგულ სისტემის ჩამოყალიბებაზე და შეგვეფასებინა მისი ეფექტები ეპილეფტოგენეზში. გამომდინარე დასახული მიზნიდან NADH-Cyb5 რედუქტაზული სისტემის ინჰიბირებისთვის გამოვიყენეთ პროპრილთიოურაცილი. ინჰიბირების ეფექტები შეფასდა შესაბამისი (Rat NADH-Cytochrome b5 Reductase 3 (CYB5R3) ELISA Kit), ELISA Kit-ით; ხოლო ბიოქიმიური მეთოდით- (Choline/Acetylcholine Assay Kit (ab65345)) განისაზღვრა ქოლინისა და აცეტილქოლინის მაჩვენებლები ტვინოვან ქსოვილში.

პტუ-შეყვანილ ცხოველებში შეფასდა ქცევითი მახასიათებლები ღია ველის ტესტში და ჰიპოკამპში ელექტრული აქტივობა და მიღებული მონაცემები შედარდა საკონტროლო ცხოველების იგივე მაჩვენებლებს. პტუ-ინექცირებულ ცხოველებში მიღებული მონაცემების ანალიზმა აჩვენა აცეტილქოლინის შემცირებული რაოდენობა სტატისტიკურად სარწმუნოდ მომატებული ქოლინის დონის ფონზე. ქცევით ექსპერიმენტში (ღია ველის ტესტი) დაქვეითებული მოტორული აქტივობის

პარალელურად გამოვლინდა ცხოველთა მაღალი ემოციური სატატუსი. ელექტროფიზიოლოგიური კვლევით ნაჩვენებია პტუ-ინექციურებულ ცხოველებში უცვლელი ფონური ნეირონული აქტივობის ფონზე აღინიშნებოდა კაინის მჟავას (კ.მ) ინტრაჰიპოკამპალური აპლიკაციით გამოწვეული ეპილეფსიური განმუხტვების ხანგრძლივობისა და სიხშირის შემცირება როგორც მარჯვენა, ისე მარცხენა ჰიპოკამპში.

კვლევა განხორციელდა „შოთა რუსთაველის საქართველოს ეროვნული სამეცნიერო ფონდის“ მხარდაჭერით [გრანტის ნომერი MR-21-158]



Annotation

Epilepsy is a chronic, progressive disease characterized by recurrent seizures. Frequent convulsive activity characteristic of it may cause structural changes in the highly epileptogenic structure of the brain, such as the hippocampus, caused by neuronal death. Both glutamatergic and cholinergic projections are found in the hippocampus. Acetylcholine is formed in connection with choline and acetyl-CoA. Acetylcholine exerts its functions in the CNS by activating nicotinic ionotropic and muscarinic G-protein-binding receptors.

It has been observed that on the hippocampal pyramidal neurons, M1 receptors are colocalized with NMDA glutamatergic receptors. It has been shown that activation of this type of receptor by acetylcholine enhances NMDA responses. Due to the existing data on the mechanisms of epileptogenesis, hypercholinergic states can lead to excessive excitation of the pyramidal neurons in the hippocampus and cortex in general and cause the generation of epileptiform discharges.

This study aimed to investigate the effect of reduced NADH-Cyb5 reductase activity on the cholinergic system in the early postnatal period and to study its effects on the development of the epileptiform activity. Depending on the purpose, the NADH-Cyb5 reductase system was inhibited using propylthiouracil, and its effects were evaluated accordingly (Rat NADH-Cytochrome b5 Reductase 3 (CYB5R3) ELISA Kit), ELISA Kit; And the biochemical method - (Choline / Acetylcholine Assay Kit (ab65345)) determined the levels of choline and acetylcholine, in particular, in the background of the statistically significant increase in choline levels, reduced amounts of acetylcholine.

In parallel with immunological and biochemical studies, the experiment revealed a high emotional status of the animals in the context of impaired motor activity (open field test). Electrophysiological data showed reduced numbers and frequency of epileptic discharges after intrahippocampal application of kainic acid. in PTU-injected animals, with unchanged background neuronal activity in both the right and left hippocampus.

This work was supported by “Shota Rustaveli National Science Foundation of Georgia” (SRNSFG) [grant number MR-21-158]



შესავალი

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, როგორცაა: 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).

ბოლო ათწლეულების მანძილზე მნიშვნელოვანი პროგრესი იქნა მიღწეული ეპილეფსიის ფარმაკოთერაპიაში, შეიქმნა ანტიეპილეფსიური მედიკამენტები, რომელთა რეგულარული მიღება გარკვეულწილად შესაძლებელს ხდის დაავადების კონტროლს,

თუმცა ეპილეფსიის მქონე პაციენტთა დაახლოებით 30% ავლენს წამლებისადმი რეზისტენტულობას (Kalilani, L; et.al 2018); სამომავლოდ ეპილეფტოგენეზის ნატიფი მექანიზმების კვლევა შესაძლებელს გახდის შემუშავდეს ისეთი თერაპიული მიდგომები, რომელიც მნიშვნელოვნად შეამცირებს ეპილეფსიით გამოწვეულ დარღვევებს.

მოცემული კვლევის მიზანი იყო ადრეულ პოსტნატალურ პერიოდში ღვიძლის NADH-Cyb5 რედუქტაზული სისტემის აქტივობის დაქვეითებით შექმნილი მდგომარეობის გავლენის შესწავლა ქოლინერგულ სისტემასთან მიმართებაში. აქედან გამომდინარე, საკვლევ ობიექტად გამოყენებულ თეთრ ლაბორატორიულ ვირთაგვებში პრეპარატ - პროპილთიოურაცილის (პტუ) გამოყენებით ვახდენდით NADH-Cyb5 რედუქტაზული სისტემის აქტივობის ინჰიბირებას, რაც შემოწმდა შეაბამისი ELISA კიტის (Cyb5r3 elisa kit: Rat NADH-cytochrome b5 reductase 3 ELISA Kit) გამოყენებით. აღნიშნული ჯგუფის ცხოველებში Choline Acetylcholine Assay Kit-ის დახმარებით აღვწერეთ როგორც ნეიროტრანსმიტერ აცეტილქოლინის, ისე სრული (Total) ქოლინის რაოდენობრივი ცვლილებები. პტუ-ინექცირებულ ცხოველებში შეფასდა ქცევითი მახასიათებლები „ღია ველის“ ტესტში და ჰიპოკამში ელექტრული აქტივობა და მიღებული მონაცემები შედარდა საკონტროლო ცხოველების იგივე პარამეტრებს.

ქცევით ექსპერიმენტში გამოყენებულმა „ღია ველის“ ტესტის შედეგების ანალიზმა გვაჩვენა ორ ექსპერიმენტულ ჯგუფს შორის არსებული განსხვავება, რაც გამოვლინდა როგორც მოტორულ აქტივობაზე, ისე ცვლილებებით ემოციურ სტატუსში. ხოლო ელექტროფიზიოლოგიური კვლევის მონაცემების ანალიზმა აჩვენა პტუ ინექცირებულ ცხოველებში ეპილეპტიფორმული განმუხტვების რაოდენობრივი და დროით პარამეტრში განვითარებული ცვლილებები კონტროლთან მიმართებაში.

თავი I – ლიტერატურული მიმოხილვა

I.1. ეპილევსია-თავის ტვინის ნეიროდეგენერაციული მდგომარეობა

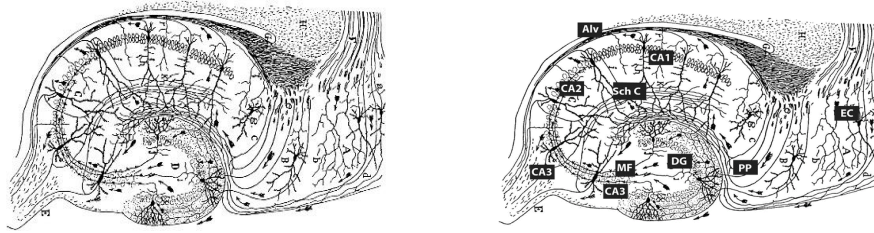
ჯანდაცვის მსოფლიო ორგანიზაციის მონაცემებით განვითარებადი ქვეყნებში მცხოვრები ეპილევსიით დაავადებული ადამიანების დაახლოებით 80-90% საერთოდ ვერ ღებულობს მათთვის საჭირო სამედიცინო სერვისსა და ანტიეპილევსიურ მედიკამენტებს (Epilepsy in the WHO European region, 2010), ეს კი იმის გათვალისწინებით, რომ პლანეტის მოსახლეობის 80%-ზე მეტი განვითარებადი ქვეყნების მოსახლეობას წარმოადგენს და ეპილევსიით 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 ვლემულობთ ეპილევსიით დაავადებულ 50 მილიონზე მეტ ადამიანს (www.who.int). საქართველში ჩატარებული ეპიდემიოლოგიური კვლევების მიხედვით (2008-2011) ყოველი 1000-დან ეპილევსია აღენიშნება 8.8-ს, რაც ნიშნავს, რომ ქვეყანაში ეპილევსიით დაავადებულია 35 000-მდე ფიზიკური პირი (www.moh.gov.ge).

ეპილევსიის წინააღმდეგ ბრძოლის საერთაშორისო ლიგის (ILAE) და ეპილევსიის საერთაშორისო ლიგის (IBE) განმარტების თანახმად ეპილევსია წარმოადგენს თავის ტვინის ქრონიკულ ნეიროდეგენერაციულ პათოლოგიას, რომელისთვისაც დამახასიათებელია რეკურენტული მიდრეკილება გულყრებისადმი. ეს უკანასკნელი თავის ტვინში პაროქსიზმული ელექტრული განმუხტვის კლინიკურ გამოვლინებას წარმოადგენს. ეპილევსიის 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 მშვნელობა არ აქვს მეორეული გავრცელების (გენერალიზაციის) შედეგად აღნიშნულ პროცესში ჩაერთვება თუ არა ქერქის სხვა უბნები; 2) გენერალიზირებული ფორმის გულყრა, როდესაც ორივე ჰემისფეროში თანადროულად აღმოცენდება ზეზღურბლოვანი 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. ჰიპოკამპი მისი როლი თავის ტვინის აქტივობაში

ჰიპოკამპისადმი ინტერესი ჯერ კიდევ გასული საუკუნის დასაწყისში გაჩნდა, როდესაც 1911 წელს რამონ კახალმა მღრნელებზე დაიწყო მისი ანატომიური მახასიათებლების შესწავლა. კახალი აღნიშნავდა, რომ ჰიპოკამს ახასიათებს შრეობრივი აგებულება და ყოფდა ორ ძირითად ნაწილად: 1-regio superior და 2-regio inferior. მოგვიანებით, ლორენტე დე ნომ წარმოადგინა უფრო ნატივი ციტოქრქიტექტონიკა. მან ჰიპოკამპი დაყო CA1, CA2, CA3 და CA4 ველებად (Cornu Ammonis – CA). წარმოდგენილი კახალისა და დე ნოს მიერ მოწოდებული სქემები (სურ.1).



სურ.1- რ.კახალისა და ლორენტე დე ნოს მიერ მოწოდებული სქემები

ჰიპოკამპი მდებარეობს დიდი ტვინის ქერქის ვენტროპოსტერიორ და ვენტროლატერალურ მიდამოში და კარგად ჩანს თავის ტვინის ჰორიზონტალურ ანათლებზე. მისი ფორმიდან გამომდინარე განარჩევენ ორ ძირითად ღერძს: 1) სეპტოტემპოლარული ღერძი, რომლიც ფაქტობრივად მის სიგრძეზე ღერძად მიიჩნევა და 2) ტრანსვერსალური ანუ განივი ღერძი. ამასთან ჰიპოკამპი წარმოდგენილია ორი კომპონენტით: 1) ამონის რქის სამი ველისგან: CA1, CA2 და CA3 და 2) დაკბილული ფასციით (Patwari, S; 2009).

ჰიპოკამპის მთავარ უჯრედებს პირამიდული ნეირონები წარმოადგენენ, რომლებიც მულტიპოლარულ ნეირონებად განიხილებიან და განთავსებულნი არიან ჰიპოკამპის შრეობრივ სტრუქტურაში. აქვთ გრძელი აპიკალური დენდრიტები და სომადან ჰიპოკამპის ცენტრისკენ-დაკბილული ფასციისკენ მიემართებიან. CA1 და CA2-ის შემთხვევაში აპიკალური დენდრიტები გადაკვეთენ strata radiatum და stratum lacunosum-moleculare-ს სადაც უხვადაა წარმოდგენილი GABA-ერგული ინტერნეირონები (Somogyi et al., 1985). მათგან განსხვავებით CA3 ველი დამატებით კვეთს stratum lucidum-ს, რომელიც ძირითადად აცელულარული შრეა და მოთავსებულია საკუთრივ პირამიდული უჯრედების შრის ქვეშ.

გარდა აპიკალური დენდრიტებისა პირამიდულ ნეირონებს ბაზალური დენდრიტებიც გააჩნიათ, რომლებიც ვრცელდებიან შესაბამისი ველების stratum oriens-ში. სხვადასხვა ველში მყოფი პირამიდული ნეირონები აგებულიებით ერთმანეთის მსგავსია, თუმცა არსებობს მათ შორის გარკვეული ტიპის განსხვავებები.

CA3 პირამიდული ნეირონების სიგრძე და ორგანიზაცია განსხვავებულია. მისი დენდრიტული ხის დატოტვიანობა განსხვავდება უჯრედის სხეულის ადგილმდებარეობის მიხედვით. CA3-ის პირამიდული ნეირონები ენტროინალური ქერქიდან სიგნალებს მხოლოდ დაკბილული ფასციის გრანულარი უჯრედების აქტივაციის შედეგად იღებენ (Cherubini, E; 2015). მათ როგორც აპიკალურ, ისე ბაზალური დენდრიტების ეკლისებურ ქაცვებზე უხვად არის წარმოდგენილი ხავსისებრი ბოჭკოების

პროექციები. ნაჩვენებია, რომ (Münster-Wandowski) ხავსისებრი ბოჭკოების ტერმინალური დაბოლებიდან განვითარების ადრეულ პოსტნატალურ პერიოდში გამოთავისუფლდება როგორც გლუტამატი, ისე GABA (Agnieszka Münster-Wandowski 2013).

