



საქართველოს ტექნიკური
უნივერსიტეტი
1922 წლიდან

თამრიკო ხობელია

ერლიხის კარცინომის განვითარების პროცესში
ბიოინჟინრული მეთოდებით მიღებული
პროტეოლიზური ფერმენტების და მათი
ინჰიბიტორების მოქმედების შესწავლა

წარმოდგენილია დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

სადოქტოროს პროგრამა - ქიმიური და ბიოლოგიური ინჟინერია

შიფრი- 0711

საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტი თბილისი, 0160, საქართველო

2023 წ

საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტი

ფაკულტეტი - ქიმიური ტექნოლოგიისა და მეტალურგიის

ჩვენ, ქვემოთ ხელისმომწერნი ვადასტურებთ, რომ გავეცანით თამრიკო ხობელიას მიერ შესრულებულ სადისერტაციო ნაშრომს დასახელებით:

„ერლიხის კარცინომის განვითარების პროცესში ბიოინჟინრული მეთოდებით მიღებული პროტეოლიზური ფერმენტების და მათი ინჰიბიტორების მოქმედების შესწავლა“ და ვამლევთ რეკომენდაციას საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტის საინჟინრო, ტექნოლოგიური და საბუნებისმეტყველო საუნივერსიტეტო სადისერტაციო საბჭოში მის განხილვას დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად.

-----,-----20-- წელი

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: პროფ. ედიშერ კვესიტაძე

რეცენზენტი:_____

რეცენზენტი:_____

საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტი

2023 წ

ავტორი: თამრიკო ხობელია

დასახელება: ერლიხის კარცინომის განვითარების პროცესში ბიოინჟინრული მეთოდებით მიღებული პროტეოლიზური ფერმენტების და მათი ინჰიბიტორების მოქმედების შესწავლა

სადოქტორო პროგრამა: ქიმიური და ბიოლოგიური ინჟინერია

ხარისხი: ქიმიური და ბიოლოგიური ინჟინერიის დოქტორი

სხდომა ჩატარდა _____

ინდივიდუალური პიროვნებების ან ინსტიტუტების მიერ ზემომოყვანილი დასახელების დისერტაციის გაცნობის მიზნით მოთხოვნის შემთხვევაში მისი არაკომერციული მიზნებით კოპირებისა და გავრცელების უფლება მინიჭებული აქვს საქართველოს ტექნიკურ უნივერსიტეტს.

ავტორის ხელმოწერა _____

ავტორი ინარჩუნებს დანარჩენ საგამომცემლო უფლებებს და არც მთლიანი ნაშრომის და არც მისი ცალკეული კომპონენტების გადაბეჭდვა ან სხვა რაიმე მე- თოდით რეპროდუქცია დაუშვებელია ავტორის წერილობითი ნებართვის გარეშე. ავტორი ირწმუნება, რომ ნაშრომში გამოყენებული საავტორო უფლებებით დაცულ მასალებზე მიღებულია შესაბამისი ნებართვა (გარდა იმ მცირე ზომის ციტატებისა, რომლებიც მოითხოვენ მხოლოდ სპეციფიურ მიმართებას ლიტერატურის ციტირებაში, როგორც ეს მიღებულია სამეცნიერო ნაშრომების შესრულებისას) და ყველა მათგანზე იღებს პასუხისმგებლობას.

რეზიუმე

სადოქტორო ნაშრომი ეხება მიკროსკოპული სოკოების მყარფაზოვანი ფერმენტაციის შედეგად გამოყოფილ, ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების ანტისიმსივნიური ეფექტის დადგენას და პრეპარატის მიღების ტექნოლოგიური სქემის შემუშავებას. კვლევები ჩატარდა ერლიხის კარცინომის iv vivo მოდელზე, დაიტესტა 7 სინჯი: K1, T1, M II-12, Nl- 50, NL-51, Gz 9-10, Gz 9-6. აღნიშნული სინჯების გავლენით, კონკრეტულად K1, T1, M II-12 საკონტროლო ჯგუფის თავგებთან შედარებით დაფიქსირდა სიმსივნით დასნებოვნებული თავგების სიცოცხლის გახანგრძლივება და სიმსივნური ქსოვილის ზრდის შეჩერების ტენდენცია.

მოცემული ეფექტის შესასწავლად ლიტერატურულ წყაროებზე დაყრდნობით, მიღებულ ბიოლოგიურად აქტიურ ნაერთებში განისაზღვრა პროტეოლიზური აქტივობა და ჩატარდა პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორების სკრინინგი. სინჯებს რომეზსაც აღმოაჩნდათ პროტეპლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორული თვისება (K1, T1) გაახანგრძლივეს თავგების სიცოცხლისუნარიანობა, ხოლო M II-12 სინჯის შემთხვევაში, რომელსაც აღმოაჩნდა როგორც პროტეოლიზური ფერმენტების მაინჰიბირებელი ასევე სპეციფიური პროტეოლიზური აქტივობა განსხვავებით K1, T1 სინჯებისგან, დაფიქსირდა როგორც სიცოცხლის გახანგრძლივების და სიმსივნური ქსოვილის შემცირების ეფექტი.

მიღებული ეფექტის გასაძლიერებლად კვლევების შემდგომ ეტაპზე ჩატარდა M II-12 შტამის მუტაგენეზი, რომლის შედეგადაც დაფიქსირდა პროტეოლიზური ფერმენტების აქტივობის მატება. მუტირებული შტამის ლიზატის ინტრაპენიტონიურმა ინექციამ გაზარდა 10 %-ით თავგების სიცოცხლის უნარიანობა. ხოლო სიმსივნით დასნებოვნებული ქსოვილების არიალი შემცირდა.

Abstract

The doctoral dissertation focuses on determining the antitumor effect of biologically active compounds that were isolated through solid-phase fermentation of microscopic fungi, as well as developing a technological scheme for drug preparation. The study was conducted using an in vivo model of Ehrlich carcinoma, where 7 different samples (K1, T1, M II-12, N1-50, NL-51, Gz 9-10, Gz 9-6) were tested. The results showed that the K1, T1, and M II-12 samples had increased the lifespan of mice treated with a tumor and demonstrated a tendency to stop the growth of tumor tissue compared to the control group.

To understand this effect, the proteolytic activity of the biologically active compounds was determined based on literature sources, and proteolytic enzyme inhibitors were screened. The samples showed inhibitory properties of proteolytic enzymes (K1, T1) and extended the lifespan of mice. In the case of sample M II-12, which had both inhibitory and specific proteolytic activity, an effect was observed in prolonging life and reducing tumor tissue compared to K1 and T1.

To enhance the effect, the strain M II-12 was subjected to mutagenesis in the next stage of the research, resulting in an increase in the activity of proteolytic enzymes. Administration of the lysate of the mutant strain through intraperitoneal injection increased the survival rate of mice by 10%. the area of cancerous tissue also decreased.

შინაარსი

შესავალი.....	18
1. ლიტერატურის მიმოხილვა	23
1.1. სიმსივნე და მისი გამომწვევი მიზეზები.....	23
1.2. სიმსივნის სახეები.....	25
1.2.1. ერლიხის ასციტური კარცინომა.....	26
1.3. სიმსივნის მკურნალობის მეთოდები და მკურნალობასთან დაკავშირებული პრობლემები	27
1.3.1. ქიმიოთერაპია.....	28
1.3.2. რადიოთერაპია.....	28
1.3.3. ქირურგიული მკურნალობა	29
1.4. პროტეოლიტიკური ფერმენტების გავლენა სიმსივნეზე	29
1.4.1. ცისტეინ პროტეაზები	30
1.4.2. სერინ პროტეაზები.....	31
1.4.3. ასპარტატ პროტეაზები	31
1.4.4. თრეონ პროტეაზები	32
1.4.5. მატრიქსილი მეტალოპროტეაზები	32
1.5. ანტისიმსივნური ეფექტის მქონე პროტეაზები	32
1.6. პროტეოლიზური ფერმენტების აქტივობის განსაზღვრის მეთოდები და მათთან დაკავშირებული პრობლემები	34
1.7. პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორების როლი სიმსივნის მკურნალობაში	35
1.8. მიკროსკოპული სოკოები	35
1.8.1. ასპერგილუს ნიგერი.....	37
1.8.2. პენიცილიუმი.....	39
1.8.3. მუკორი.....	41
1.8.4. ფუზარიუმი.....	42
1.9. მიკროსკოპული სოკოების იდენტიფიკაციის პრინციპები	43
1.10. მუტაგენეზი.....	46
1.11. ფენოლური ნაერთები.....	48
1.11.1. ფენოლური ნაერთების ბიოსინთეზი სოკოებში.....	50
2. მეთოდოლოგიური კვლევა.....	52
2.1. მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფა	52
2.1.1. პირველადი ჩანათესებიდან სუფთა კულტურების მიღება	52

2.1.2. მიკროსკოპული სოკოების ზრდის ოპტიმალური პირობების დადგენა.....	53
2.1.3. მიკროსკოპული სოკოების უჯრედშია ლიზატის მიღება	54
2.2. ცილის განსაზღვრის მეთოდი	54
2.2.1. ცილის განსაზღვრა ბრედფორდის მეთოდით.....	55
2.3. ავთვისებიანი სიმსივნის in vivo მოდელირება.....	55
2.3.1. უჯრედშია ლიზატის გავლენა ერლიხის კარცინომის in vivo მოდელების სიცოცხლის ხანგრძლივობაზე	56
2.3.2 ერლიხის კარცინომის in vivo მოდელში სიმსივნური ქსოვილის განვითარების შეფასება.....	56
2.4. კოლორიმეტრული ანალიზის ახალი მეთოდის შექნა საკვლევ ლიზატში საერთო პროტეოლიზური აქტივობის დასადგენად	56
2.4.1. სხვადასხვა წყაროდან ფერმენტული ნიმუშების გამოყოფა.	57
2.4.2. ფერმენტ სუბსტრატული დამოკიდებულების განსაზღვრა.	58
2.4.3. ფერმენტული აქტივობის განსაზღვრა სხვადასხვა ბიოლოგიურ ექსტრაქტებში	58
სადისერტაციო თემის ფარგლებში ჩატარებული კვლევის შესამე ეტაპი.....	59
2.5. კოლორიმეტრული მეთოდით უჯრედშია ლიზატში პროტეოლიზური აქტივობისა და პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორის განსაზღვრა.....	59
2.6. უჯრედშია ლიზატებში პროტეოლიზური აქტივობის განსაზღვრა გელ- დიფუზიური მეთოდით	60
2.7. უჯრედშია ლიზატებში პროტეოლიზური ინჰიბიტორული თვისების განსაზღვრა გელ-დიფუზიური მეთოდით.....	61
2.8. საერთო ფენოლური ნაერთების განსაზღვრა სპექტროფოტომეტრულად ფოლინ-ჩიკოლტეს მეთოდით.....	61
2.9. სიმსივნური ქსოვილის აპოპტორზური აქტივობის განსაზღვრა ELISA ტესტით.....	61
2.10. მიკროსკოპული სოკოების იდენტიფიცირება.....	63
სადისერტაციო თემის ფარგლებში ჩატარებული კვლევის მეოთხე ეტაპი	63
2.11. მუტაგენეზი - როგორც ბიოინჟინრული მეთოდი ორგანიზმის ბიოსინთეზის გასამდიერებლად	63
3. შედეგები და მათი განსჯა.....	65
3.1 საკვლევ მიკროსკოპული სოკოები.....	65
3.2 საკვები არისა და ტემპერატურის გავლენა მიკროსკოპული სოკოების ზრდაზე	65
3.3. მიკროსკოპული სოკოებიდან გამოყოფილი პრეპარატები	80
3.4. ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებში ცილების საერთო რაოდენობის განსაზღვრა ბიურეტის მეთოდით	80

3.5. ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებებში ცილების საერთო რაოდენობის განსაზღვრა ბრედფორდის მეთოდით	81
3.6. ავთვისებიანი სიმსივნის in vivo მოდელირება ლაბ. თაგვებში	81
3.6.1. დაკვირვება სიცოცხლის ხანგრძლივობაზე	82
3.6.2. დაკვირვება სიმსივნური ქსოვილის ზრდის დინამიკაზე.....	83
3.7. კაზეინის უხსნადი ნაწილიდან ფერმენტული რეაქციის შედეგად მიღებული ხსნადი ფრაგმენტების გაზომვა.....	91
3.8. EWMP სუბსტრატის დახასიათება	92
3.9. ფერმენტ-სუბსტრატული დამოკიდებულების შესწავლა.....	93
3.10. სხვადასხვა ბიოლოგიური ობიექტებიდან მიღებული პროტეოლიზური ფერმენტების აქტივობის განსაზღვრა	94
კაზეინისა და EWMP სუბსტრატების შედარება.....	94
3.11. პროტეოლიზური აქტივობის განსაზღვრა კოლორიმეტრული მეთოდით - EWMP სუბსტრატის გამოყენებით.....	99
3.12. პროტეოლიზური აქტივობის დადგენა გელ-დიფუზიური მეთოდით	101
3.13. პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორული ეფექტის დადგენა.....	101
3.14. უჯრედშიდა ლიზატში საერთო ფენოლური ნაერთების განსაზღვრა.....	103
3.15. კასპაზა 3-ის განსაზღვრა ფოტოკოლორიმეტრული მეთოდით.....	104
3.16. მიკროსკოპული სოკოების იდენტიფიცირება	103
3.17. მუტაგენეზის ოპტიმალური პირობების დადგენა.....	105
3.18. მუტირებულ სინჯებში ცილის განსაზღვრა ბიურეტის მეთოდით.....	107
3.19. მუტაგენურ შტამ M II-12 -ში პროტეოლიზური ფერმენტების სკრინინგი.....	107
3.20. მუტაგენეზის შედეგად მიღებულ M II-12 შტამში პროტეოლიზური აქტივობის განსაზღვრა გელ დიფუზიური მეთოდით.	108
3.21 მუტაგენეზის შედეგად მიღებულ M II-12 შტამში პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორის განსაზღვრა.....	109
3.22. მუტაგენეზის შედეგად მიღებულ სინჯში პროტეოლიზური აქტივობისა და ინჰიბირების განსაზღვრა კოლორიმეტრული მეთოდით	110
3.23. სიმსივნური ქსოვილის განვითარების შეფასება.....	111
3.24. დაკვირვება სიცოცხლის ხანგრძლივობაზე მუტაგენეზირებული შტამებიდან მიღებული სინჯების ზეგავლენით.....	113
3.25. პრეპარატის მიღების ტექნოლოგიური სქემა.....	115
დასკვნა.....	118
ციტირებული ლიტერატურის ნუსხა	119

ცხრილების ნუსხა

ცხრილი 1. სხვადასხვა საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული T1 მიკროსკოპული სოკო.....	66
ცხრილი 2. სხვადასხვა საკვებ არეზე კულტივირებული K1 მიკროსკოპული სოკო.....	68
ცხრილი 3. სხვადასხვა საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული NL 50 მიკროსკოპული სოკო.....	70
ცხრილი 4. სხვადასხვა საკვებ არეზე კულტივირებული NL 51 მიკროსკოპული სოკო.....	72
ცხრილი 5. სხვადასხვა საკვებ არეზე კულტივირებული M II-12 მიკროსკოპული სოკო.....	74
ცხრილი 6. სხვადასხვა საკვებ ნიადაგზე კულტივირებულ Gz 9-6 მიკროსკოპული სოკო.....	76
ცხრილი 7. სხვადასხვა საკვებ ნიადაგზე კულტივირებულ Gz 9-10 მიკროსკოპული სოკო.....	78
ცხრილი 8. მიკროსკოპული სოკოების მყარფაზოვანი ფერმენტაციის შედეგად მიღებულ უჯრედშიდა ლიზატში ბიურეტის მეთოდით განსაზღვრული ცილის კონცენტრაცია.	80
ცხრილი 9. მიკროსკოპული სოკოების მყარფაზოვანი ფერმენტაციის შედეგად მიღებულ უჯრედშიდა ლიზატში ბრედფორდის მეთოდით განსაზღვრული ცილის კონცენტრაცია.	81
ცხრილი 10. საკონტროლო ჯგუფის სიმსივური ქსოვილის ზრდის დინამიკა.....	84
ცხრილი 11. K1 სინჯის გავლენა სიმსივური ქსოვილის ზრდის დინამიკაზე.	84
ცხრილი 12. T1 სინჯის გავლენა სიმსივური ქსოვილის ზრდის დინამიკაზე.....	84
ცხრილი 13. M II-12 სინჯის გავლენა სიმსივური ქსოვილის ზრდის დინამიკაზე.	85
ცხრილი 14. NL 51 სინჯის გავლენა სიმსივური ქსოვილის ზრდის დინამიკაზე.	85
ცხრილი 15. NL 50 სინჯის გავლენა სიმსივური ქსოვილის ზრდის დინამიკაზე.	85
ცხრილი 16. Gz 9-10 სინჯის გავლენა სიმსივური ქსოვილის ზრდის დინამიკაზე.....	86

ცხრილი 17. Gz 9-4 სინჯის გავლენა სიმსივური ქსოვილის ზრდის დინამიკაზე.	86
ცხრილი 18. თიროზინის რაოდენობა გაზომილი ხსნარის 1-ისა და 2-ის სუპერნატანტებში 1-ლი სქემის მიხედვით Folin & Ciocalteu-ს მეთოდით.....	92
ცხრილი 19. სხვადასხვა ბიოლოგიური ობიექტებიდან მიღებული პროტეაზების აქტივობა	94
ცხრილი 20. საკვლევ სინჯებში განსაზღვრული ფერმენტული აქტივობა.....	100
ცხრილი 21. საკვლევი სინჯების ერლიხის კარცინომის in vivo მოდელზე ზეგავლენის შედეგად მიღებული პასუხები	103
ცხრილი 22. M II-12 მიკროსკოპული სოკოს დასხივება ულტრაიისფერი გამოსხივებით 240 ნანომეტრზე.....	105
ცხრილი 23. კოლორიმეტრული მეთოდით მუტირებულ სინჯებში პროტეოლიზური ფერმენტების აქტივობისა და ინჰიბირების განსაზღვრა	111
ცხრილი 24. მუტაგენებირებულ და არამუტაგენებირებული სინჯების გავლენის შედარება სიცოცხლის ხანგრძლივობისა და მოცულობის ცვლილებაზე.....	115

გრაფიკების ნუსხა

გრაფიკი 1. ჩაპეკის საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული T1 მიკროსკოპული სოკო.....	66
გრაფიკი 2. საბუროს საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული T1 მიკროსკოპული სოკო.....	67
გრაფიკი 3. უნივერსალურ საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული T1 მიკროსკოპული სოკო.....	67
გრაფიკი 4. ჩაპეკის საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული K1 მიკროსკოპული სოკო	68
გრაფიკი 5. საბუროს საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული K1 მიკროსკოპული სოკო.....	69
გრაფიკი 6. უნივერსალურ საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული T1 მიკროსკოპული სოკო.....	69
გრაფიკი 7. ჩაპეკის საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული NL 50 მიკროსკოპული სოკო.....	70
გრაფიკი 8. საბუროს საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული NL 50 მიკროსკოპული სოკო.....	71
გრაფიკი 9. უნივერსალურ საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული NL 50 მიკროსკოპული სოკო.....	71
გრაფიკი 10. ჩაპეკის საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული NL 51 მიკროსკოპული სოკო.....	72
გრაფიკი 11. საბუროს საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული NL 51 მიკროსკოპული სოკო.....	73
გრაფიკი 12. უნივერსალურ საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული NL 51 მიკროსკოპული სოკო.....	73
გრაფიკი 13. ჩაპეკის საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული M II-12 მიკროსკოპული სოკო.....	74
გრაფიკი 14. საბუროს საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული M II-12 მიკროსკოპული სოკო.....	75
გრაფიკი 15. უნივერსალურ საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული M II-12 მიკროსკოპული სოკო.....	75

გრაფიკი 16. ჩაპეკის საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული Gz 9-6 მიკროსკოპული სოკო.....	76
გრაფიკი 17. საბუროს საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული Gz 9-6 მიკროსკოპული სოკო.....	77
გრაფიკი 18. უნივერსალურ საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული T1 მიკროსკოპული სოკო.....	77
გრაფიკი 19. ჩაპეკის საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული Gz 9-10 მიკროსკოპული სოკო.....	78
გრაფიკი 20. საბუროს საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული Gz 9-10 მიკროსკოპული სოკო.....	79
გრაფიკი 21. უნივერსალურ საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული Gz 9-10 მიკროსკოპული სოკო.....	79
გრაფიკი 22. EWMP სუბსტრატის უხსნადობის მაჩვენებელი დროის ინტერვალში....	93
გრაფიკი 23. რეაქციის სიჩქარისა და სუბსტრატის კონცენტრაციის დამოკიდებულება.	93

დიაგრამების ნუსხა

დიაგრამა 1. კარცინომიანი თავის სიცოცხლის ხანგრძლივობა საკვლევი სინჯების: T1, K1, M II-12, NL-50, NL-51, Gz 9-4, Gz-9-10 ზეგავლენის შედეგად.....	82
დიაგრამა 2. ერლიხის კარცინომით დასნებოვნებული თავების სიცოცხლის მაჩვენებლის პროცენტული გამოსახულება საკვლევი სინჯების ზეგავლენის შემდეგ.....	83
დიაგრამა 3. კარცინომის in vivo მოდელზე პრეპარატების 1 კვირის ზემოქმედების შედეგად მიღებული სიმსივნური ქსოვილის მოცულობა.....	87
დიაგრამა 4. კარცინომის in vivo მოდელზე პრეპარატების 2 კვირის ზემოქმედების შედეგად მიღებული სიმსივნური ქსოვილის მოცულობა.....	88
დიაგრამა 5. კარცინომის in vivo მოდელზე პრეპარატების 3 კვირის ზემოქმედების შედეგად მიღებული სიმსივნური ქსოვილის მოცულობა.....	88
დიაგრამა 6. I კვირის სიმსივნური ქსოვილის ზრდის და შემცირების პროცენტული მაჩვენებელი.....	89
დიაგრამა 7. II კვირის სიმსივნური ქსოვილის ზრდის და შემცირების პროცენტული მაჩვენებელი.....	90
დიაგრამა 8. III კვირის სიმსივნური ქსოვილის ზრდის და შემცირების პროცენტული მაჩვენებელი.....	90
დიაგრამა 9. M II-12 მიკროსკოპული სოკოს დასხივება ულტრაიისფერი გამოსხივებით 240 ნანომეტრზე.....	107
დიაგრამა 10. კარცინომის in vivo მოდელზე პრეპარატების V კვირის ზემოქმედების შედეგად მიღებული სიმსივნური ქსოვილის მოცულობა.....	112
დიაგრამა 11. კარცინომის in vivo მოდელზე პრეპარატების V კვირის ზემოქმედების შედეგად მიღებული სიმსივნური ქსოვილის მოცულობის პროცენტული მაჩვენებელი.....	112
დიაგრამა 12. კარცინომიანი თავის სიცოცხლის ხანგრძლივობა საკვლევი სინჯის M II-12 ზეგავლენის შედეგად.....	114
დიაგრამა 13. კარცინომიანი თავის სიცოცხლის ხანგრძლივობის პროცენტული გამოსახულება საკვლევი სინჯის M II-12 ზეგავლენის შედეგად.....	114

სურათების ნუსხა

სურათი 1. სადოქტორო კვლევის ფარგლებში გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოები.	65
სურათი 2. საკონტროლო და ერლიხის კარცინომით დასნებოვნებული თაგვი.....	82
სურათი 3. პროტეილიზური აქტივობის დადგენა გელ-დიფუზიური მეთოდით.....	101
სურათი 4. საკვლევ სინჯებში პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორული ეფექტის დადგენა გელ-დიფუზიური მეთოდით მეთოდი.....	102
სურათი 5. იდენტიფიცირებული მიკროსკოპული სოკო	104
სურათი 6. არა მუტირებული შტამის პროტეოლიზური აქტივობა. დასხივებული შტამების ფერმენტული აქტივობა.	108
სურათი 7. მუტირებულისინჯის პროტეილიზური აქტივობის დადგენა გელ-დიფუზიური მეთოდით.	109
სურათი 8. პროტეილიზური ფერმენტის ინჰიბიტორული აქტივობის დადგენა გელ დიფუზიური მეთოდით	110
სურათი 9. სხვადასხვა პრეპარატების ზეგავლენის შედეგად მიღებული ქსოვილური ნაზრდი	113

სქემების ნუსხა

სქემა 1. მუტაგენუზის ბიო-ინჟინრული სქემა	64
სქემა 2. კაზეინის ჰიდროლიზის სქემა პროტეოლიზური ფერმენტების ზეგავლენით.....	96
სქემა 3. EWMP ჰიდროლიზის სქემა პროტეოლიზური ფერმენტების ზეგავლენით.....	98
სქემა 4. პრეპარატის მიღების ტექნოლოგიური სქემა.....	117

გამოყენებული აბრევიატურების ნუსხა

TCA - Trichloroacetic Acid (სამქლორ ძმარმჟავა)

OD- Optical Density (ოპტიკური სიმკვრივე)

CIP- Casein Insoluble Part (კაზეინის უხსნადი ნაწილი)

CSP-Casein Soluble Part (კაზეინის ხსნადი ნაწილი)

CSF- Casein Soluble Fraction (კაზეინის ხსნადი ფრაქცია)

TSF-Trichloroacetic Acid-Soluble Fraction (ტრიქლოროძმარმჟავას ხსნადი ფრაქცია)

TSF/EP-Trichloroacetic Acid-Soluble Fraction/Enzyme Product (სამქლორ ძმარმჟავაში ხსნადი ფრაქციის/ფერმენტის პროდუქტი)

CSF/EP - Casein Soluble Fraction/Enzyme Product (კაზეინის ხსნადი ფრაქციის /ფერმენტის პროდუქტი)

CIP/EP - Casein Insoluble Part/Enzyme Product (კაზეინის უხსნადი ნაწილი/ფერმენტის პროდუქტი)

EWMP - Egg White Modified Protein (კვერცხის თეთრი მოდიფიცირებული ცილა)

EWMPI - Egg White Modified Protein Insoluble (კვერცხის ცილა მოდიფიცირებული პროტეინის ხსნადი ფრაქციის/ფერმენტის პროდუქტი)

EWMPSP/EP-Egg White Modified Protein Soluble Fraction/Enzyme Product (კვერცხის ცილა მოდიფიცირებული პროტეინის ხსნადი ფრაქციის/ფერმენტის პროდუქტი)

SF/EP - Soluble Fraction/Enzyme Product (ხსნადი ფრაქციის/ფერმენტის პროდუქტი)

მადლიერების გვერდი

ნაშრომში წარმოდგენილი კვლევითი სამუშაო განხორციელდა „შოთა რუსთაველის საქართველოს ეროვნული სამეცნიერო ფონდის ფინანსური მხარდაჭერით, PHDF-22-5398 სადოქტორო გრანტის ფარგლებში“. რისთვისაც დიდ მადლობას ვუხდით აღნიშნულ ფონდს.



