ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი
ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი

ალექსანდრე წიკლაური

„თავის ტვინში ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის მიმდინარეობა ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში“

სამაგისტრო პროგრამა

ნაშრომი შესრულებულია ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის, ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტის, ბიოლოგიის დეპარტამენტის, ბიოქიმიის კათედრაზე ბიოლოგიის მაგისტრის ხარისხის მოსაპოვებლად

ხელმძღვანელი: თსუ, ბ.მ.დ პროფ. ნანა კოშორიძე

თბილისი

2022

სარჩევი

სარჩევი 2

ანოტაცია 4

Anotation 5

შესავალი 6

თავი I. ლიტერატურული მიმოხილავა 10

I.1. სტრესი და მისი მოქმედების მოლეკულური მექანიზმი 10

I.2. უჯრედის ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში ზოგიერთი ფერმენტის დახასიათება 17

I.2.1. კრეატინკინაზა 17

I.2.2. ალდოლაზა 18

I.2.3. კრებსის ციკლის ფერმენტები 19

I.2.3.1. ფერმენტი აკონიტაზა 20

I.2.3.2. ფერმენტი იზოციტარტდეჰიდროგენაზა 22

I.2.3.3. ფუმარაზა 23

I.2.3.4. მალატდეჰიდროგენაზა 24

I.3. ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე სასიგნალო ცილები და მათი მოქმედების მექანიზმი 26

ა) ფოსფატიდილ-ინოზიტოლ-3-კინაზები (PI3K) - სტრუქტურა და ფუნქციები 26

ბ) პროტეინკინაზა B (Akt), სტრუქტურა და ფუნქციები 27

გ) რაფამიცინის სამიზნე ცილა - mTOR (mammalian target of rapamycin) სტრუქტურა და ფუნქციები 28

II. კვლევის ობიექტი და მეთოდიკა 32

II.1. კვლევის ობიექტი 32

II.2. ფერმენტ აკონიტაზას აქტივობის განსაზღვრა 32

II.3. ფერმენტ ფუმარაზას აქტივობის განსაზღვრა 33

II.4. ფერმენტ სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობის განსაზღვრა 33

II.5. ფერმენტ კრეატინკინაზას აქტივობის განსაზღვრა 34

II.6. ფერმენტ ჰექსოკინაზას აქტივობის განსაზღვრა 35

II.7. ვესტერ-ბლოტის ანალიზი 35

სტატისტიკური ანალიზი 35

III. მიღებული შედეგები 36

III.1. ჰიპოკამპის უჯრედებში ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე ზოგიერთი ფერმენტის აქტივობის ცვლილება ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში 36

III.2. ფერმენტული ატივობის ცვლილების მიზეზის დადგენა ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში 37

III.3. PI3K / AKT / mTOR სასიგნალო გზის კომპონენტების რაოდნეობრივი ცვლილებების დადგენა ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში..... 39

IV. მიღებული მონაცემების განხილვა..... 43

დასკვნა 45

გამოყენებული ლიტერატურა..... 46

ანოტაცია

ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევით შესძლებელია დადგეს ლეტალური შედეგი როგორც ცხოველურ ორგანიზმებში, ასევე ადამიანში, რაც გამოიხატება ორგანიზმის სხვადასხვა ორგანოში, მათ შორის ნერვულ ქსოვილში მიმდინარე რთული მოლეკულური მექანიზმების ცვლილებაში. კვლევებმა აჩვენა, რომ ხანგრძლივი, 30-დღიანი ცირკადული რიტმის დარღვევა იწვევს ექსპერიმეტული ცხოველების თავის ტვინის ჰიპოკამპის უჯრედებში მეტაბოლურ ცვლილებებს, რაც გამოიხატება ენერგეტიკულ პროცესებში ჩართული ფერმენტების აქტივობის შემცირებით. ცნობილია, რომ კრეატინკინაზა მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ნერვული ქსოვილის ენერგეტიკაში. მისი აქტივაცია მნიშვნელოვნად ცვლის უჯრედშიდა ATP-ის დონეს და ამით უზრუნველყოფს ენერგეტიკული პროცესების სტაბილიზაციას. მონაცემები აჩვენებენ, რომ ლაბორატორიული ვირთაგვების ხანგრძლივი, 30 დღიანი, ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში ჰიპოკამპის უჯრედებში საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით შეინიშნება მიტოქონდრიული ფერმენტების, სუქცინატდეჰიდროგენაზას, α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზას, აკონიტაზას და კრეატინკინაზას აქტივობის შემცირება.

განსხვავებული შედეგები იქნა მიღებული გლიკოლიზის პროცესში მონაწილე ფერმენტების შემთხვევაში. შესწავლილი იქნა ამ პროცესის ორი ფერმენტი ალდოლაზა და ჰექსოკინაზა. მიღებულმა მონაცემებმა აჩვენა საპირისპირო ეფექტი, კერძოდ ალდოლაზას აქტივობა ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში მატულობს. ანალოგიური მონაცემები იქნა მიღებული ჰექსოკინაზას შემთვევაშიც. ნაჩვენები იქნა, რომ ჰექსოკინაზას აქტივობა, ალდოლაზას ანალოგიურად მატულობს.

ვირთაგვას თავის ტვინის ჰიპოკამპის უჯრედებში ნანახი იქნა, რომ ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში შეინიშნება ჰიპოკამპის პლაზმური მემბრანის PI3K p110α-სა და PI3K p85-ის სუბერთეულების ექსპრესიის შემცირება.

შემდგომ ექსპერიმენტში შესწავლილი იქნა ამ სასიგანლო გზის კიდევ ერთი კომპონენტის, კერძოდ mTOR-ის და მისი ფოსფორილირებული ფორმის რაოდენობრივი ცვლილებები. ნანახი იქნა, რომ mTOR-ის რაოდენობა ცირკადული რიტმის დარღვევის შედეგად საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით სარწმუნოდ ანალოგიური ცვლილებები შეინიშნება ასევე ფოსფორილირებული mTOR-ის შემთხვევაშიც, ხოლო AKT-ს აქტივობა მცირდება.

Anotation

"The course of energy metabolism in the brain in conditions of circadian rhythm disorders"

Long-term circadian rhythm disturbances can have lethal consequences in both animal and human organisms, manifesting themselves in altered complex molecular mechanisms in various organs of the body, including neural tissue. Studies have shown that disruption of the long, 30-day circadian rhythm leads to metabolic changes in the hippocampal cells of the brain of experimental animals, manifested by a decrease in the activity of enzymes involved in energy processes. Creatine kinase is known to play an important role in nerve tissue energy. Its activation significantly changes the level of intracellular ATP and thus ensures the stabilization of energy processes. The data show that mitochondrial enzymes, succinate dehydrogenase, α-ketoglutarate dehydrogenase, and aconitase activity are observed in hippocampal cells compared to the control group under conditions of prolonged 30-day circadian rhythm disturbances in laboratory rats.

Different results were obtained in the case of enzymes involved in the glycolysis process. Two enzymes of this process, aldolase and hexokinase, were studied. The data obtained showed the opposite effect, namely aldolase activity increases under conditions of prolonged circadian rhythm disturbance. Similar data were obtained in the case of hexokinase. Hexokinase activity has been shown to increase similarly to aldolase.

Decreased expression of hippocampal plasma membrane PI3K p110α and PI3K p85 subunits was observed in rat hippocampal cells under conditions of circadian rhythm disturbance.

Quantitative changes in another component of this signal pathway, namely mTOR and its phosphorylated form, were studied in a subsequent experiment. It has been observed that the number of mTORs observed as a result of circadian rhythm disturbances with respect to similar changes is observed in the case of phosphorylated mTORs as well, while the activity of AKT decreases.

შესავალი

მრავალი კვლევა აჩვენებს, რომ ორგანიზმის ცირკადული რიტმის დარღვევა მჭიდრო კავშირშია ქრონიკული სტრესის ჩამოყალიბებასთან, რაც თავის მხრივ იწვევს მთელი რიგი პათოლოგიების განვითარებას და რომელიც ხშირ შემთხვევაში ლეტალურად მთავრდება. ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევა იწვევს ისეთი დაავადებების განვითარებას როგორიცაა გულ-სისხლძარღვთა და საჭმლის მომნელებელი სისტემის პათოლოგიები, ორგანიზმის ენდოკრინული სისტემის ცვლილებები და სხვ. ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევა ასევე ნერვული სისტემის ფუნქციურ ცვლილებებს იწვევს, რომელიც მთელი რიგი ნეიროდეგენერაციული დავადებების მიზეზი ხდება. ცნობილია, რომ სოციალური იზოლაციის შედეგად ადგილი აქვს კოგნიტურ და ქცევით ცვლილებებს, აგრესიულობის ზრდას, მოძრაობითი და ორიენტაციული რეაქციების შემცირებას, მეხსიერებისა და დასწავლის გაუარესებას და სხვ. პროცესებს (Ieraci et al., 2016; Zaletel et al., 2017) (Mohawk et al., 2012; Richards et al., 2013; Ndiaye et al., 2014).

სტრესი არის „არასპეციფიური პასუხი“ გარეგან ცვლილებებზე. მისი მოლეკულური და ფიზიოლოგიური მექანიზმების შესწავლა კი თანამედროვე მეცნიერების აქტუალურ საკითხს წარმოადგენს. თანამედროვე ცხოვრების წესი ზრდის სტრესულ ფონს როგორც ადამიანში, ისე ცხოველებში და არღვევს ორგანიზმის სხვადასხვა სისტემის ნორმალური მოქმედების რიტმს და ნეგატიურად აისახება მათ ფუნქციონირებაზე. სტრესის დროს ხდება მთელი რიგი ფერმენტული სისტემების აქტივობის, ჰორმონალური სტატუსის, ბიოლოგიურად აქტიური მოლეკულების რაოდენობის ცვლილება და ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის დარღვევა, მათ შორის სტრესის დროს უჯრედებში მატულობს Ca^{2+}-ის რაოდენობა, რაც უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე ისახება.

აღსანიშნავია ის ფაქტიც, რომ სტრეს-ფაქტორების მოკლევადიანი მოქმედება, ააქტუიურებს უჯრედებს, რაც დადებითად აისახება მათ ფუნქციონირებაზე. თუმცა სტრესის გახანგრძლივების შედეგად განვითარებული მეტაბოლური ცვლილებები ხშირ შემთხვევაში სხვადასხვა პათოლოგიების ჩამოყალიბების საფუძველი ხდება.

ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული ნეირობიოლოგიური ცვლილებები მიმდინარეობს თავის ტვინის სხვადასხვა უბანში, კერძოდ პრეფრონტალურ ქერქში, ამიგდალასა და ჰიპოკამპში. მაგალითად, ვირთაგვებში, რომლებიც გაზრდილი არიან ცირკადული რიტმისდ დარღვევის პირობებში ნანახია ქცევითი და ბიოქიმიური

ეფექტების მნიშვნელოვანი დარღვევები. ცირკადული რიტმის დარღვევა წარმოადგენს ასევე აგრესული ქცევის ერთერთ მიზეზს და ამ პროცესში აქტიურადაა ჩართული პრეფრონტალური ქერქი (Goodell et al., 2017). პრეფრონტალური ქერის გარდა მაღალ მგრძნობელობას სოციალური იზოლაციით გამოწვეული სტრესის მიმართ ამჟღავნებს ჰიპოკამპიც. კერძოდ, ნაჩვენებია თავის ტვინის ამ უბანში ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში სეროტონინერგული სისტემის ცვლილებები (Muchimapura et al., 2002; Muchimapura et al., 2004). სეროტონინერგული სისტემის გარდა ცირკადული რიტმის დარღვევისადმი მმგრძნობელობას ამჟღავნებს ასევე ჰიპოკამპის გამა-ერგული სისტემაც (Talani et al.,2016), დადგენილია, რომ 8-კვირიანი იზოლაცია გავლენას ახდენს ჰიპოკაპზე, რაც აისახება C57BL/6J-ხაზის ვირთაგვების ქცევით მახასიათებლებსა და დასწავლის ხარისხზე (Gresack et al., 2009). ჰიპოკამპის გარდა სოციალურ იზოლაციაზე პასუხისმგებელია ასევე თავის ტვინის კიდევ ერთი უბანი, კერძოდ ამიგდალა. დადგენილია, რომ 30 დღიანი ცირკადული რიტმის დარღვევა იწვევს ცვლილებებს ვირთაგვას ამ სტრუქტურის შემაკავებელ ნეირონებში (Rau et al., 2015), კერძოდ შეინიშნება თავის ტვინის ნეიროტროფული ფაქტორის BDNF-ის რაოდენობრივი ცვლილებები

მონაცემები აჩვენებენ, რომ ლაბორატორიული ვირთაგვების ხანგრძლივი, 30 დღიანი, ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში ჰიპოკამპის უჯრედებში საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით შეინიშნება მიტოქონდრიული ფერმენტების, სუქცინატდეჰიდროგენაზას, α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზას, აკონიტაზას და კრეატინკინაზას აქტივობის შემცირება.

განსხვავებული შედეგები იქნა მიღებული გლიკოლიზის პროცესში მონაწილე ფერმენტების შემთხვევაში. ჩვენს მიერ შესწავლილი იქნა ამ პროცესის ორი ფერმენტი ალდოლაზა და ჰექსოკინაზა. ცნობილია, რომ ალდოლაზა უშუალო სიახლოვესაა მიტოქონდრიებთან და იქ წარმოქმნილ ROS-თან (Lenaz et al. 2002). ამის გათვალისწინებით, ჩვენ ვვარაუდობდით, რომ ადგილი ექნებოდა ამ ფერმენტის აქტივობის დაქვეითებას. თუმცა, მიღებულმა მონაცემებმა აჩვენა საპირისპირო ეფექტი, კერძოდ ალდოლაზას აქტივობა ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში მატულობს. ანალოგიური მონაცემები იქნა მიღებული ჰექსოკინაზას შემთვევაშიც. ნაჩვენები იქნა, რომ ჰექსოკინაზას აქტივობა, ალდოლაზას ანალოგიურად მატულობს. იმის გათვალისწინებით, რომ ჰექსოკინაზა წარმოადგენს გლიკოლიზის მალიმიტირებელ ფერმენტს, სავარაუდოა, რომ ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევა აძლიერებს თავის ტვინის უჯრედებში ამ პროცესს.

მიღებული შედეგები მიუთითებს, რომ ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში ადგილი აქვს მიტოქონდრიული ჟანგვითი ფოსფორილირების ინტენსივობის შემცირებას. რაც აისახება ენერგეტიკული მეტაბოლიზმში მონაწილე ფერმენტების აქტივობის დაქვეითებით.

შემდგომი ექსპერიმენტის მიზანს წარმოადგენდა იმ უჯრედშიდა სასიგნალო გზების შესწავლა, რომლებიც განსაზღვრავენ ვირთაგვას ჰიპოკამპის უჯრედების ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმს ცირკადული რიტმის დარღვვის პირობებში ამის გათვალისწინებით, შესწავლილი იქნა PI3K/AKT/mTOR სასიგნალო გზა, რომელიც ითვლება ენერგეტიკული მეტაბოლიზმისა და სინთეზური რეაქციების ერთერთ ძირითად რეგულატორად. ცდების საწყისს სტადიაზე ვესტერ-ბლოტის გამოყენებით შესწავლილი იქნა ცირკადული რიტმის 30-დღიანი დარღვევის პირობებში სასიგნალო გზის შემადგენელი კომპონენტის ფოსფატიდილ-ინოზიტოლ-3-კინაზას სუბერთებულების p110α-სა და p85-ს სულბერთეუების რაოდენობრივი ცვლილებები ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში.