CA2 ველი სიგნალს იღებს CA3 ველიდან და შემდეგ აგზავნის CA1 ველისკენ. CA2 ველი შედარებით უფრო ვიწროა, თუმცა აქ მყოფ უჯრედებს CA3 ველის მსგავსად დიდი ზომის სომები აქვთ, მაგრამ CA1 ველისაგან განსხვავებით არ იღებენ ხავსისებური ბოჭკოების პროექციებს და არ გააჩნიათ ეკლისებრი ქაცვები.

CA2 ველს სხვანაირად „რეზისტენტულ უბნად“ მოიხსენიებენ, რაც განპირობებულია მისი უნარით შეიღებოს კალციუმის დამაკავშირებელი ცილა-პარვალბუმინით. კალციუმის დამაკავშირებელი ცილა იშემიისა და აგზნებით გამოწვეული ტოქსიკურობისგან დამცველად მიიჩნევა.

განსხვავებით CA3 ველისაგან CA1-ის პირამიდული ნეირონების არბორიზაცია ჰომოგენურ ხასიათს ატარებს და შედარებით მცირე ზომისაა. CA1 ველის პირამიდულ ნეირონებზე ნანახია გლუტამატერგული რეცეპტორები, რომელთა აქტივაციაც არეგულირებს აღნიშნული ველის პლასტიურობას (Hrabetova,S; 2000; Liu,L; 2004) . პირამიდული ნეირონები განსხვავდებიან აპიკალური დენდრიტების რაოდენობით, აღწერილი ანატომიური ჰომოგენურობა არ არის ექვივალენტური მათი ფუნქციური ჰომოგენურობისა, რამდენადაც ტრანსვერსალური ღერძის სხვადასხვა ლოკაციაში მყოფ CA1-ის პირამიდულ ნეირონები ენტორინალური ქერქის განსხვავებულ შესავლებს იღებენ. აქ არსებულ სინაფსებში განსაკუთრებული სიმჭიდროვით არის წარმოდგენილი NMDA რეცეპტორები (Cotman, C W; Monaghan, D T 1986).

I.3. ჰიპოკამპის ინტერნეირონები

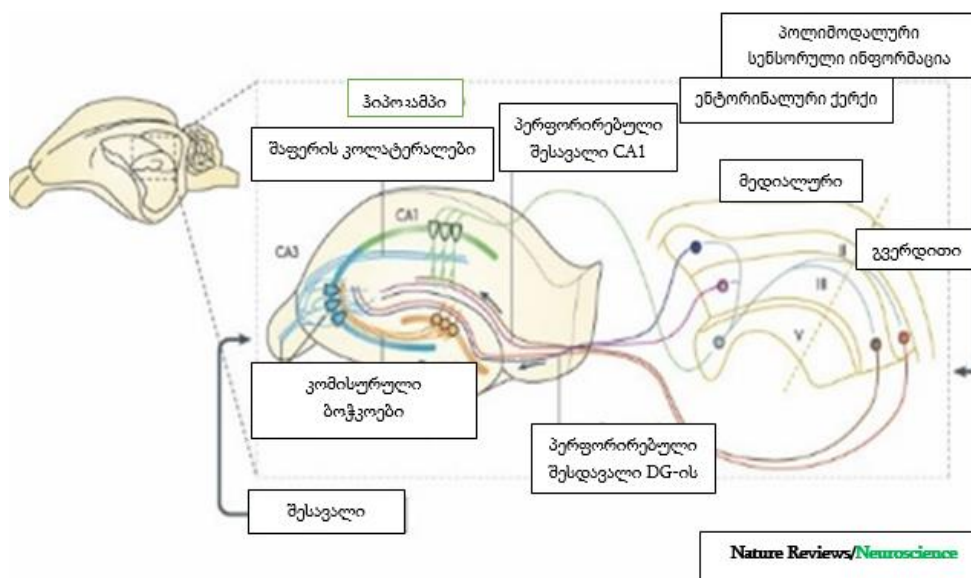
ჰიპოკამპში არსებული ინტერნეირონების დაახლოებით 10-15% შემაკავებელი (GABA) ბუნებისაა, 30 დღის ვისტარის სახეობის ვირთაგვებზე დაკვირვებით აღმოაჩინეს, რომ მათი CA1 ველის დაახლოებით 350.000 ნეირონული პოპულაციიდან მხოლოდ- 38,500 იყო შემაკავებელი ტიპის (Bezaire,J; Soltesz I; 2013).

საკუთრივ პირამიდული უჯრედების შრეში უხვად გვხვდება სხვადასხვა ტიპის ინტერნეირონები, რომლებიც განსხვავდებიან პირამიდულ უჯრედზე წარმოქმნილი სინაფსური კავშირების ლოკაციით. გვხვდება ისეთი ინტერნეირონები, როგორცაა: აქსო-აქსონური სინაფსების წარმომქნელი ინტერნეირონები (AACs), რომლებიც წარმოქმნიან

ამავე სახელებების მქონე პროექციებს. კალათისებრი უჯრედები თავიანთი აქსონის კოლატერალებით პირამიდული ნეირონების სომის ირგვლივ ქმნიან კალათისმაგვარ სტრუქტურას. გარდა შემაკავებელი ინტერნეირონებისა ჰიპოკამპში ამაგზნებელი ინტერნეირონებიც გვხდება ისეთი როგორიცაა- ჩენჩოსებური ინტერნეირონები, რომლებიც მეტწილად stratum lucidum-ში (CA3 ველში) გვხდება. ინერვირდებიან ხავსისებური ბოჭკოებით და უკავშირდება CA3 პირამიდულ ნეირონებსა და იმ ინტერნეირონებს, რომლებიც თავის მხრივ სხვა შუამდებარე ნეირონებთან ამყარებენ კონტაქტს.

I.4. ჰიპოკამპის შიდა და გარე პროექციები

ერთ-ერთი უმთავრესი გარე შესავალი საკუთრივ ჰიპოკამპისთვის არის ენტორინალური ქერქიდან წამოსული პერფორირებული გზა. ეს უკანსკნელი ერთის მხრივ უკავშირდება დაკბილული ფასციის გრანულარულ უჯრედებს და კოლატერალური ქსელით კავშირს ამყარებს კონტრალატერალური ჰიპოკამპის CA3 ველთან (N M van Strien, N L M Cappaert, M P Witter, 2009). ეს კოლატერალური სისტემა CA3 ველის str. Lacunosum moleculare-ში წარმოქმნიან შრეობრივად განლაგებულ სინაფსებს: ლატერალური ენტორინალური ქერქიდან წამოსული პროექციები მთავრდება str. Lacunosum moleculare უფრო ზედაპირულ შრეში, ხოლო მედიალური ენტორინალური ქერიდან წამოსული პერფორირებული გზის ბოჭკოები str. Lacunosum moleculare-ს შედარებით ღრმა შრეებისკენ მიემართება (სურ. 2).



სურ. 2- ჰიპოკამპალური პროექციები

პერფორირებული გზა, რომელიც სათავეს იღებს ენტორინალური ქერქის III შრე CA1 ველთან ქმნის მონოსინაფსურ კავშირს, რომელიც ხასიათდება არა შრეობრივი, არამედ განსაზღვრული ტოპოგრაფიული გადანაწილებით. კერძოდ სურათზე ნაჩვენებია, რომ ლატერალური ენტორინალური ქერქის III შრიდან წამოსული ნეირონები როგორც წესი სინაფსებს CA1 ველის უკიდურესად დისტალურ ნაწილში წარმოქმნიან, ხოლო მედიალურიდან წამოსული - პროქსიმალურ ნაწილში აგზავნის პროექციებს (Thomasvan Groen 2002). განსხვავებით CA3 ველისგან, CA1 ველის პირამიდული ბოჭკოები უკან აგზავნიან პროექციებს ენტორინალური ქერქის ღრმა შრეებისკენ. ამასთან ნანახია, რომ თითქმის ყოველი ნეირონი, რომელიც იღებს შესავალს ენტორინალური ქერქიდან პერფორირებული გზის სახით უკუკავშირს ამყარებს დაახლოებით იმავე უბანში, საიდანაც მისი მაინერვირებელი ბოჭკოები გამოვიდა.

ჰიპოკამპი, გარდა ენტორინალური ქერქისა შესავლებს იღებს თავის ტვინის სხვადასხვა სტრუქტურებიდანაც, მათ შორის ამიგდალადან, ჰიპოთალამუსიდან, სეპტალური ბირთვი, თალამუსი და სხვ. ნანახია, რომ ამიგდალა აგზავნის პროექციებს CA3 და CA1 ველებისკენ. გარდა ამიგდალისა CA3 და CA1 ველები პროექციებს პერი-და-პოსტრინალური ქერქიდანაც იღებენ, რომელთა უმრავლესობა ჰიპოკამს აღწევს ლატერალური და მედიალური ენტორინალური ქერქის გავლით. ასევე ნაჩვენებია შედარებით მწირი რაოდენობის პირდაპირი პროექციებიც ჰიპოკამპში. აღნიშნული პროექციები ნაჩვენებია CA1 ველის უკიდურესად დისტალურ ნაწილში (Amaral,D,G; 2014).

ჰიპოკამპის აფერენტებიდან განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია კავშირები სეპტალური ბირთვიდან (*მკრთალი ბირთვი*) CA3 ველში (Deng, k; 2019). სეპტალური პროექციების უმეტესი ნაწილი (65%) წარმოადგენს ქოლინერგულ გზებს, რაც წარმოადგენს ჰიპოკამპში აცეტილქოლინის გამოთავისუფლების ძირითად წყაროს (Sun et al; 2014) , ქოლინერგული პროექციების დაახლოებით 23% გლუტამატერგულ ნეირონებზე მოდის (Colom et al; 2005). აღნიშნული პროექციები მედიალური სეპტალური ბირთვიდან და ბროკას დიაგონალური კონისაგან წარმოქმნიან. ისინი სინაფსებს იძლევიან stratum oriens და stratum radium-ში. სეპტალური პროექციების გარკვეული ნაწილი გაემ-ერგული ბუნებისაა და როგორც ცნობილია წარმოქმნიან სინაფსებს CA3 ველის გაემ-ერგულ ინტერნეირონებთან. თავის მხრივ CA3 ველის ნეირონები აგზავნიან პროექციებს უკან სეპტალური ბირთვისკენ, კერძოდ ლატერალური სეპტალური ბირთვისკენ. აღნიშნული პროექციების

გადანაწილებაში შეიმჩნევა კანონზომიერება.

CA3 ბილატერალურ პროექციებს ქმნის ლატერალურ სეპტალურ ბირთვში, ანუ აღნიშნული კავშირი ორივე ჰემისფეროს სეპტალურ ბირთვებს მოიცავს. სეპტალურ პროექციებს CA1 ველიც იღებს, თუმცა მცირე რაოდენობით, განსხვავებით CA3 ველისგან. ამასთან, იგი აგზავნის კიდევ პროექციებს სეპტალურ ბირთვში, თუმცა აღნიშნული კავშირები იფსილატერალური გავრცელებით ხასიათდება.

ჰიპოკამპი პროექციებს ღებულობს უშუალოდ ჰიპოთამუსიდან და ასევე იღებს გარკვეულ შესავლებს თალამუსიდანაც. უფრო ზუსტად თალამუსის წინა ნაწილი კავშირს ამყარებს პრესუბიკულუმთან და თალამუსის ე.წ. შუახაზის (*არასპეციფიკური*) ბირთვები წარმოქმნიან პროექციებს, რომელიც CA1 ველის str.moleculare-კენ მიემართებიან. თალამუსიდან პროექციები წარმოდგენილია როგორც პირამიდულ, ისე შემაკავებელ გამერგულ ინტერნეირონებთან; რაც შეეხება ჰიპოთალამურ კავშირებს ექსპერიმენტულად ნაჩვენებია, რომ CA2-ლატერალურ სეპტალური ბირთვი-ვენტრომედიალურ ჰიპოთალამური ქსელები ჩართულია აგრესიული ქცევის კონტროლში (Wong et al., 2016; Leroy et al., 2018).

CA3 ველი უხვად ღებულობს ნორადრენერგულ კავშირებს ცისფერი ლაქადან, სეროტონინერგულ კავშირებს-ნაკრის ბირთვიდან და დოფამინერგულ კავშირებს- შუა ტვინის დოფამინერგული ბირთვებიდან (Leão,N,R; 2012).

I.5. ჰიპოკამპის შიდა კავშირები

CA3 ველის ნეირონები იპსილატერალურად წარმოქმნიან დიდი რაოდენობით ასოციაციურ პროექციებს, კონტრალატერურ მხარეს კი - კომისურულ ბოჭკოებს.

CA3 ველის ნეირონები პროეცირდებიან CA3, CA2 და CA1 ველის უჯრედებზე როგორც იპსი, ისე კონტრალატერალურად. მცირე რაოდენობით პროექციებს აგზავნიან დაკბილული ფასციის პოლიმორფული შრისკენ და არ აქვთ კავშირები სუბიკულიმში, პრესუბიკულუმში, პარასუბიკულუმში და ენტორინალურ ქერქში.

პროქსიმალურად მდებარე CA3 ნეირონები, უპირატესად stratum radiatum-ის ზედაპირულ შრეებში პროეცირებად ბოჭკოებს უდებენ საფუძველს. დისტალური ნეირონები კი stratum radiatum-ის ღრმა შრეებსა და stratum oriens-ში იძლევიან პროექციებს. CA3 ველის პროქსიმალური ნეირონები პროექციებს სეპტალური უბნისაკენ აგზავნიან, დისტალური ნეირონები-ტემპორალური უბნისკენ.