მადლობას ვუხდით ჩემს ხელმძღვანელს, პროფესორ ედიშერ კვეციტაძეს გაწეული დახმარებისთვის, რჩევა დარიგებებისთვის და ხელმძღვანელობისთვის. ასევე ჩემს მეგობარს, კოლეგას, ქრისტინე მუსელიანს თანადგომისთვის და დახმარებისთვის.

გულწრფელ მადლობას ვუხდით პროფესორ ქეთევან ღამბაშიძეს გაწეული კონსულტაციისთვის, რჩევა - დარიგებებისა და დახმარებისთვის.

შესავალი

სიმსივნე ავადობის და სიკვდილიანობის ერთერთი წამყვანი მიზეზია მსოფლიოში. სიმსივნის შედეგად გარდაცვლილთა რიცხვი დღითიდღე მატულობს. ყოველწლიურად იზრდება ფილტვის, ღვიძლის, კუჭის, ძუძუს და კოლორექტული კიბოსშემთხვევები. თანამედროვე მედიცინაში სიმსივნების სამკურნალოდ ფართოდ გამოიყენება ქირურგიული მეთოდები, ქიმიოთერაპია, რადიოთერაპია, იმუნოთერაპია, ჰორმონებზე დაფუძნებული თერაპია და სხვა. ამის მიუხედავად, ონკოპაციენტთა მკურნალობა კვლავ აქტუალურ პრობლემად რჩება, ვინაიდან მკურნალობის ყველა ზემოთჩამოთვლილ მეთოდებს თან ახლავს გვერდითი ეფექტები (ნეირო-, ჰეპატო- და კარდიოტოქსიკურობა, იმუნოსუპრესიით განვითარებული სუპერინფექციები, ჯანსაღი უჯრედების დაზიანება), რაც მკვეთრად ამცირებს მკურნალობის ეფექტურობას. ყურადსაღებია პრეპარატების მიღების ტექნოლოგიური სირთულეები და სიძვირეც. ამ მიზეზთა გამო, დღესაც აქტიურად მიმდინარეობს მეცნიერ-მკვლევართა მიერ სიმსივნის საწინააღმდეგო პრეპარატების და მეთოდების შემუშავება, რომლებიც ბევრად უფრო ეფექტური, ორგანიზმის დამზოგველი, ტექნოლოგიურად ადვილად მისაღები და ნაკლებ ხარჯიანი იქნება.

ამ თვალსაზრისით, სიმსივნეების მკურნალობისთვის შეიძლება გამოყენებული იქნეს ისეთი ბუნებრივი წყაროები, როგორცაა: ფერმენტები, ფერმენტების ინჰიბიტორები და სხვადასხვა მიკროორგანიზმებიდან მიღებული ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთები, რომელთაც სავარაუდოდ, გააჩნიათ სიმსივნის საწინააღმდეგო (სიმსივნური უჯრედების ზრდის დამთრგუნველი, და/ან გამანადგურებელი) მოქმედება მინიმალური გვერდითი ეფექტებით.

ფერმენტებიდან საყურადღებოა ჰიდროლაზების კლასის წარმომადგენლები - პროტეაზები, რომლებიც დიდ როლს თამაშობენ სასიცოცხლოდ მნიშვნელოვან ბიოლოგიური პროცესების მიმდინარეობაში. კერძოდ, მათ შეუძლიათ უჯრედში მიმდინარე ისეთი პროცესების რეგულირება, როგორცაა, უჯრედის გამრავლება, აპოპტოზი. მონაწილეობენ ახალი ბიოაქტიური მოლეკულის წარმოქმნაში, უჯრედშორისი სასიგნალო გზების რეგულაციაში და სხვა.

განასხვავებენ პროტეაზების რამდენიმე ჯგუფს: ცისტეინ, თრეონინ, გლუტამინ, ასპარტატ და მეტალოპროტეაზებს. ამ ჯგუფის გარკვეული სახეობები მონაწილეობენ სიმსივნის დათრგუნვაში. თუმცა, დადებითი თვისების გარდა, მათი აქტივობის ცვალებადობა, შესაძლოა, სავალაო აღმოჩნდეს ცოცხალი ორგანიზმისთვის.

კვლევებით გამოვლენილია, რომ ზოგიერთი სახის სიმსივნეებში, მათი განვითარების ადრეულ სტადიაზე ადგილი აქვს პროტეოლიზური ფერმენტების დონის მკვეთრ მატებას, რითაც თავის მხრივ, მონაწილეობენ კიბოს განვითარების და გავრცელების პროცესში (ინვაზია, ანგიოგენეზი, მეტასტაზირება და სხვა). ამიტომ, ამ ტიპის ფერმენტების ინჰიბიტორები შეიძლება ჩაითვალოს როგორც ერთერთი ძლიერი სტრატეგიული სამკურნალო მეთოდი სიმსივნის საწინააღმდეგო თერაპიაში.

მართალია, შესწავლილი და ცნობილი ინჰიბიტორების უმეტესობა ცილები, პეპტიდები, პოლისაქარიდები, პოლიფენოლები, გლიცეროლიპიდები, ტრიტერპენები და სხვა დაბალი მოლეკულური არაცილოვანი ნაერთებია, ბოლო წლებში დიდ ყურადღებას იპყრობს მიკროსკოპული სოკოებიდან გამოყოფილი პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორები. დღესდღეობით აღმოჩენილია სერინის, ცისტეინის და რამდენიმე ასპარტული პროტეაზას ინჰიბიტორი, რომელთა გამოყენებითაც მიმდინარეობს კვლევები, რათა დადგინდეს მათი სიმსივნის საწინააღმდეგო მოქმედების პოტენციალი.

სერინ პროტეაზას ინჰიბიტორები, აღმოჩენილია ასკომიცეტებისა და ბაზიდიომიცეტების სხვადასხვა წარმომადგენლებში. ცისტეინ პეპტიდაზას ინჰიბიტორები ნაპოვნია ბაზიდიომიცეტებში. ასპარტული პროტეაზების ინჰიბიტორები აღმოჩნდა საფუარა სოკოებში. სერინი და ცისტეინ პროტეაზების დაბალმოლეკულური ინჰიბიტორები ასევე აღმოჩენილია აქტინომიცეტებსა და სტრეპტომიცეტებში.

პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორების გარდა ზოგიერთ მიკროსკოპულ სოკოებში აღმოჩენილია პროტეოლიზური ფერმენტები, რომლებიც ინჰიბიტორების მსგავსად ასევე მოქმედებენ სიმსივნური უჯრედების დათრგუნვაში.

სადისერტაციო ნაშრომის ძირითად მიზანს წარადგენს:

- მიკროსკოპული სოკოებიდან ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების გამოყოფა
- დავაკვირდეთ და შევისწავლოთ მიკროსკოპული სოკოებიდან გამოყოფილი ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების (პროტეაზების და პროტეაზების ინჰიბიტორული თვისებების მქონე ნაერთების) გავლენას ერლიხის კარცინომის განვითარებაზე.
- დადებითი ეფექტის მიღების შემთხვევაში ისეთი პრეპარატის შექმნა, რომელთა საშუალებითაც შესაძლებელი იქნება სიმსივნის პრევენცია ან/და მკურნალობა

კვლევის ამოცანები:

1. მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფა საქართველოს შერჩეული რეგიონიდან
2. გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოებიდან სუფთა კულტურების მიღება და ზრდისთვის საჭირო ოპტიმალური პირობების შერჩევა.
3. მიკროსკოპული სოკოების სუფთა კულტურებიდან ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების შემცველი უჯრედშიდა ლიზატის მიღება
4. ერლიხის ასციტური კარცინომის in vivo მოდელის შექმნა
5. ერლიხის ასციტური კარცინომით დასნებოვნებულ თაგვებზე, მიღებული ბ.ა.ნ-ის გამოცდა (პირველ ეტაპზე დავაკვირდებით: გავლენას სიცოცხლის ხანგრძლივობაზე, სიმსივნის არეალის გაფართოების ან შემცირების ეფექტს)
6. ბიოლოგიურად აქტიურ ნაერთებში სპეციფიური პროტეაზების დეტექციისთვის შემუშავდა აქტივობის განსაზღვრის კოლორიმეტრული მეთოდი
7. განისაზღვრება პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორების და პროტეოლიზური ფერმენტების აქტივობა კოლორიმეტრული და რადიალური დიფუზიის მეთოდების გამოყენებით.
8. მიკროსკოპული სოკოების შტამების იდენტიფიცირება.
9. გარკვეული ეფექტის დაფიქსირების შემთხვევაში ჩატარდება მიკროსკოპული სოკოების მუტაგენეზის, უფრო აქტიური ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების მიღების მიზნით.
10. დადებითი ეფექტის მიღების შემთხვევაში პრეპარატის მიღების ტექნოლოგიური სქემის შემუშავება.

კვლევის ობიექტს წარმოადგენს მიკროსკოპული სოკოების უჯრედშიდა ლიზატიდან გამოყოფილი ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებები, რომელთა ბიოქიმიური შედგენილობის და მათი ზეგავლენის შესწავლა კარცინომის in vivo მოდელზე მოხერხდა სხვადასხვა მეთოდების გამოყენებით.

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე: სადისერტაციო კვლევის ფარგლებში საქართველოს შერჩეული რეგიონიდან გამოიყო მიკროსკოპული სოკოები. მიღებულ იქნება სუფთა კულტურები და განხორციელდა ზრდისთვის საჭირო ოპტიმალური პირობების შერჩევა. ჩვენს მიერ, მიკროსკოპული სოკოების (K1, T1, M II-12, Gz 9-10, Gz 9-4, NL-50, NL-51) მყარფაზოვანი ფერმენტაციის შედეგად მიღებული უჯრედშიდა ლიზატიდან გამოყოფილ იქნა ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებები, რომლებიც გამოიცადა ექსპერიმენტში ერლიხის კარცინომის in vivo მოდელზე. კვლევის შედეგად გამოვლინდა სიმსივნური ზრდის პროცესის შეფერხების ტენდენცია და სიმსივნეანი ცხოველების სიცოცხლის ხანგრძლივობის ზრდა კონტროლთან შედარებით. აღნიშნულ ნაერთებში დაფიქსირდა როგორც პროტეოლიზური ფერმენტების ასევე პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორული აქტივობა. სინჯებს რომლებსაც გააჩნდათ ინჰიბიტორული აქტივობა, გაზარდეს სიმსივნით დასნებოვნებული ცხოველების სიცოცხლის ხანგრძლივობა, ხოლო საკვლევი ხსნარების ზემოქმედებით, სადაც დაფიქსირდა როგორც ინჰიბიტორული ასევე პროტეოლიზური აქტივობა გამოვლინდა როგორც სიცოცხლის გახანგრძლივების ეფექტი, ასევე სიმსივნური ქსოვილის ზრდის ტენდენციის შემცირება. აღნიშნული ეფექტი გაძლიერებულ იქნა ბიოინჟინრული მეთოდით-მუტაგენეზით, რისი წყალობითაც მივიღეთ სიმსივნის მკვეთრი კლების ეფექტი.

ნაშრომის პრაქტიკული ღირებულება: შეიქმნას ანტისიმსივნური ეფექტის მქონე პრეპარატის წარმოების ტექნოლოგიური სქემა.

წარმატებული კვლევების შემთხვევაში, ვვარაუდობთ, რომ მიღებული შედეგები მნიშვნელოვნად გააფართოვებს მეცნიერების თეორიულ ცოდნას და მომავალში, შესაძლოა, შემოთავაზებულ იქნას ახალი, ნაკლები გვერდითი

ეფექტის მქონე, ბუნებრივი და იაფი/ხელმისაწვდომი ბიოპრეპარატი ავთვისებიანი სიმსივნეების პრევენციის/ან და სამკურნალოდ.

1. ლიტერატურის მიმოხილვა

1.1. სიმსივნე და მისი გამომწვევი მიზეზები

სიმსივნე არის მდგომარეობა, რომლის დროსაც უჯრედები უგულვებელყოფენ მათი გაყოფის ფიზიოლოგიურ წესებს, იზრდებიან და მრავლდებიან უკონტროლო გზით. სიმსივნე შეიძლება განვითარდეს მრავალი გზით: დნმ-ის დაზიანებით, დნმ-ის მუტაციით, უჯრედული ციკლის მარეგულირებელი და რეპრესორული სისტემების ფუნქციის დაკარგვით და სხვა ფაქტორებით. მის გამომწვევ გენეტიკურ ცვლილებებს ზოგიერთი ადამიანი მემკვიდრეობით იღებს, ზოგიერთ შემთხვევაში კი გენები მუტაციას განიცდის უჯრედების დაყოფისას დაშვებული შეცდომების ან დნმ-ს დაზიანების გამო სიმსივნური უჯრედები არ რეაგირებენ ისეთ სასიგნალო კასკადზე, რომლებიც ააქტიურებენ ნორმალურ უჯრედულ ციკლს. მათ გააჩნიათ აუტოკრინული სასიგნალო გზა, რაც იწვევს ტრანსფორმირებული უჯრედების უკონტროლო ზრდას და გამრავლებას [1,2].

მიტოზის დროს ნორმალური უჯრედები იზრდება/მრავლდება ურთიერთდამოკიდებული გზით, გარე ზრდის ფაქტორების არსებობაზე დაყრდნობით. შესაბამისად, როდესაც ზრდის სასიგნალო კასკადი შეზღუდულია ან შეჩერებულია, უჯრედები წყვეტენ რეპროდუქციას. სიმსივნური უჯრედები იზრდებიან სასიგნალო ფაქტორის არარსებობის შემთხვევაშიც კი. ნორმალურ უჯრედებს შეუძლიათ კონტაქტის დათრგუნვა, ისინი აჩერებენ უჯრედების გაყოფას უჯრედების საკმარისი რაოდენობის არსებობის შემთხვევაში, გარკვეული ზღვრის მიღწევის შემდეგ. სიმსივნურ უჯრედებს არ აქვთ ურთიერთქმედების დათრგუნვის ეს უნარი, რაც დაკავშირებულია უჯრედების არასასურველი მასის წარმოქმნასთან [3,4].

ჯანმრთელი უჯრედის სასიცოცხლო ციკლი კარგად არის დაპროგრამებული, უჯრედები გაყოფის შედეგად წარმოქმნიან 40-50 თაობას და შემდგომ იწყებენ დაბერებას და აპოპტოზს, რის შედეგად ხდება მათი ჩანაცვლება ახალი უჯრედებით. სიმსივნის უჯრედების გაყოფით მიღებული უჯრედებისთვის არ არის დამახასიათებელი დაბერება და აპოპტოზი [5].

უჯრედული „უკვდავება“ შესაძლებელია, იყოს კიბოს უჯრედების უნარი გაზარდონ თავისი ტელომერაზული აქტივობა. ადამიანის სიმსივნური უჯრედების დაახლოებით 90%-ში მომატებულია ტელომერაზას აქტივობა. ტელომერაზა ინარჩუნებს ტელომერული უბნის სიგრძეს ქრომატიდების ბოლოებში. როდესაც ორგანიზმის ასაკის მატებასთან ერთად ნორმალური უჯრედები კარგავენ ტელომერაზულ აქტივობას, კიბოს უჯრედები ინარჩუნებენ ტელომერაზას ექსპრესიის უნარს, რითაც ინარჩუნებენ ქრომატიდული ტელომერის სიგრძეს და განაგრძობენ უჯრედულ გაყოფას [6].

სიმსივნე მსოფლიოში სიკვდილის გამომწვევი ერთ-ერთი წამყვანი ფაქტორია, 2020 წლის მონაცემებით დაახლოებით 10 მილიონი ადამიანი დაიღუპა სხვადასხვა ტიპის სიმსივნით. ჯანდაცვის მსოფლიო ორგანიზაციის თანახმად, გლობალურად ყველაზე გავრცელებული სიმსივნური დაავადებები, რომლებიც სიკვდილიანობის მაღალი მაჩვენებელით გამოირჩევიან, არის:

- მკერდის სიმსივნე (დაახლოებით 2,26 მლნ შემთხვევა);
- ფილტვის სიმსივნე (დაახლოებით 2,21 მილიონი შემთხვევა);
- მსხვილი ნაწლავი და სწორი ნაწლავის სიმსივნე (დაახლოებით 1,93 მილიონი შემთხვევა);
- კანის სიმსივნე (არამელანომა) (დაახლოებით 1,20 მილიონი შემთხვევა); და
- კუჭის სიმსივნე (დაახლოებით 1,09 მილიონი შემთხვევა).

ჯანდაცვის მსოფლიო ორგანიზაციის თანახმად 2020 წელს კიბოთი სიკვდილის ყველაზე გავრცელებული მიზეზები იყო:

- ფილტვების სიმსივნე (დაახლოებით 1,80 მილიონი შემთხვევა);
- მსხვილი ნაწლავისა და სწორი ნაწლავის სიმსივნე (დაახლოებით 916 000 შემთხვევა);
- ღვიძლის სიმსივნე (აახლოებით 830 000 შემთხვევა);
- კუჭის სიმსივნე (დაახლოებით 769 000 შემთხვევა);
- მკერდის სიმსივნე (დაახლოებით 685 000 შემთხვევა).

ყოველწლიურად დაახლოებით 400000 ბავშვს უვითარდება სიმსივნე. გავრცელების მაჩვენებელი განსხვავებულია ქვეყნებს შორის. სიმსივნური

დაავადების მიერ გამოწვეული ფატალური შემთხვევების 70% დაბალი და საშუალო შემოსავლის მქონე ქვეყნებზე მოდის [6,7]

სიმსივნის წარმოქმნა და განვითარება დამოკიდებულია უჯრედში არსებულ მრავალ ფაქტორზე (მუტაციები, ორგანიზმის იმუნური მდგომარეობა, ჰორმონები და სხვა), ასევე გარემოში არსებულ გარე ფაქტორებზე (მოწევა, ქიმიკატები, გამოსხივება, ინფექციური, ვირუსული დაავადებები, და სხვა). მოცემული ფაქტორების ზემოქმედებით ორგანიზმში წარმოქმნილი არანორმალური უჯრედული მასა იზრდება და ზემოქმედებს მათ გარშემო არსებულ ჯანმრთელ ქსოვილებზე, ზოგჯერ სიმსივნე ასევე ვრცელდება სხეულის სხვა ლოკაციებზე (მეტასტაზები) და იწვევს ფატალურ შედეგს [8].

1.2. სიმსივნის სახეები

სიმსივნე შეიძლება იყოს კეთილთვისებიანი და ავთვისებიანი, განსხვავებას მათ შორის წარმოადგენს ის ფაქტი, რომ ავთვისებიანი სიმსივნე განიცდის ინვაზიას მიმდებარე ქსოვილებში მეტასტაზირების ჰემატოგენური და ლიმფოგენური გზით და იძლევა რეციდივს, ხოლო კეთილთვისებიანის შემთხვევაში არ აღინიშნება აღნიშნული მოვლენები. იგი არ ვრცელდება სხეულის დანარჩენ ნაწილებზე, იზრდება ნელა და რეციდივის რისკი დაბალია[9].

სიმსივნე შეიძლება გავრცელებული იყოს სხეულის ნებისმიერ ნაწილში და ჰქონდეს მრავალი განსხვავებული ფორმა. მისი სახელწოდება მომდინარეობს უჯრედის ტიპის და ადგილის მიხედვით, საიდანაც ისინი წარმოიქმნება. განარჩევენ სიმსივნის შემდეგ ტიპებს [10]:

- კარცინომა, ის წარმოიქმნება ეპითელური უჯრედებისგან. სხვადასხვა ტიპის ეპითელური უჯრედებისგან წარმოქმნილ კარცინომას სხვადასხვა სახელი აქვს. ადენოკარცინომა იმ ეპითელური უჯრედებისგან აღმოცენდება, რომლებიც სითხეებს ან ლორწოს გამოიმუშავებს. ისენი უმეტესად ჯირკვლოვანი ქსოვილების შემადგენელი უჯრედებია. ძუძუს, მსხვილი ნაწლავის, პროსტატის ავთვისებიანი სიმსივნეების უმეტესობა ადენოკარცინომაა. ბრტყელუჯრედ-

ოვანი კარცინომა ბრტყელი ეპითელური უჯრედებისგან ვითარდება. ასეთი უჯრედები არის კანში, კუჭში, ნაწლავებში, ფილტვებში, შარდის ბუშტსა და თირკმელებში.

- სარკომა, აღნიშნავს ძვლის, კუნთების, ცხიმებისა და შემაერთებული ქსოვილის კიბოს. ოსტეოსარკომა ძვლის ყველაზე გავრცელებული სიმსივნეა. რბილი ქსოვილების სარკომის ყველაზე გავრცელებული ტიპებია ლეიომიოსარკომა, კაპოშის სარკომა, ავთვისებიანი ბოჭკოვანი ჰისტოციტომა, ლიპოსარკომა და ამობურცული დერმატოფიბროსარკომა.
- ლეიკემია, წარმოსდგენს სისხლის თეთრი უჯრედების სიმსივნეს.
- ლიმფომა, წარმოადგენს ლიმფური სისტემის ავთვისებიან სიმსივნეს (წარმოიქმნება ძვლის ტვინიდან (BM)). ლიმფომა ლიმფოციტებიდან აღმოცენდება. არსებობს ლიმფომის ორი ძირითადი ტიპი: ჰოჯკინის ლიმფომა – ამ დროს B უჯრედებისგან წარმოიქმნება პათოლოგიური ლიმფოციტები, რომლებსაც რიდ-შტერნბერგის უჯრედებს უწოდებენ. სიმსივნე შეიძლება წარმოიქმნას როგორც B, ისე T უჯრედებისგან [11].

1.2.1. ერლიხის ასციტური კარცინომა

ექსპერიმენტულ სიმსივნეებს დიდი მნიშვნელობა აქვს სიმსივნის მოდელირებისა და მისი ბიოლოგიის შესასწავლად. ცხოველთა ან in vitro მოდელებში ექსპერიმენტული სიმსივნეების შექმნით, მეცნიერებს შეუძლიათ მიიღონ ინფორმაცია იმის შესახებ, თუ როგორ ვითარდება სიმსივნეები, როგორ ურთიერთქმედებენ ისინი იმუნურ სისტემასთან და როგორ რეაგირებენ ისინი სხვადასხვა მკურნალობაზე [12-14].

ექსპერიმენტულ სიმსივნეებერთ-ერთი მთავარი უპირატესობა ის არის, რომ მკვლევარებს საშუალებას აძლევს შეისწავლონ კონტროლირებად გარემოში. ისეთი ცვლადების კონტროლით, როგორცაა გამოყენებული კიბოს უჯრედების ტიპი, გარემო, რომელშიც ისინი იზრდებიან და მკურნალობა, რომლებსაც ისინი ექვემდებარებიან [15,16].

დღესდღეობით არსებობს სიმსივნის სხვადასხვა სამოდელო სისტემები, ერთ-ერთ გავრცელებულ მოდელს წარმოადგენს ერლიხ ასციტური კარცინომა (EAC). აღნიშნული კლასიფიცირდება, როგორც არადიფერენცირებული კარცინომა, რაც ნიშნავს, რომ სიმსივნურ უჯრედებს არ აქვთ სპეციალიზებული მახასიათებლები, რომლებიც განასხვავებენ მათ ნორმალური უჯრედებისგან. EAC არის ჰიპერდიპლოიდური, მას ჩვეულებრივზე მეტი ქრომოსომა აქვს. მისი გადანერგვა შესაძლებელია ერთი მასპინძლიდან მეორეზე. EAC ეწოდა გერმანელი იმუნოლოგისა და პათოლოგის პაულ ერლიხის სახელი, რომელმაც აღმოაჩინა იგი 1900-იანი წლების დასაწყისში [17].

EAC შეიძლება გაიზარდოს ორი ფორმით: როგორც უჯრედის სუსპენზია ასციტურ სითხეში (სითხე, რომელიც გროვდება მუცლის ღრუში) ან როგორც მყარი სიმსივნე. კარცინომის in vivo მოდელის - თავგების პერიტონეალურ ღრუში ინოკულაციის შემდეგ, EAC უჯრედები იზრდება ორ ფაზაში. ეს ორი ფაზაა: პროლიფერაციის ფაზა, რომელშიც უჯრედების რაოდენობა ექსპონენტურად იზრდება და მეორე ფაზა, რომელშიც უჯრედების რაოდენობა თითქმის მუდმივი რჩება. გადანერგვიდან 4-6 დღეში ვითარდება კარცინომა [18].

EAC ჩვეულებრივ გამოიყენება სიმსივნის მოდელირებისთვის მისი სწრაფი გავრცელების, მაღალი ტრანსპლანტურობის გამო. მკვლევარებს შეუძლიათ გამოიყენონ EAC სიმსივნის განვითარების შესასწავლად და ახალი მკურნალობის მეთოდის შესამოწმებლად [19].