მიღებული მონაცემებიდან ირკვევა, რომ ხანგრძლივი ცირკადული რიტმს დარღვევის პირობებში აღინიშნება PI3K-ს კატალიზური სუბერთეულის *PI3K* p110α რაოდენობრივი შემცირება. ცნობილია, რომ კატალიზური სუბერთეულის უარყოფით რეგულატორს წარმოადგენს *PI3K-ს* p85-სუბერთეული. ცნობილია, რომ ამ სუბერთეულის აქტივაცია ხელს უშლის კატალიზური სუბერთეულის ფოსფორილირებას და შესაბამისად, მისი აქტივობის, თუმცა ამ პირობებში ჩვენს მიერ ვერ იქნა ნანახი აქტიური *PI3K* p85-სუბერთეულის რაოდნეობრივი მატება.

შემდგომ ექსპერიმენტში შესწავლილი იქნა ამ სასიგანლო გზის კიდევ ერთი კომპონენტის, კერძოდ mTOR-ის და მისი ფოსფორილირებული ფორმის რაოდენობრივი ცვლილებები. ნანახი იქნა, რომ mTOR-ის რაოდენობა ცირკადული რიტმის დარღვევის შედეგად საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით სარწმუნოდ ანალოგიური ცვლილებები შეინიშნება ასევე ფოსფორილირებული mTOR-ის შემთხვევაშიც.

mTOR-ის პარალელურად შესწავლილი იქნა ასევე ამ სასიგნალო გზის კიდევ ერთი კომპონენტი, კერძოდ ფერმენტი AKT (პროტეინკინაზა PKB), ასევე მისი ფოსფორილირებული იზოფორმა. როგორც სურათი 6-დან ჩანს, ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში ვირთაგვების ჰიპოკამპის უჯრედებში საკონტროლო მაჩვენებელთან შედარებით აღინიშნება ამ ფერმენტის რაოდენობის შემცირება, სარწმუნოდაა შემცირებული მისი ფოსფორილირებული იზოფორმის რაოდენობაც.

ნაშრომის მიზანს წარმოადგენდა ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში თავის ტვინის ჰიპოკამპს უჯრედებში ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე ფერმენტების აქტივობის განსაზღვრა. ამავდროულად, ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე ფერმენტის კრეატინკინაზას კინეტიკული პარამეტრების კვლევის საფუძველზე ფერმენტების აქტივობის დაქვეითების მიზეზის დადგენა ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში.

თავი I. ლიტერატურული მიმოხილავა

I.1. სტრესი და მისი მოქმედების მოლეკულური მექანიზმი

სტრესი ბუნებრივი მოვლენაა, რომელიც ხშირად ვითარდება მაშინ, როცა ადამიანს არ შეუძლია გაუმკლავდეს კონკრეტულ მოთხოვნებსა და მოვლენებს. ანუ სტრესი მდგომარეობაა, რომელიც ჩნდება რთულ სიტუაციებში. დადგენილია, რომ სტრესი შეიძლება გახდეს ქრონიკული მდგომარეობა, თუ პიროვნება არ გადადგამს ნაბიჯს მისი მართვისკენ. ეს მოთხოვნები შეიძლება წარმოიშვას სამსახურში, ურთიერთობაში, ფინანსური ზეწოლის გამო და სხვა მსგავსი სიტუაციების დროს. შეიძლება ითქვას, რომ ნებისმიერმა მოვლენამ, რაც საფრთხეს უქმნის რეალურ ან აღქმულ პრობლემას და რაც ხელს უშლის პიროვნების კეთილდღეობას, შეიძლება გამოიწვიოს სტრესი.

ლიტერატურული მონაცემებით დასტურდება, რომ სტრესი შეიძლება იყოს მოტივატორი, რომელიც არსებითია გადარჩენისთვის. მექანიზმი - „იბრძოლე ან გაიქეცი“ აცნობს ადამიანს და სხვა ცოცხალ ორგანიზმებს, როდის და როგორ უნდა რეაგირებდნენ საფრთხეზე. ამასთან, როდესაც სხეული ძალიან ადვილად ღიზიანდება ან ერთდროულად ძალიან ბევრი სტრესორია ხანგრძლივი დროის განმავლობაში, ამან შეიძლება შეაფერხოს ადამიანის ფსიქიკური და ფიზიკური ჯანმრთელობა და გახდეს სხვადასხვა პათოლოგიის მიზეზი.

რა არის სტრესი?

სტრესი არის ფიზიოლოგიური მოვლენა, რომელიც ბუნებრივად იცავს სხეულს საფრთხისგან. ის იწვევს სხეულში ჰორმონების რაოდენობრივ ცვლილებას, რომლებიც ამზადებენ ორგანიზმს საშიშროების თავიდან ასაცილებლად ან მასთან შესაგუებლად.

როდესაც ადამიანი გამოწვევის ან საფრთხის წინაშე დგას, ამ დროს ორგანიზმში აქტიურდება სხვადასხვა ბიოლოგიური რესურსები, რომლებიც ეხმარება პიროვნებას დარჩეს და დაუპირისპირდეს გამოწვევას, ან მიიღოს უსაფრთხოების ზომები.

შედეგად ორგანიზმში აქტიურად წარმოიქმნება და დიდი რაოდენობით გამოიყოფა: გლუკოკორტიკოიდი კორტიზოლი, ეპინეფრინი და ნორეპინეფრინი. ეს კი იწვევს არტერიული წნევის მომატებას, კუნთების დაძაბულობას, ოფლიანობას, გულისცემის გახშირება და სიფხიზლეს.

სტრესი ანელებს ორგანიზმში მიმდინარე პროცესებს, მაგალითად: საჭმლის მონელებას და იმუნურ პასუხს. ამ დროს ორგანიზმი მზად არის გამოიყენოს საკუთარი

რესურსები სუნთქვის, სისხლის ნაკადის, სიფხიზლის, კუნთების მოულოდნელი გამოყენებისთვის.

სტრესული რეაქციის დროს ვითრედება არტერიული ჰიპერტენზია და ჩქარდება პულსი, სუნთქვა ხშირდება, საჭმლის მონელება ითრგუნება, იმუნური აქტივობა ქვეითდება, კუნთები უფრო დაძაბულია და მატულობს სიფხიზლე, შესაბამისად ვითარდება უძილობა.

იმის მიხედვით თუ როგორ რეაგირებს ადამიანი რთულ ვითარებაზე, ეს განსაზღვრავს სტრესის გავლენას ჯანმრთელობაზე. ზოგიერთი ადამიანი, ერთროულად განიცდის რამდენი სტრესორის ზემოქმედებას, რაც უფრო მძიმედ აღიქმება ორგანიზმის მიერ.

ზოგიერთმა ბუნებრივმა მოვლენამ, შეიძლება გამოიწვიოს სტრესული მდგომარეობა მაგალითად ბავშვის გაჩენა, საცხოვრებელი ადგილის შეცვლა და სამსახურის დაკარგვა. ამის მიზეზი ისაა, რომ ისინი ჩვეულებრივ მოიცავს მნიშვნელოვან ცვლილებას, დამატებით ძალისხმევას, ახალ პასუხისმგებლობას და ადაპტაციის აუცილებლობას. არსებობს უამრავი სტრეს-ფაქტორი.

ფსიქიკური ჯანმრთელობის ეროვნული ინსტიტუტი (NIMH) აღიარებს სტრესის ორ სახეს: მწვავეს და ქრონიკულს.

NIMH ასევე განსაზღვრავს სტრესორის ტიპის სამ მაგალითს:

რუტინული სტრესი, როგორიცაა ბავშვის მოვლა, საშინაო დავალება ან ფინანსური პასუხისმგებლობა მოულოდნელი, დამანგრეველი ცვლილებები, მაგალითად, ოჯახის გაჭირვება ან სამსახურის დაკარგვის შესახებ ინფორმაცია ტრავმული სტრესი, რომელიც შეიძლება მოხდეს მძიმე ავარიის, თავდასხმის, ეკოლოგიური კატასტროფის ან ომის შედეგად ექსტრემალური ტრავმის გამო. ასევე ბოლო პერიოდში აღმოჩენილია *იზოლაციური* და *ცირკადული რიტმის* დარღვევით გამოწვეული სტრესი.

მწვავე სტრესი მოკლევადიანი და როგორც წესი, სტრესის უფრო გავრცელებული ფორმაა. მწვავე სტრესი ხშირად ვითარდება, როდესაც ადამიანები განიხილავენ მოვლენათა ზეწოლას, რომელიც მოხდა ბოლო პერიოდში ან უახლოეს მომავალში განიცდიან უახლოეს გამოწვევებს. მწვავე სტრესი არ იწვევს ისეთ ზიანს, როგორც ხანგრძლივი და ქრონიკული სტრესის. მოკლევადიანი ეფექტები მოიცავს დაძაბულობის თავის ტკივილს და აღიზიანებს კუჭს.

ამასთან, მწვავე სტრესის განმეორებითი შემთხვევები ხანგრძლივი პერიოდის განმავლობაში შეიძლება გადავიდეს ქრონიკულ მდგომარეობაში. ქრონიკული სტრესი დიდი ხნის განმავლობაში ვითარდება და უფრო მძიმეა ორგანიზმისთვის.

მიმდინარე სიღარიბე, არასრულფასოვანი ოჯახი ან უბედური ქორწინება არის სიტუაციების მაგალითები, რამაც შეიძლება ქრონიკული სტრესი გამოიწვიოს. ეს ხდება, როდესაც ადამიანი ვერ პოულობს გზას, რომ თავიდან აიცილოს მძიმე სიტუაცია და წყვეტს პრობლემების გადაჭრას. ადრეულ ასაკში ტრავმულმა მდგომარეობამ შეიძლება ასევე ხელი შეუწყოს ქრონიკული სტრესის განვითარებას.

ქრონიკული სტრესი აფერხებს სტრესის ჰორმონის (ადრენალინი) აქტივობის ნორმალური დონის შენარჩუნებას, რამაც შეიძლება ხელი შეუწყოს შემდეგ სისტემებში პათოლოგიების განვითრებას: გულ-სისხლძარღვთა, რესპირატორული, ნერვული, იმუნური, რეპროდუქციული.

სტრესის მუდმივმა მდგომარეობამ შეიძლება გაამწვავოს მე-2 ტიპის დიაბეტი, ჰიპერტენზია და გულის დაავადებების რისკი, ასევე დეპრესია, შფოთვა და ფსიქიკური ჯანმრთელობის სხვა დარღვევები, მაგალითად, ტრავმული სტრესის შემდგომი აშლილობა (PTSD).

ქრონიკული სტრესი შეიძლება გაგრძელდეს შეუმჩნეველად, რადგან ადამიანი შეიძლება შეგუებული იყოს სტრესულ მდგომარეობას. ის შეიძლება გახდეს პიროვნების ნაწილი, რითაც ის მუდმივად მიდრეკილია სტრესის ზემოქმედებისკენ, მიუხედავად გარემოებისა.

ქრონიკული სტრესის მქონე პირებს აქვთ ფსიქო-ემოციური დარღვევები, რამაც შეიძლება გამოიწვიოს თვითმკვლელობა, ძალადობრივი ქმედებები, გულის შეტევა ან ინსულტი.

ზოგიერთისთვის, უბრალოდ ფიქრიც კი შეიძლება სტრეს-ფაქტორის როლში გვევლინებოდეს. თუმცა, ეს მეცნიერულად გამოკვლეული და დასაბუთბული ჯერ არ არის. ფსიქიკური ჯანმრთელობის მდგომარეობა, როგორიცაა დეპრესია, ან იმედგაცრუება, უსამართლობის შეგრძნება შეიძლება ასევე განსხვავებულად მოქმედებდეს სხვადასხვა ადამიანზე.

ცხოვრების ძირითადი მნიშვნელოვანი მოვლენები რომელიც იწვევს სტრესს, არის გადატვირთული სამუშაო გრაფიკი, დღე-ღამური რიტმის დარღვევა, ცხოველების შემთვევაში სოციალური იზოლაცია [1].

ტვინი სტრესისა და ადაპტაციის ცენტრალური ორგანოა სოციალური და ფიზიკური სტრესორების მოქმედებისას, ვინაიდან ის განსაზღვრავს და აფასებს საფრთხეს, ინახავს მეხსიერებას და არეგულირებს ფიზიოლოგიურ და ქცევით პასუხებს. ფიზიოლოგიური პასუხები, რომლებიც წარმოქმნიან ადაპტაციას ალოსტაზის საშუალებით, მოიცავს არა

მხოლოდ ჰიპოთალამო-ჰიპოფიზურ-თირკმელზედა ჯირკვლის ღერძს და ავტონომიურ ნერვულ სისტემას, არამედ მათი ურთიერთქმედებების მეტაბოლურ სისტემასაც. ალოსტაზი არის სტრესორებისადმი ადაპტაციის აქტიური პროცესი მედიატორების საშუალებით, როგორიცაა *კორტიზოლი,* ავტონომიური სისტემის მედიატორები და იმუნური სისტემა, რომლებიც ნელა და ურთიერთშეთნხმებულად მოქმედებენ ჰომეოსტაზის შესანარჩუნებლად.

ტვინი და ზოგადად ნერვული სისტემა არის სტრეს-ფაქტორების სამიზნე, ხოლო გლუკოკორტიკოიდები და ამინომჟავის ნაწარმები ნეიროტრანსმიტერების სახით ცვლიან ნეირონულ „არქიტექტურას“ და სინაფსების სიმჭიდროვის შემცირებით ან გაზრდით. არსებობს მრავალი ინტრა- და ექსტრაუჯრედული ლიგანდი , რომლებიც მონაწილეობენ სტრესის დროს ნეირონის მეტაბოლიზმის შეცვლაში და ამცირებენ სტრესულ მდგომარეობას.

აღმოჩენილია მექანიზმები, რომლებიც ემყარება სტრესულ გავლენას ტვინზე. სტრესორები ცვლიან გენის ექსპრესიას მრავალი მექანიზმის საშუალებით, მათ შორის გლუკოკორტიკოიდების უშუალო ეფექტებს გენის ტრანსკრიპციაზე.

გლუკოკორტიკოიდები არ არიან ამ ეფექტების ერთადერთი მედიატორები, მათში აგზნებადი ამინომჟავები და მრავალი სხვა უჯრედული მედიატორი მნიშვნელოვან როლს ასრულებს.

თავდაპირველად თვლიდნენ, რომ სტრესს ორგანიზმზე ყოველთვის უარყოფითი გავლენა ჰქონდა. თუმცა მოგვიანებით დადასტურდა სტრესის გამომწვევი ფაქტორები - სტრესორების ბუნებისა და მათი ზემოქმედების ხასიათის მიხედვით გამოიყო სტრესის ორი ტიპი, კერძოდ დადებითი და უარყოფითი სტრესი. ამასთან, შემოღბულ იქნა განმარტება, რომელის მიხედვითაც „დადებით“ სტრესს ეუსტრესი (ფიზიოლოგიური) ეწოდა, ხოლო „უარყოფითს“ – დისტრესი (პათოლოგიური) .

სელიეს მიხედვით ეუსტრესს ორი ფუნქციური დატვირთვა გააჩნია, კერძოდ იგი გამოწვეულია დადებითი ემოციებით და იგი არ არის ძლიერი და იწვევს ორგანიზმის მობილიზებას. რაც შეეხება დისტრესს, ის წარმოადგენს სტრესის ისეთ ფორმას, რომელთანაც გამკლავება ორგანიზმის ძალებს აღემატება და მას მძიმე სომატური და ფსიქიკური დაავადებების გამოწვევა შეუძლია [2,3].