CA1 ველის ნეირონების აქსონები სუბიკულუმისკენ მიემართება და იქ პრამიდული უჯრედებს უკავშირდებიან და მოლეკულურ შრეში იტოტებაიან. ამავე ველის ნეირონებს ახასიათებთ ზუსტი ტოპოგრაფიული გადანაწილება სუბიკულუმში სინაფსის წარმოქმნის დროს. CA1 ველის პროქსიმალური უბნიდან წამოსული ნეირონები სინაფსებს სუბიკულუმის დისტალურ უბანში მყოფ უჯრედებზე წარმოქმნიან. მაშინ როცა დისტალური უბნიდან წამოსული ნეირონები სუბიკულუმის პროქსიმალურ უბანში წარმოქმნიან პროექციებს.

I.6. 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/გამე-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 გამე-ერგული ნეირონების აქტივობას (<https://digital.csic.es/handle/10261/220515>; Ge, S 2005).

I.7. 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, როგრიცაა: 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 საფუძვეელი თავისუფალი ქოლინის დაგროვებისთვის.

თავი II

მეთოდისა

ექსპერიმენტებში გამოვიყენეთ იმუნოლოგიური (GABA ELISA kit: Rat Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) ELISA Kit; Cyb5r3 ELISA kit: Rat NADH-cytochrome b5 reductase 3 ELISA Kit) და ბიოქიმიური Choline/Acetylcholine Assay Kit (ab65345) მეთოდები.

გარდა ამისა შევისწავლეთ საკვლევ ჯგუფებში მყოფი ცხოველების ქცევითი და ელექტროფიზიოლოგიური მახასიათებლები. ქცევით ექსპერიმენტში გამოვიყენეთ „ღია ველის“ ტესტი, რომლის დახმარებითაც შეფასდა ცხოველთა ემოციური სტატუსი და მოტორული აქტივობა. ელექტროფიზიოლოგიურ ექსპერიმენტში სხვადასხვა ჯგუფის ცხოველებში ვსწავლობდით ჰიპოკამპის CA1 ველის ნეირონულ აქტივობას მონაცემთა ურთიერთშედარების მიზნით.

II.1. ცდის ობიექტი

ცდის ობიექტს ექსპერიმენტში წარმოადგენენ 7-9 დღის ველური ხაზის თეთრ ლაბულატორიული ვირთაგვები. ცდებში გამოყენებული იყო ორივე სქესის ცხოველი. ექსპერიმენტის მიზნიდან გამომდინარე ცდებში გამოყენებული იყო შემდეგი ჯგუფის ცხოველები

1. ცდის ჯგუფი, რომელთაც ინტრაპერიტონეალურად უკეთდებოდათ პროპრილთიოურაცილი 60მგ/კგ-ზე. ოთხჯერადი ინექცია ერთკვირიანი ინტერვალებით.

2. საკონტროლო ცხოველები იგივე სქემით დებულობდნენ ფიზიოლოგიურ ხსნარს საკონტროლო და პტუ-ინექცირებულ ცხოველებს 6 კვირის ასაკში კ.მ. ეპილეფსიური სტატუსის შესაქმენლად ინტრაპერიტონეალურად (IP) უკეთდებოდათ გლუტამატური კაინერგული რეცეპტორების აგონისტი - კაინის მჟავა, დოზით 10მგ/კგ (10მგ კაინის მჟავა იხნებოდა 2მლ NaCl-ში ინტრაპერიტონეალური ინექციისთვის). შესაბამისად მომდევნო კვლევები ჩატარდა: კონტროლ+კ.მ და პტუ+კ.მ. ცხოველურ მოდელზე.

აღნიშნულ ცხოველთა ჯგუფებში, ვსაწვლობდით როგორც ქცევით, ისე ელექტროფიზიოლოგიურ მახასიათებლებს, ღვიძლის CYB5R3 სისტემის (Cyb5r3 elisa kit:

Rat NADH-cytochrome b5 reductase 3 ELISA Kit) აქტივობას, ნეიტროტრანსმიტერების აცეტილქოლინისა (Ach) (Choline/Acetylcholine Assay kit (Colorimetric)) და GABA (ELISA Kit- Rat Gamma-Aminobutyric Acid (GABA)) შემცველობას ნერვულ ქსოვილში შესაბამისი ELISA კიტებისა და ბიოქიმიური მეთოდების გამოყენებით. აღნიშნული მეთოდის გამოყენებით ვადგენდით CYB5R3 სისტემის პტუ-თი ინჰიბირების დონეს და შესაბამის ცვლილებებს ქოლინ-ერგულ/გაემ-ერგული სისტემების ფუნქციონირებაში.

II.2. ქცევითი ექსპერიმენტი - ღია ველის ტესტი

ექსპერიმენტული ცხოველების ქცევითი მონაცემები მოწმდებოდა „ღია ველის“ ტესტში, სადაც ფასდებოდა საკონტროლო და ცდის ჯგუფის ცხოველების როგორც მოტორული აქტივობა, ისე მათი ემოციური სტატუსის განმსაზღვრელი პარამეტრები.

„ღია ველის“ ტესტში ცხოველთა ქცევითი პარამეტრები ფასდებოდა ზედიზედ 5 დღის განმავლობაში. „ღია ველის“ კაბინა არის 1.5 მეტრი დიამეტრის მრგვალი პლასტმასის ყუთი, რომელიც წარმოდგენილია შავი რეზინით დაფარული იატაკით, ეს უკანასკნელი კი დაყოფილია ლითონის სალტეებით 12 გარე და 6 შიგა კვადრატად და ცენტრად. ვირთაგვა თავსდებოდა „ღია ველში“ 5 წუთის განმავლობაში, რა დროსაც აღირიცხებოდა: შიდა და გარე კვადრატების გადაკვეთის, ვერტიკალური დგომების, ცენტრში გამოსვლის, გრუმინგების და ფეკალური მასების რაოდენობა, ცენტრში გაჩერებისა და გრუმინგების ხანგრძლივობა.

მიღებული პარამეტრების მიხედვით განვსაზღვრეთ დაბალემოციური და მაღალემოციური ცხოველთა ჯგუფი. პირველ ჯგუფს მივაკუთვნეთ ცხოველები შემდეგი მახასიათებლებით: ცენტრში ხშირი გამოსვლა ხანგრძლივი დაყოვნებით, გრუმინგების შეზღუდული რაოდენობა და შემცირებული ხანგრძლივობით და ფეკალური მასების ნაკლები ოდენობის გამოყოფა. მაღალემოციური სტატუსი მქონედ შევაფასეთ ვირთაგვები- ხშირი დეფეკაციით, გრუმინგების დროში გახანგრძლივებული და გაზრდილი ოდენობით. ცხოველთა მოტორული აქტივობა ფასდებოდა გადაკვეთილი კვადრატებისა და ვერტიკალური დგომების საერთო მაჩვენებლის მიხედვით.

II.3. ელექტროფიზიოლოგიური ექსპერიმენტი

ექვსი კვირის ასაკში როგორც პტუ-იანი, ისე კონტროლის ჯგუფის ცხოველებში, კაინის მჟავას ეპილეფსიური სტატუსტის მისაღებად შეგვყავდა 2 მლ-NaCl-ში გახსნილი 10მგ კაინის მჟავა. ყველა ცხოველს უვლინდებოდა ეპილეფსიისთვის დამახასიათებელი ნიშნები, როგორცაა: ხშირი სალივაცია, კანკალი, მლოცველის პოზა და სხვ. ეპილეფსიური სტატუსტის ჩამოყალიბებიდან 48-72 საათის შემდეგ, საერთო ნარკოზის ინტრაპერიტონეალური შეყვანის გზით (კალიფსოლი-გლუტამატური NMDA რეცეპტორების არაკონკურენტული ანტაგონისტი) ვატარებდით ელექტროფიზიოლოგიურ ექსპერიმენტს. ექსპერიმენტის ხანგრძლივობიდან და სანარკოზო საშუალების მიწოდების საჭიროებიდან გამომდინარე მრავალჯერადად ვამატებდით კალიფსოლს.

გამლიზიანებელი და გამომყავნი ელექტროდების ინტრაჰიპოკამპური ჩანერგვა ხორციელდებოდა სტეროტაქსულად: ვირთავას თავი მყარად ფიქსირდებოდა 3 წერტილში- ყურები, კბილები და ცხვირი. ექსპერიმენტის მიმდინარეობისას გამოვიყენეთ ადგილობრივი საანესთეზიო საშუალება-ნოვოკაინი. ქალას ძვლების კან-კუნთოვანი ნაწილებისაგან განთავისუფლების შემდეგ ატლასის (პაქსინოს/ვოტსონ) მიხედვით სწორდებოდა თავი, ისე რომ ბრეგმა (წინა ჯვარედინი) და ლამბდა (უკანა ჯვარედინი) ერთ დონეზე ყოფილიყო. ქალას ძვლების ტრეპანაციის მიზნით ვიყენებდით პორტატულ ელექტრობურღს. ვერცხლის ინდიფერენტული ელექტროდი ფიქსირდებოდა ქალას ძვალზე, ხოლო ჰიპოკამპის ნეიორნული აქტივობის რეგისტრაციისთვის ტრიპოლარული მეტალის ელექტროდები ინერგებოდა შემდეგი კოორდინატების მიხედვით: მარჯვენა/მარცხენა ჰიპოკამპი - AP-3.8, L-2.5, H-3. კ.მ. ინტრაჰიპოკამპური ინექციის მიზნით კეთდებოდა ღრუ მარჯვენა ჰიპოკამპის პროეციაზე, კოორდინატებით: AP-3.8, L-4.4, H-2.5

ელექტროდების ფიქსაცია ქალას ძვალზე ხდებოდა კბილის ცემენტით. ექსპერიმენტებში ვიყენებდით რეგისტრაციისა და ანალიზის კომპიუტერულ პროგრამას Chart5.5-ს. სტატისტიკური დამუშავებისათვის გამოვიყენეთ პროგრამა -PPRIZM.

II.4. ELISA ტესტირება, პროცედურები

II.4.1. NADH-Cyb5 რედუქტაზული სისტემის ELISA ტესტირების 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 შედეგების 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 buffir-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 ჰერმეტიკულად 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(სურ1). მომდევნო 10 წუთი მანძილზე მოხდა ELISA plate-ის წაკითხვა O.D. 450nm ტალღის სიგრძეზე.
- 12- მიღებული შედეგების დამუშავების შედეგად აიგო სტანდარტული მრუდი

II.4.2. გაემ-ELISA Kit ტესტირების პროცედურა

ცდის ჯგუფის ცხოველები გაემ-ის დონის დასადგენად გამოვიყენეთ შესაბამისი ELISA კიტი (GABA elisa kit: Rat Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) ELISA Kit). საკვლევ მასალად გამოყენებულ იქნა თავის ტვინი, რომელიც დაიყო ორ: წინა და უკანა ნაწილებად, გაირეცხა 0.01M PBS (*phosphate buffer saline*) და 1 გრამზე დავამატეთ 5-10 Ml ცივი 0.86%-იანი ფიზიოლოგიური ხსნარი. პროცედურის დღეს აღებული ნიმუში ჰომოგენატის მისაღებად დავაცენტრიფუგეთ 10 წუთის განმავლობაში 5000 rpm-ით. პროცედურა მიმდინარეობდა პროტოკოლის სრული დაცვით.

1-ეტაპზე 30 წუთით ადრე ელაიზა კიტი (GABA elisa kit: Rat Gamma-Aminobutyric Acid

(GABA) ELISA Kit) გამოვიტანეთ მაცივრიდან (ინახებოდა 8 კვირის მანძილზე -20°C პირობებში) რათა ეტაპობრივად მომხდარიყო კიტის დამუშავება ოთახის ტემპერატურაზე.

2- ამასობაში მოვამზადეთ გასარეცხად გამოსაყენებელი სითხე შემდეგნაირად: 10 მლ გამრეცხი სითხე ე.წ. Wash Buffer გავხსენით 250 მლ გამოხდილ წყალში.

3-standart-ის ექვსი სხვადასხვა კონცენტრაცია მომზადდა შემდეგი წესით: თავდაპირველად ავიღეთ სტანდარტისთვის განკუთვნილი ექვსი ცალი დანომრილი "სინჯარა" (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2 pg/ml). თითოეულ მათგანს წინასწარ დავამატეთ 300-300 მკლ სტანდარტის მარტივი გამხსნელი (Standart simple diluent). ზუსტად იგივე ოდენობის გამხსნელი დავამატეთ ცალკე standart-ს, რომლიდანაც ამოვიღეთ კვლავ 300 მკლ-ი ხსნარი და დავამატეთ პირველ სინჯარას (მონიშნული 1000 pg/ML), შემდგომ ამ უკანსკნელიდან (პირველი სინჯარიდან) კვლავ 300 მკლ-ი ხსნარი დავამატა მის მომდევნო, მეორე სინჯარას (მონიშნული 500 pg/ML) და ასე გაგრძელდა უკანსკნელ სინჯარამდე (მონიშნული 31.2 pg/ML). პროტოკოლის თანახმად შესაბამის ფოსოებში გადავანაწილეთ კონცენტრაციის მზარდი თანმიმდევრობით თითოეულ ფოსოში 100 მკლ ოდენობით. (31.2, 62.5, 125, 250, 500, 1000 pg/ml) ამავე ოდენობის (100 მკლ) გადავიტანეთ ჯანმრთელი და დაავადებული ცხოველების თავინის ტვინის ჰომოგენატები შესაბამის ფოსოებში, რის შემდეგადაც მოხდა მათი ინკუბირება თერმოსტატში 37°C-ზე 90 წუთის განმავლობაში.