1.3. სიმსივნის მკურნალობის მეთოდები და მკურნალობასთან დაკავშირებული პრობლემები

თანამედროვე მედიცინაში სიმსივნის სამკურნალოდ ზოგადად გამოიყენება სხვადასხვა მეთოდები, როგორცაა ქიმიოთერაპია, რადიოთერაპია, ქირურგია, იმუნოთერაპია, ჰორმონებზე დაფუძნებული თერაპია და სხვა. თუმცა მათ შორის ყველაზე გავრცელებულ მეთოდებს წარმოადგენს ქიმიოთერაპია, რადიოთერაპია და ქირურგია [20].

1.3.1. ქიმიოთერაპია

ქიმიოთერაპია არის სიმსივნის მკურნალობის ტიპი, რომელსაც დროსაც დასწავლული უჯრედების გასანადგურებლად გამოიყენება მედიკამენტები. მოცემული მეთოდი გამოიყენება მრავალი სახის სიმსივნის სამკურნალოდ. მას ასევე იყენებენ ქირურგიული ან რადიოთერაპიით მკურნალობის შემდგომ [21]. ქიმიოთერაპია არა მხოლოდ კლავს სწრაფად მზარდ კიბოს უჯრედებს, არამედ კლავს ან ანელებს ჯანსაღი უჯრედების ზრდას, ასევე შესაძლოა გამოიწვიოს სხვადასხვა გვერდითი ეფექტები, როგორცაა თმისცვენა, სისუსტე, იმუნური სისტემის დაქვეითება და სხვა. მოცემული მდგომარეობა შესაძლოა დამოკიდებული იყოს მედიკამენტის ტოქსიკურობაზე, კონცენტრაციაზე და სხვა ფაქტორებზე [22].

1.3.2. რადიოთერაპია

რადიაციული თერაპია (ასევე უწოდებენ რადიოთერაპიას) არის სიმსივნის მკურნალობის ერთ-ერთი გავრცელებული მეთოდი, რომელსაც დროსაც ხდება რადიაციის მაღალ დოზების გამოყენება კიბოს უჯრედების მოსაკლავად. მაღალი დოზით სხივური თერაპია კლავს სიმსივნის უჯრედებს ან ანელებს მათ ზრდას მათი დნმ-ის დაზიანებით. სიმსივნური უჯრედები, რომელთა დნმ დაზიანებულია წყვეტს გაყოფას ან კვდება. როდესაც დაზიანებული უჯრედები იღუპებიან, ისინი ნადგურდება ორგანიზმის მიერ. რადიაციული თერაპიით მკურნალობას შესაძლოა დასჭირდეს გარკვეული დრო. დღეები ან კვირა, მკურნალობა გრძელდება მანამ, სანამ დნმ იმდენად დაზიანდება, რომ კიბოს უჯრედები იწყებენ დაღუპვას [23].

რადიაცია არა მხოლოდ კლავს ან ანელებს კიბოს უჯრედების ზრდას, არამედ შეიძლება გავლენა იქონიოს ახლომდებარე ჯანმრთელ უჯრედებზეც. ჯანსაღი უჯრედების დაზიანებამ შეიძლება გამოიწვიოს გვერდითი მოვლენები [24].

1.3.3. ქირურგიული მკურნალობა

სიმსივნის მრავალი სახეობაის მკურნალობა ხდება ქირურგიით. ქირურგიული ჩარევით შორდება მხოლოდ მყარი სახის სიმსივნეები, რომლებიც მოთავსებულია გარკვეულ უბანში. მოცემული მკურნალობის ხერხი არ გამოიყენება ზოგიერთი ტიპის სიმსივნისთვის, მაგ: ლეიკემია (სისხლის კიბოს ტიპი) ან მეტასტაზირებული სიმსივნისთვის. მოცემულ მეთოდსაც გააჩნია უარყოფითი მხარეები, როგორცაა ტკივილი ოპერაციის შემდგომ, სისხლდენა, მიმდებარე ქსოვილების დაზიანება, ან ანთებითი პროცესების განვითარება [25,26].

ზემოთაღნიშნულიდან გამომდინარე დღესდრეობით მიმდინარეობს ისეთი მედიკამენტებისა თუ მეთოდის ძიება, რომელიც ნაკლებ საზიანო იქნება ადამიანის ჯანმრთელობისთვის, სწორედ ამიტომ ბუნებრივი წყაროების გამოყენებას ნაკლები ტოქსიკურობითა და უკეთესი ეფექტით დიდი მნიშვნელობა აქვს სიმსივნის ზრდის კონტროლისა და განადგურებისთვის. სიმსივნის მკურნალობისთვის ბუნებრივ წყაროდ შესაძლოა გამოყენებულ იქნენ ფერმენტები, ფერმენტების ინჰიბიტორები, და სხვადასხვა მიკროორგანიზმებიდან მირებული ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთები, რომელთა საშუალებითაც შესაძლებელი იქნება სხვადასხვა გზებით სიმსივნესთან ბრძოლა [27-31].

1.4. პროტეოლიტიკური ფერმენტების გავლენა სიმსივნეზე

ერთ-ერთი ყველაზე მნიშვნელოვანი ბიოლოგიური კატალიზური რეაქცია პროტეოლიზია, რომელიც მიმდინარეობს პროტეოლიტიკური ფერმენტების მეშვეობით. პროტეოლიზი წარმოადგენს ცილის პეპტიდური ბმის ჰიდროლიზს პეპტიდებისა და ამინომჟავების მიღებით. პროტეაზას აქტიური საიტის ამინომჟავური თანმიმდევრობის ბუნებიდან და ასევე პეპტიდური ბმის გაწყვეტის მექანიზმიდან გამომდინარე განასხვავებენ პროტეაზების შემდეგ ჯგუფებს: ცისტეინ, თრეონინ, გლუტამინ, ასპარტატ და მეტალოპროტეაზებს [32-34].

პროტეოლიზური ფერმენტები ჯანმრთელ უჯრედებში მნიშვნელოვანი კომპონენტია სასიცოცხლოდ აუცილებელი ბიოლოგიური პროცესების შესრულებისთვის. მათ შეუძლიათ მრავალი სხვადასხვა უჯრედული პროცესის რეგულირება, როგორცაა გენის ექსპრესია, გამრავლება და უჯრედების სიკვდილი [35]. თუმცა, პროტეაზები ასევე მონაწილეობენ სიმსივნის ზრდასა და პროგრესირებაში, როგორც პირველადი, ასევე მეტასტაზური განვითარების დროს [32].

აღმოჩენილია, რომ ზოგიერთი სახის სიმსივნეებში, მათი განვითარების ადრეულ სტადიაზე დაფიქსირებულია პროტეაზების მომატებული დონე, რომლებიც თავისმხრივ მონაწილეობენ კობოს გავრცელებაში, ინვაზიაში, ანგიოგენეზში, მეტასტაზირებაში, აპოპტოზში და სხვა [36,37]. შესაბამისად, პროტეაზების მოქმედების მრავალფეროვნებიდან გამომდინარე თითოეული პროტეოლოტური ფერმენტი სხვადასხვაგვარად მოქმედებენ სიმსივნის განვითარებასა თუ დათრგუნვაში.

1.4.1. ცისტეინ პროტეაზები

ცისტეინ პროტეაზები (კალპაინები) ლოკალიზებულია ციტოზოლში ან ლიზოსომებში (კათეფსინები B, L, H და S) და პათოლოგიურ პირობებში გამოიყოფა უჯრედების ზოგიერთ ტიპში. პროტეაზას ეს კლასი შუამავლობს ზოგად ფუნქციებს, როგორცაა უჯრედშიდა ცილის კატაბოლიზმი და უჯრედგარე ცილის დეგრადაციის შერჩევითი გააქტიურება, მაკროფაგების გააქტიურების ფუნქციას, ძვლის რეზორბციას [38].

კათეფსინ-ცისტეინის პროტეაზების ოჯახს შეუძლია დამალოს როგორც უჯრედშიდა, ისე უჯრედგარე მატრიქსის ცილები. აღმოჩენილია, რომ კათეფსინები ფუნქციონირებენ როგორც უჯრედგარე, ასევე უჯრედშიდა გარემოში. ვარაუდობენ, რომ კათეფსინები გახდება სიმსივნის საწინააღმდეგო თერაპიის პოტენციური სამიზნეები. კათეფსინების უჯრედგარე აქტივობა ხელს უწყობს სიმსივნის უჯრედების პროგრესირებას ახლომდებარე ქსოვილებში,

სისხლსა და ლიმფურ სისხლძარღვებში და მეტასტაზების განვითარებას ქსოვილებში [39-43].

კათეფსინ B მონაწილეობს ბაზალური მემბრანისა და შემაერთებელი ქსოვილის რემოდელირებასა და დაშლაში სიმსივნის ზრდის, ინვაზიის და მეტასტაზების პროცესებში, რამაც შეიძლება გამოიწვიოს პროდონოსომის საშუალებით გამოწვეული უჯრედგარე მარტიქსის დეგრადაცია და ინვაზია სეკრეტირებული ლიზოსომების მეშვეობით. კათეფსინები ასევე განიხილება მარკერებად ისეთი პაციენტების იდენტიფიცირებისთვის, რომლებსაც აწუხებთ კოლორექტალური კიბო, ძუძუს კიბო, პანკრეასის კიბო და ენის კარცინომა. სხვა ლიზოსომური პროტეაზების გაზრდილი დონეები, როგორცაა კათეფსინები D, H, ან L, ასევე დაფიქსირდა კიბოს ზოგიერთ სახეობაში. ნაჩვენებია, რომ კათეფსინი L2 (CTSL2) გააქტიურებულია სხვადასხვა ავთვისებიან ნეოპლაზმებში, როგორცაა ფილტვის, სარძევე ჯირკვლის, კუჭის, მსხვილი ნაწლავის, თავისა და კისრის კარცინომა, გლიომები, მელანომა და ენდომეტრიუმის სიმსივნე [44-52].

1.4.2. სერინ პროტეაზები

სერინ პროტეაზების აქტივობის ნორმალურ რეგულირებას გადამწყვეტი მნიშვნელობა აქვს უჯრედებისა და ქსოვილების ფიზიოლოგიური აქტივობისთვის, მაგრამ ამ პროტეაზების აქტივობის არანორმალურმა რეგულაციამ შეიძლება გამოიწვიოს პათოლოგიური პირობები, როგორცაა სიმსივნე. ერთ-ერთი კარგად დახასიათებული სერინის პროტეაზა არის ტრიპსინი. ეს პროტეაზები გადამწყვეტ როლს თამაშობენ პათოლოგიური პროცესების ფართო სპექტრში, როგორცაა ანთება, ათეროსკლეროზი და კიბო [53].

1.4.3. ასპარტატ პროტეაზები

კათეფსინ-D (Cath-D) არის ასპარტატული ენდოპროტეაზა, რომელიც გვხვდება ლიზოსომებში. Cath-D ასრულებს ორ მთავარ ფუნქციას: ის

აქტიურებს ბიოლოგიურად აქტიური ცილების წინამორბედს სპეციალიზებული უჯრედების პრელიზოსომურ განყოფილებებში და მოქმედებს როგორც ლიზოსომებსა და ფაგოსომებში ცილის გამანადგურებელი მთავარი ფერმენტი. ასპარტული პროტეაზა Cath-D ჭარბი რაოდენობით გამოხატულია და გამოიყოფა ადამიანის სარძევე ჯირკვლის ეპითელური კიბოს უჯრედების მიერ, შესაბამისად, ეს მოვლენა წარმოადგენს მარკერს ძუძუს კიბოს დროს. გარდა ამისა Cath-D ასტიმულირებს ფიბრობლასტების ზრდას, სიმსივნური უჯრედების პროლიფერაციას, ანგიოგენეზს და მეტასტაზებს [54-63].

1.4.4. თრეონინ პროტეაზები

თრეონინ პროტეაზები ან პროტეაზომები მონაწილეობენ უჯრედული ცილების მოცილებაში, რომლებიც განიცდიან დეგრადაციას რთული მოდიფიკაციის შედეგად, რომელიც ცნობილია როგორც პოლიუბიქვიტინირება; (უბიკვიტინის მოლეკულების დამატების პროცედურა სხვა ცილაში, რომელიც განკუთვნილია დეგრადაციისთვის). მოცემული კლასის ფერმენტები დაკავშირებულია ზოგიერთი ავთვისებიანი სიმსივნეების პათოფიზიოლოგიასთან, როგორცაა სიმსივნე [64,65].

1.4.5. მატრიქსული მეტალოპროტეაზები

მატრიქსული მეტალოპროტეაზები (MMPs) მიეკუთვნება Zn^{2+} დამოკიდებულ ენდოპეპტიდაზას კლასს. მათი ექსპრესიის გაზრდილი დონე დაფიქსირდა სიმსივნის მრავალ ტიპში. MMP-ები პასუხისმგებელი არიან უჯრედგარე მატრიქსული ცილების რემოდელირებასა და ექსპრესიის გაზრდაზე, რომელიც დაკავშირებულია კიბოს პათოფიზიოლოგიასთან [66,67].

1.5. ანტისიმსივნური ეფექტის მქონე პროტეაზები

მიუხედავად იმისა, რომ პროტეაზები მნიშვნელოვან ნაწილს ასრულებენ სიმსივნის ზრდა/განვითარებაში, არსებობენ უჯრედგარე და უჯრედშიდა

პროტეაზების გარკვეული სახეობები რომლებიც პირიქით, მონაწილეობენ სიმსივნის დათრგუნვაში [68].

უჯრედშიდა პროტეაზა, აუტოფაგინ 3 (ცნობილი, როგორც Atg4c) წარმოადგენენ ცისტეინ პროტეაზების წარმომადგენლებს, მათი საშუალებით ხორციელდება აუტოფაგიის რეგულირება [69].

თავის მხრივ აუტოფაგია არის ძირითადი კატაბოლური პროცესი, რომელიც ინარჩუნებს უჯრედულ მეტაბოლიზმს დაზიანებული ორგანელებისა და სხვა დისფუნქციური ცილების დეგრადაციის გზით, ლიზოსომების მეშვეობით. ცნობილია, რომ ამ პროცესის დისრეგულაცია დაკავშირებულია ისეთი პათოფიზიოლოგიური დაავადებების პროგრესირებასთან, როგორცაა სიმსივნე [70].

აუტოფაგინ 3-ის საშუალებით შესაძლებელია სიმსივნის ზრდის შეჩერება, აუტოფაგინ 3-ის გარდა ასევე დაფიქსირებულია ანტისიმსივნური ეფექტი სხვა უჯრედშიდა პროტეაზებშიც, როგორებიცაა კასპაზები (CASP3, CASP5, CASP6, CASP7, CASP8, CASP10). აღნიშნული ფერმენტების საშუალებით სიმსივნის წინააღმდეგ ბრძოლა მიმდინარეობს აპოპტოზის ინდუცირებით [71-76].

რაც შეეხება უჯრედგარე პროტეაზებს, მატრიქსული მეტელოპროტეაზების ჯგუფიდან ანტისიმსივნური ეფექტი გააჩნიათ გარკვეულ ფერმენტებს: MMP3, MMP8, MMP9, MMP12, MMP19, და MMP26. MMP8 (ცნობილია, როგორც კოლაგენაზა 2) ძირითადად წარმოიქმნება ნეიტროფილების მიერ და ასოცირდება ანთებით პროცესებთან. მოცემული ფერმენტზე კანცეროგენებით ზემოქმედება იწვევს ანთებითი პასუხის დარღვევას, რაც ქმნის ხელსაყრელ გარემოს სიმსივნის განვითარებისთვის, ხოლო მისი გადაჭარბებული რაოდენობით შესაძლებელი გახდა მეტასტაზური უჯრედების შემცირება [77-79].

MMP26 (ცნობილია, როგორც მატრილიზინ 2) ამ პროტეაზას ანტისიმსივნური თვისებები შეიძლება განპირობებული იყოს მისი უნარით დაარეგულიროს ესტროგენის რეცეპტორის β ექსპრესიის დონე მისი დაშლით, ამგვარი ზემოქმედებით შეუძლია გაკონტროლდეს ესტროგენის სასიგნალო გზა ჰორმონდამოკიდებულ ავთვისებიან სიმსივნეებში [80].

სასიგნალო და ანთებითი პროცესების რეგულირების გარდა მოცემული კლასის სხვა ფერმენტებს გააჩნიათ ანტისიმსივნური მოქმედების განსხვავებული მექანიზმები. MMP12 (მაკროფაგ მეტალოელასტაზები), MMP9 (ჟელატინაზა B), MMP19 მოქმედებენ ანგიოგენეზის ინჰიბირებით. MMP3 კი აპოპტოზის სტიმულაციით [81-87].

1.6. პროტეოლიზური ფერმენტების აქტივობის განსაზღვრის მეთოდები და მათთან დაკავშირებული პრობლემები

პროტეოლიზური ფერმენტების მოქმედები მექანიზმის მნიშვნელობიდან გამომდინარე მათი აქტივობის განსაზღვრას დიდი მნიშვნელობა ენიჭება როგორც ინდუსტრიულ, ფარმაცევტულ თუ ჯანმრთელობასთან დაკავშირებული მიმართულებით [88].

დრესდლეობით არსებობს პროტეოლიზური ფერმენტების აქტივობის განსაზღვრის სხვადასხვა მეთოდი: ფლუორესცენტული, მას სპექტრომეტრული, იმუნოფერმენტული, ნანონაწილაკებზე, თხევად კრისტალებზე (LCs) დაფუძნებული ანალიზი და სხა. მოცემული ტიპის მეთოდების გამოყენება უმეტეს შემთხვევაში დაკავშირებულია დიდ თანხებთან და ძვირადღირებულ აპარატურასთან [89-92].

დრესდლეობით პროტეოლიზური აქტივობის განსაზღვრისთვის ხელმისაწვდომობის გამო ყველაზე ფართოდ გამოიყენება კოლორიმეტრიული მეთოდი, სადაც სუბსტრატად ძირითადად გამოიყენება კაზეინი. მოცემული სუბსტრატისთვის დამახასიათებელია როგორც ხსნადი ასევე უხსნადი კონგლომერატების არსებობა. უნდა ითქვას, რომ პროტეაზების უმეტესი ნაწილი მოქმედებს, როგორც ხსნად, ასევე უხსნად ფრაგმენტებზე. უხსნადი ნაწილი პროტეაზების ზემოქმედების შედეგად გარდაიქმნება ხსნად ფრაგმენტებად. აღნიშნულ მეთოდში რეაქციის შესაჩერებლად გამოიყენება სამქლორ ძმარმჟავა, რომელსის საშუალებითაც შესაძლებელია ფერმენტული ზემოქმედების შედეგად მიღებული ხსნადი ნაწილის დალექვა. აღნიშნულ მეთოდში სამქლორძმარმჟავა ემატება, რათა გამოლექილ იქნას კაზეინის ხსნადი ნაწილი, რადგან იგი არ ჩაითვალოს ფერმენტის მიერ მიღებულ პროდუქტად,

მაგრამ მოცემული ტიპის ნივთიერების დამატება იწვევს ცრუ უარყოფით პასუხს ან ამცირებს ფერმენტული რეაქციის შედეგად მიღებულ რეალური აქტივობის მაჩვენებელს [93].

1.7. პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორების როლი სიმსივნის მკურნალობაში

როგორც ცნობილია პროტეაზების გარკვეული სახეობა მონაწილეობენ სიმსივნის ზრდასა და პროგრესირებაში, თუმცა მოცემული ტიპის ფერმენტების ინჰიბიტორები შეიძლება ჩაითვალოს ძლიერ სტრატეგიულ ბრძოლის მეთოდად ანტისიმსივნურ თერაპიაში [94].

დღესდღეობით შესწავლილი ინჰიბიტორების უმეტესობა ცილები, პეპტიდები, პოლისაქარიდები, პოლიფენოლები, გლიცეროლიპიდები, ტრიტერპენები და სხვა დაბალი მოლეკულური არაცილოვანი ნაერთებია. თუმცა დიდ ყურადღებას იპყრობს მიკროსკოპული სოკოებიდან გამოყოფილი პროტეოლიტური ფერმენტების ინჰიბიტორები [95-97].

დღესდღეობით აღმოჩენილია სერინის, ცისტეინის და რამდენიმე ასპარტული პროტეაზას ინჰიბიტორი, რომელთა საშუალებითაც წარმატებით მიმდინარეობს სიმსივნესთან ბრძოლა [98].

სერინ პეპტიდაზას ინჰიბიტორები, აღმოჩენილია ასკომიცეტებისა და ბაზიდიომიცეტების სხვადასხვა წარმომადგენლებში. ცისტეინ პეპტიდაზას ინჰიბიტორები (კლიტოციპინები და მაკროციპინები), ნაპოვნია ბაზიდიომიცეტებში. ასპარტული პროტეაზების ინჰიბიტორები აღმოჩნდა საფუარა სოკოებში. სერინი და ცისტეინ პროტეაზების დაბალმოლეკულური ინჰიბიტორები, ასევე აღმოჩენილია აქტინომიცეტებსა და სტრეპტომიცეტებში [99-104].

1.8. მიკროსკოპული სოკოები

მიკროსკოპული სოკოები წარმოადგენენ ეუკარიოტულ ორგანიზმებს, რომელთათვის დამახასიათებელია სპორის წარმოქმნა. მათი გავრცელების

არეალი ფართოა, მაგრამ ყველაზე ხშირად გვხვდება ნიადაგში. არკისა და კრეიზელის კლასიფიკაციაზე დაყრდნობით იდენტიფიცირებული მიკროსკოპული სოკოები ძირითადად ეკუთვნიან - Zygomycetes, Ascomycetes, Deiteromycetes კლასებს [105,106].

ზიგომიცეტები (Zygomycetes) არიან ძირითადად ხმელეთის სოკოების მცირე, ეკოლოგიურად ჰეტეროგენული, პარაფილეტური ან პოლიფილეტური ჯგუფი, ძირითადად იზრდებიან ნიადაგში და მკვდარ მცენარეულ მასალებში. ზოგი მცენარეების, მწერების და პატარა ცხოველების პარაზიტებია, ზოგი კი მცენარეებთან სიმბიოზურ ურთიერთობებს აყალიბებს. ცნობილია ზიგომიცეტების დაახლოებით 1060 სახეობა, ეს კლასი მოიცავს სამ ქვეკლასს (Mucorales, Mortierellales და Entomophthorales), რომლებიც თავის მხრივ შეიცავენ უამრავ სპეციფიკურ სოკოს (Absidia, Apophysomyces, Cokeromyces, Cunninghamella, Mucor, Rhizomucor, Rhizopus, Saksenaea, Syncephalastrum.) [107-109].

ასკომიცეტები (Ascomycetes)-განეკუთვნიან სოკოების სამეფო გვარს, მისი წარმომადგენლები საყოველთაოდ ცნობილია, როგორც ტომრის სოკოები ან ასკომიცეტები. ისინი წარმოადგენენ სოკოების ყველაზე დიდი გვარს, 64000-ზე მეტი სახეობით. ამ სოკოვანი ჯგუფის განმსაზღვრელი მახასიათებელია "ასკუსი" (ძველი ბერძნული ἄσκος (askós) 'ტომარა, ღვინის ტყავი'). ასკომიცეტები მორფოლოგიურად მრავალფეროვანია. ჯგუფში შედის ორგანიზმები ერთუჯრედიანი საფუვრებიდან დაწყებული კომპლექსური ქუდიანი სოკოებით დასრულებული [110, 111].

იდენტიფიცირებულია 2000 გვარი და 30000 სახეობა. ამ მრავალფეროვან ჯგუფებს შორის გამაერთიანებელი მახასიათებელია რეპროდუქციული სტრუქტურის არსებობა, რომელიც ცნობილია როგორც ასკუსი, თუმცა ზოგიერთ შემთხვევაში მას აქვს შემცირებული როლი სასიცოცხლო ციკლში. ბევრ ასკომიცეტს აქვს კომერციული მნიშვნელობა. ზოგი სასარგებლო როლს ასრულებს, მაგალითად, საფუარი, რომელიც გამოიყენება საცხობი, ხარშვისა და ღვინის დუღილის დროს, ასევე ტრიუფელი და მორელი, რომლებიც გურმანულ დელიკატესებად ითვლებიან. ბევრი მათგანი იწვევს ხეების დაავადებებს,

როგორცაა ჰოლანდიური თელა და ვაშლის ჭინჭრის ციება. საფუერები გამოიყენება ალკოჰოლური სასმელების და პურის დასამზადებლად [112-114].

დეიტერომიცეტები (Deiteromycetes) - ამ ჯგუფში შედის სოკოები, რომლებიც ავლენენ გამრავლების მხოლოდ ასექსუალურ ფორმას. ამიტომ მათ არასრულ სოკოებს უწოდებენ. ისინი მრავლდებიან ასექსუალური სპორებით, რომლებსაც კონიდიები ეწოდება. მათი მიცელიუმი განშტოებულია. ისინი ან საპროფიტები არიან ან პარაზიტები. დეიტერომიცეტებს დიდი ეკონომიკური მნიშვნელობა აქვთ. ისინი მოქმედებენ როგორც ორგანული ნივთიერებების დამშლელი და მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ მინერალების გადამუშავებაში. ისინი ასევე ცნობილია როგორც "მეორე კლასის" სოკოები. დეიტერომიცეტები პასუხისმგებელი არიან მცენარეთა სხვადასხვა დაავადებებზე და იწვევენ საკვების დეგრადაციას [115, 116].