სტრესის განვითარებასა და ჩამოყალიბებაში განარჩევენ სამ ძირითად ფაზას:

1. *საბრძოლო განგაშის ფაზა,* ამ დროს ინდივიდი მზადაა ბრძოლისთვის ან გაქცევისათვის.

2.*რეზისტენტობის (აქტივაციის) ფაზა*, რომელიც ხასიათდება გლუკოკორტიკოიდების დახმარებით არაკეთილსასურველი ზემოქმედების მიმართ ორგანიზმის გამძლეობის გაზრდით - მას წინააღმდეგობის გაწევის სტადიასაც უწოდებენ.

3. *გამოფიტვის (დისტრესის) ფაზა* - განვითარება დამოკიდებულია იმაზე, თუ ადაპტაციური ენერგიის რა მარაგი გააჩნია ორგანიზმს. გამოფიტვის სტადიაში თირკმელზედა ჯირკვალი წყვეტს გლუკოკორტიკოიდების გაძლიერებულ სეკრეციას, რომელიც თავის მხრივ, დაცვის ჰორმონებს წარმოადგენს, რასაც მოსდევს ორგანიზმის მდგომარეობის გაუარესება და დამძიმება - ამ ფაზას ადაპტაციის ფასაზასაც ეწოდება [2,3].

სტრესის დროს პროცესში ერთვება ორგანიზმის მრავალი სისტემა, მაგრამ სტრესს პასუხის ინტეგრაციაში, როგორც აღინიშნა განსაკუთრებული მნიშვნელობა თავის ტვინს აკისრია. კერძოდ, სტრესზე კონტროლს და სხვადასხვა ფსიქიატრიული დაავადებების ექსპრესიას ლიმბური სისტემა განსაზღვრავს. ამ დროს ორგანიზმში შეიძლება განვითარდნენ ფსიქიატრიული დარღვევები, რასაც მოყვება დეპრესიები, შფოთვა და სხვა ტიპის ემოციური მოშლილობები [4,5,6].

ორგანიზმში წარმოდგენილი ტვინის სამი რეგიონი მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ქცევაში და კოგნიტურ ფუნქციებში, აგრეთვე ავტონომიურ და HPA (ჰიპოთალამო–ჰიპოფიზის–თირკმელზედა ჯირკვალის სისტემა) სისტემის სტრესზე რეაგირების რეგულირებაში.

გლუკოკორტიკოიდული და მინერალოკორტიკოიდული რეცეპტორები პირველად აღმოჩენილ იქნა **ჰიპოკამპში**, რაც აჩვენებს, რომ თირკმელზედა ჯირკვლის სტეროიდები უფრო მეტ გავლენას ახდენენ თავის ტვინის სწორად ამ ნაწილზე, ვიდრე სხვა ნაწილებზე.

ჰიპოკამპში პირველად იქნა ნაჩვენები უჯრედული სტრესი და გლუკოკორტიკოიდების მოქმედება.

სწორედ ჰიპოკამპუსში იქნა აღიარებული ნეორომედიატორი ამინომჟავების როლი სტრესულ ეფექტებში.

მწვავე და ქრონიკული სტრესის ეფექტები ამიგდალაზე განსხვავდება ჰიპოკამპისაგან. აღმოჩენილია, რომ მწვავე ტრავმულმა სტრესორებმა შესაძლოა გამოიწვიოს ზურგის ტვინის სიმჭიდროვის გაზრდა, ბაზოლატერალურ ამიგდალას ნეირონებზე და

ქრონიკული სტრესი იწვევს ბაზოლატერალურ ამიგდალას დენდრიტების მოცულობის ზრდას. პრეფრონტალური ქერქის შიგნით, ქრონიკული სტრესი იწვევს მედიალური PFC ნეირონების დენდრიტების რაოდენობის შემცირებას, რაც ასოცირდება კოგნიტურ სიმტკიცეზე, ხოლო ორბიტოფრონტალური კორტიკალური ნეირონები ზრდიან დენდრიტების მოცულობას, რაც შეიძლება დაკავშირებული იყოს სიფხიზლის ზრდასთან.

ჰიპოკამპის ფუნქციას წარმოადგენს ყოველდღიური მეხსიერების ჩამოყალიბება, განწყობის რეგულაცია, სივრცითი მეხსიერება, სტრესის შემდგომი რეაგირების გათიშვა.

ამიგდალას ფუნქციებია: აგრესია, შიში, შფოთვა, სტრესული ჰორმონების გააქტიურება და გულის რიტმის გაზრდა.

პრეფრონტალური ქერქის ფუნქციები კი - გადაწყვეტილების მიღება, სამუშაო მეხსიერება, თვითრეგულირების ქცევა: განწყობა, იმპულსები, სტრესის შემდგომი რეაგირების გათიშვას წარმოადგენს.

სტრესი ზეგავლენას ახდენს ტვინში მიმდინარე ცვლილებებზე

ბოლოდროინდელმა ტექნოლოგიურმა მიღწევებმა საშუალება მისცა ადამიანს მოეხდინა დაკვირვება და ანალიზი გენთა ექსპრესიაზე სტრესის საპასუხოდ.

მაგალითად, ჰიპოკამპის ანალიზმა თაგვებში მწვავე სტრესის, ქრონიკული სტრესის და სტრესის გამოჯანმრთელების შემდეგ დაადგინა, რომ მწვავე და ქრონიკული სტრესი ახდენს ბირთვულ გენებზე გარკვეულ ზეგავლენას, ახდენს მათ მოდულაციას.

დადგენილია, რომ სოციალური იზოლაცია გავლენას ახდენს ნერვულ, ენდოკრინულ და იმუნურ სისტემებზე.

სტრესის განვითარების გამომწვევ ფაქტორს მიეკუთვნება ასევე ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევაც. დღე-ღამური რიტმის ცნება შემოიღო ამერიკელმა ფიზიოლოგმა ფრანც ჰალბერგმა. იგი მომდინარეობს ლათინური სიტყვიდან - „circa dies" ანუ „დღის შესახებ". ცირკადული რიტმის რეგულაცია, ხორციელდება ჰიპოთალლამუსის სუპრაქიაზმური ბირთვებით, რომელიც ამავე დროს არეგულირებს ძილ-ღვიძილის ციკლს და სხეულის ტემპერატურას . ყველა ცოცხალი ინდივიდი განიცდის დღე-ღამის ბუნებრივი რიტმის ზემოქმედებას. იგი ცოცხალი სისტემის ორგანიზაციის უჯრედულ, ორგანოთა, ორგანიზმულ და პოპულაციურ დონეებზე ვლინდება [7,8].

ამინომჟავები, განსაკუთრებით კი გლუტამატი, მნიშვნელოვან როლს ასრულებს თავის ტვინში სტრუქტურულ, ასევე ფუნქციურ ცვლილებებზე. კონტროლირებადი სტრესის საწყისმა კვლევებმა, რომელშიც ქრონიკული სტრესი იწვევს ჰიპოკამპური CA3

ნეირონების აპიკალური დენდრიტის რაოდების შემცირებას, აჩვენა, რომ მწვავე კონტროლირებადი სტრესი ზრდის უჯრედული გლუტამატის დონეს იმ პროცესის საშუალებით, რომელიც არ არის ადრენალექტომიურ ცხოველებში [9].

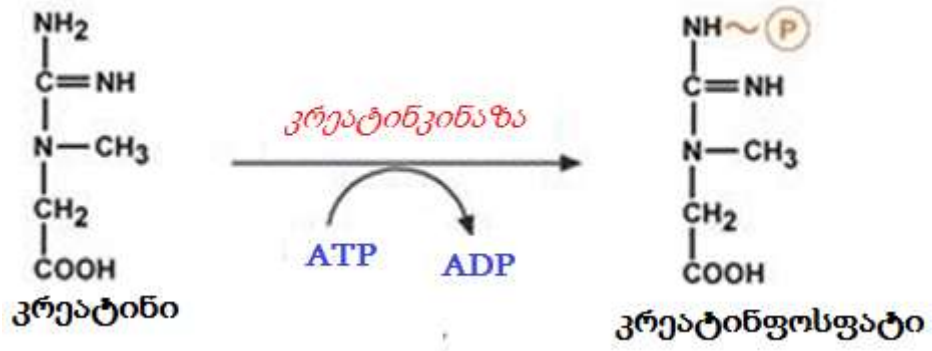
ლიტერატურილი მონაცემებით ცნობილია, რომ თავის ტვინში ქრონიკული სტრესით განპირობებული ოქსიდაციური პროცესების მიმართ განსაკუთრებულ მგრძნობელობას ავლენს NMDA-რეცეპტორი, კერძოდ მისი **GluN1** სუბერთეული, რომლის ჰიპერატივაცია იწვევს კალციუმის იონის დიდი რაოდენობით უჯრედის ციტოპლაზმაში შესვლას და შესაბამისად, ამ ეფექტით გამოწვეულ შემდგომ მოვლენებს. ქრონიკული სტრესის შედეგად განვითარებული პროცესები ზრდის რა ჰემატოენცეფალური ბარიერის გავლადობას, იწვევს ასევე NMDA-რეცეპტორის აქტივაციას GluN1 სუბერთეულის ფოსფორილირებით და შესაბამისად, უჯრედშიდა Ca^{2+}-ის რაოდენობის მატებას [10,11].

I.2. უჯრედის ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში ზოგიერთი ფერმენტის დახასიათება

I.2.1. კრეატინკინაზა

უჯრედში ენერგიის ძირითად წყაროს წარმოადგენს ატფ (ადენოზინტრიფოსფორმავა). არსებული ატფ-ის 95% სინთეზდება მიტოქონდრიაში ჟანგვითი ფოსფორილირების მეშვეობით. დანარჩენი 5% კი წარმოიქმნება გლიკოლიზის პროცესში. უჯრედის ყველა სახის აქტივობა ხორციელდება ატფ-ის დაშლის (დეფოსფორილირების) შედეგად გამოყოფილი ენერგიის ხარჯზე [12,13].

როგორც ცნობილია, ატფ-ს მუდმივობის შენარჩუნებაში მთავარი როლი კრეატინ/კრეატინკინაზა/ფოსფოკრეატინის (**Cr/CK/PCr**) სისტემას ენიჭება. ეს სტემა **კრეატინკინაზული** სისტემის სახელითაა ცნობილი და აქტიურია ნერვულ და კუნთოვან ქსოვილში. აღნიშნული სისტემა სწრაფად აღადგენს დახარჯული ატფ-ს დონეს, პროცესი მიტოქონდრიული აერობული მეტაბოლიზმის გვერდის ავლით მიმდინარეობს (სურ.1).



სურათი 1. კრეატინიდან ფოსფოკრეატინის წარმოქმნა

ეს პროცესი შემდეგი სახით მიმდინარეობს: უჯრედში ეგზოგენურად შემოსული (CrT-ის მეშვეობით) ანდა ციტოპლაზმაში წარმოქმნილი კრეატინი ხვდება მიტოქონდრიაში სადაც ხდება მისი ფოსფორილირება. რეაქციას ფერმენტი კრეატინკინაზა (**კრეატინფოსფოკინაზა)** აკატალიზებს (კრეატინკინაზა არის CKB გენის პროდუქტი, რომელიც მონაწილეობს ენერგიის ჰომეოსტაზში) .ამ ფერმენტის 2 სახე

არსებობს: მიტოქონდრიული (MtCK) და ციტოპლლოზმური (CK). MtCK ახდენს მიტოქონდრიაში წარმოქმნილი ატფ-ის ფოსფორმჟავას ნაშთის გადატანს კრეატინზე, რეაქციის შედეგად წარმოიქმნება ფოსფოკრეატინი (PCr) და ადფ. შემგომ PCr უკან ბუნდება ციტოლაზმაში, სადაც ენერგიის მარაგის სახით არსებობს და საჭიროებისამებრ ახდენს აკუმულირებული ენერგიის გამონთვისუფლებას. მაგალითად: კუნთის ძლიერი დატვირთვისას, ატფ-ის სიმცირის დროს, ფოსფოკრეატინი განიცდის დეფოსფორილირებას. ამ რეაქციის კატალიზს ახდენს ციტოპლაზმაში არსებული ანუ ციტოპლაზმური CK, რასაც ადფ-ის ფოსფორილირება და ატფ-ის წარმოქმნა მოყვება. შემდგომ დეფოსფორილირებული კრეატინი იმავე ციკლს იმეორებს. ეს სისტემა მიჩნეულია უჯრედის ფუნქციონირების მნიშვნელოვან მეტაბოლურ რეგულატორად, რომლის მოშლა მრავალი პათოლოგიის განვითარების მიზეზი ხდება [14,15,16].

ასევე ცნობილია, რომ CK არის ორი საერთო გენის პროდუქტი, რომელთაგან ერთი კოდირებს ფერმენტის ერთ ფორმას (ე.წ. კუნთებში მისი უპირატესობის გამო M) და მეორე - კი კოდირებს ფერმენტის მეორე ფორმა (ე.წ. ტვინის ქსოვილებში მისი უპირატესობის გამო B). მათ შორის განსხვავება აგებულებაში გამოიხატება, რასაც ფარმაკოლოგიური მნიშვნელობა აქვს [17,18].

I.2.2. ალდოლაზა

ალდოლაზა გლიკოლიზის პროცესში ჩართული ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი ფერმენტია, რომელიც ფრუქტოზო-1,6-დიფოსფატს გარდაქმნის გლიცერალდეჰიდ-3-ფოსფატად და ჰიდროქსიაცეტონდიფოსფატად. ფერმენტს გააჩნია სამი იზოფორმა (A,B,C). ალდოლაზა A- ნანახია ემბრიონსა და მოზრდილი ადამიანის კუნთებში, ასევე ღვიძლში, თირკმელსა და ნაწლავებში. იგი ლოკალიზებულია ციტოპლაზმაში, მაგრამ უჯრედული ციკლის S ფაზაში, დნმ-ის სინთეზისას, მას შეუძლია ბირთვშიც გადაინაცვლოს. ბირთვში მისი ლოკალიზაცია რეგულირდება პროტეინკინაზა B (PKB) და p38-ის მიერ. ალდოლაზა A შესაძლოა ლოკალიზებული იყოს მიტოქონდრიაშიც(Wyss et al. 2011). ფერმენტის აქტივობა რეგულირდება მეტაბოლიზმში მონაწილე სხვადასხვა სუბსტრატებით, მაგალითად გლუკოზით, ლაქტატითა და გლუტამინით. ალდოლაზა A-ს მაკოდირებელი გენი განსაკუთრებული ინტენსივობით ექსპრესირდება სხვადასხვა სახის სიმსივნის დროს (მაგ. ფილტვის ბრტყელუჯრედოვანი კარცინომა), რაც იწვევს გლიკოლიზის პროცესის

გააქტიურებას და შესაბამისად, სიმსივნური უჯრედების ზომაში სწრაფ ზრდას. მისი გააქტიურება მიანიშნებს მეტასტაზების გავრცელებაზე, ხოლო დაქვეითება ამცირებს სიმსივნური უჯრედების გადაადგილებას. ასე რომ, ალდოლაზა A მიიჩნევა ფილტვის ბრტყელუჯრედიანი კარცინომის ერთგვარ მარკერადაც[19,20,21].