4- 1 საათის გასვლის შემდეგ ანუ თერმოსტატიდან გამოტანამდე 30 წუთით ადრე დავიწყეთ შემდეგი საფეხურისთვის ბიოტინირებული ანტისხეულის (Biotinylated Antibody) მომზადება 1:100 პროპორციის დაცვით, რისთვისაც გამოვიყენეთ 6930 მკლ - გამხსნელი (Antibody diluent) და 70 მკლ - ბიოტინირებული ანტისხეული (Biotinylated Antibody). თერმოსტატიდან გამოტანისთანავე ELISA plate ორჯერ გაირეცხა (10 მლ Wash Buffer გახსნილი 250 მლ გამოხდილ წყალში)

5- ამ ეტაპზე დავამატა წინასწარ მომზადებული ბიოტინირებული ანტისხეული კონცენტრაციით-100 მკლ თითოეულ ფოსოში (როგორც სტანდარტის, ისე ინტაქტური და დაავადებული ცხოველების ნიმუშების შესაბამის ფოსოებს). რის შემდგომაც დავაბრუნეთ კვლავ კვლავ თერმოსტატში 37 °C, ამჯერად 1 საათით.

6- თერმოსტატში ყოფნიდან 30 წუთის შემდეგ დავიწყეთ ენზიმის კონიუგატის (Enzyme conjugate) მომზადება 1:100 პროპორციით, რისთვისაც გამოვიყენეთ ენზიმის გამხსნელი (Enzyme diluent)-6930 მკლ და ენზიმის კონიუგატი (Enzyme conjugate)-70 მკლ. თერმოსტატიდან გამოტანისას ELISA plate სამჯერ გაირეცხა (10 მლ Wash Buffer გახსნილი

250 მლ გამოხდილ წყალში)

7- წინასწარ გამზადებული ენზიმის კონიუგატი დავამატეთ 100-100 მკლ თითოეულ ფოსოში. რის შემდეგაც კვლავ თერმოსტატში დავაბრუნეთ 30 წუთით 37°C შემდეგ საფეხურისთვის ფერის რეაგენტების მზადება მაშინათვე დავიწყეთ, რისთვისაც გამოვიყენეთ ფერის რეაგენტი A და ფერის რეაგენტი B-ს 9:1 თანაფარდობა, რაც ნიშნავს, რომ ფერის რეაგენტი A-ს კონცენტრაცია იყო- 9 000 მკლ და ფერის რეაგენტი B-ს - 1 000 მკლ. თერმოსტატიდან გამოტანის შემდეგ ELISA plate გაირეცხა ხუთჯერ (10 მლ Wash Buffer გახსნილი 250 მლ გამოხდილ წყალში),

8- ტაპზე უკვე გამზადებული ფერის რეაგენტის 100-100 მკლ დაემატა თითოეულ ფოსოში და დაბრუნდა ისევ თერმოსტატში 37°Cზე 30 წუთით.

9-ბოლო ეტაპზე კი დაემატა ფერის რეაგენტი C (Color reagent C) კარგად შევანჯღრიეთ და გავუშვით ELISA აპარატში წასაკითხად (ტალლის სიგრძე 450 ნმ).

10- მიღებული შედეგების ანალიზის მიხედვით აიგო მრუდი

II.4.3. ქოლინისა და აცეტილქოლინის დონის განსაზღვრის პროცედურა

აცეტილქოლინის დონის განსაზღვრად წინასწარ პროტოკოლში შეტანილი მითითებების მიხედვით მიღებული შედეგის ქოლორომეტრული ანალიზისთვის დავამზადეთ 0.5 nmol/ μ L Choline Standard, რისთვისაც 50 nmol/ μ L Choline Standard გავხსენით 495 μ L of Choline Assay Buffer.

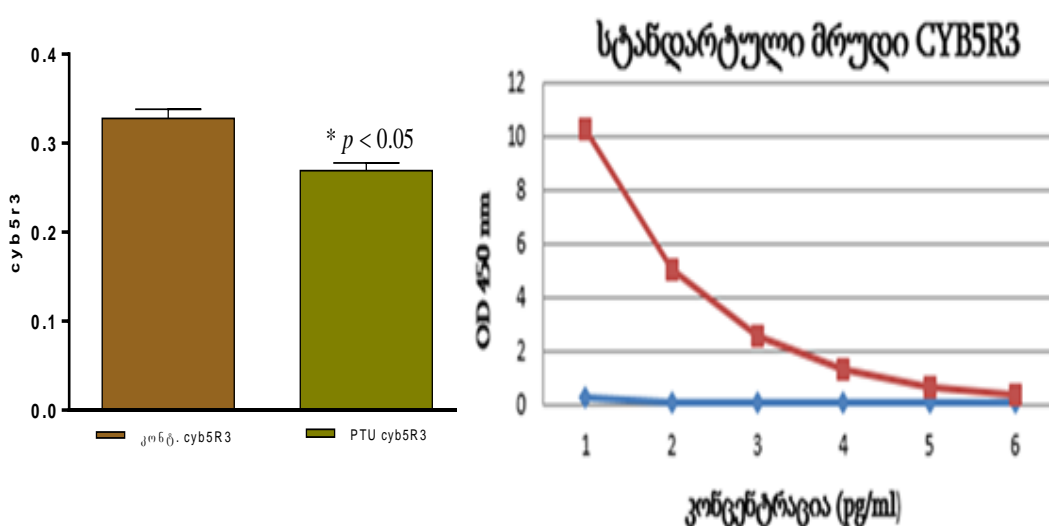
გამომდინარე იქიდან, რომ ELISA Kit იძლეოდა არჩევანის საშუალებას განგვესაზღვრა როგორც მხოლოდ Free Choline (მხოლოდ ქოლინი), ისე Total Choline (ქოლინი+ აცეტილქოლინესთერაზა) გამოვიყენეთ ორივე „მიქსტურა“ 1-Free Choline Reaction Mix: Choline Assay Buffer (46 μ L); Choline Probe (2 μ L); Choline Enzyme Mix (2 μ L); 2-Choline + AchE Reaction Mix: Choline Assay Buffer (44 μ L); Choline Probe (2 μ L); Acetylcholinesterase (2 μ L); Choline Enzyme Mix (2 μ L); მომზადებული ხსნარები 50-50 μ L ოდენობით დაემატა თითოეულ ფოსოში. ამის შემდეგ ჰერმეტიკულად დავხურეთ ELISA plate-ი და 30 წუთით დავაყოვნეთ ოთახის ტემპერატურაზე სინათლისაგან დაცულ ადგილას. მითითებული დროის გასვლის შემდეგ მონაცემები დამუშავდა ქოლორომეტრულად O.D. 630ნმ ტალლის სიგრძეზე, რის შემდეგაც მივიღეთ სტანდარტული მრუდები როგორც Total Choline , ისე Free Choline-ის.

თავი III

შედეგები და მათი ანალიზი

III.1. პტუ-ს გავლენა NADH-Cyb5 რედუქტაზული სისტემის ინჰიბირებაზე და ELISA ანალიზი

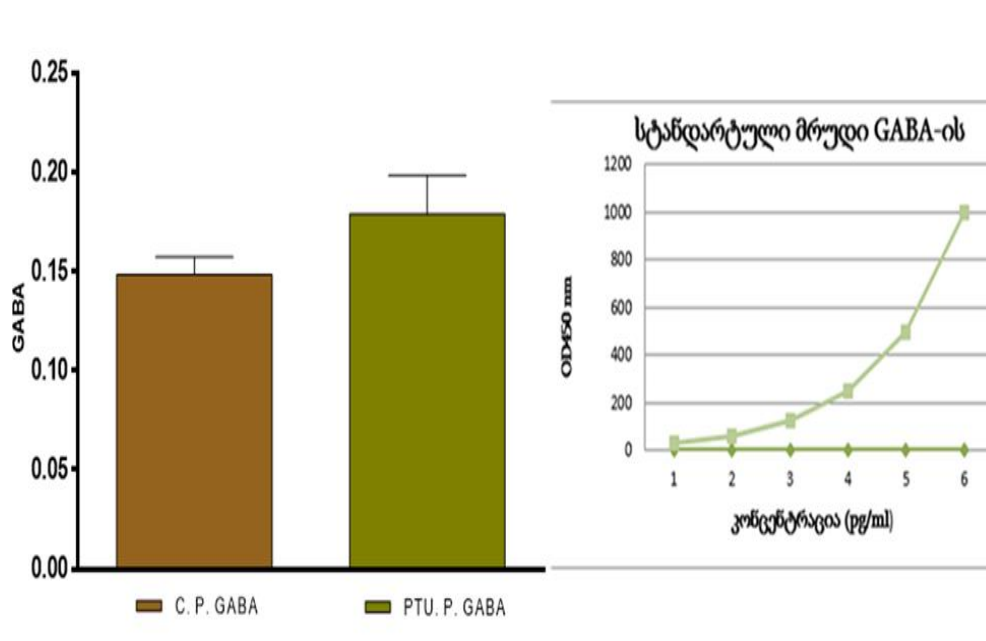
პროპილთიოურაცილის (60მგ/კგ) გამოყენებით სელექტიურად დავთრგუნეთ NADH-Cyb5 რედუქტაზული სისტემა. საკონტროლო და პტუ-ინექცირებული ცხოველების სისხლის პლაზმაში შესაბამის ELISA კიტის (Cyb5r3 elisa kit: Rat NADH-cytochrome b5 reductase 3 ELISA Kit). გამოყენებით განისაზღვრა NADH-Cyb5 რედუქტაზული სისტემის აქტივობა. მონაცემების დამუშავების შედეგად ავაგეთ სტანდარტული მრუდი. ცდის ჯგუფებში მიღებული მონაცემების საშუალო მნიშვნელობები + საშუალო სტანდარტული გადახრები წარმოდგენილია ჰისტოგრამების სახით (სურათზე 3). მიღებული შედეგებით, პტუ-ინექცირებულ ცხოველებში გამოვლინდა NADH-Cyb5 რედუქტაზული სისტემის აქტივობის შესუსტება საკონტროლო ჯგუფის ცხოველებთან შედარებით.



სურ.3- NADH-Cyb5 რედუქტაზული სისტემის დონის შეფასება *ELISA* ანალიზით. მარცხნივ მოცემულია: *CYB5R3* სისტემის აქტივობის საშუალო მნიშვნელობები + საშუალო სტანდარტული გადახრები საკონტროლო და ცდის ჯგუფის ცხოველებში; მარჯვნივ წარმოდგენილია *ELISA* პროცედურის შედეგად აგებული სტანდარტული მრუდი

III.2. NADH-Cyb5 რედუქტაზული სისტემის ინჰიბირებით განპირობებული ცვლილებები გაემ-ერგულ სისტემაში. გაემ-ELISA Kit-ის ტესტირების შედეგები

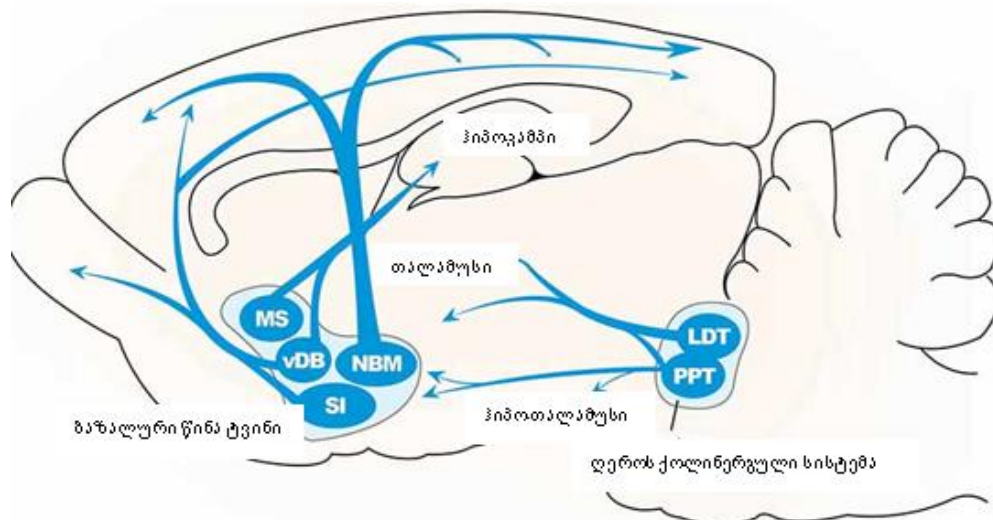
გაემის დონის შესამოწმებლად საკვლევ მასალად გამოყენებული იყო საცდელი ცხოველების (კონტროლი/პტუ) თავის ტვინის უკანა ნაწილი, რომელიც მოიცავს კველისთვის მნიშვნელოვან საკვლევ სტრუქტურას-ჰიპოკამპს. ჩატარებული ELISA კვლევის შედეგად აიგო სტანდარტილი მრუდი და შეფასდა შემაკავებელი ნეიროტრანსმიტერის დონე, მიღებული მონაცემების საშუალო მნიშვნელობები + საშუალო სტანდარტული გადახრებით წარმოდგენილია (სურ. 4). პტუ-ინექცირებული ცხოველებში აღინიშნება გაემ-ის მატების ტენდენცია, თუმცა ცვლილებები სტატისტიკურად სარწმუნო არ იყო (კონტროლი/გაემი=0.148 ± 0.03; პტუ/გაემი=0.178 ± 0.02).



სურ.4- მარცხნივ მოცემული სვეტები გამოხატავს გაემ-ის დონეს საშუალო მნიშვნელობები + საშუალო სტანდარტული გადახრებით საცდელ და პტუ-ინექცირებული ცხოველების თავის ტვინის უკანა ნაწილებში; მარჯვნივ მოცემულია ELISA პრეცედიურის შედეგად აღნიშნული კიტის შესაბამისი სტანდარტული მრუდი.