დეიტერომიცეტების წარმომადგენლები არიან: *Cercospora*: ამ გვარის სახეობების უმრავლესობა იწვევს მცენარეთა დაავადებებსა და ფოთლებზე ლაქებს. *Colletotrichum*: ეს სოკოები ცხოვრობენ როგორც ენდოფიტები ან ფიტოპათოგენები მცენარეებზე. ზოგიერთს შეიძლება ჰქონდეს ორმხრივი ურთიერთობა მასპინძლებთან. *Trichoderma*: ეს არის ყველაზე გავრცელებული კულტივირებადი სოკო და გვხვდება ყველა სახის ნიადაგში. ამ გვარის სახეობების უმეტესობა მცენარეების სიმბიონტებია. *Tolyocladium inflatum*: მათგან მიიღება იმუნოსუპრესანტი ციკლოსპორინი. *Lecanicillium* სახეობები: ისინი წარმოქმნიან კონიდიებს, რომლებიც აკონტროლებენ მწერების მავნებლების გარკვეულ სახეობებს. პოქონიას სახეობები: ისინი დამუშავების პროცესშია ნემატოდების მავნებლების კონტროლისთვის და სხვა [117-120]

1.8.1. ასპერგილუს ნიგერი

Aspergillus niger წარმოადგენს ასპერგილუსის ყველაზე გავრცელებული სახეობას. მისი სახელწოდება წარმოიშვა ლათინური სახელიდან *aspergillum*, რაც ნიშნავს წმინდა წყლის გამფრქვევს, რადგან მას მიკროსკოპის ქვეშ დანახვისას მსგავსი გარეგნობა აქვს. საყოველთაოდ ცნობილია, რომ *Aspergillus niger* იწვევს

შავ ობს ხილსა და ბოსტნეულში, როგორცაა ყურძენი, გარგარი, ხახვი და არაქისი. ასევე ცნობილია, რომ ის იწვევს საკვების დაბინძურებას ან საკვების გაფუჭებას. მას ასევე უფრო მეტად აქვს გამოხატული მსუბუქ პნევმონიასთან დაკავშირებული ოპორტუნისტული მახასიათებლები იმუნოდეფიციტის მქონე პირებში, ვიდრე ასპერგილუსის სხვა სახეობებს, როგორცაა *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* და *Aspergillus clavatus*. ის თითქმის ყველგან გვხვდება, მათ შორის ნიადაგში და შენობებში. *Aspergillus niger* საუკუნეების განმავლობაში გამოიყენებოდა ლიმონმჟავას წარმოებაში, რომელიც წარმოადგენს საკვების საერთო კონსერვანტს დაკონსერვებულ ხილში, შამპუნებსა და სისხლში. *Aspergillus niger*-ის ზოგიერთი შტამი წარმოქმნის მიკოტოქსინებს [121-125].

Aspergillus niger არის ასკომიცეტების წარმომადგენელი, გამომდინარე იმისა რომ შესწავლილია მისი მორფოლოგია, ფიზიოლოგია, სასრაგებლო თვისებები, დადასტურებულია მისი ნაკლებად პათოგენურობა როგორც ადამიანებისთვის, ასევე ცხოველებისთვის. 1917 წელს კვების პროდუქტების ქიმიკოსმა ჯეიმს კურიმ აღმოაჩინა, რომ *Aspergillus niger* წარმოქმნის ლიმონმჟავას შაქრის მაღალ კონცენტრაციის გარემოში, საიდანაც მან მოიპოვა მჟავა და ფართოდ შეისწავლა მისი სარგებლიანობა, როგორც საკვები კონსერვანტის. სხვა კვლევებმა ასევე აჩვენა, რომ მისი გამოყენება შესაძლებელია გლუკოამილაზას, α -გალაქტოზიდაზას და მრავალი სხვა ინდუსტრიულად მნიშვნელოვანი ფერმენტის წარმოებაში [123-127].

ეს სახეობა ასევე შეიძლება გამოყენებულ იქნას ბიოაქტიური მეტაბოლიტების, ისევე როგორც სხვა ფარმაცევტული პროდუქტების წარმოებისთვის. *Aspergillus niger* შეიძლება ადაპტირებული იყოს დიდი რაოდენობით ფრუქტოოლიგოსაქარიდების წარმოებისთვის, მის ზედაპირზე არსებული ფერმენტების შესამჩნევად მაღალი ტრანსფრუქტოზილატორული აქტივობის გამო. *Aspergillus niger*-ს აქვს ძლიერი ბიოაბსორბციის უნარი და მისი კოლონიები გამოიყენება გარკვეული საღებავების შთანთქმის უნარის გასაზრდელად, როგორცაა წითელი კონგო და ლურჯი საღებავი.

Aspergillus niger არის ძაფისებრი სოკო, რომელიც წარმოქმნის ძაფიან ჰიფებს, *Aspergillus niger*-ის მაკროსკოპული დაკვირვება ცხადყოფს, რომ მათი

ნაზრდი თავდაპირველად თეთრია, მაგრამ რამდენიმე დღის შემდეგ ისინი იცვლებიან შავში და წარმოქმნიან კონიდიურ სპორებს [128].

Aspergillus niger მრავლდება უსქესო გზით კონიდიური სპორების წარმოქმნით. სიცოცხლის ციკლი იწყება კონიდიების დისპერსიით ხელსაყრელი პირობებში (25-40°C). შემდეგ კონიდიები აღმოცენდება და ქმნის ვეგეტატიურ უჯრედს, უჯრედები გადაიქცევა ჰიფალურ მიცელიუმად, რომელიც განშტოებულია ორმხრივად და ქმნის საჰაერო ჰიფებს. საჰაერო ჰიფები შემდეგ იზრდებიან კონიდიოფორების წარმოქმნით, რომლებიც იშლება და ქმნის კონიდიოფორის ვეზიკულურ ნაწილს. ვეზიკულებიდან წარმოიქმნება პირველადი სტერიგმატა, რომელიც ცნობილია როგორც ფიალიდები. სტერიგმატები ქმნიან მეორად სტერიგმატებს, რომლებიც იწყებენ კონიდიალური სპორების წარმოქმნას. სპორები განლაგებულია სვეტებად (რამდენიმე მწკრივში) ფიალიდების თავზე [127, 128].

Aspergillus niger არის ძალიან თერმოტოლერანტული, ამიტომ მათ შეუძლიათ გაზრდა ექსტრემალურ ტემპერატურაზე, მათ შორის უკიდურესად დაბალ და უკიდურესად მაღალ პირობებში. ის იდეალურად ცხოვრობს გაფუჭებულ მცენარეებში, როგორცაა კომპოსტის გროვა და მკვდარი ფოთლები, მარცვლეულზე და სხვა. საერთაშორისო კოსმოსურ სადგურებზე ბოლოდროინდელმა კვლევამ აჩვენა, რომ *Aspergillus niger* ძალიან ადაპტირებულია კოსმოსურ გამოსხივებასთან, გარემოზე, რომელისთვისაც დამახასიათებელია UV გამოსხივება, რენტგენის სხივებზე და მზის ნათებაზე. ეს ასევე იმის მაჩვენებელია, თუ რამდენად ადაპტირებადია *Aspergillus niger* ექსტრემალური გარემო პირობებისადმი [129, 130].

1.8.2. პენიცილიუმი

Penicillium არის საპროფიტული (იკვება მკვდარი და გახრწნილი მასალებით) სოკოების გვარის წარმომადგენელი. ისინი საყოველთაოდ ცნობილია, როგორც ლურჯი ან მწვანე ობის სოკოები. ეკონომიკურად მნიშვნელოვანია ყველის, ორგანული მჟავების და ანტიბიოტიკების წარმოებისთვის. მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ ეკოსისტემაში. პენიცილიუმი გვხვდება სხვადასხვა ადგილას,

როგორცაა ნიადაგი, ჰაერი, გაფუჭებულ საკვებზე და ა.შ. პენიცილინი არის ერთ-ერთი ყველაზე მნიშვნელოვანი ანტიბიოტიკი, რომელიც მიღებულია *Penicillium* sp-დან [131, 132].

სახელი *Penicillium* მომდინარეობს *penicillus*-დან, რაც ნიშნავს „პატარა ფუნჯს“ და შემოიღო ლინკმა 1809 წელს (ლინკი, 1809). ეს სახელწოდება მომდინარეობს კონიდიების ჯაჭვების არსებობის გამო, რომლებიც ფუნჯის სახით ჩნდება მიცელიაზე. *Penicillium* შედის Ascomycota ან Ascomycetes შემადგენლობაში. ისინი კლასიფიცირდება სქესობრივი გამრავლების დროს ასკოსპორების წარმოქმნით. პენიცილიუმის ყველაზე გავრცელებული სახეობები არის: *Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium claviforme*, *Penicillium echinulatum*, *Penicillium glaucum*, *Penicillium roqueforti* [133-135].

პენიცილიუმის ვეგეტატიური სტრუქტურა არის მრავალუჯრედოვანი მიცელიუმი, მიცელიუმი შედგება განშტოებული, მრავალბირთვიანი და ძაფისებრი სტრუქტურისგან, რომელიც ცნობილია როგორც ჰიფები. უჯრედის კედელი შედგება გლუკოზის პოლისაქარიდისა და ქიტინისგან. კონიდიები წარმოიქმნება ბაზიპეტალური თანმიმდევრობით, ანუ ყველაზე ახალგაზრდა კონიდიუმი არის ძირში. კონიდიები წარმოიქმნება ჯგუფში არსებული სპეციალიზირებული უჯრედებიდან, რომელსაც ეწოდება ფიალიდი და სოკოს ფუნჯის მსგავს იერს აძლევს. ასკოსპორები გვხვდება ასკოკარპებში განლაგებულ ასკებში, რომლებიც ენდოგენურად წარმოქმნილი სქესობრივი სპორებია. ზოგიერთი მიცელია უფრო ღრმად იზრდება სუბსტრატში საკვების მისაღებად [135 -139].

პენიცილიუმის სახეობები ძალიან მნიშვნელოვანია ეკონომიკურად. ისინი აწარმოებენ ბევრ საკვებ პროდუქტს, ორგანულ მჟავებს, ანტიბიოტიკებს და მიკოტოქსინებს. ისინი გამოიყენება :

- ყველის წარმოებაში- პენიცილიუმის მრავალი სახეობა გამოიყენება სხვადასხვა სახის ყველის წარმოებაში, მაგ. ლურჯი ყველი(*P. camemberti*-ს იყენებენ Camembert და Brie ყველის წარმოებაში და *P. roqueforti*-ს - როკფორის ყველის მისაღებად).

- ფერმენტები და ორგანული მჟავების წარმოება - პენიცილიუმის მრავალი სახეობა გამოიყენება ორგანული მჟავების წარმოებაში, როგორცაა ლიმონმჟავა, გლუკონის მჟავა, ღვინის მჟავა და ფერმენტები, როგორცაა ამილაზები, პროტეაზები, ცელულაზა, ლიპაზა და პექტინაზა.
- ანტიბიოტიკის (პენიცილინის) წარმოება - 1929 წელს ალექსანდრე ფლემინგმა პენიცილიუმისგან გამოყო ანტიბიოტიკი პენიცილინი, რომელიც თრგუნავდა გრამდადებითი ბაქტერიების ზრდას. მოგვიანებით ფლორიმ და ჩეინმა გამოყვეს და გამოუშვეს პენიცილინის მეორე მსოფლიო ომის ჯარისკაცების სამკურნალოდ. პენიცილინს აწარმოებს *Penicillium chrysogenum* (ადრე ცნობილი როგორც *Penicillium notatum*). ბუნებრივი წარმოშობის პენიცილინები არის პენიცილინი G (ბენზილპენიცილინი), რომელიც ინიშნება ინტრამუსკულური ინექციით და პენიცილინი V (ფენოქსიმეთილპენიცილინი) პერორალურად სხვადასხვა ინფექციების სამკურნალოდ. პენიცილინი მოქმედებს ბაქტერიების უჯრედის კედლის ფორმირებაზე პასუხისმგებელი ფერმენტების ინჰიბირებით და ბაქტერიების დამცავი კედლის რღვევაზე პასუხისმგებელი ფერმენტების გააქტიურებით.
- პენიცილიუმის სახეობები ასევე გამოიყენება სოკოს საწინააღმდეგო პრეპარატებისა და სიმსივნის დამთრგუნველი ნაერთების წარმოებაში. პენიცილიუმის სახეობები ასევე გამოიყენება მიკორემედიაციაში, ანუ ბიორემედიაციის პროცესში სოკოების გამოყენებით გარემოს გასასუფთავებლად, ქსენობიოტური ნაერთების დაშლის უნარის გამო [140-146].

1.8.3. მუკორი

მუკორი არის ზიგომიცეტების წარმომადგენელი ძაფისებრი სოკო, რომელიც გვხვდება ნიადაგში, მცენარეებში, გახრწნილ ხილსა და ბოსტნეულში. გარდა იმისა, რომ იგი ბუნებაში გავრცელებულია და საერთო ლაბორატორიული დამაბინძურებელია, *Mucor* spp. შეიძლება გამოიწვიოს ინფექციები ადამიანებში, ბაყაყებში, ამფიბიებში, პირუტყვში და ღორებში. გვარი *Mucor* შეიცავს რამდენიმე სახეობას. ყველაზე გავრცელებულია *Mucor*

amphibiorum, *Mucor circinelloides*, *Mucor hiemalis*, *Mucor indicus*, *Mucor racemosus* და *Mucor ramosissimus*. მუკორის კოლონიები სწრაფად იზრდება 25-30°C ტემპერატურაზე და სწრაფად ფარავს აგარის ზედაპირს. წინა მხრიდან ფერი თავდაპირველად თეთრია და დროთა განმავლობაში მოყავისფრო ხდება. *Mucor indicus* შეიძლება გაიზარდოს 40°C ტემპერატურაზე. მეორეს მხრივ, *Mucor racemosus* და *Mucor ramosissimus*, ცუდად იზრდება ან საერთოდ არ იზრდება 37°C ტემპერატურაზე [147].

სხვა გვარების მსგავსად, რომლებიც მიეკუთვნებიან Zygomycota-ს ჯგუფს, მუკორის ინფექციების მკურნალობა რთულია. სისხლძარღვთა ქსოვილებში შეჭრის უნარის გამო, ინფიცირებული ქსოვილის ინფარქტი ხშირია და სიკვდილიანობა ძალიან მაღალია. ადრეული დიაგნოსტიკა გადამწყვეტია და, როგორც წესი, საჭიროა ქირურგიული რეზექცია, ისევე როგორც სოკოს საწინააღმდეგო თერაპია. ამფოტერიცინი B არის ყველაზე ხშირად გამოყენებული სოკოს საწინააღმდეგო საშუალება [148].

1.8.4. ფუზარიუმი

ფუზარიუმი არის ასკომიცეტების წარმომადგენელი ძაფისებრი სოკო, რომელიც ფართოდ არის გავრცელებული მცენარეებზე და ნიადაგში. ის გვხვდება ბრინჯში, ლობიო, სოიოსა და სხვა კულტურებში. მიუხედავად იმისა, რომ სახეობების უმეტესობა უფრო გავრცელებულია ტროპიკულ და სუბტროპიკულ ადგილებში, ზოგი ბინადრობს ნიადაგში ცივ კლიმატურ პირობებში. ფუზარიუმის ზოგიერთ სახეობას აქვს ტელეომორფული მდგომარეობა. გარდა იმისა, რომ არის საერთო დამაბინძურებელი და მცენარეთა კარგად ცნობილი პათოგენი, *Fusarium* spp. შეიძლება გამოიწვიოს სხვადასხვა ინფექციები ადამიანებში. ფუზარიუმი ოპორტუნისტული მიკოზების ერთ-ერთი გამომწვევი მიზეზია [149-152].

გვარი *Fusarium* ამჟამად შეიცავს 20-ზე მეტ სახეობას. მათგან ყველაზე გავრცელებულია *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* და *Fusarium chlamydosporum*.

Fusarium spp. სწრაფად იზრდება საბუროს აგარზე 25°C ტემპერატურაზე. ერთადერთი ნელა მზარდი სახეობაა *Fusarium dimerum*. წინა მხრიდან, კოლონიის ფერი შეიძლება იყოს თეთრი, კრემისფერი, დარიჩინისფერი, ყვითელი, წითელი, იისფერი, ვარდისფერი ან მეწამული. საპირისპიროდან ის შეიძლება იყოს უფერო, წითელი, მუქი მეწამული ან ყავისფერი. სკლეროტიუმი, რომელიც არის ჰიფების ორგანიზებული მასა, რომელიც რჩება მიძინებული არახელსაყრელი პირობების დროს, შეიძლება დაფიქსირდეს მაკროსკოპიულად და ჩვეულებრივ მუქი ლურჯი ფერისაა [153-154].

1.9. მიკროსკოპული სოკოების იდენტიფიკაციის პრინციპები

მიკროსკოპული სოკოების იდენტიფიკაცია დამყარებულია საკვლევი კულტურის მაკრო და მიკროსკოპული თვისებების შეჯერებით უკვე ცნობილი სოკოების ადრე აღწერილ თვისებებთან. თითოეული კულტურის იდენტიფიკაციისთვის აუცილებელია განისაზღვროს ზედაპირის ფერი, ზრდის სიჩქარის შესაბამისად კოლონიის დიამეტრი. ეს განეკუთვნება მაკროსკოპულ თვისებებს. იდენტიფიკაციის შემდეგი ეტაპია რეპროდუქციული ორგანოების პრეპარატების დამზადება. თავდაპირველად ხდება მსხვილი ტაქსონომიური ერთეულის დადგენა (კლასი, რიგი). ეს ერთეული განისაზღვრება რეპროდუქციული ორგანოებისა და აღნაგობის თავისებურებებით. არკისა და კრეიზელის კლასიფიკაციაზე დაყრდნობით იდენტიფიცირებული მიკროსკოპული სოკოები ძირითადად ეკუთვნიან - Zygomycetes, Ascomycetes, Deiteromycetes კლასებს .

Zygomycetes კლასს მიეკუთვნენ მიკროსკოპული სოკოების ის კულტურები, რომლებიც სქესობრივი გზით წარმოქმნიან – ზიგოტას, უსქესო გზით – სპორანგიებს ან სპორანგიოლებს უმოძრაო სპორებით. მართალია ზოგიერთ ზიგომიცეტს უვითარდება კონიდიები, მაგრამ ამ შემთხვევაში ხდებოდა დადგენა, რომ ზიგოტა ნამდვილად წარმოიქმნება [155].

Ascomycetes კლასს მიეკუთვნენ მიკროსკოპული სოკოების ის კულტურები, რომლებიც განვითარების ციკლში წარმოქმნიან ნებისნიერი

ფორმისა და სიდიდის ჩანთებს. უფრო ხშირად ეს ჩანთები შეიცავენ 8 ასკოსპორას. რამდენადმე განსხვავებულია ამ კლასში შემავალი გვარების -- *Penicillium*-ის და *Aspergillus* -ის წარმომადგენლების გამრავლება. უსქესო გამრავლება- კონდიებით, სქესობრივი გამრავლება- ჩანთებით. მხოლოდ ზოგიერთ წარმომადგენელს არ აღენიშნებოდა ჩანთების წარმოქმნა, ან თუ წარმოქმნიდნენ კლუისტოტეციების ტიპის ჩაკეტილ ნაყოფსხეულებში. ამ გვარის სახეობების იდენტიფიცირებისათვის დიდი მნიშვნელობა ენიჭებოდა კულტურალური თვისებების დადგენას. კერძოდ, კოლონიის ზრდის სიჩქარე, ფერი და სიდიდე, კიდეების და ცენტრის აღნაგობა, ზედაპირის ხასიათი, (ხავერდოვანი, ფუმფულა, ხაოიანი, ბეწვისებრი). რეპროდუქციული ორგანოების თავისებურება, კონდიამატარებლობა, კონდიების განლაგება. კოლონიის ჰაეროვანი ნაწილი (ვეგეტატიური მიცელიუმი, კონდიალური თავები) [156].

Deuteromycetes კლასს მიეკუთვნენ ის კულტურები, რომელთაც ახასიათებდათ მრავალფეროვანი კონდიალური სპორათა შერწყმა და განვითარების ციკლში არ აღენიშნებათ სქესობრივი სტადია [157].

დიდი ხნის განმავლობაში არასრული (Deuteromycota) სოკოების სისტემა იყო სქემატური და ხელოვნური, რომელიც ემსახურებოდა მათ იდენტიფიკაციას. უკანასკნელ წლებში ამ სოკოების ტაქსონების ინტეგრაცია ასკომიცეტების სისტემაში წარმოადგენს თანამედროვე მიკოლოგიის ერთ-ერთ მთავარ მიმართულებას, რომელსაც ხელი შეუწყო მოლეკულური ბიოლოგიის მეთოდების განვითარებამ. თუმცა მათი იდენტიფიკაცია ანამორფულ თვისებებზე დაყრდნობით არ არის უგულებელყოფილი.

ვინაიდან დღევანდელ დღეს არ არსებობს სოკოების კლასიფიკაცია, რომელიც მისაღებია ყველა მიკოლოგისათვის, ლიტერატურაში მოცემული ინფორმაცია ასახავს სხვადასხვა ავტორების შეხედულებებს [158].

სოკოების ნებისმიერი კლასიფიკაცია დაფუძნებულია მათი გამრავლების უნარზე.

- უმდაბლესი სოკოები ან ზიგომიცეტები (Zygomycota)
- არასრული სოკოები ან დეიტერომიცეტები (Deuteromycota)

- უმაღლესი სოკოები, ჩანთიანი სოკოები ან ასკომიცეტები (Ascomycota)
- უმაღლესი სოკოები, ბაზიდიური სოკოები ან ბაზიდიომიცეტები (Basidiomycota).

მკვლევარების უმრავლესობა ჭესმარტ სოკოებს აკუთვნებს მხოლოდ ზემოთ ჩამოთვლილ სოკოებს, კერძოდ: უმდაბლესი, არასრული და უმაღლესი სოკოები [158-159].

აუცილებელია აღინიშნოს, რომ ნიადაგის მიკრომიცეტები (სოკოები რომლებიც ბინადრობენ ნიადაგში და არ აქვთ რეპროდუქციული სტრუქტურა 1მმ-ზე მეტი) შეიცავენ სახეობების ფართო სპექტრს, რომელთა ამომწურავად შესწავლა შეუძლებელი, თუმცა მიკოლოგების დიდი ნაწილი მიიჩნევს, რომ ნიადაგის მიკრომიცეტებში იგულისხმება ზუსტად ის სოკოები, რომელთა გამოყოფა შესაძლებელია სუფთა კულტურის სახით. ბევრი მიკროსკოპული სოკო დაკავშირებულია მცენარესთან და დამოუკიდებლად არსებობა სიმბიონტის გარეშე არ შეუძლია, ასევე ნელა მზარდი სოკოები შეიძლება დაიკარგოს (შეუმჩნეველი დარჩეს) საკვებ არეზე ჩათესვისას. ამრიგად, ნიადაგის მიკობიოტის უფრო მეტად შესწავლილ ნაწილს მიეკუთვნება ზომიერად და სწრაფად მზარდი საფროფიტები და ფაკულტატური პარაზიტები. ტაქსონომიურად ასეთი ტიპის ჯგუფებს ეკუთვნის ასკომიცეტები და ზიგომიცეტები. თუ გავითვალისწინებთ, რომ დეიტერომიცეტების კლასში არსებული ბევრი გვარი გადატანილია ასკომიცეტების კლასში. ამ ჯგუფში შედის დეიტერომიცეტების კლასიც [160,161].

თანამედროვე ბიოლოგიის ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი პრობლემაა ცოცხალი ორგანიზმების არსებობის ზღვრების დადგენა. ამა თუ იმ ნიადაგში მიკროორგანიზმების გავრცელება მნიშვნელოვნად არის დამოკიდებული ისეთ ფაქტორებზე, როგორც არის ნიადაგის ფიზიკური და ქიმიური თვისებები – აქტიური მჟავიანობა და ტუტიანობა pH), ტემპერატურა, ტენიანობა, ასევე ჰაერის ჟანგბადით უზრუნველყოფასა და მცენარეულ საფარზე, როგორც ფიტოცენოზის მთლიანობაზე [162].

ერთი და იგივე pH –ის შემთხვევაშიც, მაგრამ განსხვავებულ ნიადაგობრივ-კლიმატურ ზონებში გამოყოფილი მიკროორგანიზმების სახეობები სხვადასხვაა,

ამასთანავე ერთი და იგივე გვარის წარმომადგენელთა დამოკიდებულებაც ნიადაგის pH –ზე შეიძლება იყოს მკვეთრად განსხვავებული. ასევე ერთი და იგივე გვარის სახეობები შეიძლება იზრდებოდნენ 5°C-ზე, 30°C სა და უფრო მაღალ ტემპერატურაზე. ნიადაგის ზედა ფენები უფრო მეტად ექვემდებარებიან ტემპერატურის სეზონურ და დღეღამურ ცვლილებებს, ვიდრე ნიადაგის ღრმა ფენები, სადაც ტემპერატურული რეჟიმი სტაბილურია. ამიტომ ნიადაგის ზედა ფენებისათვის პირველხარისხოვანი ეკოლოგიური ფაქტორია ტემპერატურული რეჟიმი, მაშინ როდესაც ღრმა ფენებში ამ ფაქტორთან ერთად მნიშვნელოვანია მჟავიანობა, ტენიანობა და ჟანგბადის რეჟიმი [163].

სწორი ეკოლოგიური მიდგომით შესაძლებელია მრავალფეროვანი და მრავალრიცხოვანი მიკროორგანიზმების მიღება. მიკროორგანიზმთა სპეციფიკური ტიპები ადაპტირებულია განსაზღვრულ ნიშებთან და განიხილება ეკოსისტემების შემადგენელ ნაწილად. ნიმუშების დამუშავება განაპირობებს ნიადაგიდან, წყლიდან და მცენარეული სუბსტრატებიდან გამოყოფილი მიკროორგანიზმების ტიპსა და რაოდენობას. ეკოსისტემიდან გამოყოფილი ბაქტერიების, აქტინომიცეტების, საფუვრებისა და მიკროსკოპული სოკოების ოპტიმალური რაოდენობა დიდად არის დამოკიდებული გამოყოფის მეთოდების სწორედ შერჩევაზე. გამოყოფის დროს კი უპირველესად აღწერილი უნდა იქნეს ეკოსისტემა, საიდანაც ნიმუშები იქნება აღებული [164].