ალდოლაზა B უმეტესად ღვიძლში ლოკალიზრდება და მისი დეფიციტი მკვეთრად აფერხებს გლიკოლიზისა და გლუკონეოგენეზის მიმდინარეობას. ასევე, მისმა დეფიციტმა შესაძლოა გამოიწვიოს ფრუქტოზის აუტანლობა, რომელიც მემკვიდრეობით ხასიათს ატარებს. ალდოლაზა C-ს ლოკალიზაციის ადგილს წარმოადგენს თავის ტვინი. ფერმენტი განსაკუთრებით აქტივდება შიზოფრენიის დროს, თავის ტვინის სიმსივნეებისა და ასევე ალცჰაიმერის დაავადებისას. ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ სტრესის პირობებში მან შეიძლება განიცადოს სტრუქტურული მოდიფიკაცია, რის გამოც მისი აქტივობა მნიშვნელოვნად კლებულობს[19,22].

I.2.3. კრებსის ციკლის ფერმენტები

კრებსის ციკლი წარმოადგენს რთული ქიმიური რეაქციების ჯაჭვს, რომელიც მიმდინარეობს მიტოქონდრიის მატრიქსში 8 სტადიად.

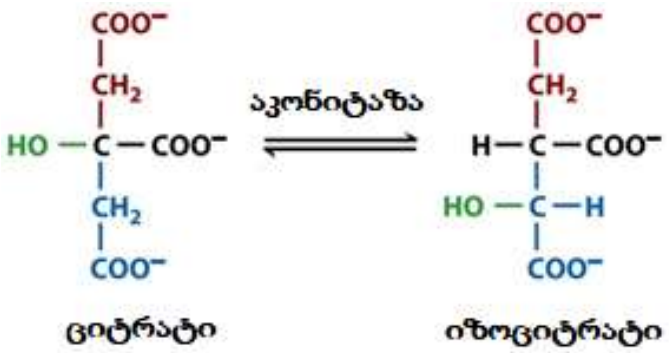
ციკლის პირველი ფერმენტია აკონიტაზა, რომელსაც ენერგიის წარმოქმნაში მნიშნელოვანი როლი აკისრია. იგი წარმართავს იზომერიზაციის რეაქციას, რომლის შედეგად ციტრატიდან მიიღება იზოციტრატი. ფერმენტს სპეციფიური აგებულება გააჩნია, აქტიური ცენტრი წარმოდგენილია რკინა-გოგირდოვანი კლასტერით (Fe-S-ჯგუფი), რის გამოც იგი მგრძნობიარეა ჟანგბადის აქტიური რადიკალების მიმართ. ROS-ის მაღალი კონცენტრაციით არსებობისას ხდება ფერმენტის აქტიური ცენტრის ინაქტივაცია, რასაც ფერმენტის ინჰიბირება და შესაბამისად, მეტაბოლიზმის პროცესის შეფერხება მოსდევს. გარდა აღნიშნულისა, აკონიტაზას ციტოზოლურ ფორმა ფუნქციონირებს, როგორც რკინა-დამაკავშირებელი ცილა (IRP) და მონაწილეობს რკინის ჰომეოსტაზში [23].

სუქცინატდეჰიდროგენაზა, ან სუქცინატ კოენზიმ Q რედუქტაზა წარმოადგენს სუნთქვის ჯაჭვისა და კრებისის ციკლის ფერმენტს, მოთავსებულია მიტოქონდრიის შიდა მემბრანაზე. მისი მეშვეობით ხორციელდება სუქცინატის დეჰიდრირება, რის შედეგადაც წარმოიქმნება ფუმარატი (ფუმარის მჟავა). ფერმენტის პროსთეტულ ჯგუფს წარმოადგენს დაჟანგული FAD+, რომელიც რეაქციის მსვლელობისას წყალბადის ორ ატომს იკავშირებს და აღდგება FADH2–მდე. ფერმენტული კომპლექსი წარმოდგენილია შემდეგი

სუბერთეულებით: SdhA, SdhB, SdhC და SdhD. ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ B, C და D სუბერთეულების მუტაცია განაპირობებს ოქსიდაციური სტრესის ინიცირებას [24]. სუქცინატდეჰიდროგენაზას მიერ წარმოქმნილი ფუმარატი ფერმენტ ფუმარაზას მეშვეობით გარდაიქმნება მალატად. არსებობს ფერმენტის ორი იზოფორმა: ციტოზოლური და მიტოქონდრიული. მიტოქონდრიული იზოფორმა ჩართულია კრებსის ციკლში, ხოლო ციტოზოლური იზოფორმა ამინომჟვებისა და ფუმარატის მეტაბოლიზმში მონაწილეობს. ფუმარაზას მაკოდირებელი გენის მუტაციამ შესაძლოა გამოიწვიოს თირკმლის კარცინომა და კანის ლეიომიომა. ფერმენტის დეფიციტი განაპირობებს ენცეფალოპათიის განვითარებას, რისი მიზეზი ორგანიზმში დიდი რაოდენობით ფუმარის მჟავის დაგროვებაა[25].

I.2.3.1. ფერმენტი აკონიტაზა

აკონიტაზა არის ძირითადი ფერმენტი ენერგიის წარმოქმნის პროცესში. როგორც ლიმონმჟავას ციკლის ნაწილი, ის ციტრატს გარდაქმნის იზოციტრატად. მიტოქონდრიაში არის აკონიტაზას ერთი ფორმა, ხოლო მსგავსი ფორმა გვხდება ციტოპლაზმაშიც რომელიც მონაწილეობს იზოციტრატის წარმოქმნაში (სურათი 2).



სურათი 2. ციტრატიდან იზოციტრატის წარმოქმნა

მიტოქონდრიული აკონიტაზა არის ლიმონმჟავას ციკლის ფერმენტი, რომელიც პასუხისმგებელია ციტრატ-იზოციტრატის გარდაქმნაზე. იზოფორმა ციტოპლაზმაში ახდენს ანალოგიურ რეაქციას. მიტოქონდრიული აკონიტაზა ძალიან მგრძნობიარეა სუპეროქსიდის, პეროქსინიტრიტისა და H2O2-ის მიმართ[26].

მიუხედავად იმისა, რომ მიტოქონდრიაში აკონიტაზა ლიმონმჟავას ციკლის ნაწილია, ციტოზოლში აკონიტაზა არის ტრანს-მარეგულირებელი ფაქტორი, რომელიც აკონტროლებს რკინის ჰომეოსტაზს პოსტტრანსკრიპციულ დონეზე.

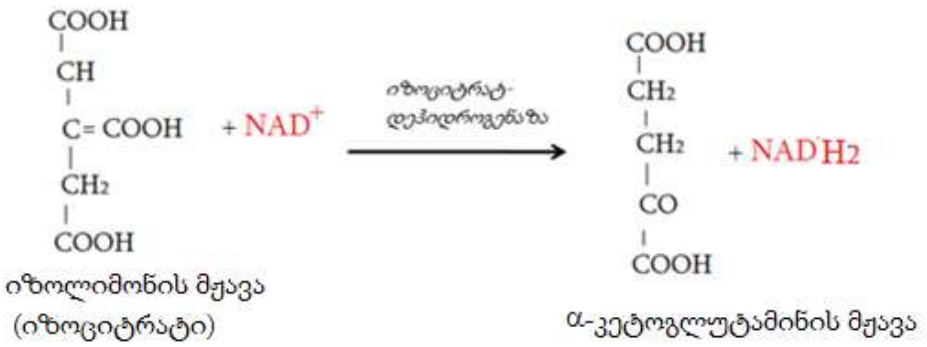
ორივე იზოფორმა (მიტოქონდრიული, m-; და ციტოზოლური, c-) შეიცავს [4Fe-4S] პროსტეთიურ ჯგუფს, რომელშიც ერთ-ერთი რკინა, Feα, არ არის მიბმული ცილოვან ნარჩენთან და, ამრიგად, შეუძლია დაუკავშირდეს სუბსტრატების ჰიდროქსილის ჯგუფებს ან წყალს[27].

იგი შედგება ერთი ცილოვანი ჯაჭვისგან, რომელიც წარმოდგენილია რამდენიმე დომენად. დომენები იხურება, აქტიური საიტის გარშემო, რომელიც შეიცავს რკინა-გოგირდოვან ცილებს, რომელიც ეხმარება რეაქციის წარმართვაში.

აკონიტაზას ციტოზოლური ფორმა ასევე მოქმედებს, როგორც რკინის მარეგულირებელი პროტეინი. რკინა-გოგირდოვანი ცილები აკონიტაზაში არასტაბილურია და დროდადრო იცვლება როდესაც ის ამოვარდება. როდესაც უჯრედში რკინის დონე იკლებს, არ არის საკმარისი რკინის რეგენერაციისთვის და ცილა გადადის მეორე ფუნქციაზე. აკონიტაზა ციტრატს აშორებს ჰიდროქსილის ჯგუფს და წყალბადის ატომს და ანაცვლებს მათ გეომეტრიულად ზუსტი გზით იზოციტრატის წარმოქმნით [28].

I.2.3.2. ფერმენტი იზოციტარტდეჰიდროგენაზა

იზოციტრატდეჰიდროგენაზა წარმოადგენს კრებსის ციკლის ერთ-ერთ ფერმენტს, რომელიც მონაწილეობს იზოციტრატის გარდაქმნაში α-კეტოგლუტარატად. რეაქციის კოფერმენტია NAD+ (სურ.3)

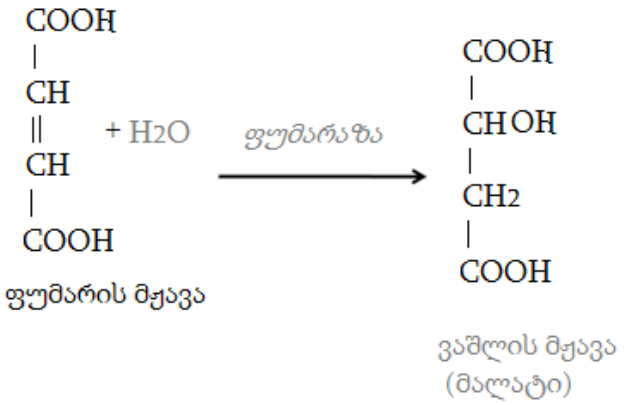


სურათი 3. იზოციტრატიდან ალფა-კეტოგლუტარამინის მჟავის წარმოქმნა

ფერმენტი იზოციტრატდეჰიდროგენაზა კინაზა/ფოსფატაზა ახორციელებს ორივე რეაქციას: ფოსფორილირება ფერმენტის ინაქტივაციის და მისი დეფოსფორილირება ფერმენტის გააქტიურებისთვისაა საჭირო. როდესაც ატფ-ის დონე მაღალია, AMP უკავშირდება მარეგულირებელ საიტს, ააქტიურებს ფოსფატის მოცილების მექანიზმს, წინააღმდეგ შემთხვევაში ის აქტიურია, როგორც კინაზა[29].

I.2.3.3. ფუმარაზა

ფუმარაზა არის ამ ციკლის ფერმენტი მიტოქონდრიაში. ფუმარაზა აკატალიზებს ფუმარატის ჰიდრატაციას L-მალატამდე და დეჰიდრატაციის საპირისპირო რეაქციას[30]. (სურ.4)



სურათი 4. ფუმარის მჟავიდან მალატის სინთეზი

არსებობს მრავალი ცნობილი მექანიზმი, რომელიც არეგულირებს ფუმარაზას უჯრედულ განაწილებას ეუკარიოტებში. S. cerevisiae-ში, ციტოზოლური და მიტოქონდრიული ფუმარაზას ექოფორმები კოდირებულია FUM-1 გენით[31].

ადამიანის უჯრედებში ნანახია ფუმარაზას ჰომოლოგი, რომელსაც უწოდებენ ფუმარატ- ჰიდრატაზას (FH), ექსპრესირებულია ერთი გენიდან[32].

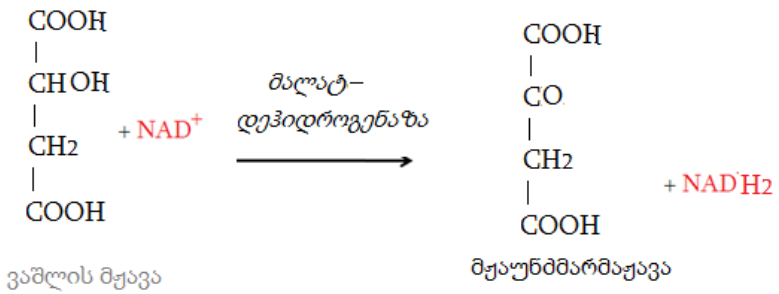
ნაჩვენებია, რომ ფუმარაზას გენის პრომოტორი შეიცავს ტრანსკრიფციის მრავალჯერადი დაწყების ადგილს, საიდანაც ხდება ფუმარაზას mRNA-ების ორი ჯგუფის ტრანსკრიპცია.

პირველ ჯგუფში შედის ტრანსკრიპტები, რომლებიც ტრანსლირდება ცილებად, რომლებიც შეიცავს ფუმარაზას მიტოქონდრიული სამიზნე თანმიმდევრობას (MTS), ხოლო მეორე ჯგუფი ტრსნდლირდება ფუმარაზას პროტეინებად, რომლებსაც არ გააჩნიათ ეს თანმიმდევრობა. ტრანსლაციის შემდეგ, ცილის ეს ორი ვერსია წარმოადგენს ფუმარაზას მიტოქონდრიულ და ციტოზოლურ იზოფორმებს. ეს ფერმენტი ფუნქციონირებს როგორც სიმსივნის სუპრესორიც. ფერმენტი ფუმარაზა აკატალიზებს ფუმარატის მალატამდე შექცევად ჰიდრატაციას. ფუმარაზას მიერ კატალიზებული

რეაქცია მნიშვნელოვანია უჯრედული ენერგიისთვის, როგორც კრებსის ციკლის ნაწილი, რომელიც წარმოქმნის შემცირებულ ეკვივალენტებს ჟანგვითი ATP სინთეზისთვის[33].

I.2.3.4. მალატდეჰიდროგენაზა

მალატდეჰიდროგენაზა ლიმონმჟავას ციკლის ბოლო ეტაპზე ხელახლა წარმოიქმნება ოქსალოაცეტატი, ამ პროცესში ელექტრონები გადადისს NADH-ზე. მალატდეჰიდროგენაზა გვხვდება,როგორც მიტოქონდრიაში, ასევე ციტოპლაზმაში[34]. (სურ.5)



სურათი 5. მალატიდან მჟაუნმჟვის სინთეზი

მალატდეჰიდროგენაზა ძლიერად არის გამოხატული ღვიძლის უჯრედების ციტოპლაზმაშიც, თუმცა მისი ძირითადი აქტივობა დაფიქსირებულია მიტოქონდრიებში.

ეს ფერმენტი ლიმონმჟავას აკატალიზირებს ახდენს მალატის შექცევად გარდაქმნას ოქსალოაცეტატად[35].

მალატდეჰიდროგენაზა არის მულტიმერული სისტემის ფერმენტი, რომელიც შედგება იდენტური სუბერთეულისგან, რომლებიც ხშირად განლაგებულია დიმერის ან ტეტრამერის სახით. თითოეული სუბერთეულის მოლეკულური წონა არის დაახლოებით 30-40 კდალ თითოეული სუბერთეული ახორციელებს თავის კატალიტიკურ რეაქციას დამოუკიდებლად. მალატდეჰიდროგენაზა გვხვდება ბევრ ორგანიზმში, მათ შორის ბაქტერიებში, სოკოებში, მცენარეებსა და ცხოველებში. მალატდეჰიდროგენაზას აქვს რამდენიმე იზოფერმენტი, რომლებიც განლაგებულია სხვადასხვა უჯრედულ ორგანელებში, მათ შორის მიტოქონდრიებში, ქლოროპლასტებში, გლიოქსიზომებში და პეროქსისომაში.