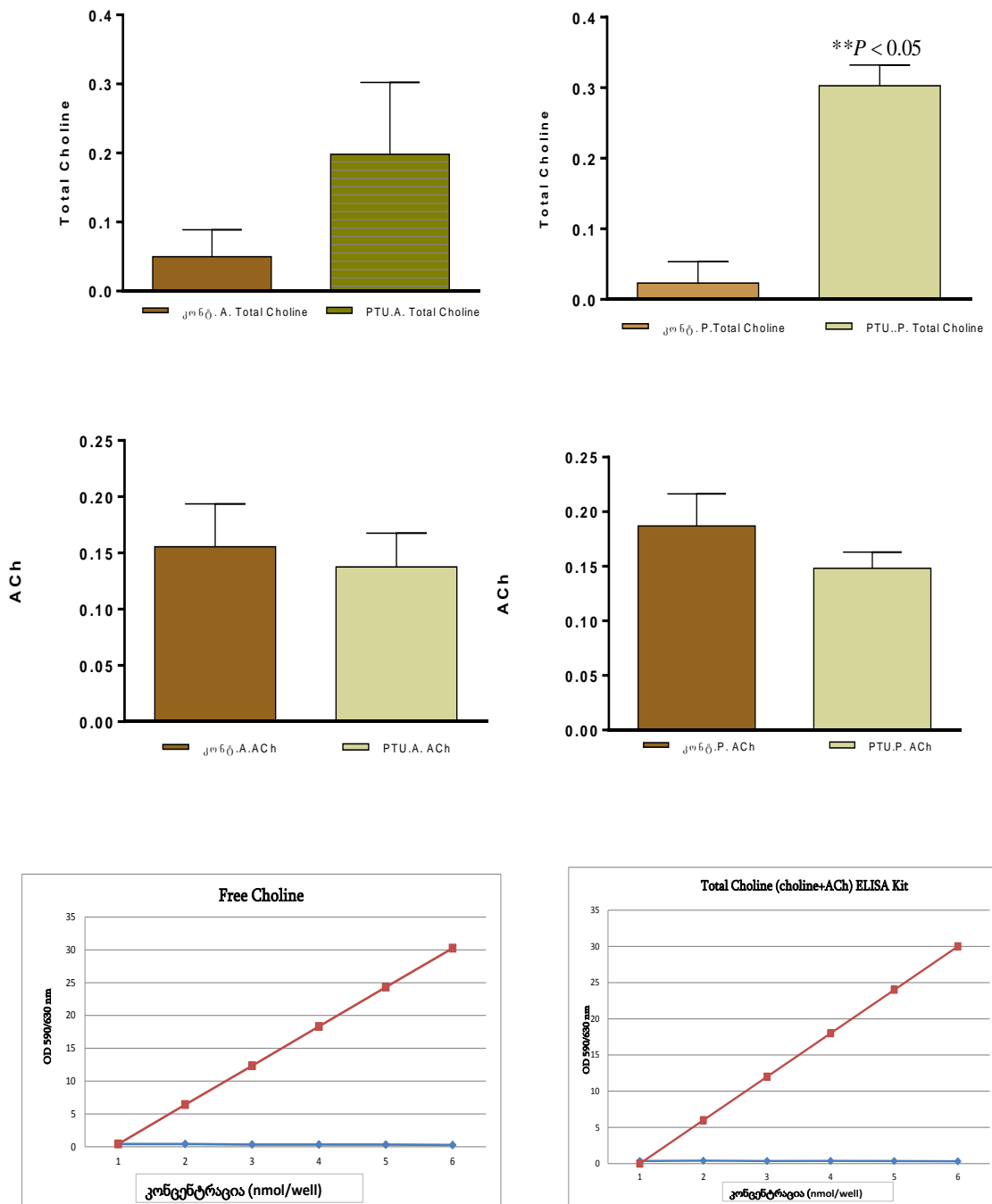
III.3. NADH-Cy5 რედუქტაზული სისტემის ინჰიბირების გავლენა ქოლინისა და აცეტილქოლინის დონეზე

ქოლინისა და აცეტილქოლინის დონე შევისწავლეთ cy5r3 რედუქტაზული სისტემის შეცვლილი აქტივობის ფონზე, საკონტროლო და პტუ-ინექცირებული ცხოველების ტვინოვანი ქსოვილში. ცხოველთა თავის ტვინს ვაცილებდით ნათხემს და ღეროს ბირთვებს და დარჩენილი ტვინი იყოფოდა ორ: წინა და უკანა ნაწილებად. წინა ნაწილი წარმოდგენილია წინა ტვინის ქოლინერგული ბირთვებით, ხოლო უკანა ნაწილში ძირითადად გვხვდება ჰიპოკამპი, რომელიც ღებულობს სეპტალურ ქოლინერგულ პროექციებს (სურათი 5).



სურათი 5: ქოლინერგული პროექციები ტვინის წინა და უკანა ნაწილებში

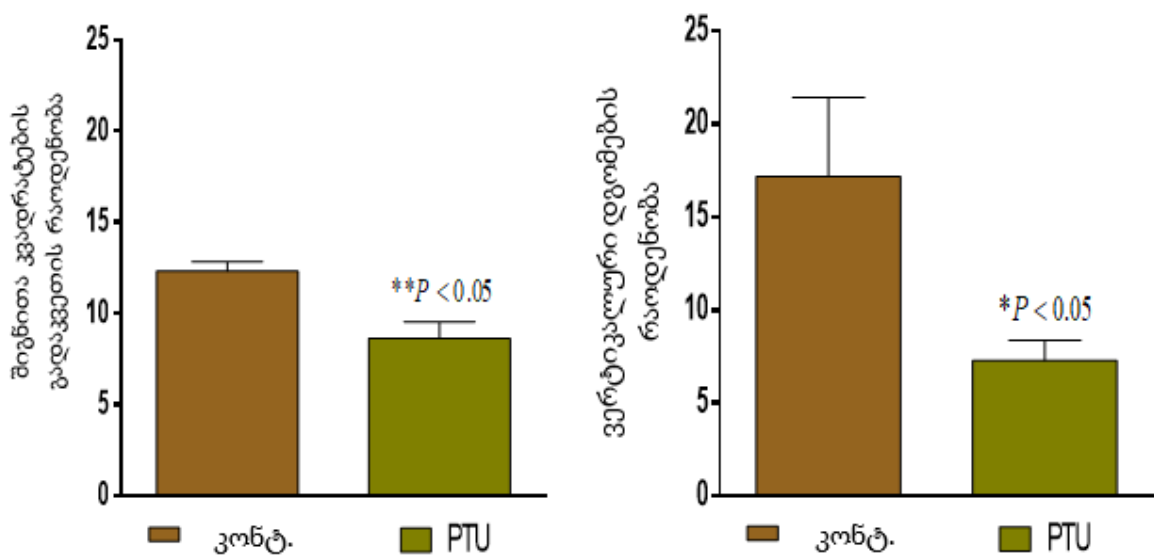
ბიოქიმიური მეთოდის გამოყენებით შევძელით ერთმანეთისგან განცალკევებით განგვესაზღვრა როგორც თავისუფალი (Free Choline), ისე მთლიანი ქოლინის (Total Choline) დონე, რის შემდეგაც ავაგეთ შესაბამისი სტანდარტული მრუდები. აცეტილქოლინის დონე განისაზღვრა პროტოკოლში მითითებული ფორმულით: $Acetylcholine = Total\ Choline - Free\ Choline$, რის შემდეგაც ავაგეთ დიაგრამა, რომელზეც ასახულია მიღებული მონაცემების საშუალო მნიშვნელობები + საშუალო სტანდარტული გადახრებით. მიღებული სურათიდან ჩანს შემცირებული აცეტილქოლინის დონე, თავის ტვინის უკანა ნაწილში სტატისტიკურად სარწმუნოდ გაზრდილი Total Choline-ის ფონზე (სურ.6).



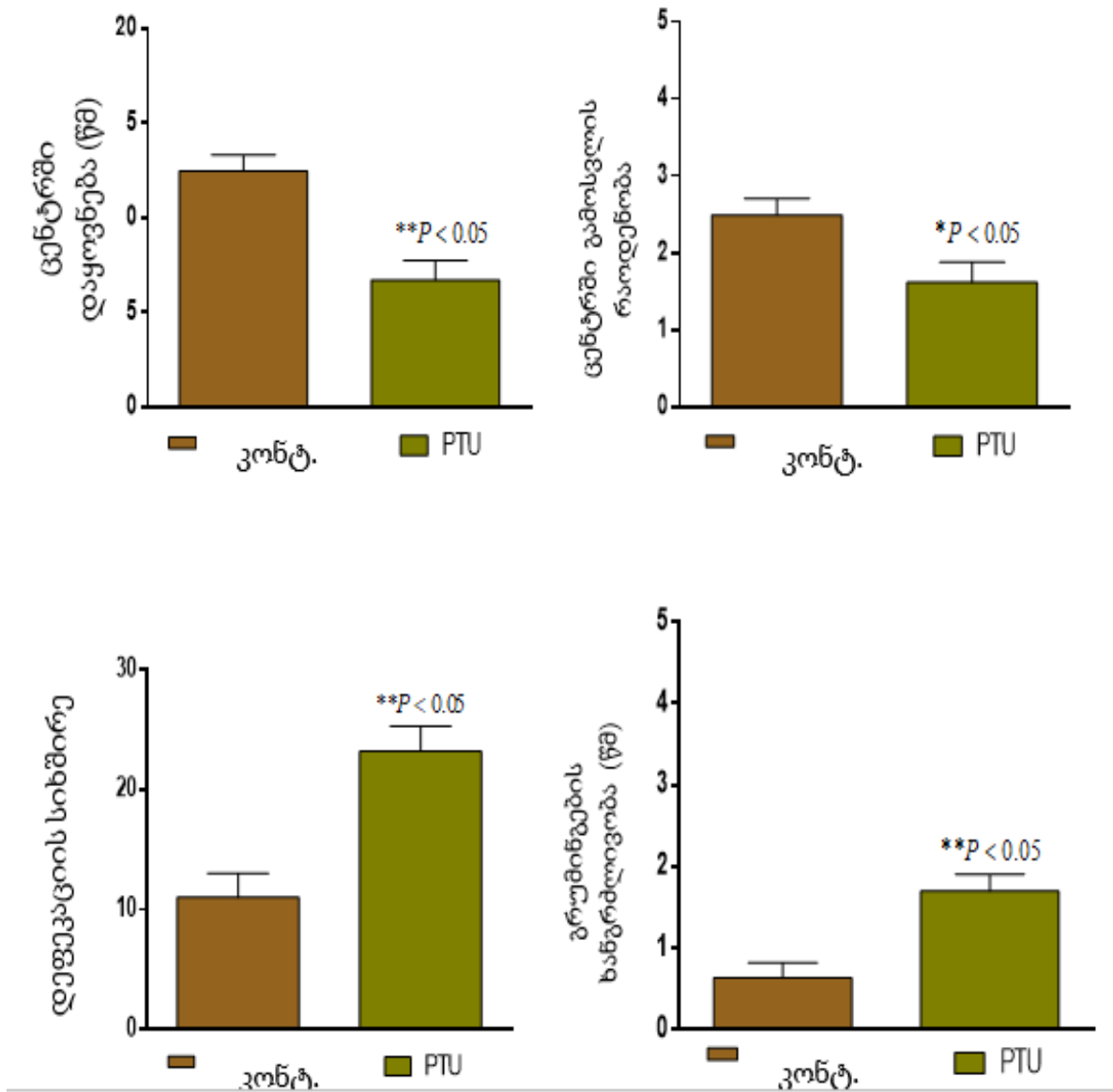
სურ.6-ჰისტოგრამებზე წარმოდგენილია აცეტილქოლინისა და სრული ქოლინის საშუალო მნიშვნელობები + საშუალო სტანდარტული გადახრებით. ქვემოთ მოცემულია Free Choline-ისა და Total Choline-ის სტანდარტული მრუდები.

III.4. NADH-Cyb5 რედუქტაზული სისტემის ინჰიბირების გავლენა ქცევით მახასიათებლებზე. „ღია ველის“ მონაცემები

ქცევით ექსპერიმენტში შვეისწავლეთ პროპილთიოურაცილის (პტუ) ადრეულ პოსტნატალში ოთხჯერადი ინექციის (60მგ/კგ) გავლენა ცხოველების როგორც ემოციური სტატუსის მაჩვენებლებზე, ისე მოტორულ აქტივობაზე. მიღებული შედეგების ანალიზმა აჩვენა, რომ პტუ-ინექცირებული ცხოველები, კონტროლის ცხოველებთან შედარებით, გამოირჩეოდნენ მაღალი ემოციური ფონით, რაც ვლინდებოდა როგორც ხშირი დეფეკაციით, გრუმინგების გაზრდილი ოდენობითა და დროში გახანგრძლივებით, ისე ცენტრში იშვიათი გამოსვლითა და ხანმოკლე დაყოვნებით (სურ.7). ამასთან უნდა აღინიშნოს, რომ ზოგიერთი პარამეტრის (გრუმინგების რაოდენობა და გარეთა კვადრატების გადაკვეთის რაოდენობა) საშუალო მაჩვენებლებში აღრიცხული ცვლილებები არ აღმოჩნდა სტატისტიკურად სარწმუნო (არაა ნაჩვენები).