1.10. მუტაგენეზი

მუტაგენეზი არის პროცესი, რომლის დროსაც ორგანიზმის გენეტიკური ინფორმაცია იცვლება მუტანტური გენების, ცილების ან ორგანიზმების წარმოქმნით. ეს არის ეფექტური მეთოდი სამრეწველო მიკროორგანიზმების მისაღებად და ექვემდებარება განმეორებით მუტაგენეზს, რომლის შედეგადაც ტარდება სელექცია და სკრინინგი შესაფერისი თვისებების მქონე მიკროორგანიზმების შესარჩევად. მუტაცია შეიძლება იყოს ბუნებრივი მოვლენა, ან იყოს გამოწვეული სხვადასხვა ფაქტორით. მუტაგენეზი გამოიყენება ბიოინჟინერიაში, უფრო მაღალი პროდუქტიულობის ფერმენტების ან სხვა

თვისებების გამოსავლენად. მუტაგენები იწვევს დნმ-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის მოდიფიკაციას, ჩანაცვლებას ან წაშლას. მუტაგენების პროცესი ასევე ეფექტურია პენიცილინის, ამინომჟავების პროდუქტიულობის გასაზრდელად და ა.შ. მუტაგენების საუკეთესო მაგალითია *Penicillium chrysogenum*-ის მუტანტის შტამის წარმოება, რომელშიც პენიცილინის გამოსავლიანობა იზრდება 550 მგ/ლ-დან 7000 მგ/ლ-მდე [165, 166].

სპონტანური მუტაცია: სპონტანური მუტაციის სიხშირე დროში ძალიან ნელა მიმდინარეობს, მაგრამ ეს პროცესი შეიძლება დაჩქარდეს მუტაგენების გამოყენებით. სპონტანური მუტაციის სიხშირე დამოკიდებულია ორგანიზმის ზრდის პირობებზე და მუტაციების სიხშირე (მუტანტების პროპორცია პოპულაციაში), ასევე შეიძლება მნიშვნელოვნად გაიზარდოს მუტაგენური აგენტების მოქმედებით [167].

ინდუცირებული მუტაციები: ინდუცირებული მუტაციების დროს მუტაგენები არიან ფიზიკური ან ქიმიური ხასიათის. ქიმიური მუტაგენების დროს დროს გამოიყენება N-მეთილ- N'-ნიტრო-N ნიტროგუანიდინი (NTG), აზოტ მჟავა, ეთილის მეთილ სულფონატი. ფიზიკური მუტაგენების დროს კი: ულტრაიისფერი, გამა სხივები და სხვა. UV გამოსხივება ფართოდ გამოიყენება ინდუსტრიაში, რადგან ის ძალიან ეფექტურია და არ მოითხოვს რაიმე ძვირადღირებულ აღჭურვილობას [168].

კვლევებმა აჩვენა, რომ UV გამოსხივება არის ძლიერი მუტაგენი. UV-ის როგორც მუტაგენური აგენტის გამოყენებამ საგრძნობლად გაზარდა სპეციფიკური ფერმენტების სამრეწველო წარმოება. ულტრაიისფერი გამოსხივების ტალღის სიგრძე მერყეობს 200-300 ნმ-მდე. UV მოქმედების მნიშვნელოვანი პროდუქტებია დიმერები (თიმინ-თიმინი, თიმინ-ციტოზინი და ციტოზინ-ციტოზინი), რომლებიც წარმოიქმნება პირმიდინების სიახლოვეს.

UV გამოსხივება ძირითადად იწვევს გადასვლებს, ტრანსვერსიებს, დელეციებს და სხვა. ულტრაიისფერი სხივები ალაგზნებს მოლეკულების ელექტრონებს, რომელიც იწვევს დამატებით ბმების წარმოქმნას პირმიდინის მიმდებარე მოლეკულებს შორის [169].

1.11. ფენოლოგიური ნაერთები

პოლიფენოლოგიური ნაერთები ადამიანის კვების მნიშვნელოვანი ნაწილია. მათი უმეტესი ნაწილი გვხვდება მცენარეებში და მიკროორგანიზმების მეტაბოლიტებში. პოლიფენოლოგიური ნაერთები წარმოადგენს მცენარეთა მეტაბოლიტების ერთ-ერთ უდიდეს და ყველაზე გავრცელებულ ჯგუფს. ბუნებაში, ისინი წარმოიქმნება მცენარეებში ფოტოსინთეზური სტრესის, რეაქტიული ჟანგბადის სახეობების, UV გამოსხივებისგან თავის დასაცავად. მიუხედავად იმისა, რომ ყველა მცენარეული ფენოლოგიური ნაერთი წარმოიქმნება ამინომჟავების ფენილალანინისა და ტიროზინისგან, მათი სტრუქტურები ძალიან მრავალფეროვანია და ისინი შეიძლება დაიყოს მინიმუმ ათ კლასად მათი ქიმიური სტრუქტურების მიხედვით [170-172].

პოლიფენოლებს შეუძლიათ მოახდინონ ისეთ პროცესებზე გავლენა, როგორცაა უჯრედების გამრავლების, დიფერენციაციის, აპოპტოზის, ანგიოგენეზის ან მეტასტაზების რეგულირება. პოლიფენოლების კიბოს საწინააღმდეგო ეფექტებთან დაკავშირებული მოლეკულური გზები დამოკიდებულია კონკრეტულ პოლიფენოლოგიურ მოლეკულაზე, სხვადასხვა მათ კონცენტრაციებზე და უჯრედების ტიპებსა თუ ქსოვილებზე. შედეგად, ძალიან რთული ხდება ამ ნაერთების შედარება და კლასიფიკაცია ერთი კონკრეტული მეტაბოლიტის ცვლილების ან ერთი კონკრეტული ცილის მოქმედების მიხედვით [173].

ცნობილია რომ ხილის, ბოსტნეულის და ჩაის რეგულარული მოხმარება დაკავშირებულია კიბოს რისკის განვითარების შემცირებასთან. კვლევებმა აჩვენა, რომ კვება დიდ როლს თამაშობს ადამიანის კიბოს პროფილაქტიკაში. მაგალითად, კურკუმინს საუკუნეების განმავლობაში იყენებდნენ აზიის ქვეყნებში და მონაცემებიც მიუთითებს იმაზე, რომ კურკუმინი შეიძლება იყოს პასუხისმგებელი ზოგიერთ ქვეყნებში კოლორექტალური კიბოს დაბალ მაჩვენებელზე (ინდოეთი). ანალოგიურად, იაპონიასა და ჩინეთში ჩატარებულმა რამდენიმე კვლევამ აჩვენა, რომ მწვანე ჩაის მოხმარება დაკავშირებულია სხვადასხვა ტიპის კიბოს (კუჭი, სარძევე ჯირკვალი, საყლაპავი) დაბალ შემთხვევასთან. *in vitro* და *in vivo* სამეცნიერო კვლევების მონაცემებზე

დაყრდნობით, რომელიც ეხება სიმსივნეზე პოლიფენოლების ქიმიო-პრევენციულ და თერაპიულ ეფექტებს, დადებითი შედეგი აჩვენა ადამიანებში კვერცეტინის, და კურკუმის ზეგავლენამ [173-176].

ანტიოქსიდანტები ანეიტრალებენ თავისუფალ რადიკალებს, რომლებიც წარმოიქმნება ცოცხალი ორგანიზმის ნორმალური ბიოლოგიური მოქმედებით. თავისუფალმა რადიკალებმა შეიძლება გამოიწვიოს სერიოზული დაავადებები, როგორცაა სიმსივნე, ათეროსკლეროზი, იმუნოსუპრესია, დაბერება, ანთება, გულის იშემიური დაავადება, დიაბეტი და ნეიროდეგენერაციული დაავადებები, როგორცაა პარკინსონი და ალცჰაიმერი [177].

სინთეზური ანტიოქსიდანტები ფართოდ გამოიყენება საკვები და ფარმაცევტული პროდუქტების ლიპიდური დაჟანგვის თავიდან ასაცილებლად, როგორცაა ბუტილ-ჰიდროქსი-ტოლუენი, ბუტილ-ჰიდროქსი-ანიზოლი და პროპილი. სინთეზური ანტიოქსიდანტების ტოქსიკოლოგიაზე ჩატარებულმა კვლევებმა აჩვენა, რომ მათ შეიძლება გამოავლინონ კანცეროგენული ეფექტი [178, 179].

საკვებში გამოყენებული ბევრი ბუნებრივი ანტიოქსიდანტი მცენარეული წარმოშობისაა ფენოლური და პოლიფენოლური ნაერთების, კაროტინოიდების და ანტიოქსიდანტური ვიტამინების კლასებიდან. ისეთი ფაქტორები, როგორცაა ნედლეულის ხელმისაწვდომობა და მცენარის ზრდის დრო, რომელიც დამოკიდებულია კლიმატურ პირობებზე და სეზონურობაზე, შეუძლია შეზღუდოს მეტაბოლიტების გამოყენება [180].

თუმცა, მიკრობული მეტაბოლიტები არ არის დამოკიდებული კლიმატურ და სეზონურ ფაქტორებზე და შეიძლება სწრაფად გამომუშავდეს, რადგან მათი ზრდა შედარებით სწრაფია. გარდა ამისა სხვა უპირატესობებია მარტივი და სწრაფი გენეტიკური მანიპულირება და ნაერთების წარმოება ფერმენტაციური პროცესებით. სოკოები წარმოქმნიან ბევრ უჯრედგარე ფერმენტს და მეორად მეტაბოლიტს, როგორცაა ორგანული მჟავები, პიგმენტები და სხვა საკვები დანამატები. სოკოებისგან იზოლირებულ ანტიოქსიდანტურ ნაერთებს შორის არის კაროტინოიდები, ფლავონოიდები, ფენოლის მჟავები და მათი წარმოებულები [181].

1.11.1. ფენოლური ნაერთების ბიოსინთეზი სოკოებში

ცნობილია, რომ ფენოლური ნაერთები რომლებიც თავდაპირველად ბიოსინთეზირდება ბოსტნეულში შეიძლება მოიძებნოს ენდოფიტების სოკოების კოლონიებშიც. ამ ნაერთებს შორისაა: ემოდინი, კაჰსაიცინი, ლუტეოლინი, ჰიპერიცინი და ქლოროგენის მჟავა. სოკოს ფლავონოიდები, ფენოლები და საპონინები არის ძალიან მნიშვნელოვანი ბიოაქტიური კომპონენტები, რომლებიც განიხილება როგორც ინოვაციური და შესაძლო ანტიოქსიდანტური ნაერთების მნიშვნელოვანი წყარო. მაგალითად, ბუნებრივი ანტიოქსიდანტური ნაერთები, როგორცაა ფლორიზინი, რუტინი, გალის მჟავა და 2,6-დი-ტერტ-ბუტილ ჰიდროქინონი გამოვლენილი იქნა 53 განსხვავებული ენდოფიტიდან, რომლებმაც აჩვენეს ანტიოქსიდანტური აქტივობა. ტიროსოლი, ცნობილი ფენოლური ნაერთი, იზოლირებულია ენდოფიტების ექსტრაქტებიდან ითვლება სასიგნალო ნივთიერებად სოკოების სახეობებში [182,183].

სოკოების სხვა ფენოლური ნაერთების ბიოაქტიური თვისებები მოიცავს სიმსივნის საწინააღმდეგო, ანტიმიკრობულ და ანტიოქსიდანტურ აქტივობას. სუბსტრატსა და სოკოებს შორის ურთიერთქმედება გავლენას ახდენს ბიოაქტიური მეტაბოლიტების წარმოებაზე. მაგალითად, როდესაც *Stemphylium globuliferum* გაიზარდა თეთრ ლობიოს საკვებ არეზე, იგი წარმოქმნიდა ტეტრაჰიდროანტრაქინონებს, რომლებიც არააქტიური იყო L5178Y თავის ლიმფომის უჯრედული ხაზზე, მაგრამ როდესაც ის გაიზარდა ბრინჯის კულტურაში, სხვა ანტრაქინონები წარმოიქმნა რომლებიც ლიმფომის უჯრედების ზრდას აფერხებდნენ [184].

Ampelomyces sp., არის ენდოფიტური სოკო, რომელსაც შეუძლია რამდენიმე მეორადი ფენოლური ნაერთების სინთეზირება მყარი და თხევადი ფერმენტაციის გზით. ზოგიერთი ფენოლური ნაერთი, რომელიც წარმოებულია მიკროორგანიზმების მიერ არის: მიკოფენოლის მჟავა, დიცერანდროლი C, ციტოსპორონი C, ფომოფსინი A, ფომოფსინი B, ალტერსოლანოლი A, დესმეთილდიაპორტინოლი და ა.შ. ამ ორმა ბოლო ნაერთმა აჩვენა დადებითი მაჩვენებელი ლიმფომის უჯრედული ხაზების მიმართ; წარმოებულ სხვა

ფენოლებს აქვთ ანტიმიკრობული მოქმედება *S. aureus*-ის, *S. epidermidis*-ის და *E. faecalis*-ის მიმართ, *Pestalotiopsis* sp. და *Phoma pinodella*-ს შეუძლია წარმოქმნას ფენოლიკები, როგორცაა ფომოდინი, უსნიკის მჟავა, ცერკოსპორამიდი, პესტალოლი D და E და რამდენიმე სხვა, რომელთაგან ზოგიერთს აქვთ ანტიპროლიფერაციული მოქმედება ადამიანის სიმსივნური უჯრედების ჯგუფი მიმართ (როგორცაა ფილტვების, პროსტატას, საკვერცხე, მსხვილი ნაწლავისა და, სამვილოსნოს ყელის სიმსივნე) [185].

2. მეთოდოლოგიური კვლევა (სადისერტაციო თემის ფარგლებში ჩატარებული კვლევის პირველი ეტაპი)

2.1. მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფა

მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფა საქართველოს შერჩეული კლიმატური ზონიდან მოხდა ანტისიმსივნიური ეფექტის დადგენის მიზნით.

ნიმუშები შეირჩა სამეგრელოს რეგიონის ნიადაგიდან, კონკრეტული ნიადაგის შერჩევის შემდეგ 5 მეტრის რადიუსზე 5 წერტილი მოინიშნა 4 დიაგონალურად და ერთი ცენტრში. ნიადაგის ნიმუშის აღება წარმოებდა 15-20 სმ-ის სიღრმიდან, სტერილური შპატელით. ნიმუშები თავსდებოდა წინასწარ მომზადებულ სტერილურ პერგამენტის და პოლიეთილენის კონვერტებში. საველე პირობებში, ლაბორატორიაში მიტანამდე ნიმუშები რამდენიმე საათი განთავსდა ჰაერზე, ისე რომ, არ ხდებოდა მზის სხივების უშუალო ზემოქმედება. შემდეგ ეტაპზე მიმდინარეობდა ნიმუშებიდან პირველადი ჩანათესების გამოყოფა.

2.1.1. პირველადი ჩანათესებიდან სუფთა კულტურების მიღება

მიკრობიოლოგიური ჩათესვის წინ ხდებოდა ნიადაგის ნიმუშების წინასწარი დამუშავება, რათა მიღებული ყოფილიყო სუსპენზია, რომელშიც უჯრედები იქნებოდნენ ცალკეულ თავისუფლად მოცურავე უჯრედების სახით. ეს მიღწეულ იქნა ნიადაგის აგრეგატების დისპერგირების მიკროორგანიზმთა უჯრედების დესორბციის და მიკროკოლონიების ცალკეულ შემადგენელ უჯრედებად დაყოფის გზით. დამუშავებული ნიადაგის ნიმუშების ჩათესვა ხორციელდებოდა ვაკსმანის - ნიადაგების განზავების მეთოდით, აღებული იყო შემდეგი განზავებები -1/10; 1/100; 1/1000; 1/10000), და ნიადაგის პირდაპირი ჩათესვის მეთოდით. იმისათვის, რომ სუსპენზიის თითოეულ თავისუფლად მოცურავე უჯრედს საკვებ არეზე მოხვედრისას მოეცა კოლონია, შერჩეულ იქნა სელექტიური საკვები არეები.

შერჩეულ იქნა 3 საკვები არე:

1. უნივერსალური საკვები არე - შემადგენლობა: 1ლიტრზე : 0,5ლუდის ზადაგი, 0,5ლ ონკანის წყალი, 20,0გ აგარ-აგარი. (pH 5.5-6.0)
2. ჩაპეკის შემჟავებული საკვები არე - შემადგენლობა: NaNO_3 -0,91 %, KH_2PO_4 -0,1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ -0,05 %, KCl -0,05 %, $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -0,002 %, გლუკოზა 2,0 %, აგარ-აგარი-2,0 %. (pH 3.5-4.0).
3. საბუროს საკვები არე - შემადგენლობა 1ლ-ზე: გლუკოზა 40გ, აგარი 15გ, პეპტონი 5 გ, კაზეინი 5გ.

სტერილიზაციის რეჟიმი 0,5 ატმ-30 წთ. ნიადაგიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოები იზრდებოდა თერმოსტატში 30⁰ C-ზე. პეტრის თასებზე ჩათესილი ნიადაგის ნიმუშების დათვალიერება და აღწერა ხდებოდა მე-3, მე-5, მე-7, მე-10 დღეს. ოპტიმალური აღმოჩნდა განზავებები 10² და 10³. პეტრის თასებზე გაზრდილი მიკროორგანიზმებიდან სუფთა კულტურების მიღების მიზნით მიცელიუმის ნაგლეჯი თავსდებოდა საკვებ არეზე. კულტივირების ტემპერატურა იყო ისეთივე, როგორც გამოყოფის მომენტში.

გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოები იზრდებოდნენ თერმოსტატში 30⁰ C-ზე. პეტრის თასებზე ჩათესილი ნიადაგის ნიმუშების დათვალიერება და აღწერა ხდებოდა მე-3, მე-5, მე-7, მე-9, მე-12 დღეს. თითოეული ნიმუში - თითოეული საკვები არიდან ამოთესილი და თითო კოლონიის სახით თავსდებოდა პეტრის თასებზე. შემდეგი კვლევებისთვის გამოყოფილი და მიღებული სუფთა კულტურები გადაიტანებოდა აგარიზებულ არეებთან სინჯარებში .

2.1.2. მიკროსკოპული სოკოების ზრდის ოპტიმალური პირობების დადგენა

მიკროსკოპული სოკოები კულტივირებულ იქნა ჩაპეკის, საბუროს და უნივერსალურ საკვებ არეებზე. საკულტივაციოდ სპორების სუსპენზია მომზადდა ფიზიოლოგიური ხსნარის გამოყენებით. ჰემოციტომეტრის საშუალებით დათვლილ იქნა სპორების რაოდენობა, კულტივირებისთვის გამოყენებულ იქნა 10⁻³ სპორა/მლ. კულტურები იზრდებოდნენ

სტანდარტულ 90 მმ პეტრის ფინჯნებში 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C 40°C-ზე

2.1.3. მიკროსკოპული სოკოების უჯრედშია ლიზატის მიღება

კვლევის ფარგლებში საქართველოს დასავლეთ რეგიონიდან გამოიყო მიკროსკოპული სოკოების კულტურები, მოხდა მათი საკვები არეების ოპტიმიზაცია და სუფთა კულტურების გამოყოფა. გაზრდილი კულტურები დაამუშავდა ჰომოგენიზატორის საშუალებით მინის ფქვილის გამოყენებით, რომელიც შემდგომ დაიფუჭა 10000 rpm-ზე 20 წუთის განმავლობაში. გამოყოფილი პრეპარატი გაშრა ლიოფილურად. მიღებული უჯრედშია ლიზატი დაიტესტა ერლიხის კარცინომის მოდელზე მასში ანტისიმსივნური ეფექტის აღმოჩენის მიზნით.

2.2. ცილის განსაზღვრის მეთოდი

ცილის შემცველობის რაოდენობრივ მაჩვენებლის განსაზღვრა მნიშვნელოვანია კვლევებში, განსაკუთრებით ბიოქიმიის სფეროში. ცილის კონცენტრაციის ცვლილებაზე შესაძლოა დამოკიდებული იყოს ექსპერიმენტის სწორი მსვლელობა და მიღებული შედეგები. არსებობს ცილის განსაზღვრის სხვადასხვა მეთოდები მაგრამ ხელმისაწვდომობის, სიმარტივისა და სისწრაფის გამო ყველაზე ხშირად გამოიყენება სპექტომეტრული მეთოდები, როგორცაა: ბრედფორდის, ბიურეტისა და ლოურის მეთოდი [186].

ბიურეტის მეთოდი გამოიყენება ბიოლოგიურ ნივთიერებებში ცილების, პეპტიდური ზმების არსებობის დასადგენად. პეპტიდების თანაობისას სპილენძი II-ის იონები ტუტე გარემოში წარმოქმნის შეფერილ (იასამნისფერ) კომპლექს, რომლის გაზომვაც შესალებელია სპექტრომეტრულად 540-560 ნმ-ზე. წარმოქმნილი ფერის ინტენსივობა პირდაპირპროპორციულია ცილის კონცენტრაციასთან [187].

საერთო ცილების განსაზღვრისთვის საკვლევ სინჯებში საერთო ცილის გაზომისთვის 4 ნაწილ ბიურეტის რეაგენტს (0.15% სპილენძის სულფატი, 0.6%

ნატლიუმის კალიუმის ტარტრატი და 3% NaOH) დაემატა 1 მოცულობა საკვლევი ხსნარი. 10 წუთი ინკუბაციის შემდეგ გაიზომა ოპტიკური მაჩვენებელი 546 ნმ-ზე . ცილის კონცენტრაცია განისაზღვრა ხარის შრატის ალბუმინის სტანდარტული ხსნარებით (0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 25, 12.5, 25 მგ/მლ) აგებულ საკალიბრო მრუდზე

2.2.1. ცილის განსაზღვრა ბრედფორდის მეთოდით

ბრედფორდის მეთოდი გამოიყენება ბიოლოგიურ ნიმუშში ცილის კონცენტრაციის გასაზომად. ამ ანალიზის პრინციპია, შემყავებულ გარემოში ცილის მოლეკულების შეკავშირება კუმასი G-250 საღებავთან, რაც იწვევს ფერის ცვლილებას ყავისფერიდან ლურჯამდე. მიღებული პასუხის გაზომვა შესაძლებელია სპექტრომეტრის საშუალებით 578-595 ნმ-ზე. ეს მეთოდი ძირითადი ზომავს შემდეგ ამონიმყავებს: არგინინს, ლიზინსა და ჰისტიდინს [188].

კვლევის ფარგლებში 1 მლ ბრედფორდის რეაგენტს დაემატა 100 მკლ საანალიზო ხსნარები, სინჯები მოთავსდა საინკუბაციოდ თერმოსტატში 25°C-ზე 10 წუთის განმავლობაში. ინკუბაციის დასრულების შემდგომ სინჯები გაიზომა სპექტრომეტრზე (578 ნმ) საკონტროლო ხსნარის მიმართ.

2.3. ავთვისებიანი სიმსივნის in vivo მოდელირება

მიკროსკოპული სოკოების მყარფაზოვანი ფერმენტაციის შედეგად მიღებულ უჯრედშიდა ლიზატის სიმსივნურ ზრდაზე სინერგისტული და/ან მაინჰიბირებელი მოქმედების მექანიზმების დასადგენად შეიქმნა ერლიხის კარცინომის in vivo მოდელი.

საკვლევ ლიზატში არსებული ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების სიმსივნის ზრდის საწინააღმდეგო თვისებების შესასწავლად კვლევები ჩატარდება 20-25 გ მასის მამრ, უჯიშო თეთრ თაგვებზე. ავთვისებიანი სიმსივნის მოდელირება მოხდა ერლიხის ასციტური კარცინომის 2×10^6

უჯრედის გადანერგვით ლაბ. თავგების ბეჭქვეშა მიდამოში. საინექციო სიმსივნური უჯრედების დასათვლელად, უჯრედები შეიღება ტრიპანის ლურჯით და დაითვალა ჰემოციტომეტრის საშუალებით. კვლევის პერიოდში ცხოველები იმყოფებოდნენ მუდმივ გარემო პირობებში სინათლის-სიბნელის ციკლით 12/12, 23 ± 2 °C-ზე, იკვებებოდნენ სტანდარტული გრანულირებული საკვებით [189-191].

2.3.1. უჯრედშიდა ლიზატის გავლენა ერლიხის კარცინომის in vivo მოდელების სიცოცხლის ხანგრძლივობაზე

კვლევის ფარგლებში თავდაპირველად დავაკვირდით პრერარატის გავლენას ერლიხის კარცინომის ზრდაზე და სიმსივნით დასნებოვნებული თავგების სიცოცხლის ხანგრძლივობაზე. ცდისთვის გადაირჩა 8-8 თავგი, საკონტროლო ჯგუფები ინექცირებულ იქნა 100 მკლ ფიზიოლოგიური ხსნარით, ხოლო საკვლევი ჯგუფები 100 მკლ საანალიზო ხსნარებით T1, K1, NL-50, NL-51, Gz 9-6, Gz 9-10 M II-12 (ცილის კონცენტრაცია 2 მგ/მლ). მონაცემთა ანალიზისთვის გამოყენებული იყო SPSS (ვერსია 10.0).

2.3.2 ერლიხის კარცინომის in vivo მოდელში სიმსივნური ქსოვილის განვითარების შეფასება

სიმსივნური ქსოვილის მოცულობის გაზომვა მოხდება კალიპერით. საშუალო ზომა გამოითვლება ფორმულით $V = a \times b^2 \times \pi/6$, სადაც V არის სიმსივნური ქსოვილის მოცულობა, a - სიმსივნური ქსოვილის სიგრძე, b-სიგანე, [192].

(სადისერტაციო თემის ფარგლებში ჩატარებული კვლევის მეორე ეტაპი)

2.4. კოლორიმეტრული ანალიზის ახალი მეთოდის შემუშავება საკვლევ ლიზატში საერთო პროტეოლიზური აქტივობის დასადგენად

სადისერტაციო თემის ფარგლებში შეიქმნა პროტეოლიზური აქტივობის

განსაზღვრის ახალი მეთოდი ახალი ტიპის სუბსტრატის გამოყენებით. სუბსტრატის სახით გამოყენებული იქნა მოდიფიცირებული კვერცხის ცილა EWMP. მოცემული ცილა წარმოადგენს ბუფერულ ხსნარში თითქმის უხსნად კომპლექსს. ამავდროულად იგი ექვემდებარება ფერმენტულ ზემოქმედებას, მისი ამ თვისების გამო შესაძლებელი გახდა ზუსტი აქტივობის დადგენა სხვა ალტერნატიულ მეთოდებთან შედარებით. შემუშავებული მეთოდი შესაძლოა გამოყენებულ იქნეს საერთო პროტეოლიზური აქტივობის განსასაზღვრავად.