ამ ფერმენტის ცნობილი ინჰიბიტორებია იოდი, ციანიდი და ქლოროტრიციინი, ხოლო ფოსფატი, არსენატი და თუთიის იონები ამ ფერმენტის აქტივატორები არიან[36].

იდენტიფიცირებულია ფერმენტის რამდენიმე იზოფორმა, რომლებიც განსხვავდებიან სუბუჯრედული ლოკალიზაციით და სპეციფიკურობით NAD ან NADP-სადამი. ეუკარიოტულ უჯრედებში შეიძლება მოიძებნოს ფერმენტის სულ მცირე ორი ფორმა. ერთი იზოფორმა არის ლიმონმჟავას ციკლის ძირითადი ფერმენტი, რომელიც მოქმედებს მიტოქონდრიაში, მეორე გვხვდება ციტოზოლში.

MDH გვხვდება ყველა ეუკარიოტულ უჯრედში, როგორც ორი იზფერმენტი: მიტოქონდრიული (m-MDH) და ციტოპლაზმური (ხსნადი, s-MDH). პროკარიოტები შეიცავს მხოლოდ ერთ ფორმას[37].

I.3. ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე სასიგნალო ცილები და მათი მოქმედების მექანიზმი

ა) ფოსფატიდილ-ინოზიტოლ-3-კინაზები (PI3K) - სტრუქტურა და ფუნქციები

ფოსფატიდილ-ინოზიტოლ-3-კინაზები (PI3Ks) წარმოადგენს ლიპიდური კინაზების ოჯახს, რომელსაც ახასიათებს ინოზიტოლის რგოლის 3'-OH ჯგუფის ფოსფორილირების უნარი ინოზიტოლის ფოსფოლიპიდებში. ცნობილია ამ ფერმენტიბ რამდენიმე კლასი.

I კლასის PI3K წარმოდგენილია ჰეტეროდიმერებით, რომლებიც შედგება კატალიზური (CAT) სუბერთეულისგან და ადაპტორის/მარეგულირებელი სუბერთეულისგან. ეს კლასი შემდგომში იყოფა ორ ქვეკლასად: ქვეკლასი IA (PI3Kα, β და δ), რომელიც გააქტიურებულია რეცეპტორებით პროტეინის ტიროზინ კინაზას აქტივობით, და ქვეკლასი IB (PI3Kγ), რომელიც აქტიურდება G-ცილასთან შეუღლებული რეცეპტორებით.

PI3K აქტივაცია იწვევს მეორადი მესინჯერის ფოსფატიდილინოზიტოლ-3,4,5-ტრიფოსფატის (PI3,4,5-P3) წარმოქმნას ფოსფატიდილინოზიტოლ-4,4-ბისფოსფატის სუბსტრატიდან (PI-4,5). შემდეგ PI3,4,5-P3 აგროვებს სასიგნალო ცილების ქვეჯგუფს პლექსტრინის ჰომოლოგიის (PH) დომენებით მემბრანასთან, მათ შორის პროტეინის სერინი/ტრეონინი კინაზა-3'-ფოს ფოინოზიტიდადამოკიდებული კინაზა 1 (PDK1) და Akt/პროტეინკინაზა B (PKB)[38]

ააქტიურებული Akt/PKB არეგულირებს უჯრედების რამდენიმე პროცესს, რომლებიც მონაწილეობენ უჯრედების გადარჩენასა და უჯრედული ციკლის პროგრესირებაში.

რაც შეეხება უჯრედის გადარჩენას, Akt/PKB-ს შეუძლია გააააქტიუროს ისეთი პრო-აპოპტოზური ფაქტორები, როგორიცაა Bad და Procaspase-9, ისევე როგორც ტრანსკრიფციის ფაქტორების Forkhead-ის ოჯახი, რომლებიც იწვევენ სხვა პრო-აპოპტოზური ფაქტორების გამოხატვას, როგორიცაა Fas-ლიგანდი (FasL)[39].

Akt/PKB აქტივაცია დაკავშირებულია პროსტატის კიბოს უჯრედების გაზრდილ წინააღმდეგობასთან აპოპტოზის მიმართ, რომელსაც შუამავლობს სიმსივნის ნეკროზის ფაქტორი (TNF) დაკავშირებული აპოპტოზის გამომწვევი ლიგანდი (TRAIL)/APO-2L და ბოლოს, Akt/PKB ასევე ააქტიურებს IKB კინაზას (IKK), გადარჩენის ფაქტორის NFκB-ს დადებით რეგულატორი.

აღსანიშნავია, რომ ასევე ნაჩვენებია ძლიერი ბიოლოგიური კავშირი NFκB და PI3K/Akt გზებს შორის ანტი-აპოპტოზური ეფექტების მოდულაციაში ლიმფომის უჯრედებში,

რომლებიც ექვემდებარებიან NFκB აქტივაციის შეუქცევად ინჰიბიტორს და IκBα BAY11-7085-ის ფოსფორილირებას.

რაც შეეხება უჯრედული ციკლის პროგრესირებას და უჯრედების ზრდას, Akt-ის რამდენიმე სამიზნე მონაწილეობს ცილის სინთეზში, გლიკოგენის მეტაბოლიზმში და უჯრედული ციკლის რეგულირებაში (6), მათ შორის იგივე mTOR, გლიკოგენ სინთეზაზა კინაზა-3 (GSK3), ინსულინის რეცეპტორის სუბსტრატი-1 (IRS-1), ციკლინდამოკიდებული კინაზას ინჰიბიტორები p21CIP1/WAF1 და p27KIP1 და შესაძლოა ასევე Raf-1, MAPK გზის წევრი.

რაც შეეხება GSK3-ს, Akt/PKB ააქტიურებს ქსელს, რომელიც დადებითად არეგულირებს G1/S უჯრედული ციკლის პროგრესირებას GSK3-β-ის ინაქტივაციის გზით, რაც იწვევს ციკლინის D1-ის გაზრდას და Forkhead-ის ოჯახის ტრანსკრიფციის ფაქტორების და სიმსივნის სუპრესორული ტუბერინის (TSC2) ინჰიბირებას. საბოლოოდ იწვევს p27Kip1-ის შემცირებას[39,40].

ბ) პროტეინკინაზა B (Akt), სტრუქტურა და ფუნქციები

ფოსფატიდილინოზიტოლ-3-კინაზა (PI3K)/Akt და რაპამიცინის (mTOR) სასიგნალო გზები ძუძუმწოვრების სამიზნე არის ორი გზა გადამწყვეტი უჯრედების ზრდისა და გადარჩენის მრავალი ასპექტისთვის, როგორც ფიზიოლოგიურ, ასევე პათოლოგიურ პირობებში.

ისინი იმდენად ურთიერთდაკავშირებულნი არიან, რომ, გარკვეული გაგებით, ისინი შეიძლება ჩაითვალოს ერთ, უნიკალურ გზად. ეს, თავის მხრივ, ძლიერ ურთიერთქმედებს ასევე ბევრ სხვა გზასთან, მათ შორის ჰიპოქსიის ინდუქციურ ფაქტორებთან (HIFs).

PI3K/Akt გზა არის უჯრედული სტრესის დროს გადარჩენის ძირითადი რეგულატორი.

იმის გამო, რომ სიმსივნეები არსებობს შინაგანად სტრესულ გარემოში (ახასიათებს შეზღუდული საკვები ნივთიერებების და ჟანგბადის მიწოდება, ისევე როგორც დაბალი pH), ამ გზის როლი კიბოში გადამწყვეტი ჩანს.

რაპამიცინის სამიზნე ძუძუმწოვრებში არის სერინი/თრეონინ კინაზა, რომელიც ყველგან გამოხატულია ძუძუმწოვრების უჯრედებში. ის იღებს და აერთიანებს სიგნალებს, რომლებიც დაწყებულია საკვები ნივთიერებების მიღებით, ზრდის ფაქტორებით და სხვა. 4EBP1 და P70S6 კინაზას (S6K) მეშვეობით, ის მონაწილეობს mRNA-ს რიბოსომური

ტრანსლაციის ინიცირებაში, რომელიც აუცილებელია უჯრედის ზრდისთვის, უჯრედული ციკლის პროგრესირებისთვის და უჯრედული მეტაბოლიზმისთვის [41].

PI3K/Akt/mTOR გზის გააქტიურება იწვევს უჯრედების ზრდისა და გადარჩენის კონტროლის დარღვევას, რაც საბოლოო ჯამში იწვევს ზრდის კონკურენტულ უპირატესობას, მეტასტაზურ კომპეტენციას, ანგიოგენეზს და თერაპიის რეზისტენტობას.

Akt კინაზები მიეკუთვნება AGC კინაზას ოჯახს, დაკავშირებული AMP/GMP კინაზებთან და ცილა კინაზა C. ისინი შედგება სამი კონსერვატიული დომენისგან, N-ტერმინალური PH დომენი, ცენტრალური კინაზა CAT დომენი და C-ტერმინალური გაფართოება (EXT), რომელიც შეიცავს მარეგულირებელი ჰიდროფობიური მოტივი (HM).

Akt იზოფორმებს შორის, PH დომენები ~80% იდენტურია და ~30% იდენტურია PH დომენებისა პლექსტრინში და სხვა პროტეინებში.

დამაკავშირებელი (LINK) რეგიონი, რომელიც აკავშირებს PH დომენს CAT დომენთან, ცუდად არის დაცული Akt იზოფორმებს შორის (17-46% იდენტურია) და არ აქვს მნიშვნელოვანი ჰომოლოგია სხვა ადამიანის ცილებთან.

კონსენსუსის CAT დომენი ~90% იდენტურია Akt იზოფორმებს შორის და მჭიდროდ არის დაკავშირებული AGC კინაზას ოჯახის PKC, PKA, SGK და S6 ქვეოჯახებთან.

C-ტერმინალი EXT ~70% იდენტურია Akt იზოფორმებს შორის და ყველაზე მჭიდროდ არის დაკავშირებული PKC ოჯახთან[42].

გ) რაფამიცინის სამიზნე ცილა - mTOR (mammalian target of rapamycin) სტრუქტურა და ფუნქციები

mTOR არის 289 KDA-იანი ცილა, რომელიც წარმოადგენს სერინ-თრეონინ პროტეინკინაზას. მისი აქტივაცია ხდება ფოსფორილირებით, ზრდის ფაქტორებისა და სტრესის საპასუხოდ. mTOR ნანახია როგორც საფუარ სოკოებში, ასევე ყველა სახის ეუკარიოტულ ორგანიზმებში მათ შორის მცენარეებში, მწრებსა და ძუძუმწოვრებში. მას გააჩნია არსებითი ფუნქცია ცილის სინთეზში, ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში, ლიპიდების მეტაბოლიზმში, უჯრდის აუტოფაგიაში ლიზოსომების ბიოგენეზში და მრავალ სხვა პროცესში. ასევე თავის ტვინში ის მონაწილეობს აქსონალურ ზრდაში, აქსონალურ რეგენერაციაში და მიელინიზაციაში, იონური არხების ექსპრესიაში, ასტროციტების მიგრაციასა და პროლიფერაციაში[43].

mTOR-ის აღმოჩენამ და შესწავლამ ფუნდამენტურად შეცვალა მეცნიერების შეხედულება უჯრედის პროლიფერაციაზე. ცილა mTOR-ის აქტივაცია არის არა სპონტანური არამედ ეს არის მაღალორგანიზებული პროცესი რომელიც რეგულირდება მასთან დაკავშირებული გარე და შიდაუჯრედული სასიგნალო მოლეკულებით.

mTOR ორი კომპლექსის სახით არსებობს, ესაა ე.წ. mTORC1 კომპლექსი1 და mTORC2 კომპლექსი2. mTORC1-ის ძირითადი დანიშნულებაა ცილის სინთეზის კონტროლი, უჯრედების ზრდა და პროლიფერაცია.კომპლექსი სტიმულირდება ზრდის ფაქტორებითა და ზოგიერთი ამინომჟავით, აგრეთვე მისი აქტივობა იზრდება ოქსიდაციური სტრესის ზრდისა და ანთებითი პროცესების საპასუხოდ. mTORC1 კომპლექსი1-ის შემადგენლობაში გარდა mTOR-სა შედის ცილა MLST8, რომელიც ადამიანებში კოდირდება MLST8 გენით. ის შედის mTOR ის ორივე კომპლექსის mTORC1და mTORC2-ის შემადგენლობაში. ნანახია ცილა MLST8-ის რაოდენობის ზრდა მსხვილი ნაწლავის და პროსტატის სიმსივნეების დროს. ასევე პირველი კომპლექსის შემადგენლობაში შედის ცილა Pras40, Raptor და Deptor.ცილა Raptor-ს (Regulatory associated protein of mTOR) იგივე KIAA1303 ადაპტორი ცილაა რომელიც კოდირდება RPTOR გენით. გენი ლოკალიზებულია მე-17 ქრომოსომაში. გენის პროდუქტია ორი მ-რნმ რომლებიც ტრანსლირებენ Raptor-ის ორი იზოფორმის სინთეზს. Raptor1 იზოფორმა შეიცავს 1335 ამინომჟავას, ხოლო Raptor-ის მეორე იზოფორმა 1177 ამინომჟავას შეიცავს[44].

ცილა Deptor-ც ასევე შედის mTOR-ის ორივე კომპლექსის შემადგენლობაში. მას ასევე უწოდებენ DEP დომენის შემცველ ცილას-DEPDC6, ის შედგება 409 ამინომჟავისგან. Deptor ცნობილია როგორც mTOR-ის ინჰიბიტორი მოლეკულა. ის ჩართულია ისეთ მოლეკულურ მექანიზმებში, როგორებიცაა უჯრედული ზრდა და აპოპტოზი, აუტოფაგია და სტრესის საპასუხო რეაქციები.Deptor-ურთიერთქმედებს mTOR-თან და აინჰიბირებს მის კინაზურ აქტივობას, ხოლო Deptor-ის რაოდენობის შემცირება თავდაპირველად იწვევს mTOR-ის აქტივობის ზრდას, რაც შემდგომში იწვევს ცილა Deptor-ის ექსპრესიის შემცირებას[45].

რაც შეეხება mTORC2 კომპლექს 2-ს მის შესახებ შედარებით ნაკლები ინფორმაციაა ცნობილი, თუმცა დღესდღეობით დადგენილია რომ ის აკონტროლებს უჯრედულ მეტაბოლიზმს და ასევე უჯრედის ციტოჩონჩხის რეორგანიზაციაზე ახდენს ზეგავლენას. mTORC2 კომპლექსი 2-ის შემადგენლობაში გარდა ცილებისა: mTOR; Deptor და mLST8, რომლებიც შედიან ასევე mTORC1-ის შემადგენლობაში დამატებით შედის ცილები: Rictor, mSin1;protor1 და protor2-ს.

mTOR-ის ფუნქციაზე ზეგავლენას ახდენს ისეთი რეცეპტორების აქტივაცია როგორებიცაა NMDA, AMPA, ტროპომიოზინის რეცეპტორის კინაზა B (TrkB), დოფამინერგული და მეტაბოტროპული გლუტამატური რეცეპტორები (mGLuRs). ჩვენი წინა კვლევებით ნანახია რომ ცირკადული რიტმის დარღვევის შედეგად გამოწვეული სტრესის დროს ხდება შიდაუჯრედული კალციუმის იონის რაოდენობრივი ზრდა, უჯრედებზე კორტიზოლის ჭარბი რაოდენობით ზემოქმედების გამო, და კალციუმის რაოდენობრივი მატებაც უჯრედში ასტიმულირებს mTORC1-ის აქტივაციას, ვინაიდან ამ დროს ხდება IP3K-სა და Akt-ს ფოსფორილირება. თუმცა როდესაც საქმე ქრონიკულ სტრესს ეხება დროთა განმავლობაში ხდება mTOR-ის ექსპრესიის შემცირება, რაც ჩვენს მიერ მიღებულ შედეგებშიც იქნა ნანახი. ამასთანავე საგულისხმოა ის ფაქტიც, რომ NMDA რეცეპტორის ანტაგონისტი ნივთიერების კეტამინის ზემოქმედება იწვევს ჰიპოკამპის უჯრედებში ფერმენტ გლიკოგენსინთაზკინაზა3-ის (GSK-3)-ის ინჰიბირებას, რის შედეგადაც ვეღარ ხდება GSK3-ით IP3K/Akt/mTOR-სასიგნალო კასკადის ინაქტივაცია. ამიტომ კეტამინი და სხვა ანტიდეპრესანტი საშუალებებიც გვევლინება როგორც mTOR-ის სასიგნალო გზის გამააქტივებელი მოლეკულები[46].