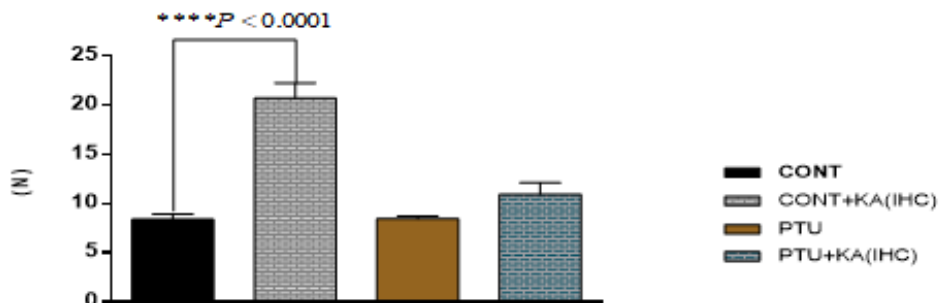
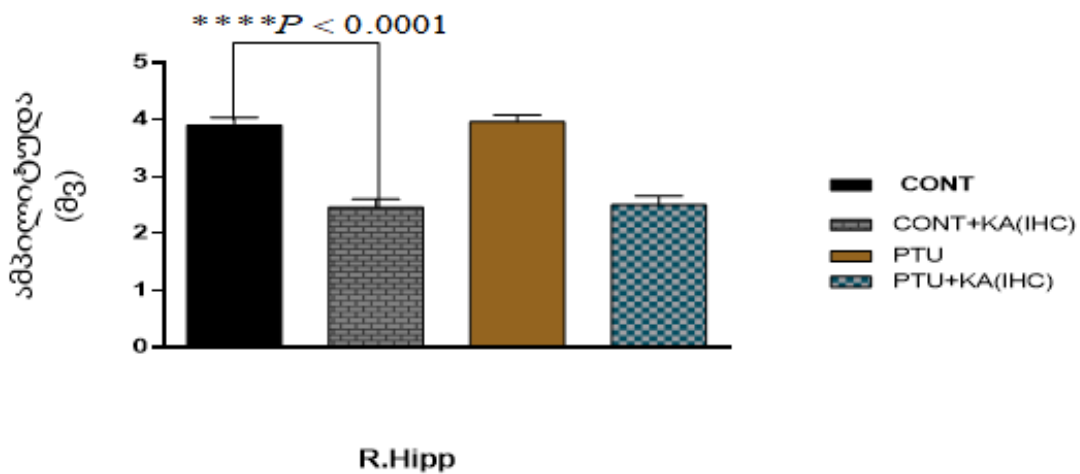
სურ. 7- პტუ-ს გავლენა მოტორული აქტივობის მაჩვენებლებზე. ჰისტოგრამები გამოხატავს „ღია ველში“ საკონტროლო და პტუ ინექცირებული ვირთაგვების მოტორული 5 დღის აქტივობის საშუალო მონაცემებს, საშუალო სტანდარტული გადახრებით (იხილეთ მითითებები გრაფიკებზე).



სურ. 8-პტუ-ს გავლენა ცხოველის ემოციურ სტატუსზე. ჰისტოგრამებ გამოხატავს „ღია ველში“ საკონტროლო და პტუ-ინექცირებული ვირთაგვების ემოციური სტატუსის 5 დღის საშუალო მონაცემებს საშუალო სტანდარტული გადახრებით (იხილეთ მითითებები გრაფიკებზე).

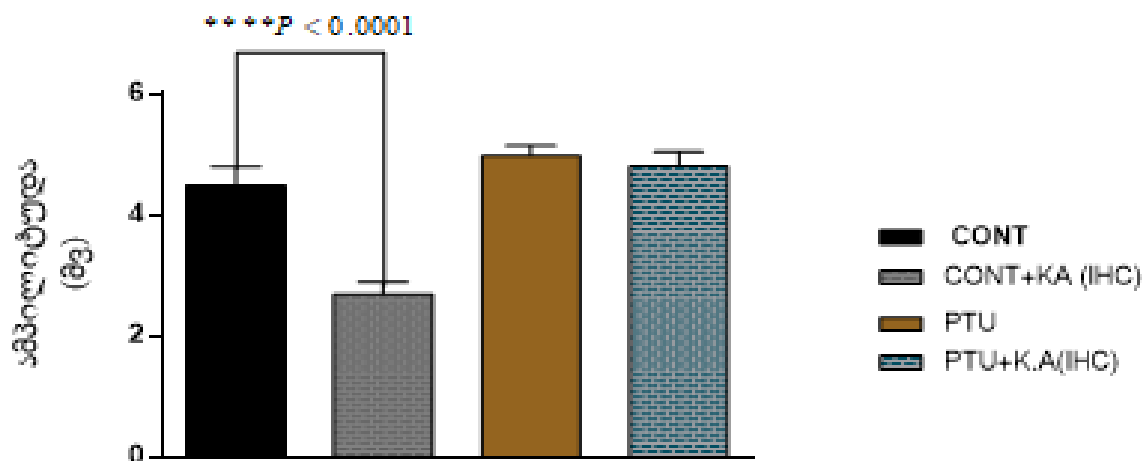
III.5. NADH-Cy5 რედუქტაზული სისტემის ინჰიბირების გავლენა ელექტროფიზიოლოგიურ მონაცემებზე

ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა *in vivo* ელექტროფიზიოლოგიური მეთოდის გამოყენებით შეგვესწავლა და შეგვეფასებინა NADH-Cy5 რედუქტაზული სისტემის ინჰიბირების ეფექტები ჰიპოკამპის CA1 ველის ფონურ ნეირონულ აქტივობაზე. მიღებული მონაცემების ანალიზმა აჩვენა, რომ პტუ-ინექცირებული ჯგუფის ცხოველებისგან განსხვავებით, კონტროლის ჯგუფის ცხოველებს აღენიშნებოდათ ამპლიტუდური მაჩვენებლების ზრდა (სურათი 9 და 10).

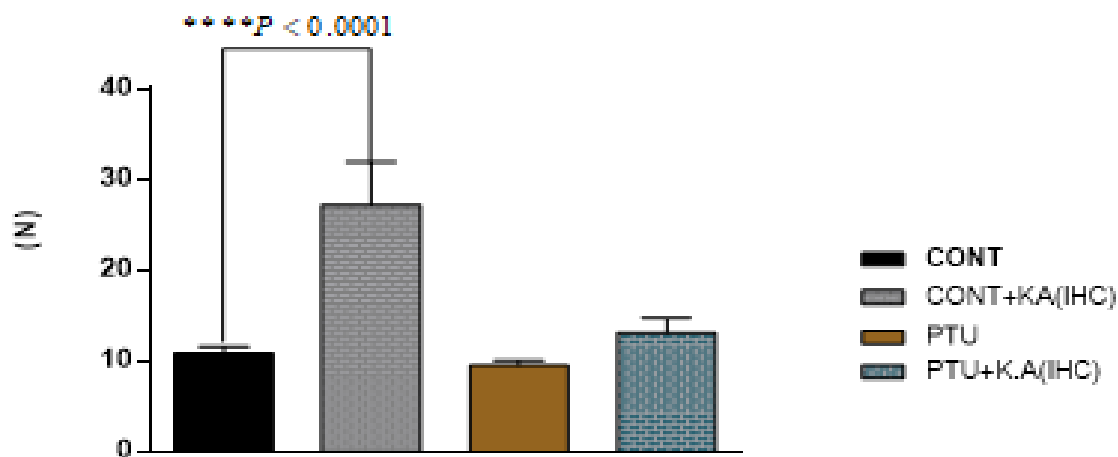


სურ. 9- ფონური აქტივობის მონაცემები, მარჯვენა ჰიპოკამპში. მოცემული ჰისტოგრამები გამოხატავს ნეირონული აქტივობის ამპლიტუდურ და რაოდენობის საშუალო მნიშვნელობებს + საშუალო სტანდარტული გადახრებით ფონში- მარჯვენა ჰიპოკამპი (R.Hipp).

L.Hipp

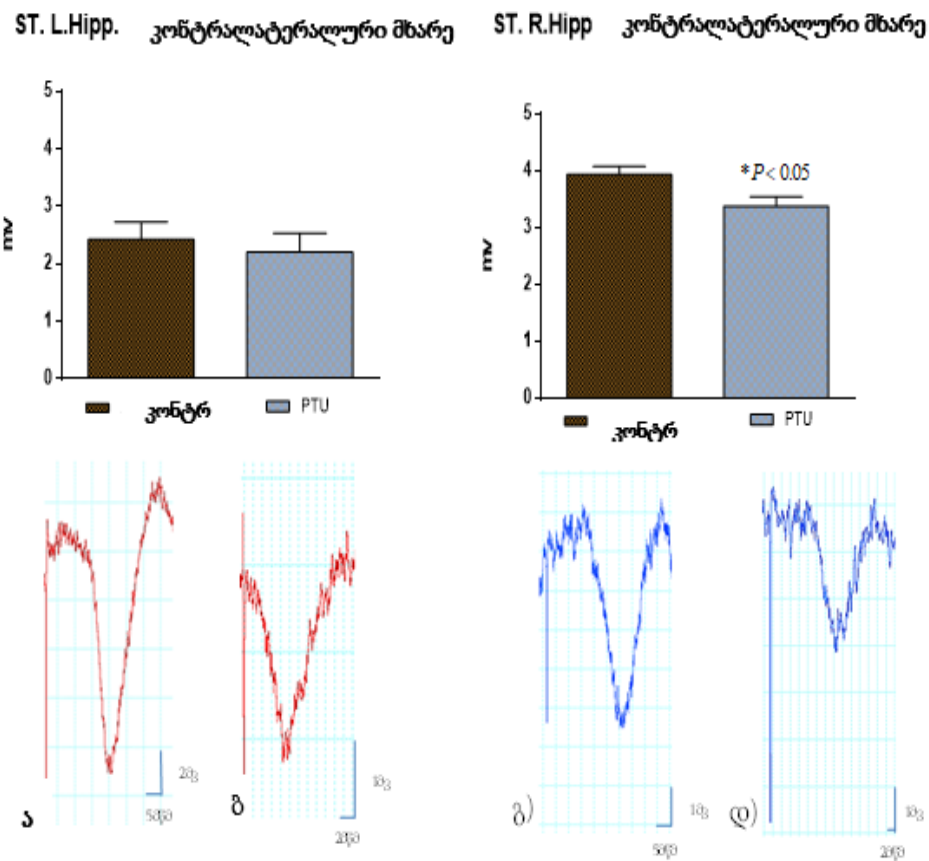


L.Hipp



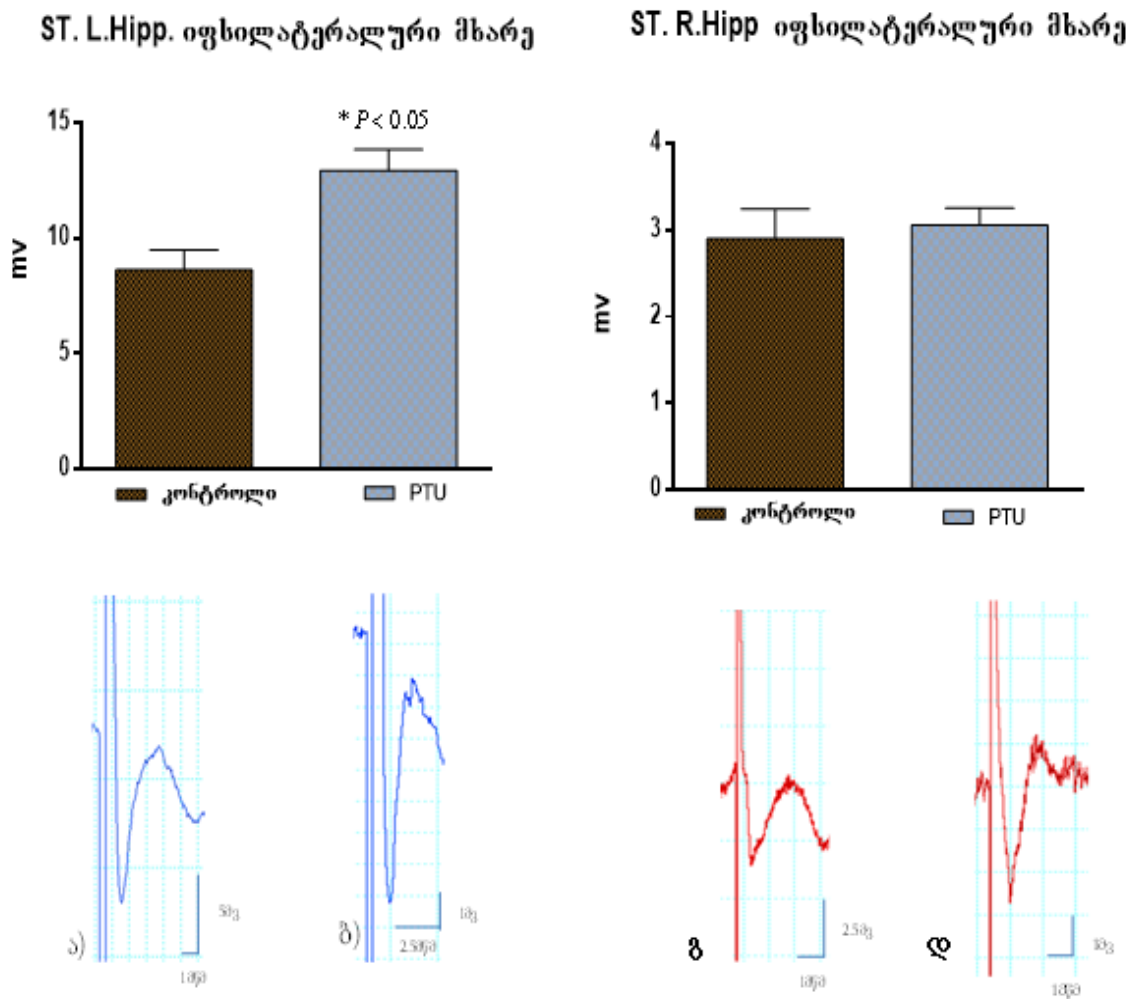
სურ.10- მარცხენა ჰიპოკამპის ფონური აქტივობების მონაცემი. მოცემული ჰისტოგრამები გამოხატავს ნეირონული აქტივობის ამპლიტუდის და როდენობის საშუალო მნიშვნელობებს + საშუალო სტანდარტული გადახრებით ფონში - მარცხენა ჰიპოკამპი (L.Hipp).