კვლევის ფარგლებში მიღებული სუბსტრატი EWMP შევადარეთ კაზეინს, რომელიც უმეტესწილად გამოიყენება პროტეოლიზური აქტივობის განსაზღვრისთვის ხელმისაწვდომობის გამო. ცდისთვის დაიტესტა სხვადასხვა ფერმენტები, დადგენილ იქნა კინეტიკური პარამეტრები და განისაზღვრა აღნიშნულ სუბსტრატებზე ფერმენტული აქტივობა [93].

2.4.1. სხვადასხვა წყაროდან ფერმენტული ნიმუშების გამოყოფა.

გამომდინარე იქიდან რომ პროტეოლიზური ფერმენტები ხასიათდებიან სპეციფიურობით, კვლევისთვის გამოყენებულ იქნა პროტეოლიზური აქტივობის მქონე სხვადასხვა ბიოლოგიური სითხეები. მცენარეულ წყაროდ მინდვრისნემსას ექსტრაქტი. 10 გრამ მშრალ მცენარეს დაემატა 100 მლ 50 მმ კალიუმი ფოსფატის ბუფერი, pH 7.4. ჰომოგენიზატორის დახმარებით მოვახდინეთ ექსტრაქტის ჰომოგენიზირება, რის შემდეგმაც სინჯი დაცენტრიფუგა 1500 rpm-ზე 15 წუთის განმავლობაში. სარეაქციოდ აღებული იქნა 10 μ ლ ექსტრაქტი. სოკოვანი წარმოშობი პროტეაზების წყაროდ გამოყენებული იყო 10 μ ლ *Aspergillus Oryzae*-ს კულტურალური სითხე. რაც შეეხება კომერციულ პროტეაზას, 1 ქიმორალის ტაბლეტი, რომელიც უდრის 121000 USPj, წვრილად დაქუცმაცდა და გაიხსნა 10 მლ 50 მმ კალიუმის ფოსფატურ ბუფერში, pH 7.4, რის შემდეგაც დაცენტრიფუგირდა 1500 rpm-ზე 15 წუთის განმავლობაში, სარეაქციოდ აღებულ იქნა 10 მკლ სუპერნატანტი [193].

2.4.2. ფერმენტ სუბსტრატული დამოკიდებულების განსაზღვრა.

ფერმენტის კინეტიკური პარამეტრების დასადგენად გამოიყენებულ იქნა EWMP სუბსტრატის შემდეგი კონცენტრაციები: 2,5-50 მგ/მლ (1,5-29,6 მიკრომოლი). სარეაქციოდ გამოყენებული იქნა 50 მმ კალიუმის ფოსფატური ბუფერი, pH 7.4. ცდის მსვლელობის დროს სუბსტრატის სხვადასხვა კონცენტრაციას დაემატა 0,01 მლ ფერმენტი, სინჯები მოთავსდა თერმოსტატში 30 წუთის განმავლობაში 25°C -ზე. ინკუბაციის შემდეგ, რეაქცია შეჩერდა ნიმუშების ყინულში მოთავსებით. სარეაქციო ნარევეები დაცენტრიფუგირდა 1500 rpm-ზე ეპენდორფის ცენტრიფუგის გამოყენებით. მიღებულ სუპერნატანტებს დაემატა Na₂CO₃ და Folin & Ciocalteu რეაგენტი (პროპორციით 2:5:1), და ინკუბირებულ იქნა 37°C-ზე 30 წუთის განმავლობაში [194]. ოპტიკური მაჩვენებელი-OD გაიზომა 660 ნმ-ზე UV-VIS სპექტროფოტომეტრის გამოყენებით (პერკინ ელმერი, აშშ) რეაგენტ ბლენქის წინააღმდეგ. ჩვენს შემთხვევაში, თითოეული ნიმუშისთვის, კონტროლად იქნა აღებული 30 წუთის განმავლობაში ინკუბირებული სუბსტრატის ნიმუშები ფერმენტის გარეშე. მოცემული ტიპის კონტროლი იქნა აღებული ფერმენტის შთანთქმის მაჩვენებლის გამოსარიცხად.

2.4.3. ფერმენტული აქტივობის განსაზღვრა სხვადასხვა ბიოლოგიურ ექსტრაქტებში

სუბსტრატის კონცენტრაციის დადგენის შემდგომ განისაზღვრა სუბსტრატის ხსნადობა დროში და დაყენდა პროტეაზული აქტივობა გარკვეულ ბიოლოგიურ ექსტრაქტებზე. კვლევისთვის გამოვიყენეთ კომერციული პროტეაზა ქიმორალი, მინდვრისნემსას ექსტრაქტი, სოკოვანი წარმოშობის პროტეაზა. რეაქციისთვის აღბულ იქნა 30 მგ EWMP სუბსტრატი, რეაქციის მსვლელობა ჩატარდა ზემოთ მოცემული ფერმენტული კინეტიკის განსაზღვრის ანალოგიურად. ფერმენტის აქტივობის ერთეულებში გამოსათვლელად (ერთეული/მლ და ერთეული/მგ-ზე) გამოყენებული იყო შემდეგში

ფორმულები:

$$A(U) = \frac{[PR]_{\mu mol} * [V_t]_{ml}}{[R_t]_{min} * [V_m]_{ml}}$$

$$A(U / ml) = \frac{[PR]_{\mu mol} * [V_t]_{ml}}{[R_t]_{min} * [V_m]_{ml} * [V_E]_{ml}} = \frac{A(U)}{[V_E]_{ml}}$$

$$A(U / mg) = \frac{A(U / ml)}{E(mg / ml)}$$

$[PR]_{\mu mol}$ – პროდუქტი მიკრომოლებში

$[V_t]_{ml}$ – რეაქციის საერთო მოცულობა მიკრომოლებში

$[R_t]_{min}$ – რეაქციის დრო წუთებში

$[V_m]_{ml}$ – კიუვეტის საზომი მოცულობა მილილიტრებში

$[V_E]_{ml}$ – ფერმენტის მოცულობა მილილიტრებში

(სადისერტაციო თემის ფარგლებში ჩატარებული კვლევის მესამე ეტაპი)

2.5. კოლორიმეტრული მეთოდით უჯრედშიდა ლიზატში პროტეოლიზური აქტივობისა და პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორის განსაზღვრა

მიკორსკოპული სოკოებიდან გამოყოფილ საკვლევ ლიზატებში პროტეოლიზური აქტივობა განისაზღვრა სადოქტორო კვლევის ფარგლებში შექმნილი კოლორიმეტრული მეთოდით. სარეაქციოდ გამოყენებული იქნა 50 მმ კალიუმის ფოსფატური ბუფერი, pH 7.4. ცდის მსვლელობის დროს EWMP სუბსტრატს 50 მგ/მლ (29,6 მიკრომოლი) დაემატა 0,1 მლ საკვლევი ხსნარები (K1, T1, NL-50, NL-51 Gz 9-10, Gz 9-6, Gz II-12), სინჯები მოთავსდა თერმოსტატში 30 წუთის განმავლობაში 25°C -ზე. ინკუბაციის შემდეგ, რეაქცია შეჩერდა ნიმუშების ცინულში მოთავსებით. სარეაქციო ნარევეები დაცენტრიფუგირდა 1500 rpm-ზე ცენტრიფუგის გამოყენებით. მიღებულ სუპერნატანტებს დაემატა Na₂CO₃ და Folin & Ciocalteu რეაგენტი (პროპორციით

2:5:1), და ინკუბირებულ იქნა 37°C-ზე 30 წუთის განმავლობაში [194]. ოპტიკური მაჩვენებელი გაიზომა 660 ნმ-ზე UV-VIS სპექტროფოტომეტრის გამოყენებით (პერკინ ელმერი, აშშ) საკონტროლო სინჯის წინააღმდეგ. ჩვენს შემთხვევაში, თითოეული ნიმუშისთვის, კონტროლად იქნა აღებული 30 წუთის განმავლობაში ინკუბირებული სუბსტრატის ნიმუშები ფერმენტის გარეშე. მოცემული ტიპის კონტროლი იქნა აღებული ფერმენტის შთანთქმის მაჩვენებლის გამოსარიცხად.

პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორების განსაზღვრა განხორციელდა იგვე მეთოდით, თუმცა ამ შემთხვევაში საკვლევი ხსნარები დავამატეთ კომერციულ პროტეაზას მათი ინჰიბიტორების მიზნით (მოცულობა 2:1), დავაყოვნეთ 30 წუთი საინკუბაციოდ რის შემდეგაც ჩატარდა ცდა ზემოთ მოცემული თანმიმდევრობით.

2.6. უჯრედშიდა ლიზატებში პროტეოლიზური აქტივობის განსაზღვრა გელ-დიფუზიური მეთოდით

კაზეინის ან უცხიმო რძის ფხვნილის გელ-დიფუზიური მეთოდი საშუალებას იძლევა განისაზღვროს პროტეოლიზური აქტივობა სხვადასხვა ტიპის ბიოლოგიურად აქტიურ ნაერთებში. მეთოდის მთავარი პრინციპია აგარში ჩაპოლიმერიზდეს სუბსტრატი, რომელზეც იმოქმედებს ფერმენტი. კაზეინი, რძის მთავარი ცილა, არის მაკრომოლეკულა, რომელიც შედგება პეპტიდური ბმებით (CO—NH) დაკავშირებული ამინომჟავებისგან. პროტეოლიზურ ფერმენტებს შესწევთ უნარი გახლიჩონ მოცემული ტიპის ბმები და მივიღოთ პოლიპეპტიდები დიპეპტიდები ან ამინომჟავები. აგარზე წარმოქმნილი პროტეოლიზური (გამჭვირვალე) ზონა ფერმენტული აქტივობის დამადასტურებელია [196].

აღნიშნული მეთოდით მიკროსკოპული სოკოების მყარფაზოვანი ფერმენტაციის შედეგად მიღებულ უჯრედშიდა ლიზატში არსებული პროტეოლიზური ფერმენტების განსაზღვრისთვის სუბსტრატად აღებულ იქნა 1 % კაზეინი და უცხიმო რძის ფხვნილი, აღნიშნული სუბსტრატები

ჩაპოლიმერიზდა 1 % აგაროზის გელში (პეტრის ფინჯნებში). გელის გამყარების შემდგომ ამოჭრილ იქნა რგოლები დიამეტრით 3 მმ და შეტანილ იქნა 10 მკლ საკვლევი ხსნარები. პეტრის ფინჯნები 18 საათის განმავლობაში საინკუბაციოდ მოთავსდა 37°C-ზე [197, 198].

2.7. უჯრედშიდა ლიზატებში პროტეოლიზური ინჰიბიტორული თვისების განსაზღვრა გელ-დიფუზიური მეთოდით

გელ-დიფუზიური მეთოდი საშუალებას იძლევა სხვადასხვა საკვლევი სინჯებში ვიზუალურად დადგინდეს ინჰიბიტორული აქტივობა. მეთოდის მთავარი პრინციპია აგარში ჩაპოლიმერიზდეს სუბსტრატი, ამოიჭრას რგოლები როგორც ფერმენტის ასევე წინასწარ ინკუბირებული ფერმენტს დამატებული ინჰიბიტორული აქტივობის მქონე ნივთიერებისთვის. ინკუბაციის შემდგომ ინჰიბიტორის არსებობის შემთხვევაში საკონტროლო ფერმენტულ ხსნართან შედარებით არ უნდა დაფიქსირდეს გამჭირვალე ზონის წარმოქმნა [199].

კულტურალური სითხეების პროტეაზების ინჰიბიტორული თვისების განსაზღვრისთვის სუბსტრატად აღებული იქნა 1 % უცხიმო რძის ფხვნილი, აღნიშნული სუბსტი ჩაპოლიმერიზდა 1 % აგაროზის გელში (პეტრის ფინჯნებში). გელის გამყარების შემდგომ ამოჭრილ იქნა რგოლები დიამეტრით 3 მმ და შეტანილ იქნა 20 მკლ საკვლევი ხსნარები. პეტრის ფინჯნები 18 საათის განმავლობაში საინკუბაციოდ მოთავსდა 37°C-ზე

2.8. საერთო ფენოლური ნაერთების განსაზღვრა სპექტროფოტომეტრულად ფოლინ -ჩიკოლტეს მეთოდით

ფოლინ - ჩიკოლტეს მეთოდი ფართოდ გამოიყენება მცენარეული წარმოშობის საკვებსა და ბიოლოგიურ ნიმუშებში ფენოლების/პოლიფენოლების შემცველობის დასადგენად. მეთოდში გამოყენებული რეაგენტი შეიცავს ფოსფო-მოლობდენისა ($H_3 PMO_{12}O_{40}$) და ფოსფო-ვოლფრამის ($H_3 PW_{12}O_{40}$) მჟავას კომპლექსებს. აღნიშნული მჟავები ტუტე გარემოში ურთიერთქმედებენ ფენოლურ ნაერთებთან, რის შედეგადაც მიიღბა ლურჯი შეფერილობა. ფერთა

ინტენსივობა იზომება სპექტრომეტრულად 690-710 ნმ-ზე [194].

საერთო ფენოლური ნაერთების დასადგენად 350 მკლ საკვლევ ხსნარებს დაემატა 750 მკლ 20% Na₂CO₃ და 150 მკლ ფოლინ-ჩიკოლტეს რეაგენტი. სინჯები მოთავსდა საინკუბაციოდ თერმოსტატში 37°C-ზე სიბნელეში, 30 წუთის განმავლობაში. ინკუბაციის გასვლის შემდგომ სინჯები გაიზომა 660 ნმ-ზე სპექტროფოტომეტრზე საკონტროლო ხსნარის მიმართ.

2.9 სიმსივნური ქსოვილის აპოპტოზური აქტივობის განსაზღვრა

ELISA ტესტით

ELISA წარმოადგენს ფერმენტ დაკავშირებული იმუნოსორბენტული ანალიზს, რომლის საშუალებითაც მყარ ფაზაზე მიმდინარეობს ანტიგენ ანტისხეულის სპეციფიკური დაკავშირება, ამ დაკავშირების აღმოჩენა კი ხდება ფერმენტ სუბსტრატული ურთიერთქმედების შედეგად წარმოქმნილი პასუხის კოლორიმეტრული გაზომვით .

ELISA ტესტი მიმდინარეობდა ორი დღის განმავლობაში. პირველ დღეს პოლისტირენის 96-ფოსოიან პლანშეტის თითოეულ ფოსოში ვამატებდით 100 მკლ პირველად ანტისხეულს, და მთელი ღამის განმავლობაში ვაინკუბირებდით მაცივარში 2 დან 8°C ზე .

მეორე დღეს პლანშეტს ვრეცხავდით PBS-ით ოთხჯერ და შემდგომ ვამატებდით 200მკლ დამბლოკავ სითხეს (1% ხარის შრატის ალბუმინი), პლანშეტს ვათავსებდით ოთახის ტემპერატურაზე სანჯღრეველაზე (500rpm) 1 სთ-ის განმავლობაში. ინკუბაციის გასვლის შემდგომ პლანშეტს ისევ ოთხჯერ ვრეცხავდით PBS-თი და ვამატებდით 100 მკლ სხვადასხვა კონცენტრაციის სტანდარტულ ხსნარებს და საკვლევ სუპერნატანს შესაბამის ფოსოებში. ინკუბირება მიმდინარეობდა სანჯღრეველაზე (500rpm) 2 სთ-ის განმავლობაში ,ოთახის ტემპერატურაზე. ინკუბაციის გასვლის შემდეგ ისევ ვახდენდით ფოსოების ოთხჯერ გარეცხვას PBS-თი, და ვამატებდით 100მკლ მეორად ანტისხეულს, ვაინკუბირებდით სანჯღრეველაზე (500 rpm) 1 საათის განმავლობაში, ოთახის ტემპერატურაზე. ინკუბაციის გასვლის შემდეგ ისევ

ვრეცხავდით ოთხჯერ და ვამატებდით 100 მკლ კონიუგატს და ვაინკუბირებდით 30 წუთის განმავლობაში სანჯდრეველაზე (500rpm) ოთახის ტემპერატურაზე. ინკუბაციის გასვლის შემდეგ პლანშეტს ვრეცხავდით ხუთჯერ. გარეცხვის შემდეგ ვამატებდით 100 მკლ სუბსტრატულ ხსნარს (TMB) ინკუბირებას ვახდენდით სიბნელეში 15წთ-ის განმავლობაში. ინკუბაციის გასვლის შემდგომ ვამატებდით 100 მკლ შემაჩერებელ ხსნარს 2N H₂SO₄ ს,რის შემდეგაც ვზომავდით ოპტიკურ მაჩვენებელს 450 nm-ზე

2.10. მიკროსკოპული სოკოების იდენტიფიცირება

კვლევის ფარგლებში იდენტიფიცირება ჩტარდა საკვლევი კულტურის მაკრო და მიკროსკოპული თვისებების შეჯერებით უკვე ცნობილი სოკოების ადრე აღწერილ თვისებებთან შედარებით. ასევე განისაზღვრა გაზრდილი კულტურის ზედაპირის ფერი, ზრდის სიჩქარის შესაბამისად კოლონიის დიამეტრი და რეპროდუქციული ორგანოებისა და აღნაგობის თავისებურებები.

(სადისერტაციო თემის ფარგლებში ჩატარებული კვლევის მეოთხე ეტაპი)

2.11. მუტაგენები - როგორც ბიოინჟინრული მეთოდი ორგანიზმის ბიოსინთეზის გასაძლიერებლად

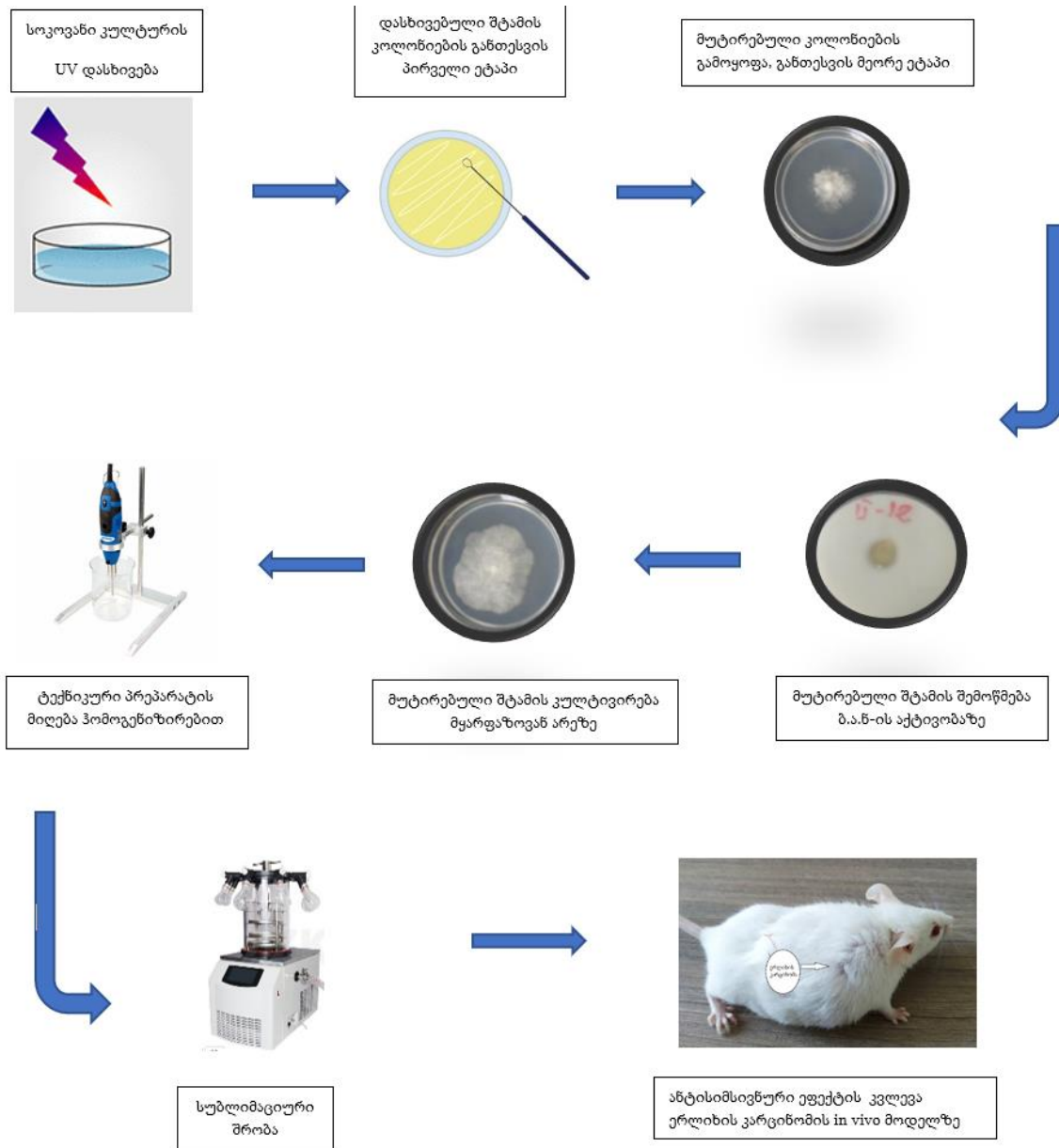
გამომდინარე იქიდან, რომ მუტაგენების საშუალებით შესაძლებელია გენეტიკური მუტაციების გამოწვევა და გარკვეულწილად ფიზიკო/ქიმიური თვისების გაუმჯობესება გადავწყვიტეთ ჩაგვეტარებინა ფიზიკური მუტაგენები შერჩეულ შტამზე .

გაზრდილ საკვლევ მიკროსკოპული სოკოს **Gz II-12** დავამატეთ 10 მლ 0.1 % იანი ტრიტონ X-100-ს ხსნარი, სინჯი შევანძღრიეთ ერთგვაროვანი სპოროვანი სუსპენზიის მიღების მიზნით. შემდგომ, მიღებული სუსპენზია განვაზავეთ 10⁻⁵-ჯერ და 2 მლ გადავიტანეთ სტერილურ პეტრის ფინჯანში UV დასხივებისთვის. მუტაგენები ჩატარდა დროის სხვადასხვა დიაპაზონში (2.5, 5, 10, 15, 20, 30, 40 წთ), სხვადასხვა დაშორებაზე (5, 10, 15, 20, 25 სმ) 240 ნმ-ზე.

UV დასხივებითი სინჯები (0.1 მლ) ჩაითესა მყარ საკვებ არეზე, აგარიდან ფოსფატურ ბუფერში ფერმენტების ექსტრაქციის შემდგომ განისაზღვრა პროტეოლიზური აქტივობა კოლორიმეტრული მეთოდის გამოყენებით.

სადოქტორო თემის ფარგლებში ჩატარებული მუტაგენეზის ბიო-ინჟინრული სქემა შედგება რამდენიმე ეტაპისგან (იხ სქემა 1).

მუტირებული შტამიდან პრეპარატის სახით გამოვყავით ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთები, განვსაზღვრეთ ცილის რაოდენობა, ჩავატარეთ სკრინინგი როგორც პროტეოლიზურ აქტივობაზე ასევე პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორებზე, დავაკვირდით სიცოცხლის ხანგრძლივობას.



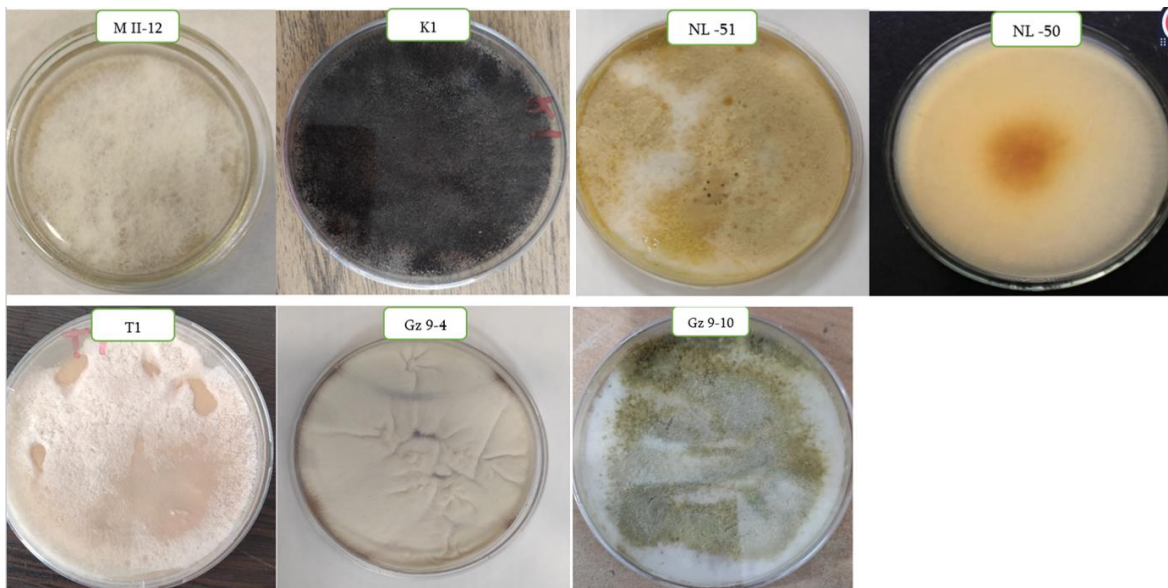
სქემა 1. მუტაგენეზის ბიო-ინჟინრული სქემა

3. შედეგები და მათი განსჯა

(სადისერტაციო თემის ფარგლებში ჩატარებული კვლევის პირველი ეტაპის შედეგები და მათი განსჯა)

3.1 საკვლევი მიკროსკოპული სოკოები

ანტისიმსივნური ეფექტის კვლევისთვის გამოყოფილ იქნა მიკროსკოპული სოკოები (იხილეთ სურათი 1), რომელთაც დაერქვათ შემდეგი სახელწოდება: M II-12, K1, NL-51, NL-50, T1, Gz 9-4, Gz 9-10.