ნორმალურ უჯრედებში, mTOR აქტივობა კონტროლდება დადებითი და უარყოფითი რეგულატორებით. დადებითი რეგულატორები მოიცავს ზრდის ფაქტორებს და მათ რეცეპტორებს, როგორიცაა ინსულინის მსგავსი ზრდის ფაქტორი-1 (IGF-1) და მისი მონათესავე რეცეპტორი IFGR-1, ადამიანის ეპიდერმული ზრდის ფაქტორის რეცეპტორების (HER) ოჯახის წევრები და ასოცირებული ლიგანდები და სისხლძარღვთა ენდოთელიუმი. ზრდის ფაქტორის რეცეპტორები (VEGFRs) და მათი ლიგანდები, რომლებიც გადასცემენ სიგნალებს mTOR-ზე PI3K-Akt-ის მეშვეობით.

mTORC1 კომპლექსი შედგება mTOR, Raptor, mLST8 და PRAS40-ისგან. ის უკიდურესად მგრძნობიარეა რაპამიცინის მიმართ და, შესაბამისად, წარმოადგენს პირველი თაობის mTOR ინჰიბიტორების სამიზნეს. ის ასევე ააქტიურებს S6K-ს და ააქტიურებს 4EBP1-ს, რაც იწვევს ცილების ტრანსლაციას და უჯრედების ზრდას.

mTORC2 კომპლექსი შედგება mTOR, Rictor, Sin1 და mLST8-ისგან. ის ნაკლებად მგრძნობიარეა რაპამიცინის მიმართ და მისი როლი უჯრედების ნორმალურ ფუნქციონირებასა და ონკოგენეზში კარგად არ არის ცნობილი. თუმცა, ცნობილია, რომ ააქტიურებს Akt-ს, რითაც ხელს უწყობს უჯრედების გამრავლებას და გადარჩენას. mTOR აქტივაციის კანონიკური გზა დამოკიდებულია მიტოგენის სიგნალიზაციაზე PI3K/Akt-ის

მეშვეობით, თუმცა ალტერნატიული არა-Akt-დამოკიდებული აქტივაცია Ras/MEK/ERK გზის მეშვეობით ახლა უკვე აღიარებულია.

მთლიანობაში, mTOR აქტივაცია იწვევს მრავალი ცილის სინთეზის გაზრდას. ეს მოიცავს რამდენიმეს, რომლებიც მონაწილეობდნენ მრავალი სიმსივნის პათოგენეზში, მაგალითად, ციკლინი D1, რომელიც საშუალებას აძლევს უჯრედების პროგრესირებას უჯრედულ ციკლში და HIF, რომელიც განაპირობებს პრო-ანგიოგენური ზრდის ფაქტორების ექსპრესიას, როგორიცაა VEGF (სისხლძარღვთა ენდოთელიალური GF)[47].

II. კვლევის ობიექტი და მეთოდიკა

II.1. კვლევის ობიექტი

ექსპერიმენტები ტარდებოდა მამრობითი სქესის, თეთრ, ლაბორატორიულ ვირთაგვებზე. სტრესის მოდელს წარმოადგენდა ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული ფსიქო-ემოციური სტრესი. ამისათვის საკვლევი ცხოველები (თეთრი ლაბორატორიული მამრი ვირთაგვები) დაყოფილი იქნა 2 ჯგუფად:

1 ჯგუფი (G1) - საკონტროლო ცხოველები (10 ვირთაგვა), რომლებიც იმყოფებოდნენ ბუნებრივი ცირკადული რიტმის პირობებში; კონტროლად ვიყენებდით ვირთაგვებს, რომლებიც მოთავსებულნი იყვნენ ერთად, საერთო გალიაში, ჩვეულებრივ პირობებში (თანაფარდობა სიბნელესა და სინათლეს შორის შეადგენდა 10.00/14.00სთ).

2 ჯგუფი (G2) - სტრესირებული ცხოველები (10 ვირთაგვა) , რომლებიც 30 დღის განმავლობაში იმყოფებოდნენ ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში (23.5სთ სიბნელე/0.5 სთ სინათლე);

ცხოველებს საკვები და წყალი ეძლეოდათ შეუზღუდავად. ასეთ პირობებში ვირთაგვები იმყოფებოდნენ 30 დღის განმავლობაში. 30-დღიანი ცირკადული რიტმის დარღვევის შემდეგ ვირთაგვებს ვაძინებდით ქლოროფორმით და ვახდენდით მათ დეკაპიტაციას (თავის მოკვეთა), თავის ტვინიდან ცივ პირობებში ვიღებდით ჰიპოკამპს და მიღებულ ქსოვილს ვინახავდით -10^0 C-ზე. ჰომოგენიზაციას ვახდენდით ტრის-HCl-ის ბუფერში (pH-7.4-7.5).

II.2. ფერმენტ აკონიტაზას აქტივობის განსაზღვრა

ფერმენტ აკონიტაზას აქტივობის დასადგენად ნატიურ მიტოქონდრიებს ვამუშავებდით ბუფერით, რომელიც შეიცავდა 100 mM ტრის-HCl-ის ბუფერზე (pH=7.4) დამზადებულ 0.1%-იან ტრიტონ X-100-ს და ნატრიუმის ციტრატს. მიღებულ ნალექს ვუმატებდით საინკუბაციო არეს (150 mM ტრის-HCl-ის ბუფერზე დამზადებული: 8.6 mM ცის-აკონიტატი, 60 mM $MgCl_2$, 0.04 U იზოციტრატ დეჰიდროგენაზა, 125 mM ნადP, 240 mM MTT და 80 mM ფენაზილ მეტოსულფატი (PMS); pH=8.6), ვაყოვნებდით 15 წთ. ოთახის ტემპერატურაზე და ვაცენტრიფურირებდით (3000 g x 10´).

სუპერნატანტში ცის აკონიტის მჟავას გარდაქმნის პროდუქტს ვსაზღვრავდით სპექტროფოტომეტრულად (λ=240 ნმ) [48].

ფერმენტ აკონიტაზას აქტივობას ვითვლიდით 1 მგ ცილაზე გადაანგარიშებით (U/მგ ცილა).

II.3. ფერმენტ ფუმარაზას აქტივობის განსაზღვრა

ფერმენტ ფუმარაზას აქტივობას ვსაზღვრავდით ფერმენტის იმ რაოდენობის მიხედვით,. რომელიც საჭიროა 1 წუთში 1 M ფუმარის მჟავას (ფუმარატი) დასასინთეზირებლად.

მიტოქონდრიულ სუსპენზიას ვამუშავებდით ტრის-HCl-ის ბუფერით (pH=8.6), რომელიც შეიცავდა 30 mM კალიუმის ფოსფატს და 0.1 mM L-მალატს.

ნარევს ვაყოვნებდით 15 წუთი ოთახის ტემპერატურაზე და ვაცენტრიფუგებდით (3000 g x 10´).

სუპერნატანტში ფუმარატის რაოდენობას ვსაზღვრავდით სპექტროფოტომეტრულად (λ=240 ნმ) [49].

ფერმენტ ფუმარაზას აქტივობას ვითვლიდით 1 მგ ცილაზე გადაანგარიშებით (U/მგ ცილა).

II.4. ფერმენტ სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობის განსაზღვრა

ფერმენტ სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობის განსასაზღვრავად ვიყენებდით აბესა და მატსუკის მოდიფიცირებულ მეთოდს [50].

ექსპერიმენტის საწყის ეტაპზე 500 μლ მიტოქონდრიულ ფრაქციას ვუმატებდით 1 მლ HBM ბუფერს (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM $NaHCO_3$, 1.1 mM $MgCl_2$ x $6H_2O$, 1.2 mM Na_2HPO_4, 1.2 mM $CaCl_2$, 5.5 mM $C_6H_{12}O_6$ და 20 mM HEPES; pH=7.4) და ვაცენტრიფუგირებდით (16,000 rpm x 10´).

შემდეგ ეტაპზე მიღებულ ნალექს ვასუსპენზირებდით 500 μლ 3-(4,5-დიმეთილტეტრაზოლ-2)-2,5-დიფენილტეტრაზოლინის ბრომიდი (MTT) (0.5 მგ/მლ) დამზადებული HBM ბუფერზე. მიღებულ სუსპენზიას ვაინკუბირებდით 45 წუთის განმავლობაში 37°C-ზე და ვაცენტრიფუგებით (16,000 rpm x 10´). მიღებულ ნალექს

ვხსნიდით 800 μლ დიმეთილსულფოქსიდში, ვანჯღრევდით საღებავის გადმოსვლამდე და კვლავ ვაცენტრიფუგირებდით (16,000 rpm x 5´).

შემდგომ ეტაპზე ვსაზღვრავდით მიღებული სუპერნატანტის შუქშთანთქმის სიდიდეს სპექტროფოტომეტრულად (λ=540 ნმ).

ფერმენტ სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობას ვითვლიდით 1 მგ ცილაზე (U/მგ ცილა) გადაანგარიშებით.

II.5. ფერმენტ კრეატინკინაზას აქტივობის განსაზღვრა

ფერმენტ კრეატინკინაზას აქტივობას ვსაზღვრავდით შუმანისა და სხვათა მოდიფიცირებული მეთოდით.

ექსპერიმენტის საწყის ეტაპზე ვამზადებდით სამუშაო რეაგენტს, რომელიც შეიცავდა იმიდაზოლის ბუფერზე დამზადებულ პირველ რეაქტივს (20 mM გლუკოზა, 10 mM მაგნიუმის აცეტატი, 2 mM EDTA, 5 mM ამფ, 0.2 mM N-აცეტილცისტეინი, 10 μM დიადენოზინ პენტაფოსფატი, 2 mM ნადფ, >4 U ჰექსოკინაზა, 25 mM SH-სტაბილიზატორი; pH=6.5) და მეორე რეაქტივს (2 mM ადფ, >2.8 U G6P-DH, 30 mM კრეატინფოსფატი), შეფარდებით 4:1. მიტოქონდრიული კრეატინკინაზას აქტივობის გასნაზღვრისას მეორე რეაქტივი შეიცავდა ატფ-სა და კრეატინს, pH=7.2.

შემდგომ ეტაპზე 50 μლ მიტოქონდრიულ სუსპენზიას ვუმატებდით 1 მლ სამუშაო რეაგენტს, ვურევდით და ვახდენდით მის ინკუბაციას 5 წუთის განმავლობაში 37°C-ზე, რის შემდეგაც ვზომავდით ხსნარის შუქშთანთქმის სიდიდეს სპექტროფოტომეტრულად (λ=340 ნმ) 1, 2, 3 წუთის შემდეგ (A1, A2, A3).

ფერმენტის აქტივობას ვითვლიდით შემდეგი ფორმულით:

$$E = \Delta A \times 6508 \quad \text{μკატ./ლ}$$

სადაც:

E - ფერმენტის აქტივობაა,

$$\Delta A = \frac{(A1 + A2 + A3)}{3}$$ - მიღებული შუქშთანთქმის სიდიდეთა საშუალო

ფერმენტ კრეატინკინაზას აქტივობას ვითვლიდით 1 მგ ცილაზე გადაანგარიშებით (U/მგ ცილა)[51,52,53].

II.6. ფერმენტ ჰექსოკინაზას აქტივობის განსაზღვრა

ფერმენტ ჰექსოკინაზას ფერმენტულ აქტივობას ვსაზღვრავდით Hexokinase Colorimetric Assay Kit-ის გამოყენებით[54].

II.7. ვესტერ-ბლოტის ანალიზი

ნიმუშები დამუშავდა 8 ან 10% SDS-PAGE-ით, გადავიტანეთ PVDF მემბრანაში და გამოიკვლიეთ შესაბამისი ანტისხეულებით სტანდარტული პროცედურებით. შეიქმნა იმუნორეაქტიული ზოლები და გამოვლინდა გაძლიერებული ქემოლუმინესცენციის გამოყენებით. რაოდენობრივი შედარებისთვის, სურათები სკანირებული იყო დენსიტომეტრით. ნიმუშების სხვადასხვა განზავება დაექვემდებარა SDS-PAGE-ს და გამოყენებული იქნა ფილმების მრავალჯერადი ექსპოზიცია იმის უზრუნველსაყოფად, რომ რაოდენობები განხორციელდა ანალიზის ხაზოვან დიაპაზონში.

ცილის კონცენტრაცია გაზომილი იყო პროტეინის ანალიზის ნაკრებით (Sigma, აშშ), მწარმოებლის პროტოკოლის მიხედვით. ყველა რეაგენტი შეძენილია Sigma-Aldrich-ისგან[55].

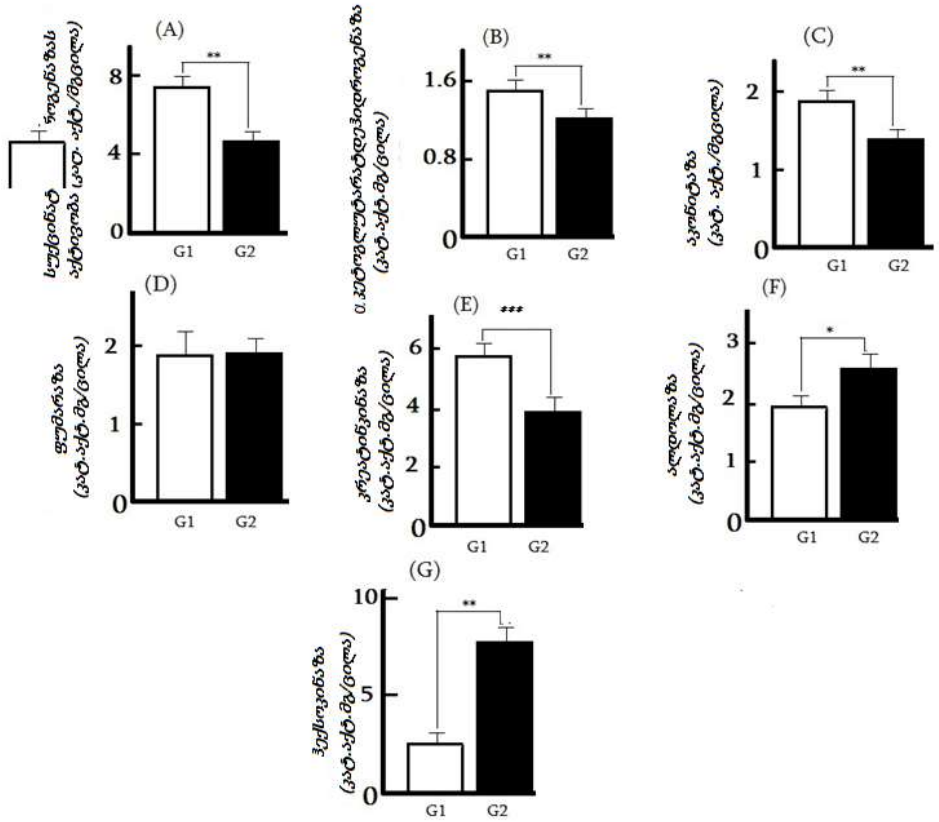
სტატისტიკური ანალიზი

საკონტროლო მნიშვნელობა დაყენებულ იქნა P 0.05. თითოეული ბიოქიმიური ექსპერიმენტის მონაცემები გაანალიზდა ცალ-ცალკე და დამუშავდა დისპერსიის ანალიზით (ANOVA). ექსპერიმენტები განმეორდა ოთხჯერ სამმაგი ნიმუშებით თითოეული ექსპერიმენტისთვის. როდესაც მნიშვნელოვანი ეფექტი დაფიქსირდა ANOVA-თი, ნიმუშების შესადარებლად ასევე გამოიყენებოდა სტუდენტური t-ტესტი

III. მიღებული შედეგები

III.1. ჰიპოკამპის უჯრედებში ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე ზოგიერთი ფერმენტის აქტივობის ცვლილება ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში

სურათზე 6 წარმოდგენილი მონაცემები აჩვენებენ, რომ ლაბორატორიული ვირთაგვების ხანგრძლივი, 30 დღიანი, ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში ჰიპოკამპის უჯრედებში საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით შეინიშნება მიტოქონდრიული ფერმენტების, სუქცინატდეჰიდროგენაზას, α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზას, აკონიტაზას და კრეატინკინაზას აქტივობის შემცირება.