პტუ-ინექცირებულ ცხოველებში გამოწვეული პასუხები შეფასდება როგორც გამლიზიანებლის მიმართ იფსილატერალურ მხარეს, ისე კონტრალატერალურ ჰიპოკამპში. იფსილატერალურ მხარეს მიღებული შედეგების ინტერპრეტირება რთულდება ლოკალურად არსებული სხვადასხვა ტიპის ნეიროტრანსმიტერული ბოჭკოების გააქტივების გამო. ჩვენს განსაკუთრებულ ინტერესს იწვევდა კონტრალატერალურ მხარეს მიღებული გლუტამატერგული კომისურული ბოჭკოებით განპირობებული პასუხები. აღმოჩნდა, რომ პტუ-ინექცირებულ ცხოველებში გამოწვეული პასუხები კონტრალატერალურ მხარეს სტატისტიკურად სარწმუნოდ მცირდებოდა, რაც აიხსნება პტუ-იანი ცხოველების ქოლინერგულ სისტემაში განვითარებული ცვლილებებით, რაც როგორც ჩანს ამცირებს გლუტამატის გამოთავისუფლებას (სურათი 11).



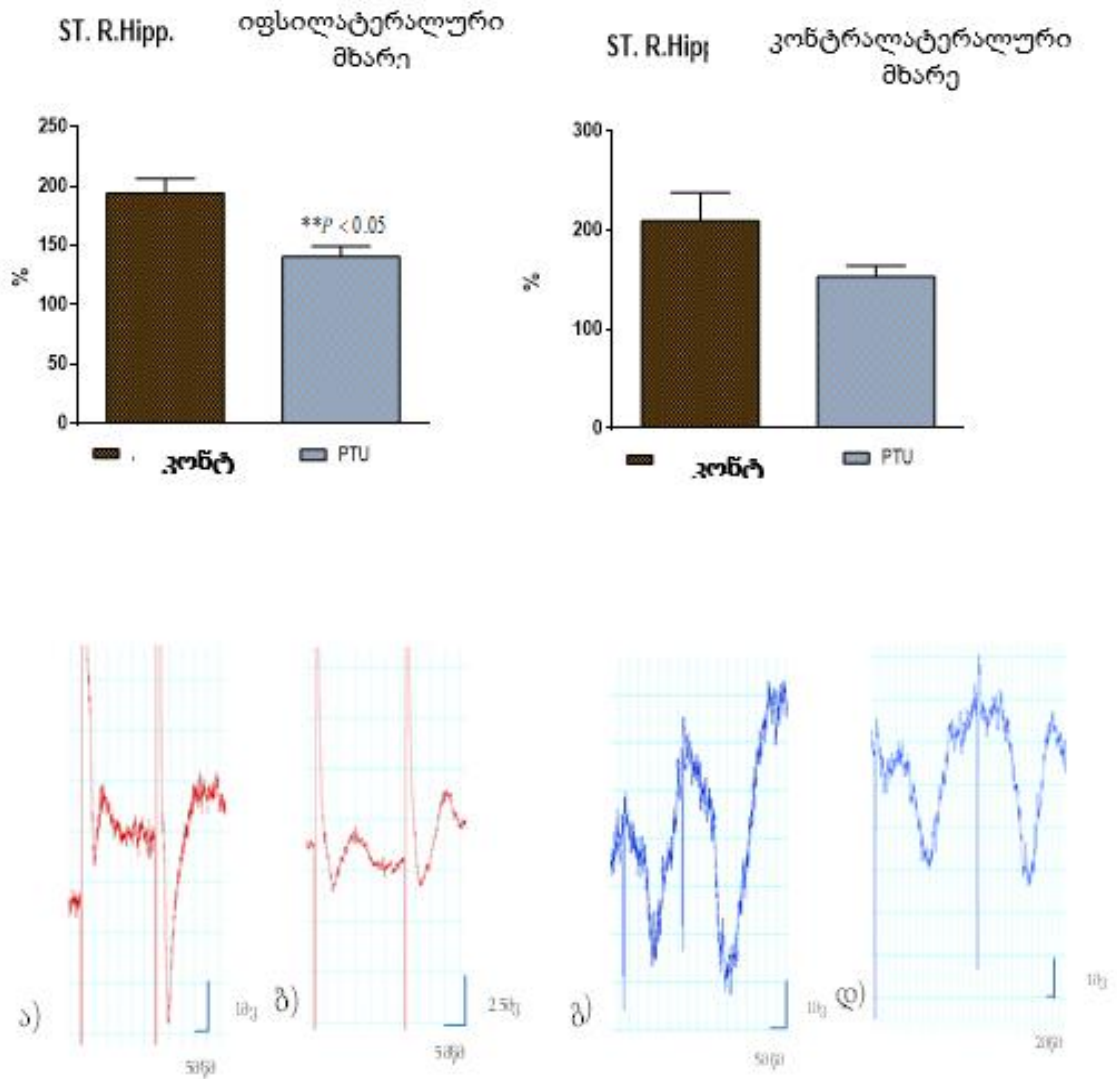
სურ.11-ჰიპოკამპში გამოწვეული პასუხები. ჰისტოგრამაზე ნაჩვენებია კონტრალატერალურ მხარეს ერთხელობრივი გაღიზიანების შედეგად მიღებული ამპლიტუდური მაჩვენებლების საშუალო მნიშვნელობები + საშუალო სტანდარტული გადახრებით. ჰისტოგრამების ქვეშ მოცემულია შესაბამის გგუფებში კონტროლის და პტუ-ცხოველების ელექტროფიზიოლოგიური ჩანაწერები.

მარჯვენა ჰიპოკამპში გამოწვეული პასუხები კონტრალატერალურ მხარეს კონტროლის ჯგუფის ცხოველების მონაცემთან შედარებით პტუ-ინექცირებული ცხოველებში მნიშვნელოვნად მცირდება; რაც შეიძლება აიხსნას აცეტილქოლინის შემცირებული დონით, და მისი შესუსტებული ზეგავლენით გლუტამატერგულ ნეირონებზე (სურათი 12).



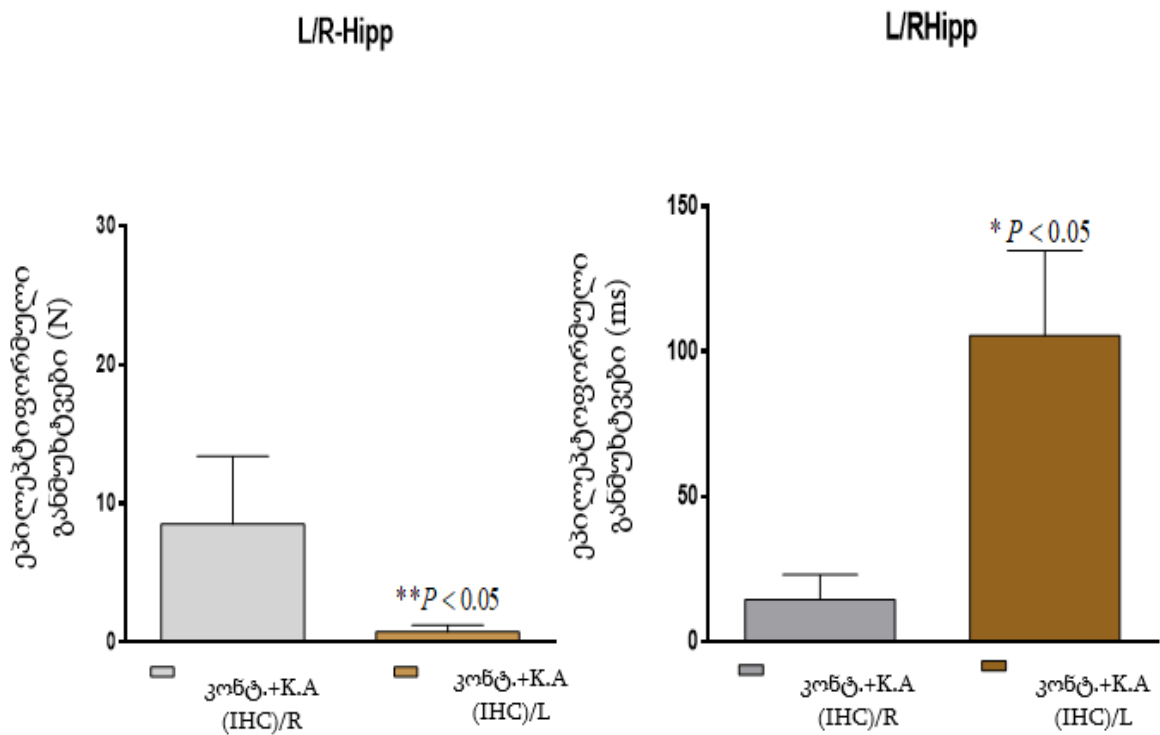
სურ.12-ჰიპოკამპში გამოწვეული პასუხები. ჰისტოგრამაზე ნაჩვენებია იფსილატერალურ მხარეს ერთხელობრივი გალიზიანების შედეგად მიღებული ამპლიტუდური მაჩვენებლების საშუალო მნიშვნელობები + საშუალო სტანდარტული გადახრებით, ჰისტოგრამების ქვეშ მოცემულია შესაბამის ჯგუფებში კონტროლის და პტუ-იანი ცხოველების ელექტროფიზიოლოგიური ჩანაწერები.

წყვილადი გალიზიანების ტესტმა გვაჩვენა, რომ სინაფსური გაადვილების პროცენტული მაჩვენებელი იცვლება, რაც პტუ-ით გამოწვეული ცვლილების პრესინაფსურ ლოკუსზე მიგვანიშნებს და კიდევ უფრო ამყარებს იმ მოსაზრებას, რომ შეიძლება ადგილი ჰქონდეს აცეტიქოლინით გლუტამატეგრულ პრესინაფსურ ტრანსმისიას (სურ.13).



სურ.13- ჰიპოკამპის წყვილადი გალიზიანება. ჰისტოგრამებზე ასახულია წყვილადი გალიზიანების შედეგად მიღებული პასუხების პროცენტული ცვლილება (საშუალო მნიშვნელობები + საშუალო სტანდარტული გადახრა) იპსი და კონტრალატერალურ ნაწილებში. ჰისტოგრამების ქვეშ მოცემულ სურათზე ნაჩვენებია შესაბამის ცდის ჯგუფებში წყვილადი გალიზიანების შედეგად მიღებული პასუხების ელექტროფიზიოლოგიური ჩანაწერები.

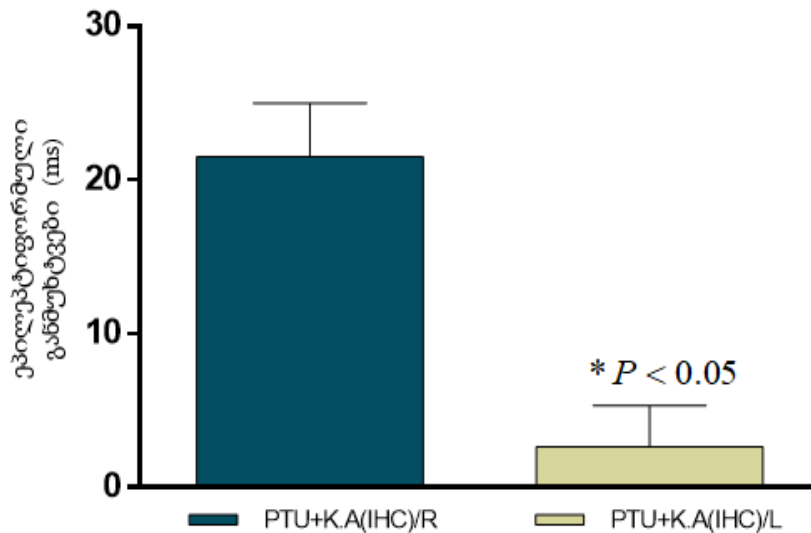
საკონტროლო ცხოველებში კაინის მჟავას ადმინისტრირების შედეგად აღმოცენდებოდა ეპილეფტიფორმული განმუხტვები. გენერირებული კრუნჩხვების რაოდენობრივი და ამპიტუდური მაჩვენებლები როგორც იფსი-, ისე კონტრალატერალურ ჰიპოკამში ნაჩვენებია სურათზე (სურ.14). აღსანიშნავია, რომ კ.მ-ს აპლიკაციის მხარეს ეპილეფტიფორმული განმუხტვების რაოდენობა მეტი იყო, კონტრალატერალურთან შედარებით; ხოლო ხანგრძლივობა უფრო მეტი იყო კონტრალატერალურ მხარეს (სურ: 15).



სურ.14-კონტროლის ცხოველებში მარჯვენა და მარცხენა ჰიპოკამში ეპილეფტიფორმული განმუხტვების სიხშირე და რაოდენობა. ჰისტოგრამები გამოხატავს ეპილეფტიფორმული განმუხტვის სიხშირისა და რაოდენობის საშუალო მაჩვენებლებს საშუალო სტანდარტული გადახრით.