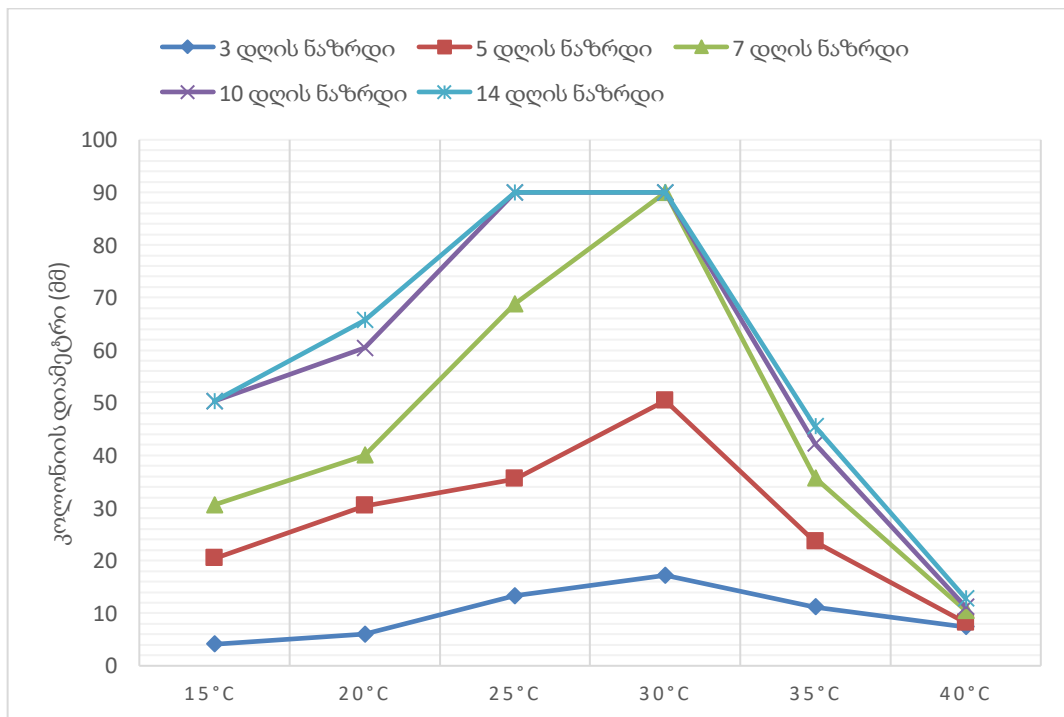
სურათი 1. სადოქტორო კვლევის ფარგლებში გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოები.

3.2 საკვები არისა და ტემპერატურის გავლენა მიკროსკოპული სოკოების ზრდაზე

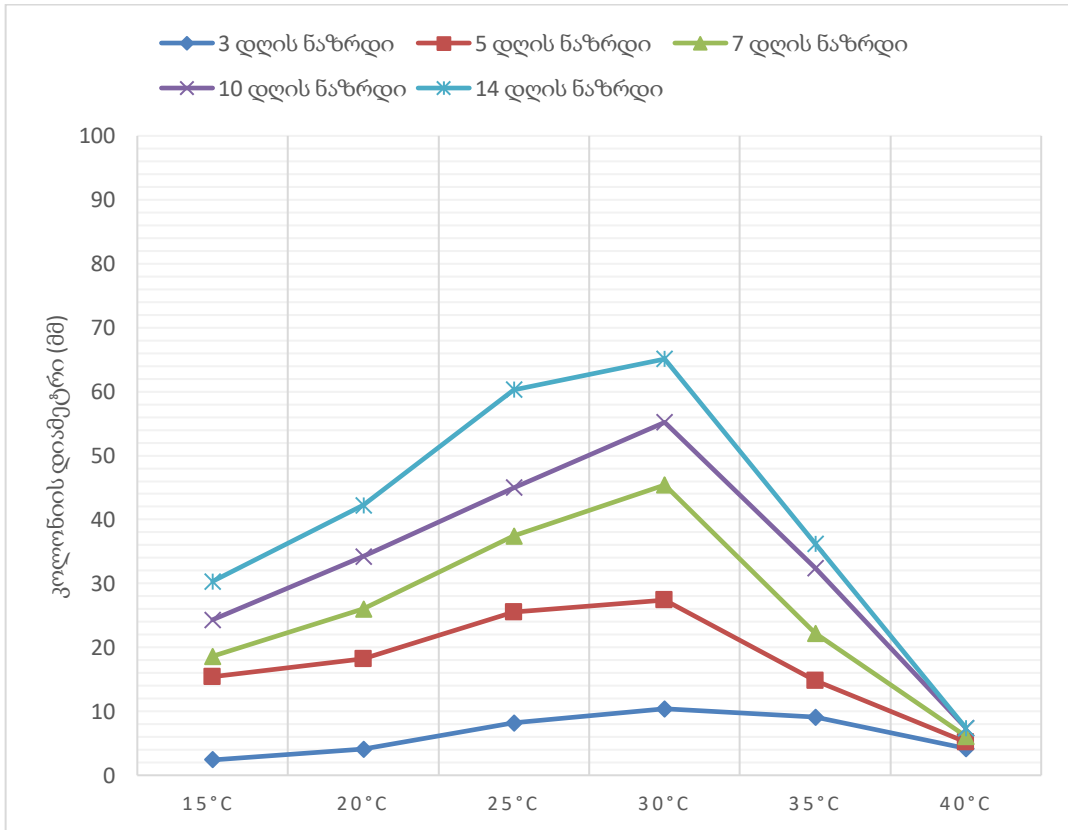
ჩაპეკის, საბუროს და უნივერსალურ საკვებ არეებზე კულტივირებული სოკოების ზრდის მაჩვენებელი განისაზღვრა ჩათესვიდან III, V, VII, X, XIV დღეს. გაზრდილი კოლონიების დიამეტრის გაზომვისთვის საწყისი ინოკულუმის ცენტრში გაივლო ორი პერპენდიკულარული ხაზი, რომელთა დიამეტრები მილიმეტრებში გაიზომა კალიპერის გამოყენებით და გამოთვლილ იქნა საშუალო მაჩვენებელი. მონაცემთა ანალიზისთვის გამოყენებული იყო SPSS (ვერსია 10.0). მიღებული მონაცემები ასახულია როგორც ცხრილის სახით ასევე გრაფიკულად (იხილეთ ცხრილი 1-7. გრაფიკი 1-21

ცხრილი 1. სხვადასხვა საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული T1 მიკროსკოპული სოკო

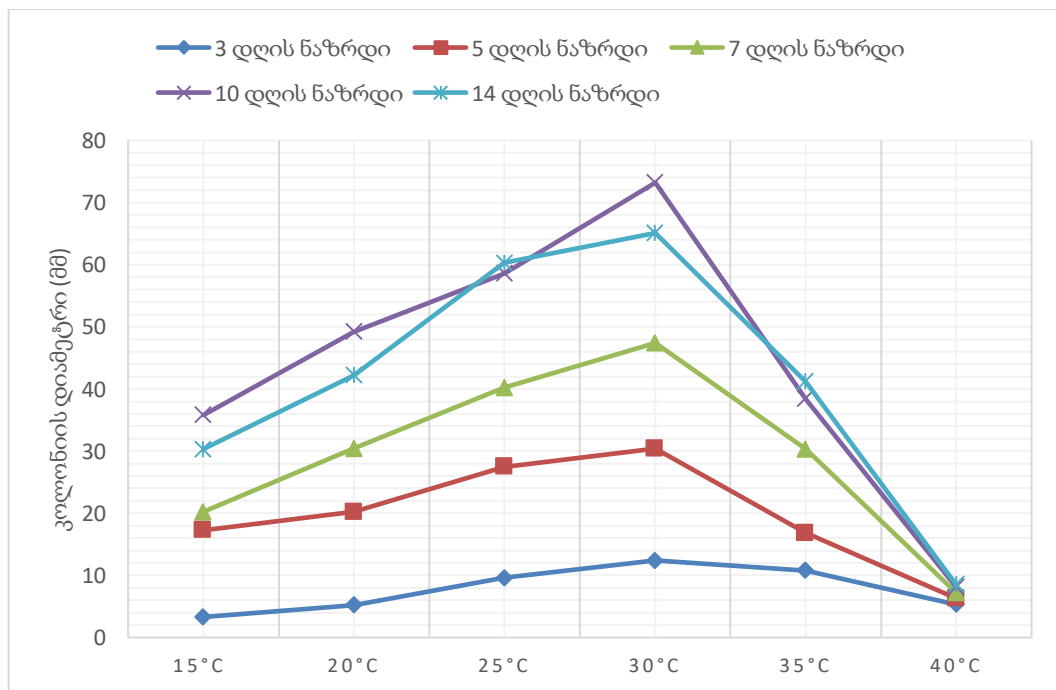
დასახელება	ტემპერატურა	3 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	5 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	7 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	10 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	14 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ
ჩაპეკის საკვები არე	15°C	4.1	20.4	30.6	50.3	50.3
	20°C	6	30.4	40	60.4	65.7
	25°C	13.3	35.5	68.8	90	90
	30°C	17.2	50.4	90	90	90
	35°C	11.2	23.6	35.7	42.2	45.5
	40°C	7.4	8.2	10.5	11.2	12.8
საბუროს საკვები არე	15°C	2.4	15.4	18.6	24.3	30.3
	20°C	4.1	18.2	26	34.2	42.2
	25°C	8.2	25.5	37.4	45	60.3
	30°C	10.4	27.4	45.4	55.2	65.1
	35°C	9.1	14.8	22.2	32.4	36.2
	40°C	4.2	5.2	6.1	7.4	7.4
უნივერსა ლური საკვები არე	15°C	3.3	17.3	20.2	35.8	30.3
	20°C	5.2	20.2	30.4	49.2	42.2
	25°C	9.6	27.5	40.2	58.6	60.3
	30°C	12.4	30.4	47.4	73.2	65.1
	35°C	10.8	16.8	30.3	38.4	41.2
	40°C	5.3	6.3	7.2	8.1	8.5



გრაფიკი 1. ჩაპეკის საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული T1 მიკროსკოპული სოკო



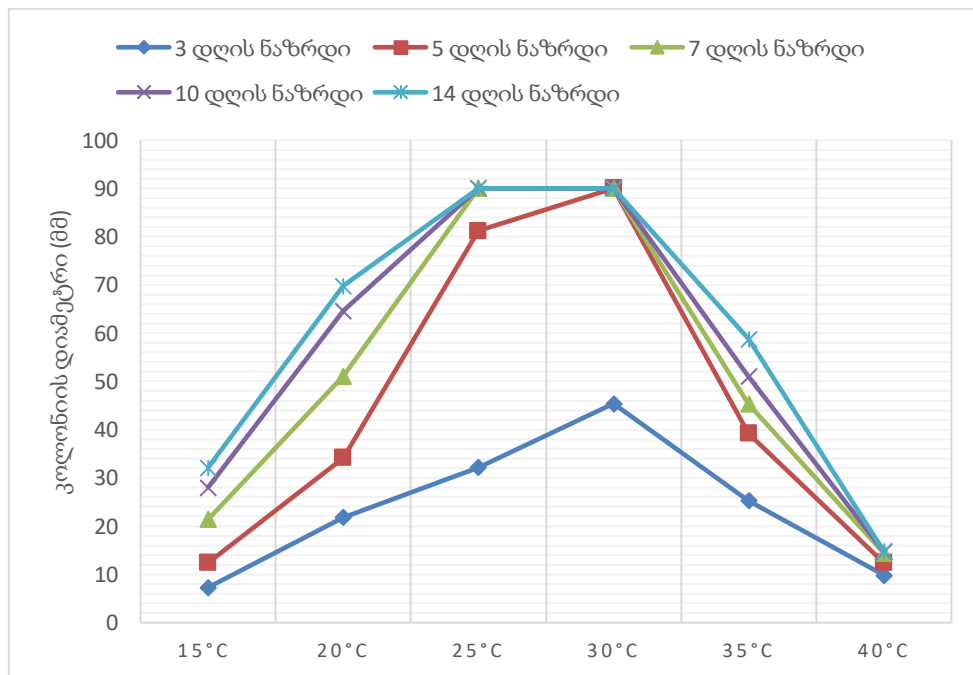
გრაფიკი 2. საბუროს საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული T1 მიკროსკოპული სოკო



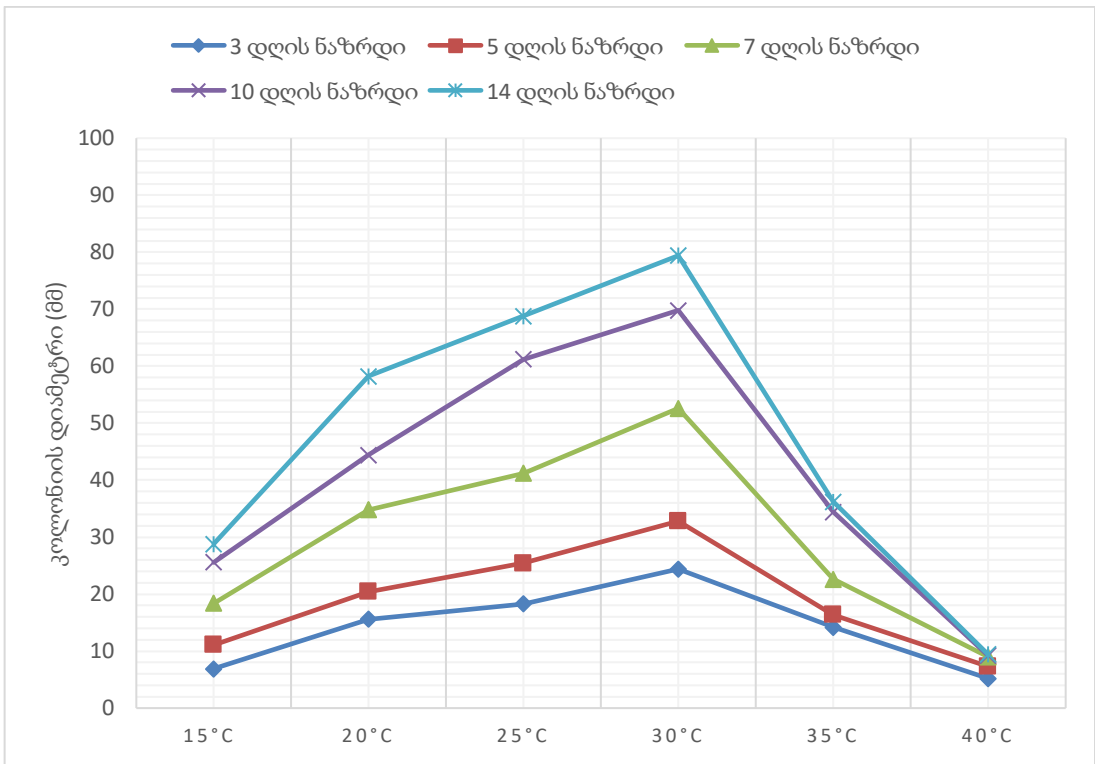
გრაფიკი 3. უნივერსალურ საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული T1 მიკროსკოპული სოკო

ცხრილი 2. სხვადასხვა საკვებ არეზე კულტივირებული K1 მიკროსკოპული სოკო

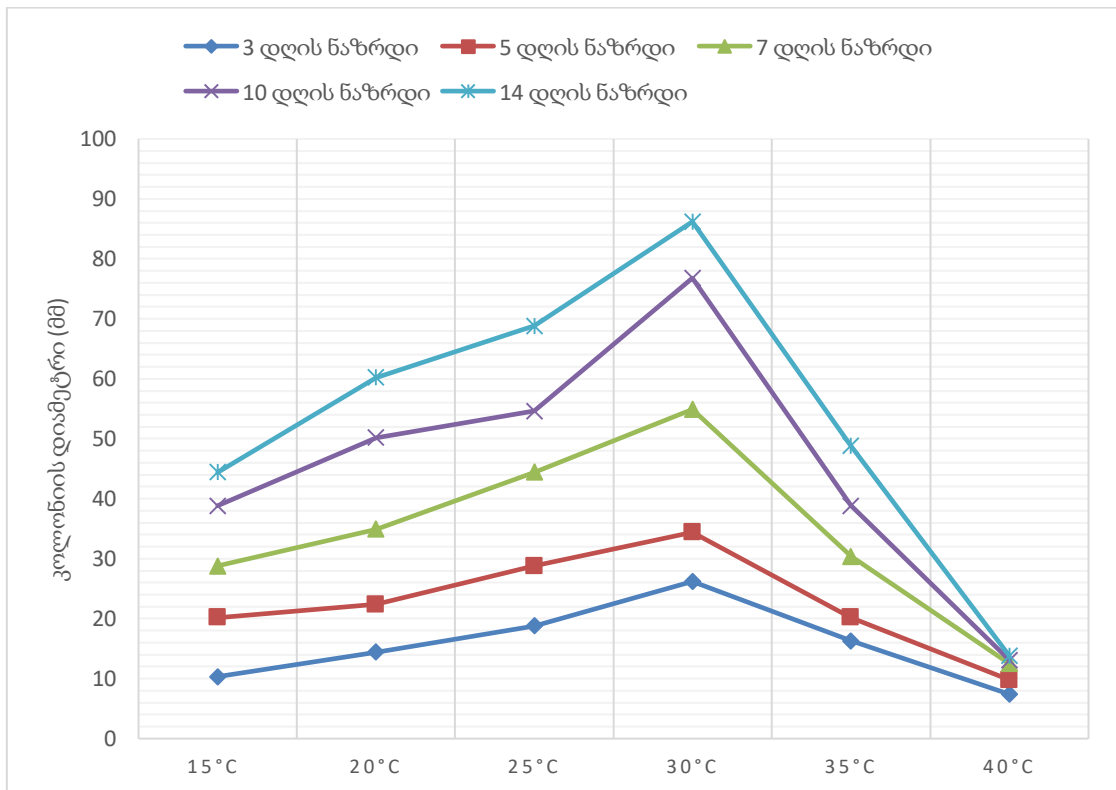
დასახელება	ტემპერატურა	3 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	5 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	7 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	10 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	14 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ
ჩაპეკის საკვები არე	15°C	7.3	12.4	21.4	28	32.1
	20°C	21.8	34.2	51.1	64.6	69.8
	25°C	32.2	81.2	90	90	90
	30°C	45.4	90	90	90	90
	35°C	25.3	39.2	45.3	51	58.8
	40°C	9.8	12.4	14.4	14.7	14.8
საბუროს საკვები არე	15°C	6.9	11.1	18.4	25.6	28.8
	20°C	15.6	20.4	34.8	44.4	58.2
	25°C	18.3	25.4	41.2	61.2	68.8
	30°C	24.4	32.8	52.6	69.8	79.4
	35°C	14.2	16.4	22.6	34.4	36.2
	40°C	5.2	7.3	9.0	9.2	9.4
უნივერსა ლური საკვები არე	15°C	10.3	20.2	28.8	38.8	44.4
	20°C	14.4	22.4	34.9	50.2	60.2
	25°C	18.8	28.8	44.4	54.6	68.8
	30°C	26.2	34.4	54.9	76.8	86.2
	35°C	16.3	20.2	30.4	38.8	48.8
	40°C	7.4	9.8	12.5	13.1	13.8



გრაფიკი 4. ჩაპეკის საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული K1 მიკროსკოპული სოკო



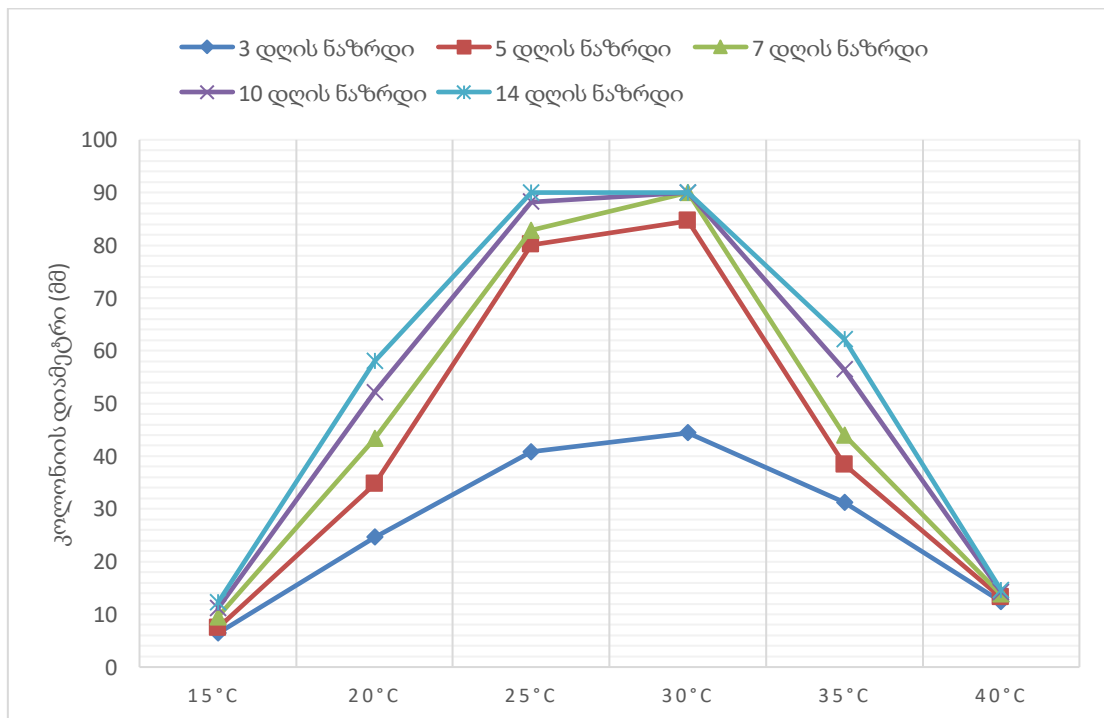
გრაფიკი 5. საბუროს საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული K1 მიკროსკოპული სოკო



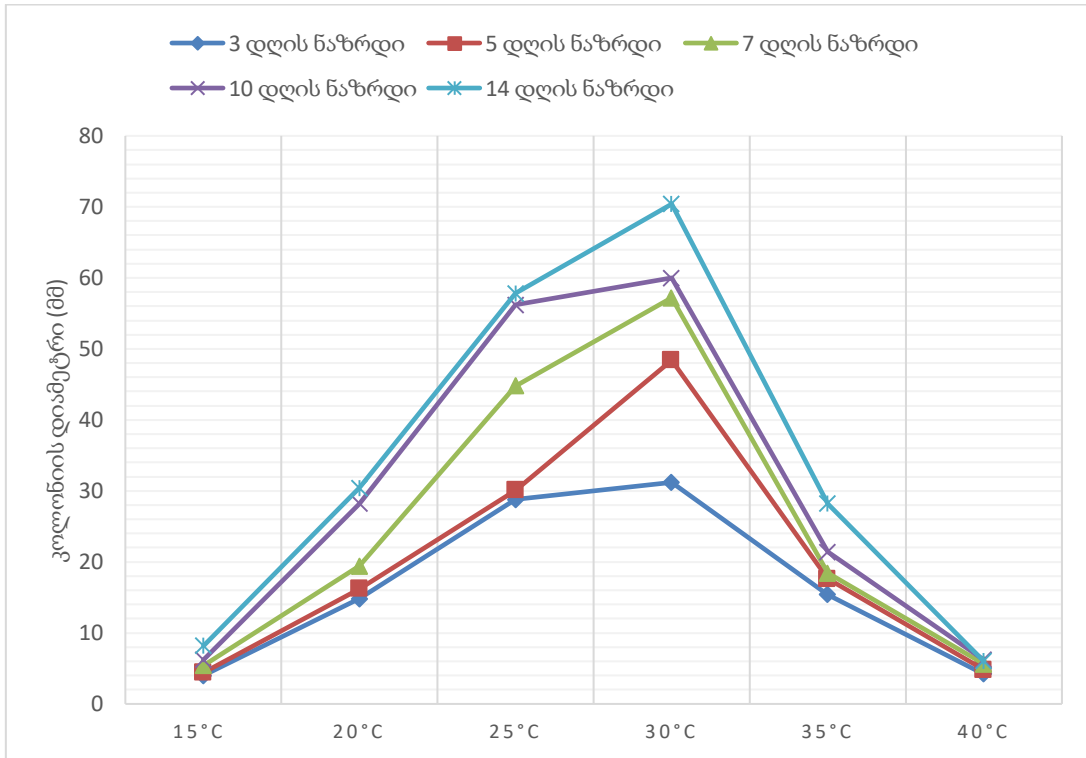
გრაფიკი 6. უნივერსალურ საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული T1 მიკროსკოპული სოკო

ცხრილი 3. ხვადასხვა საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული NL 50 მიკროსკოპული სოკო