სურათი 6. ჰიპოკამპის უჯრედებში სუქცინატდეჰიდროგენაზას (A), α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზას (B), აკონიტაზასა (C), ფუმარაზას (D), კრეატინკინაზას (E), ალდოლაზასა (F) და ჰექსოკინაზას (G) აქტივობა ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში
G1 - საკონტროლო ცხოველები; G2 - სტრესირებული ცხოველები

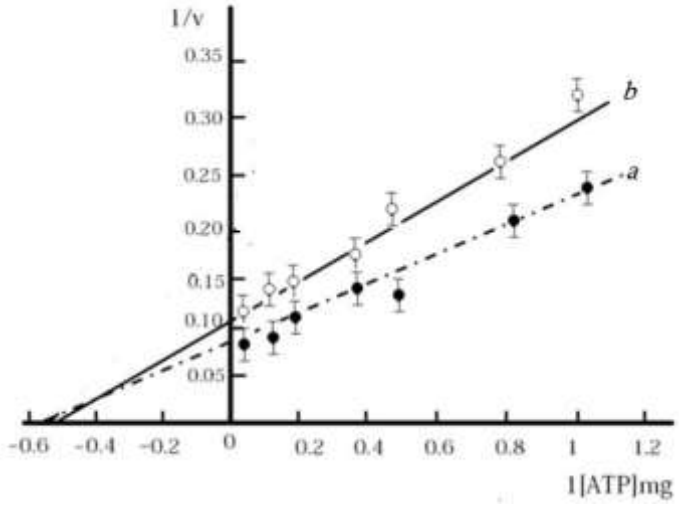
$^{*}p<0.05$; $^{**}p<0.01$; $^{***}p<0.001$

განსხვავებული შედეგები იქნა მიღებული გლიკოლიზის პროცესში მონაწილე ფერმენტების შემთხვევაში. ჩვენს მიერ შესწავლილი იქნა ამ პროცესის ორი ფერმენტი ალდოლაზა (სურ.6F) და ჰექსოკინაზა (სურ. 6G). ცნობილია, რომ ალდოლაზა უშუალო სიახლოვესაა მიტოქონდრიებთან და იქ წარმოქმნილ ROS-თან (Lenaz et al. 2002). ამის გათვალისწინებით, ჩვენ ვვარაუდობდით, რომ ადგილი ექნებოდა ამ ფერმენტის აქტივობის დაქვეითებას. თუმცა, მიღებულმა მონაცემებმა აჩვენა საპირისპირო ეფექტი, კერძოდ ალდოლაზას აქტივობა ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში მატულობს. ანალოგიური მონაცემები იქნა მიღებული ჰექსოკინაზას შემთვევაშიც (სურ.6G). ნაჩვენები იქნა, რომ ჰექსოკინაზას აქტივობა, ალდოლაზას ანალოგიურად მატულობს. იმის გათვალისწინებით, რომ ჰექსოკინაზა წარმოადგენს გლიკოლიზის მალიმიტირებელ ფერმენტს, სავარაუდოა, რომ ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევა აძლიერებს თავის ტვინის უჯრედებში ამ პროცესს.

მიღებული შედეგები მიუთითებს, რომ ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში ადგილი აქვს მიტოქონდრიული ჟანგვითი ფოსფორილირების ინტენსივობის შემცირებას. რაც აისახება ენერგეტიკული მეტაბოლიზმში მონაწილე ფერმენტების აქტივობის დაქვეითებით.

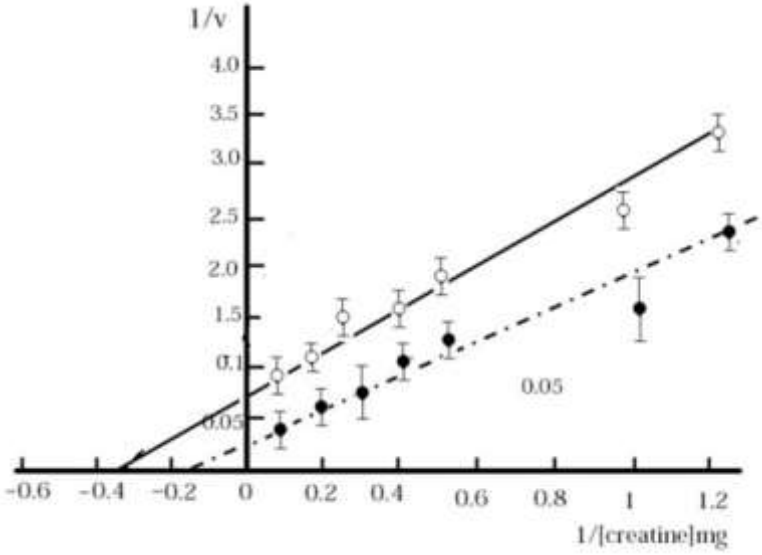
III.2. ფერმენტული ატივობის ცვლილების მიზეზის დადგენა ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში

შემდგომ ექსპერიმენტში საინტერესო იყო დაგვედგინა ენერგეტიულ მეტაბოლიზმში მონაწილე ფერმენტების აქტივობის ცვლილების მიზეზი ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის შემთვევაში ეს საკითხი შესწავლილი იქნა ფერმენტ კრეატინკინაზას (CK) კინეტიკური პარამეტრების (V_{max}, Km) ცვლილების მაგალითზე. მიღებული მონაცემები წარმოდგენილია სურათზე 7. როგორც ცნობილია, კრეატინკინაზა წარმოადგენს ორსუბსტრატიან ფერმენტს. მისი სუბსტრატებია კრეატინი და ატფ. ამის გათვალისწინებით, შესწავლილი იქნა ფერმენტის როგორც მაქსიმალური სიჩქარისა და თვისობის ცვლილება ატფ-ისა და კრეატინის ცვლადი პარამეტრების პირობებში. მიღებული მონაცემები წარმოდგენილია სუბათზე 7 და 8.



სურათი 7. ცირკადული რიტმის გავლენა კრეატინკინაზას აქტივობის კინეტიკურ პარამეტრებზე (V_{max}, K_m) ATP-ის ცვლადი სიდიდეების პირობებში

აბსცისათა ღერძზე - ატფ-ის კონცენტრაციის შებრუნებული სიდიდე [1/მგ]
ორდინატთა ღერძე - ფერმენტის სჩქარის შებრუნებული სიდიდე
a - საკონტროლო ცხოველები; b - ცხოველები ცირკადული რიტმის პირობებში



სურათი 8. ცირკადული რიტმის გავლენა კრეატინკინაზას აქტივობის კინეტიკურ პარამეტრებზე (V_{max}, K_m) კრეატინის ცვლადი სიდიდეების პირობებში

აბსცისათა ღერძზე - კრეატინის კონცენტრაციის შებრუნებული სიდიდე [1/მგ]
ორდინატთა ღერძე - ფერმენტის სჩქარის შებრუნებული სიდიდე
a - საკონტროლო ცხოველები; b - ცხოველები ცირკადული რიტმის პირობებში

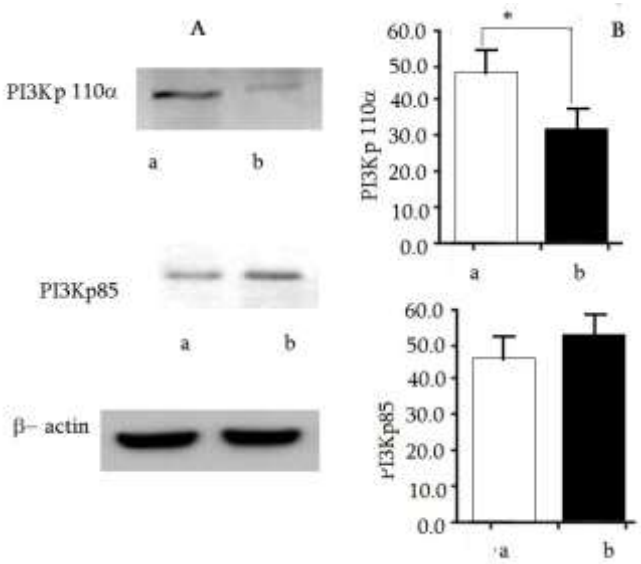
სურათზე 7 წარმოდგენილი მონაცემებიაჩვენებენ, რომ რომ ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში შეინიშნება ფერმენტის როგორც V_{max}-ის დაქვეითება ატფ-ის ცვლადი კონცენტრაციის პირობებში, თუმცა სურათიდან ასევე ჩანს, რომ არ აქვს ადგილი თვისობოს ცვლილებას. ფერმენტის მაქსიმალური სიჩქარის შემცირება აღინიშნება ასევე კრეატინის ცვლადი კონცენტაციის შემთხვევაში, თუმცა ამ შემთხვევაში ადგილი აქვს ასევე ფერმენტის თვიბოსი დაქვეითებას, ანუ K_m-სიდიდის გაზრდას კრეატინის მიმართაც. მიღებული შედეგები ცხადყოფს, ფერმენტის აქტივობის შემცირების ძირითად მიზეზს წარმოადგენს მისი რაოდენობის შემცირება, რაც სავარაუდოდ გამოწვეულია სინთეზური რეაქციების ინტენსივობის დაქვეითებით, რისი მიზეზიც უნდა იყოს ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის დაქვეითება.

III.3. PI3K / AKT / mTOR სასიგნალო გზის კომპონენტების რაოდნეობრივი ცვლილებების დადგენა ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში

შემდგომი ექსპერიმენტის მიზანს წარმოადგენდა იმ უჯრედშიდა სასიგნალო გზების შესწავლა, რომლებიც განსაზღვრავენ ვირთაგვას ჰიპოკამპის უჯრედების ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმს ცირკადული რიტმის დარღვვის პირობებში ამის გათვალისწინებით, შესწავლილი იქნა *PI3K/ AKT/ mTOR* სასიგნალო გზა, რომელიც ითვლება ენერგეტიკული მეტაბოლიზმისა და სინთეზური რეაქციების ერთერთ ძირითად რეგულატორად. ცდების საწყისს სტადიაზე ვესტერ-ბლოტის გამოყენებით შესწავლილი იქნა ცირკადული რიტმის 30-დღიანი დარღვევის პირობებში სასიგნალო გზის შემადგენელი კომპონენტის ფოსფატიდილ-ინოზიტოლ-3 კინაზას სუბერთებულების p110α-სა და p85-ს სულბერთეუების რაოდენობრივი ცვლილებები ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში. მიღებული მონაცემები წარმოდგენილია სურათზე 9.

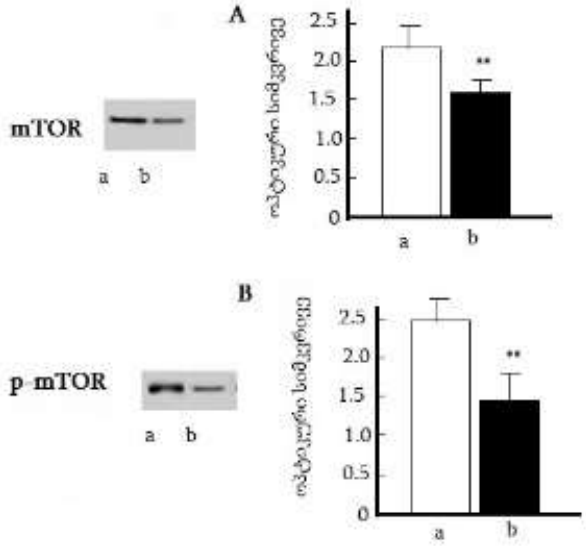
მიღებული მონაცემებიდან ირკვევა, რომ ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში აღინიშნება PI3K-ს კატალიზური სუბერთეულის *PI3K* p110α რაოდენობრივი შემცირება. ცნობილია, რომ კატალიზური სუბერთეულის უარყოფით რეგულატორს წარმოადგენს *PI3K-ს* p85-სუბერთეული. ცნობილია, რომ ამ სუბერთეულის აქტივაცია ხელს უშლის კატალიზური სუბერთეულის ფოსფორილირებას და შესაბამისად, მის

აქტივობას, თუმცა ამ პირობებში ჩვენს მიერ ვერ იქნა ნანახი აქტიური *PI3K* p85-სუბერთეულის სარწმუნო რაოდნეობრივი მატება (სურ.4).



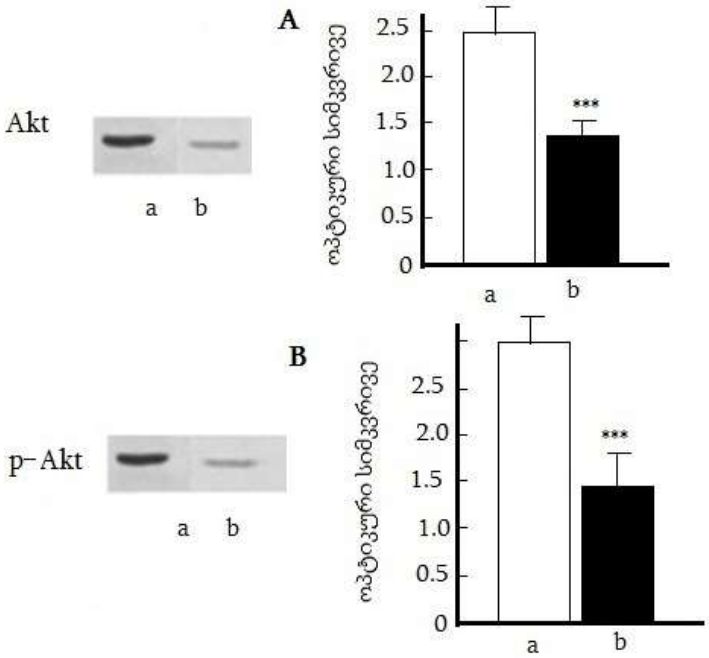
სურათი 9. (A) ჰიპოკამპის პლაზმური მემბრანის *PI3K* p110α-სა და *PI3K* p85-ის სუბერთეულების დეტექცია ვესტერ-ბლოტინგ ანალიზის მეთოდით. B) ორდინატთა ღერძზე-გამომჟღავნებული ოპტიკური სიმკვრივის მაჩვენებელი რაოდენობრივი მაჩვენებლები. a - საკონტროლო ჯგუფის ვირთაგვების ჰიპოკამპი; b - ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში მყოფი ვირთაგვების ჰიპოკამპი . *$p<0.01$

შემდგომ ექსპერიმენტში შესწავლილი იქნა ამ სასიგანლო გზის კიდევ ერთი კომპონენტის, კერძოდ mTOR-ის და მისი ფოსფორილირებული ფორმის რაოდენობრივი ცვლილებები. ნანახი იქნა, რომ mTOR-ის რაოდენობა ცირკადული რიტმის დარღვევის შედეგად საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით სარწმუნოდ მცირდება. შეინიშნება ანალოგიური ცვლილებები ასევე ფოსფორილირებული mTOR-ის შემთხვევაშიც (სურ. 10).