პტუ-იან ცხოველებში ასევე განისაზღვრა ინტრაჰიპოკამპალური ინექციით მიღებული ეპილეფტიფორმული განმუხტვების მაჩვენებლები. მიღებული მონაცემების ანალიზმა გვიჩვენა, რომ კონტრალატერალურ მხარეს, იფსილატერალურ მხარესთან შედარებით ეპილეფტიფორმული განმუხტვების ხანგრძლივობა სტატისტიკურად სარწმუნოდ იყო შემცირებული (სურ.15)

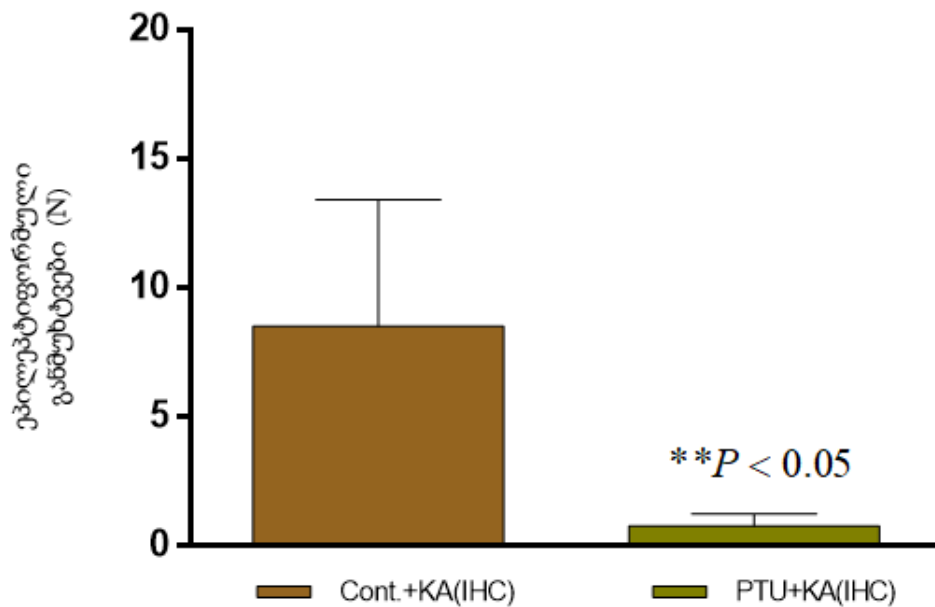
L/RHipp



სურ.15-პტუ-ს გავლენა ეპილეფტიფორმული განმუხტვების სიხშირესა და რაოდენობაზე. ჰისტოგრამები გამოხატავს პტუ ინექცირებული ცხოველების მარჯვენა და მარცხენა ჰიპოკამპში ეპილეფტიფორმული განმუხტვის სიხშირისა და რაოდენობის საშუალო მაჩვენებლებს, საშუალო სტანდარტული გადახრით.

საკონტროლო და პტუ-იანი ცხოველების მონაცემების ურთერთშედარების საფუძველზე გამოავლინდა, რომ კონტრალატერალურ მხარეს მცირდებოდა როგორც კრუნჩხვების რაოდენობა, ისე მისი ხანგრძლივობა, აღნიშნული ცვლილებები იყო სტატისტიკურად სარწმუნო (სურ 16).

R-Hipp



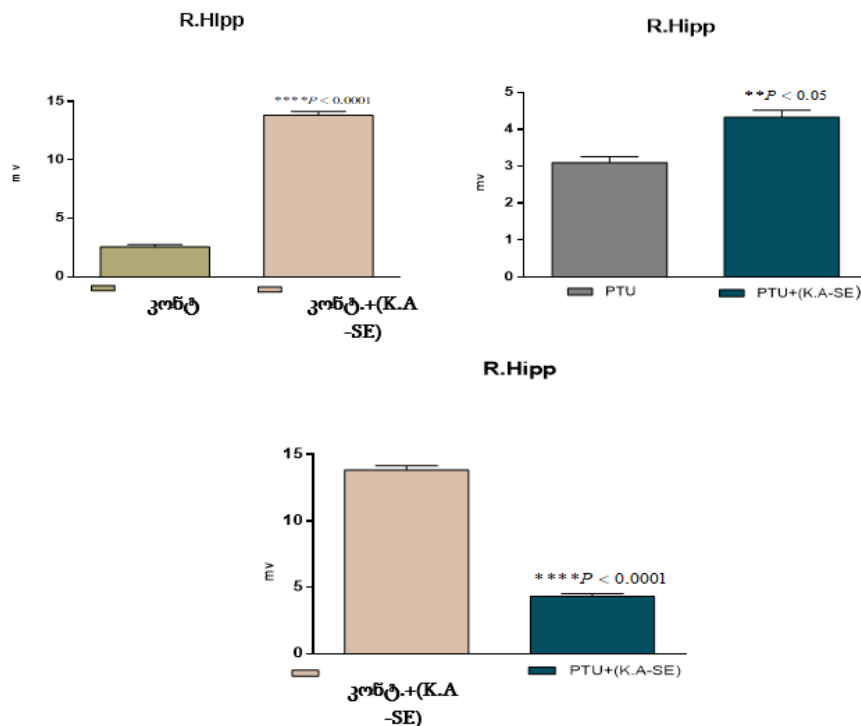
სურ.16-საკონტროლო და პტუ ინექცირებულ ცხოველებში ეპილეფტიფორმული განმუხტვების რაოდენობა კაინის მჟავას ინტრაჰიპოკამპალური ინექციის შემდეგ. ჰისტოგრამებზე ნაჩვენებია საშუალო მაჩვენებლები + საშუალო სტანდარტული გადახრით.

თავი IV

IV.1. NADH-Cyb5 რედუქტაზული სისტემის ინჰიბირების გავლენა

ეპილეფტოგენეზე

ვირთაგვებში პტუ -ს ოთხჯერადი ინექციის შემდეგ კ.მ -ის ეპილეფსიური სტატუსის მისაღებად გამოვიყენეთ ფარამკოლოგიური მიდგომა. კ.მ 10მგ/კგ. აღნიშნული მიდგომით პტუ-ინექცირებულ ცხოველებში ყალიბდებოდა ეპილეფსიური სტატუსი და კონტროლთან მიმართებაში ამ თვალსაზრისით არ აღინშნებოდა განსხვავება (ლექტალობის ერთნაირი მაჩვენებელი). ურთიერთშევადარეთ ეპილეფსიური სტატუსის მქონე საკონტროლო და პტუ ცხოველების ელექტრული აქტივობის მაჩვენებლები ჰიპოკამპში. კანის მყავას ეპილეფსიური სტატუსი ნეირონული აქტივობის ამპლიტურ მაჩვენებლებს ზრდიდა როგორც საკონტროლო, ისე პტუ-იან ცხოველებში. თუმცა, პტუ-იან ცხოველებში აღნიშნული ცვლილებები ნაკლებად იყო გამოხატული; საკონტროლო ცხოველებში ეპილეფსიური სტატუსი 5.3-ჯერ ზრდიდა პასუხებს, მაშინ როცა პტუ-იანებში 1.4 ჯერ იზრდება (სურ.17)



სურ.17-სურათზე წარმოდგენილი ჰისტოგრამები ასახავს წარმოდგენილ ექსპერიმენტულ ჯგუფებს შორის (კონტ./კონტ.+(K.A-SE); PTU/PTU+(K.A-SE); კონტ.+(K.A-SE)/PTU/PTU+(K.A-SE)) მარჯვენა ჰიპოკამპში ერთხელობრივი გაღიზიანების შედეგად მიღებულ ამპლიტუდურ საშუალო მნიშვნელობებს+ საშუალო სტანდარტული გადახრებით.

შედეგები და დასკვნები

- ✓ NADH-Cyb5 რედუქტაზული სისტემის პტუ-თი სექლექტიური ინჰიბირება იწვევს აცეტილქოლინის დონის დაქვეითებას თავის ტვინის სტრუქტურებში სტატისტიკურად საწმუნოდ მომატებული Total Choline-ის ფონზე.
- ✓ NADH-Cyb5 რედუქტაზული სისტემის ინჰიბირებით თავის ტვინის უკანა ნაწილში შეინიშნება გაემ-ის რაოდენობის მატება.
- ✓ პტუ-ინექცირებულ ცხოველთა ქცევაში გამოვლინდა შემცირებული მოტორული აქტივობა და გაზრდილი ემოციური სტატუსი.
- ✓ პტუ-ინექცირებულ ცხოველებში აღინიშნებოდა კაინის მჟავას ინტრაჰიპოკამპალური ინექციით განპირობებული ეპილეფსიური განმუხტვების ხანგრძლივობისა და რაოდენობის შემცირება კონტროლთან შედარებით.
- ✓ პტუ-იან ცხოველებში მცირდებოდა ელექტრული გაღიზიანებით გამოწვეული ერთხელობრივი სინაფსური პასუხების ამპლიტუდა და იცვლებოდა წყვილადი გაადვილების მაჩვენებელი, რაც პტუ-თი განპირობებული ცვლილებების პრესინაფსურ ლოკალიზაციაზე მიგვანიშნებდეს.
- ✓ პტუ-იან ცხოველებში კაინის მჟავას ეპილეფსიური სტატუსი იწვევდა სინაფსური პასუხების გაზრდას, რაც საკონტროლო ცხოველებში კაინის მჟავას ეპილეფსიური სტატუსით განპირობებულ ზრდასთან შედარებით ნაკლები იყო.

1. NADH-Cyb5 რედუქტაზული სისტემის ადრეულ პოსტნატალურ პერიოდში პტუ-თი ინჰიბირება ცვლის აცეტილქოლინისა და გაემ-ერგული სისტემების აქტივობას. აღნიშნული ცვლილებები ჰიპოკამპის CA1- ველში განაპირობებს სინაფსური პასუხების შემცირებას, რასაც პრესინაფსური განპირობება უნდა ქონდეს, რადგან აღინიშნა წყვილადი გაადვილების ცვლილება.
2. NADH-Cyb5 რედუქტაზული სისტემის ინჰიბირებით გამოწვეული ცვლილებები ამცირებს კაინის მჟავას როგორც ინტრაჰიპოკამპური, ისე სისტემური შეყვანით განპირობებული ეპილეფსიური განმუხტვების გენერაციის სიხშირეს.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. Linda Kalilani, Xuezheng Sun, Barbara Pelgrims, Matthia Noack-Rink, Vicente Villanueva The epidemiology of drug-resistant epilepsy: A systematic review and meta-analysis *Epilepsia* 2018 Dec;59(12):2179-2193. DOI: 10.1111/epi.14596
2. 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]
3. Robert D. G. Blair Temporal Lobe Epilepsy Semiology *Epilepsy Res Treat*. 2012; 2012: 751510. DOI: 10.1155/2012/751510
4. Benjamin D Drever, 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
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. Anne T Berg, 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
7. Shaoyu Ge and John A. Dani Nicotinic Acetylcholine Receptors at Glutamate Synapses Facilitate Long-Term Depression or Potentiation *J Neurosci*. 2005 Jun 29; 25(26): 6084–6091. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0542-05.2005
8. Birte Plitzko, Antje Havemeyer, Bettina Bork, Florian Bittner, Ralf Mendel, and Bernd Clement Defining the Role of the NADH-Cytochrome-*b* Reductase 3 in the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component Enzyme System. *Drug Metabolism and Disposition* October, 2016, 44 (10) 1617-1621.
9. 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]
10. Amaral DG, Lavenex P. Hippocampal neuroanatomy. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, editors. *The Hippocampus Book*. Oxford University Press; New York: 2007. p.
 11. Heinz Künzle An extrahippocampal projection from the dentate gyrus to the olfactory tubercle *BMC Neurosci.* 2005; 6: 38. DOI: 10.1186/1471-2202-6-38
 12. Enrico Cherubini and Richard Miles The CA3 region of the hippocampus: how is it? What is it for? How does it do it *Front. Cell. Neurosci.*, 05 February 2015 | <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00019>
 13. Nikolaos Tzakis and Matthew R. Holahan Social Memory and the Role of the Hippocampal CA2 Region *Front. Behav. Neurosci.*, 01 October 2019 | <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00233>
 14. C W Cotman, D T Monaghan Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their properties *Adv Exp Med Biol.* 1986;203:237-52. DOI: 10.1007/978-1-4684-7971-3_18
 15. P Somogyi, T F Freund, A J Hodgson, J Somogyi, D Beroukas, I W Chubb Identified axo-axonic cells are immunoreactive for GABA in the hippocampus and visual cortex of the cat *Brain Res.* 1985 Apr 15;332(1):143-9. DOI: 10.1016/0006-8993(85)90397-x
 16. S. Patwari, H. C. Chadaga, A. Rohatgi; Bangalore/IN Hippocampus Hitched - exemplifying the anatomy and pathology, a pictorial essay *ECR 2017 / C-2009* DOI: 10.1594/ecr2017/C-2009 DOI-Link: <https://dx.doi.org/10.1594/ecr2017/C-2009>
 17. Agnieszka Münster-Wandowski¹, Gisela Gómez-Lira, Rafael Gutiérrez Mixed neurotransmission in the hippocampal mossy fibers. *Front Cell Neurosci.* 2013 Nov 22;7:210. PMID: PMC3837298. DOI: 10.3389/fncel.2013.00210
 18. Andrea Pedroni, Do Duc Minh, Antonello Mallamaci, Enrico Cherubini Electrophysiological characterization of granule cells in the dentate gyrus immediately after birth *Front Cell Neurosci* 2014 Feb 14;8:44. PMID: PMC3924035. DOI: 10.3389/fncel.2014.00044
 19. Marianne J Bezaire, Ivan Soltesz Quantitative assessment of CA1 local circuits: a knowledge base for interneuron-pyramidal cell connectivity *Hippocampus.* 2013 Sep;23(9):751-85 PMID: PMC3775914 DOI: 10.1002/hipo.22141

20. S Hrabetova P Serrano, N Blace, H W Tse, D A Skifter, D E Jane, D T Monaghan, T C Sacktor Distinct NMDA receptor subpopulations contribute to long-term potentiation and long-term depression induction J Neurosci 2000 PMID: PMC6772441, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.20-12-j0002.2000
21. Lidong Liu¹, Tak Pan Wong, Mario F Pozza, Kurt Lingenhoehl, Yushan Wang, Morgan Sheng, Yves P Auberson, Yu Tian Wang Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity Science. 2004 May DOI: 10.1126/science.1096615
22. Richardson N Leão, Sanja Mikulovic, Katarina E Leão, Germany, Henrik Gezelius, Anders Enjin, Kalicharan Patra, Anders Eriksson, Leslie M. Loew, Adriano BL Tort, and Klas Kullander OLM interneurons differentially modulate CA3 and entorhinal inputs to hippocampal CA1 neurons Nat Neurosci.2012 Nov; 15(11): 1524–1530. DOI: 10.1038/nn.3235
23. Luis V Colom, 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
24. Gabriela Beatriz Acosta. Early Life Experience, Maternal Separation, and Involvement of GABA and Glutamate Transporters Published: December 20th, 2017 DOI: 10.5772/intechopen.70868