სურათი 10. საკონტროლო(a) და ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში მყოფი ვირთაგვების ჰიპოკამპის პლაზმური მემბრანის *mTOR* -სა (A) და p-mTOR- ს B) დეტექცია ვესტერ-ბლოტინგ ანალიზის მეთოდით b . ორდინატთა ღერძზე- გამომჟღავნებული ოპტიკური სიმკვრივის მაჩვენებელი რაოდენობრივი მაჩვენებლები.
**p<0.001

mTOR-ის პარალელურად შესწავლილი იქნა ასევე ამ სასიგნალო გზის კიდევ ერთი კომპონენტი, კერძოდ ფერმენტი AKT (პროტეინკინაზა PKB), ასევე მისი ფოსფორილირებული იზოფორმა. როგორც სურათი 11-დან ჩანს, ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში ვირთაგვების ჰიპოკამპის უჯრედებში საკონტროლო მაჩვენებელთან შედარებით აღინიშნება ამ ფერმენტის რაოდენობის შემცირება, სარწმუნოდაა შემცირებული მისი ფოსფორილირებული იზოფორმის რაოდენობაც.



სურათი 11. საკონტროლო(a) და ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში მყოფი ვირთაგვების ჰიპოკამპის პლაზმური მემბრანის *Akt* -სა (A) და p-Akt- ს B) დეტექცია ვესტერ-ბლოტინგ ანალიზის მეთოდით b . ორდინატთა ღერძზე- გამომჟღავნებული ოპტიკური სიმკვრივის მაჩვენებელი რაოდენობრივი მაჩვენებლები.

***p<0.001

IV. მიღებული მონაცემების განხილვა

ჩვენი კვლევის შედეგებმა აჩვენა, რომ ხანგრძლივი დროით ცირკადული რიტმის დარღვევისას ადგილი აქვს მიტოქონდრიული, ენერგეტიკულ პროცესებში მონაწილე ფერმენტების აქტივობისა და შესაბამისად ამ პროცესის ინტენსივობის დაქვეითებას, რაც თავის მხრივ, განაპირობებს გლიკოლიზის, როგორც ენერგეტიკული ბალანსის კომპენსატორული მექანიზმის გაძლიერებას ჰიპოკამპის უჯრედებში. ცნობილია, რომ ზოგადად, ფერმენტის აქტივობის ცვლილების მიზეზი შესაძლებელია იყოს როგორც მათი სტრუტურული, ასევე რაოდენობრივი ცვლილებები. ამის გათვალისწინებით, საინტერესოს წარმოადგენდა გაგვერკვია ამ პირობებში ფერმენტების აქტივობის ცვლილების ხასიათი. ეს საკითხი შესწავლილი იქნა ფერმენტ კრეატინკინაზას კინეტიკური მახასიათებლების (V_{max}, Km) ცვლილების მაგალითზე. სურათზე 3 წარმოდგენილი მონაცემები აჩვენებს, რომ ამ პპირობებში განვითარებული ოქსიდაციური სტრესის პირობებში მცირდება როგორც რეაქციის V_{max}, ასევე იცვლება Km სუბსტრატებისადმი, რაც ფერმენტის როგორც რაოდენობის შემცირების, ასევე მისი სტრუქტურული ცვლილებების მაჩვენებელია.

ამ მოსაზრებას ადასტურებს ექსპერიმენტი, სადაც შესწავლილია ცილის სინთეზის ინტენსივობა ცირკადული რიტმის ხანგრძივად დარღვევის შემთხვევაში. მიწოდებისას. ჩვენი ყურადღება მიიპყრო PI3K/ AKT / mTOR სასიგნალო გზამ, რომელიც ითვლება უჯრედული მეტაბოლლიზმის უნივერსალურ სასიგნალო გზად. მის ცენტრალურ კომპონენტად ითვლება ფერმენტი ფოსფატიდილინოზიტიდ - 3-კინაზა ( ), AKT და mTOR. ცნობილია, რომ ეს გზა მონაწილეობს ისეთ მნშვნელოვან უჯრედულ პროცეებში, როგორიცა აპოპტოზი, მეტაბოლიზმი, პროლიფერაცია და სხვ. ამ გზის პირველ კომპონენტს წრმოადგენს PI3K -ფოსფატიდილ9ნოზიროლ-3-კინაზა.როგორც ცნობილია, ეს ფერმენტი 3 კლასითაა წარმოდგენილი. აქედან საინტერესოს წარმოდგენს 1 კლასის PI3K.ეს ფერმენტი ორ სუბერთეულს შეიცავს. ესენია კატალიზური და რეგულატორული სბერთეულები, რომლებიც თავის მხრივ რადენიმე იზოფორმითაა წრმოდგენილი. კატალიზური სუბერთეულებიდან ჩვენთვის საინტერესოს წარმოადგენდა p110α, ვინაიდან ნერვულ ქსოვილში სწორედ ეს სუბერთული გვხვდება დიდი რაოდენობით. მიღებული მონაცემები აჩვენებენ, რომ ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში სწორედ ამ PI3K - p110α სუბერთეულის რაოდენობრივი ცვლილებები შეინიშნება, კერძოდ ადგილი აქვს მის

შემცირებას. PI3K -p110α-გან განსხვავებით, ვერ იქნა ნანახი როდენობრივი ცვლილებები ამ ცილის რეგულატორული სუბერთეულის (p85) შემთხვევაში.

მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე, შემდგომ ექსპერიმენტში შესწავლილი იქნა სერინ-ტრეონინ კინაზური აქტივობის მქონე რეპამიცინის სამიზნე ცილა mTOR-მა, რომელიც ითვლება ენერგეტიკული მეტაბოლიზმისა და სინთეზური რეაქციების ძირითად რეგულატორად. იგი ორი ცილოვანი კომპლექსის mTORC1-სა და mTORC2-ის შემადგენლობაში გვხვდება. mTORC1 ძირითადად ციტოპლაზმაშია ლოკალიზირებული, სადაც ასოცირებულია ლიზოსომურ მემბრანასთან და ცილის სინთეზის ძირითადი რეგულატორის ფუნქციას ასრულებს, ხოლო mTORC2 წარმოადგენს სერინ-ტრეონინკინაზური აქტივობის მქონე AKT /პროტეინინაზაB -ს აქტივატორს. ჩვენი მონაცემებიდან ჩანს, რომ ჰიპოკამპის უჯრედებში ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში შეინიშნება როგორც საერთო, ასევე ფოსფორილირებული mTOR-ის რაოდენობის შემცირება. აღსანიშნავია, რომ mTOR-ის აქტივობა განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია მიტოქონდრიული სუნთქვის ჯაჭვის ფუნქციონირებისათვის. გამოთქმულია მოსაზრება, რომ mTOR-ის ინჰიბირებას მოსდევს მოტოქონდრიული პროცესების დაქვეითება და ამის საპირისპიროდ, გლიკოლიზური პროცესების გაძლიერება, რაც კარგად გამოჩნდა ჩვენს ექსპერიმენტშიც.

ცნობილია, რომ mTOR-ის აქტივობა უჯრედში რეგულირდება როგორც უარყოფითი, ასევე დადებითი რეგულატორებით. უარყოფით რეგულატორს წარმოადგენს კომპლექსი TSC1/2 (tuberous sclerosis complex ½), რომელსაც შესწევს უნარი მოახდინოს mTORC1-ის აქტივობის ცვლილება. TSC1/2-ის ბლოკატორად ითვლება AKT/PKB, ხოლო გააქტივება სხვადასხვა ფაქტორით ხდება. ამ ფაქტორებს შორისაა უჯრედში ROS-ის რაოდენობის მატებაc . აღსანიშნავია, რომ ლიტერატურული მონაცემებით ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში ნანახია ოქსიდაციური პროცესის გააქტიურება და ROS-ის რაოდენობრივი მატება, რაც თავის მხრივ, TSC1/2 კომპლექსის აქტივაციის და ფოსფორილირებული mTOR-ის შემცირების მიზეზი შეიძლება გახდეს. mTOR-ის უარყოფით რეგულატორად ითვლება ასევე უჯრედში ატფ-ის შეცველობა, რაც ასევე დასტურდება ლიმონმჟავა ციკლის ფერმენტების აქტიურობის დაქვეითებით.

ამდენად, მიღებული მონაცემებიდან იკვეთება, რომ ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში აღინიშნება PI3K /AKT/PKB /mTOR სასიგნალო გზის აქტივობის შეფერხება, რაც სავარაუდოდ აისახება ზოგადად ცილების სინთეზის პროცესის, მათ შორის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის ფერმენტების რაოდენობრივ შემცირებაში.

დასკვნა

1. ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში თავის ტვინის ჰიპოკამპს უჯრედებში შეინიშნება ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე ფერმენტების აქტივობის დაქვეითება

2. ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე ფერმენტის კრეატინკინაზას კინეტიკული პარამეტრების კვლევის საფუძველზე, ამ ფერმენტების აქტივობის დაქვეითების მიზეზი ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში უნდა იყოს მათი სინთეზის ინტენსივობის შემცირება.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. Felman Adam, Why stress happens and how to manage it - Medically reviewed by Stacy Sampson, DO on March 12, 2020
https://www.medicalnewstoday.com/articles/145855#causes

2. https://www.braintools.ru/article/9548

3. https://arlenetaylor.org/brain-references/brain-challenges/stress-and-the-brain/2697-distress-negative-stress

4. https://cyberleninka.ru/article/n/neyrofiziologicheskie-izmeneniya-pri-emotsionalnom-stresse

5. https://medach.pro/post/1016

6. http://rsmu.ru/fileadmin/rsmu/img/lf/cpf/ucheb_rab/metodichki/stress.pdf

7. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6279965/

8. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4933289/

9. Marie L. Blanke and Antonius M.J. VanDongen.
Van Dongen AM, editor. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Biology of the NMDA Receptor. Chapter 13 Activation Mechanisms of the NMDA Receptor. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5274/

10. J Biol Chem World. 2010 Jul 26; 1(7): 229–234. Published online 2010 Jul 26. Plasma membrane Ca2+-ATPases in the nervous system during development and ageing. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3083968/

11. https://www.britannica.com/science/metabolism/ATP-synthesis-in-mitochondria

12. https://www.nature.com/scitable/topicpage/mitochondria-14053590/

13. Birch Karen, Keith George & Don McLaren . BIOS Instant Notes in Sport and Exercise Physiology; (2005).

14 Gajja S. Salomons, Wyss Markus. Creatine and Creatine Kinase in Health and Disease (2007). https://books.google.ge/books?id=HjU1FYjjoRcC&pg=PA18&lpg=PA18&dq=Cr/PCr/CK&source=bl&ots=YXPjJnWvP3&sig=ACfU3U3ndT8IF7YQOTkJKfUp6owh6vWV9A&hl=ru&sa=X&ved=2ahUKEwiZuN2oruLoAhVCAGMBHa5pCQsQ6AEwDnoECAsQNQ#v=onepage&q=Cr%2FPCr%2FCK&f=false

15. Creatine metabolism and psychiatric disorders: Does creatine supplementation have therapeutic value? (Published online 2012 Mar 24.) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3340488/

16. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1152

17. Mawer Rudy, MSc, CISSN on October 25, 2018 https://www.healthline.com/nutrition/what-is-creatine#what-it-is

18.https://www.intechopen.com/books/antioxidant-enzyme/antioxidant-enzymes-and-human-health

19. Nader Rifai PhD, in Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 2018

20. Samanta Raboni, ... Roberto Contestabile, in Comprehensive Natural Products II, 2010

21. Harry Morrison, in Enzyme Active Sites and their Reaction Mechanisms, 2021

22. R Schindler[1], E Weichselsdorfer, O Wagner, J Bereiter-Hahn 2001;79(6):719-28.

23. (Shi et al., 2011).

24. (Brierea et al., 2005).

25. John D. Enderle PhD, in Introduction to Biomedical Engineering (Third Edition), 2012

26. (L. Tretter, A. Ambrus, in Methods in Enzymology, 2014)

27. (Madia Trujillo, ... Rafael Radi, in Nitric Oxide (Second Edition), 2010) (ბეინერტი და კენედი, 1993)

28. (https://pdb101.rcsb.org/motm/89)

29. (J. H. Hurley, A. M. Dean, D. E. Koshland Jr. and R. M. Stroud (1991) Catalytic mechanism of NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase: implications from the structures of magnesium)

30. (Woods et al., 1988).

31. (Wu and Tzagoloff, 1987)

32. (van Someren et al., 1974; Craig et al., 1976)

33. (Dik et al., 2016)

34. (https://pdb101.rcsb.org/motm/154)

35. (A.D. Aulbach, C.J. Amuzie, in A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development (Second Edition), 2017)

36. (S.T. Yang, ... H. Huang, in , 2011)

37. (The other is found in the cytosol where it participates in the malate/aspartate shuttle.Jean P. Dzoyem, ... Jacobus N. Eloff, in Toxicological Survey of African Medicinal Plants, 2014).

38. PI3K-PKB/Akt Pathway Brian A. Hemmings and David F. Restuccia.

39. PI3K/AKT inhibition induces caspase-dependent apoptosis in HTLV-1 transformed cells

40. THE AKT/PKB AND GSK-3β SIGNALING PATHWAY REGULATES CELL MIGRATION THROUGH THE NFAT1 TRANSCRIPTION FACTOR, Merav Yoeli-Lerner, Y. Rebecca Chin, Christopher K. Hansen, and Alex Toker

41. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer

42. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2014.00064/full

43. (Lee et al., 2017).

44. (Sciarretta et al., 2015).

45. (Inoki et al., 2003).

46. (Sancak et al., 2010).

47. mTORC2 Is Involved in the Induction of RSK Phosphorylation by Serum or Nutrient Starvation

48. L. Tretter, A. Ambrus, in Methods in Enzymology, 2014

49. Patel M1, Day BJ, Crapo JD, Fridovich I, McNamara JO. Requirement for superoxide in excitotoxic cell death. Neuron. 1996 Feb; 16(2):345-55.

50. Abe K., Matsuki A. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) reduction activity and LDH release using MTT. // J.Neurosci. Res. -1974.-v.38.-p. 325–329.

51. Bartels, H. et.al. Clin.Chim. Acta 32, 81 (1971)

52. Popper, H. et.al. Biochem.Zeitschr. 291, 354 (1937)

53. Schumann, G. et.al. Clin Chem Acta, 327, 69-79 (2003)

54. (Biovision Inc, ১৯৯৩).

55. (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, ১৯৯৩).