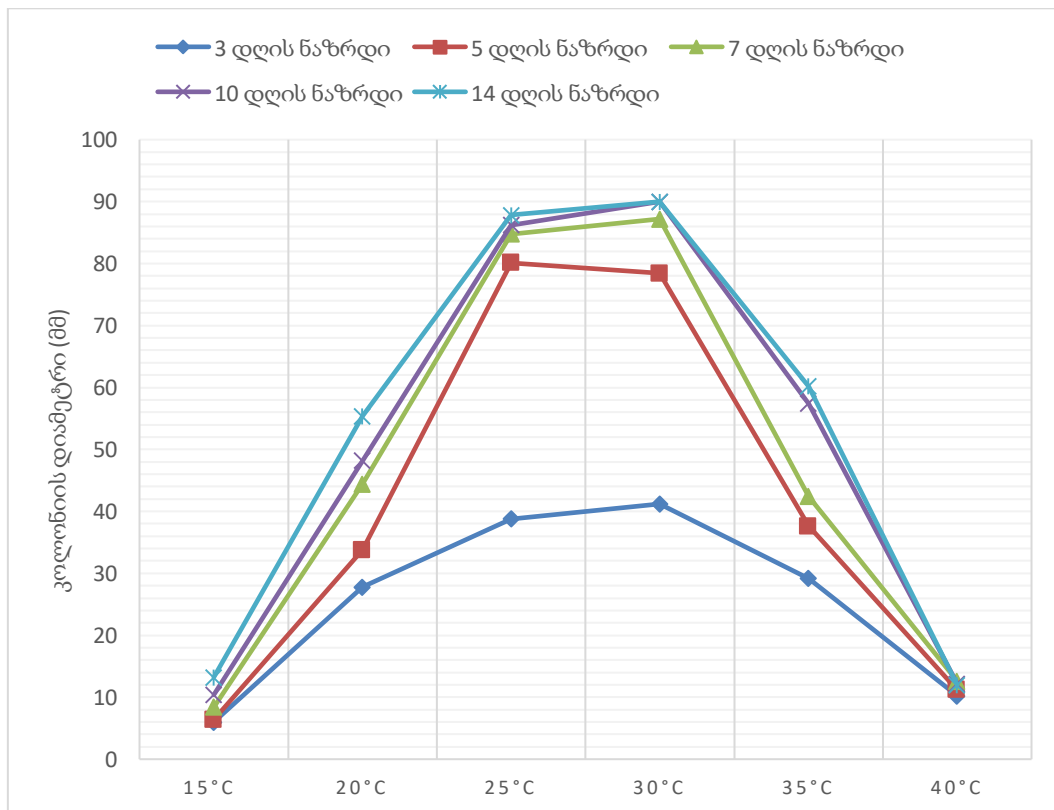
დასახელება	ტემპერატურა	3 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	5 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	7 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	10 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	14 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ
ჩაპეკის საკვები არე	15°C	6.4	7.4	9.5	11.1	12.2
	20°C	24.6	34.7	43.3	52.1	58
	25°C	40.8	80.1	82.8	88.2	90
	30°C	44.4	84.6	90	90	90
	35°C	31.2	38.4	44	56.4	62.2
	40°C	12.4	13.2	13.8	14.2	14.6
საბუროს საკვები არე	15°C	4.0	4.4	5.4	6.2	8.2
	20°C	14.8	16.2	19.4	28.2	30.4
	25°C	28.8	30.1	44.8	56.2	57.8
	30°C	31.2	48.4	57.2	60	70.4
	35°C	15.4	17.6	18.4	21.4	28.2
	40°C	4.2	4.8	5.6	6.2	6.0
უნივერსა ლური საკვები არე	15°C	6.0	6.4	8.4	10.4	13.2
	20°C	27.8	33.8	44.4	48.2	55.4
	25°C	38.8	80.1	84.8	86.2	87.8
	30°C	41.2	78.4	87.2	90	90
	35°C	29.2	37.6	42.4	57.4	60.2
	40°C	10.2	11.2	12.6	12.2	12.0



გრაფიკი 7. ჩაპეკის საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული NL 50 მიკროსკოპული სოკო



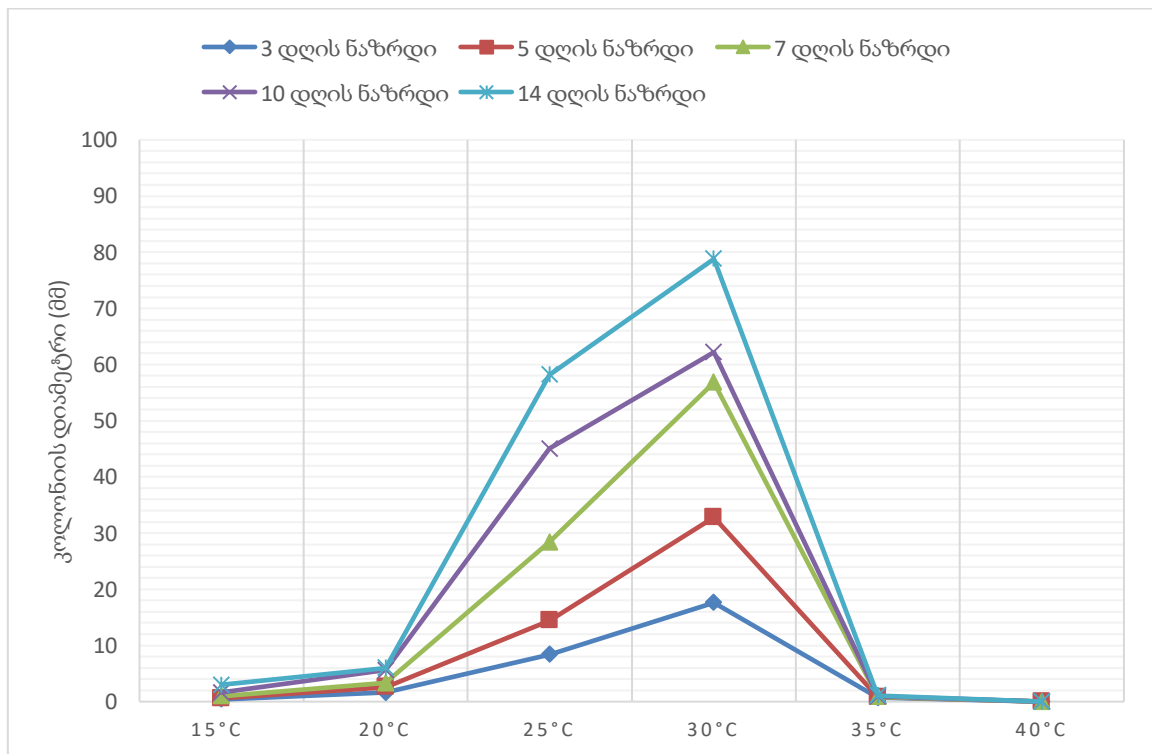
გრაფიკი 8. საბუროს საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული NL 50 მიკროსკოპული სოკო



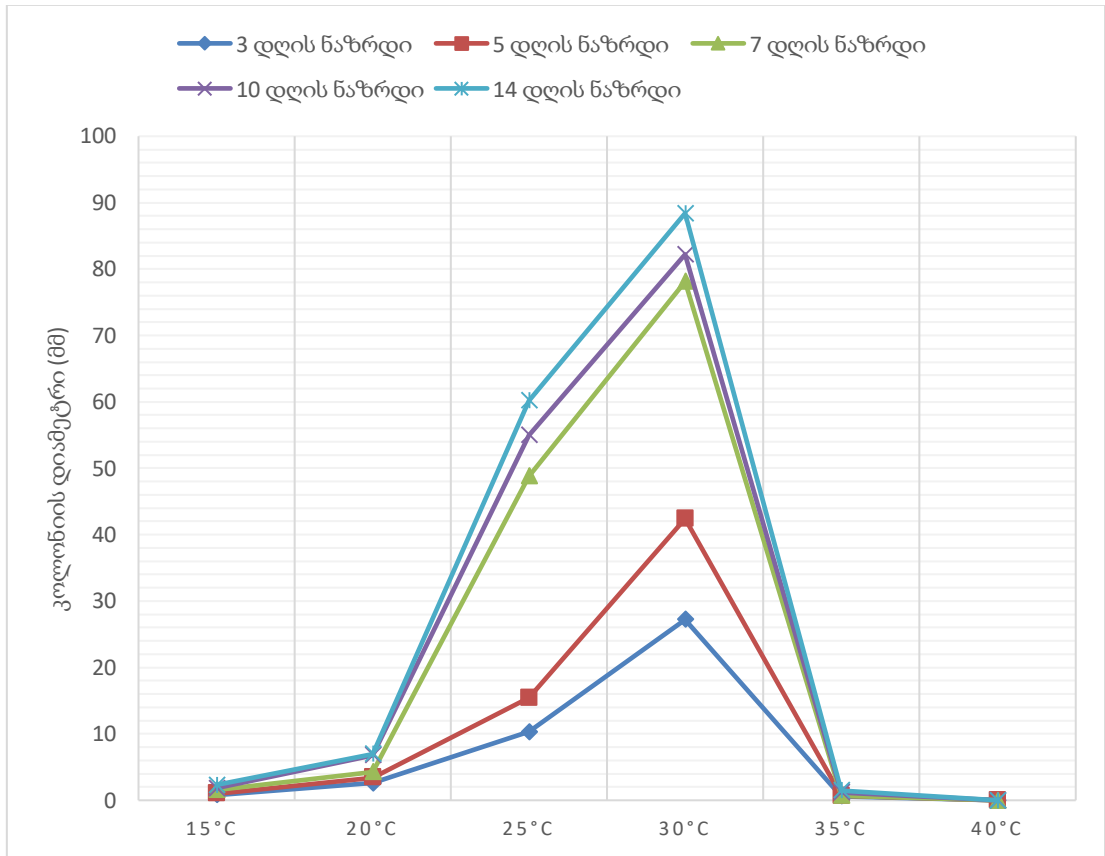
გრაფიკი 9. უნივერსალურ საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული NL 50 მიკროსკოპული სოკო

ცხრილი 4. სხვადასხვა საკვებ არეზე კულტივირებული NL 51 მიკროსკოპული სოკო

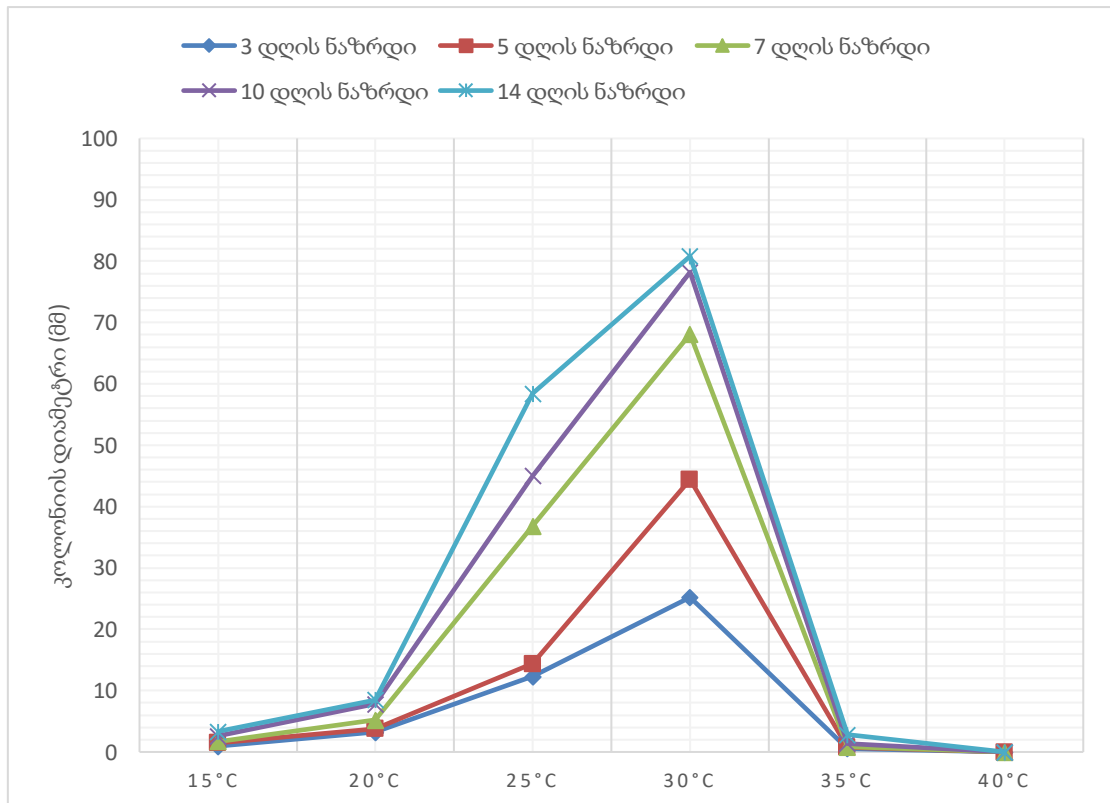
დასახელება	ტემპერატურა	3 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	5 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	7 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	10 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	14 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ
ჩაპეკის საკვები არე	15°C	0.4	0.6	1.0	1.6	3.0
	20°C	1.6	2.6	3.3	5.6	6.0
	25°C	8.4	14.4	28.4	45.0	58.2
	30°C	17.6	32.8	56.8	62.2	78.8
	35°C	0.72	0.81	0.88	0.92	1.1
	40°C	0	0	0	0	0
საბუროს საკვები არე	15°C	0.8	1.0	1.6	1.8	2.3
	20°C	2.6	3.4	4.3	6.8	7.0
	25°C	10.3	15.4	48.8	55.0	60.2
	30°C	27.2	42.4	78.1	82.2	88.4
	35°C	0.6	0.68	0.7	1.2	1.5
	40°C	0	0	0	0	0
უნივერსა ლური საკვები არე	15°C	0.9	1.5	1.7	2.6	3.3
	20°C	3.2	3.8	5.2	7.8	8.5
	25°C	12.3	14.4	36.8	45.0	58.4
	30°C	25.2	44.4	68.1	78.2	80.8
	35°C	0.55	0.78	0.8	1.4	2.8
	40°C	0	0	0	0	0



გრაფიკი 10. ჩაპეკის საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული NL 51 მიკროსკოპული სოკო



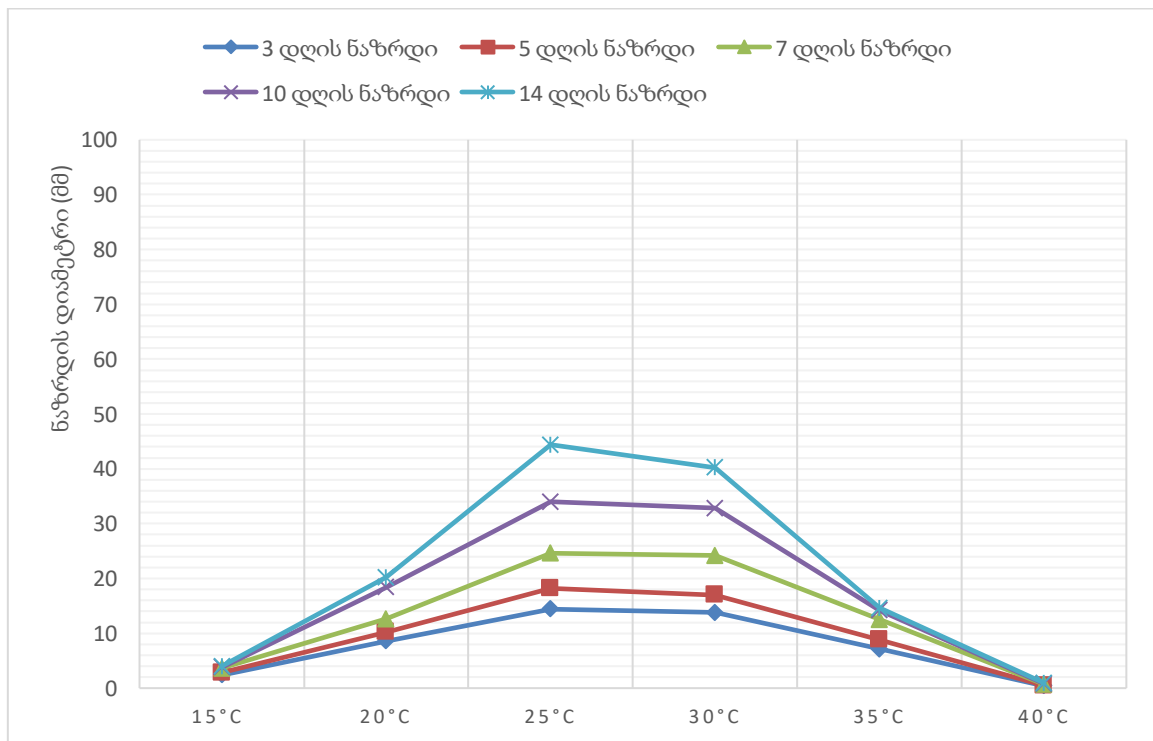
გრაფიკი 11. საბუროს საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული NL 51 მიკროსკოპული სოკო



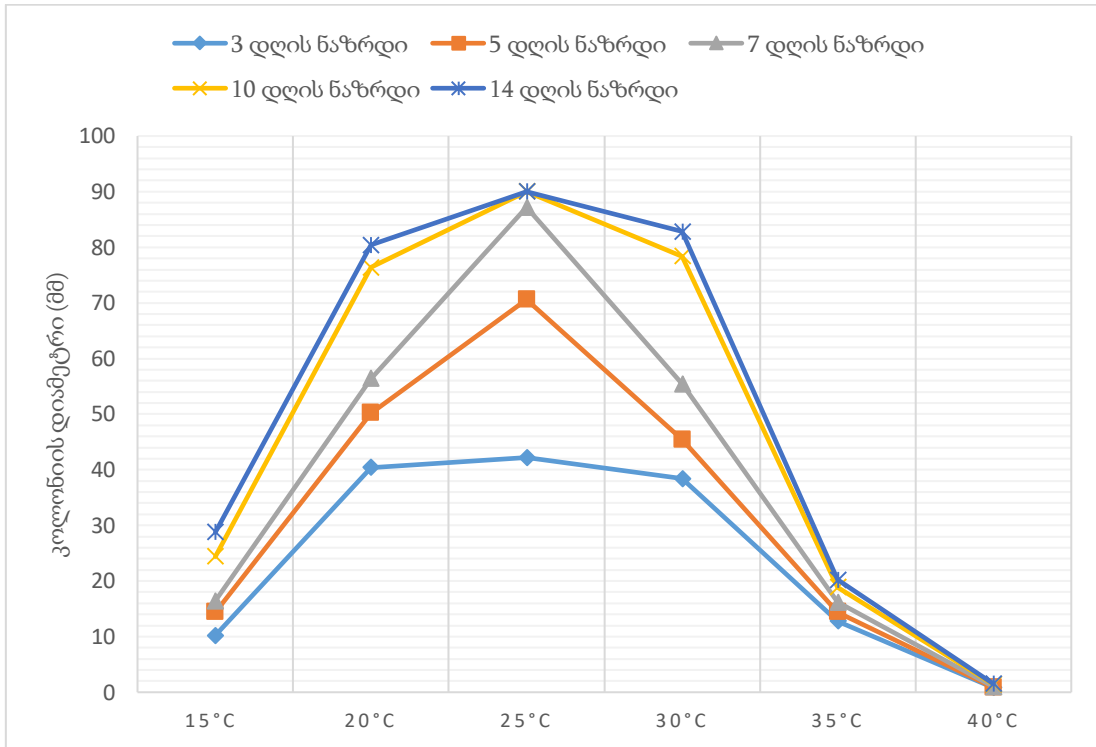
გრაფიკი 12. უნივერსალურ საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული NL 51 მიკროსკოპული სოკო

ცხრილი 5. სხვადასხვა საკვებ არეზე კულტივირებული M II-12 მიკროსკოპული სოკო

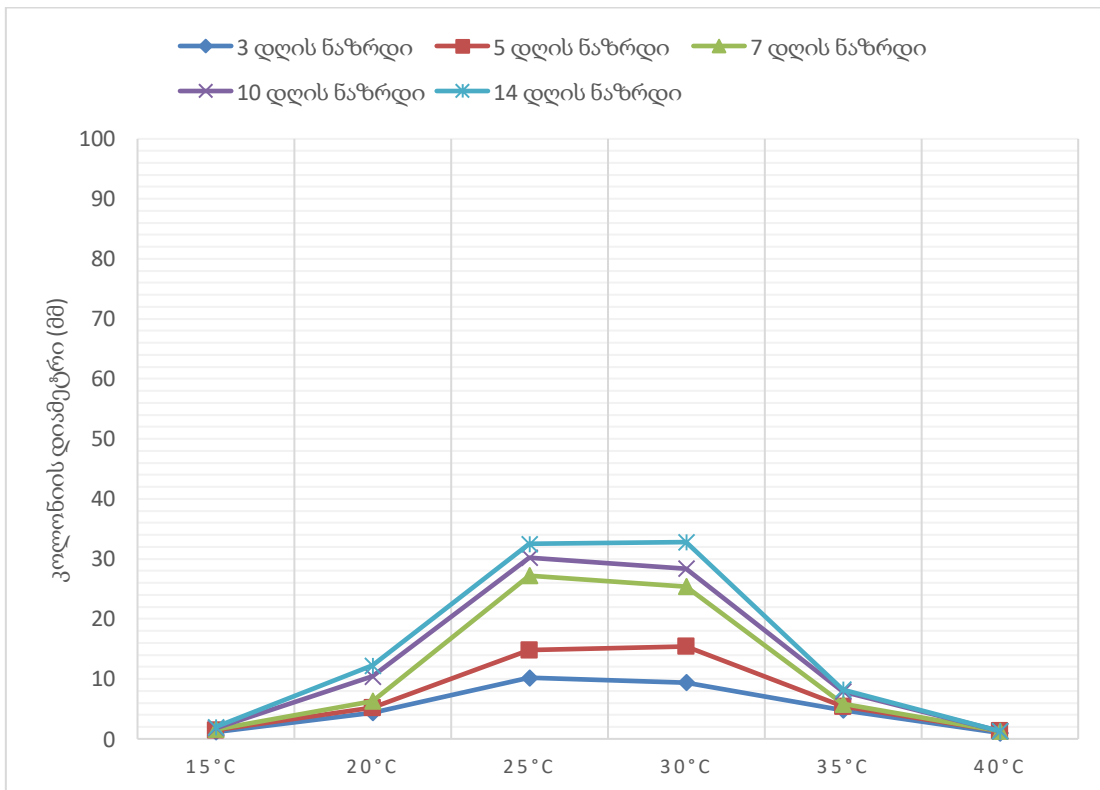
დასახელება	ტემპერატურა	3 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	5 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	7 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	10 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	14 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ
ჩაპეკის საკვები არე	15°C	2.4	2.8	3.6	3.8	4.0
	20°C	8.6	10.2	12.6	18.4	20.2
	25°C	14.4	18.2	24.6	34.0	44.4
	30°C	13.8	17.0	24.2	32.8	40.2
	35°C	7.1	8.8	12.5	14.2	14.6
	40°C	0.4	0.48	0.7	0.8	0.94
საბუროს საკვები არე	15°C	10.2	14.4	16.4	24.4	28.8
	20°C	40.4	50.2	56.4	76.4	80.4
	25°C	42.2	70.6	87.2	90	90
	30°C	38.4	45.4	55.4	78.4	82.8
	35°C	12.8	14.4	16.2	18.9	20.2
	40°C	0.8	0.84	1.0	1.4	1.5
უნივერსა ლური საკვები არე	15°C	1.2	1.44	1.62	1.84	2.0
	20°C	4.4	5.2	6.3	10.4	12.2
	25°C	10.2	14.8	27.2	30.2	32.5
	30°C	9.4	15.4	25.4	28.4	32.8
	35°C	4.8	5.4	5.8	7.9	8.2
	40°C	1.0	1.3	1.3	1.3	1.3



გრაფიკი 13. ჩაპეკის საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული M II-12 მიკროსკოპული სოკო



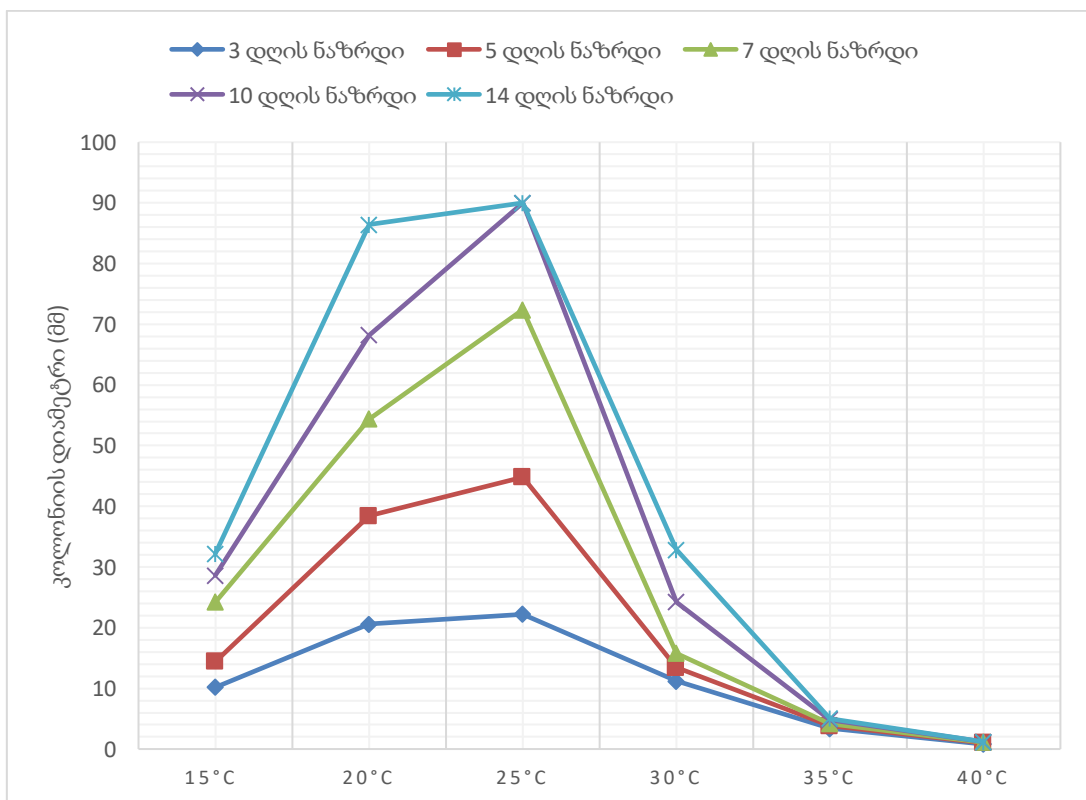
გრაფიკი 14. საბუროს საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული M II-12 მიკროსკოპული სოკო



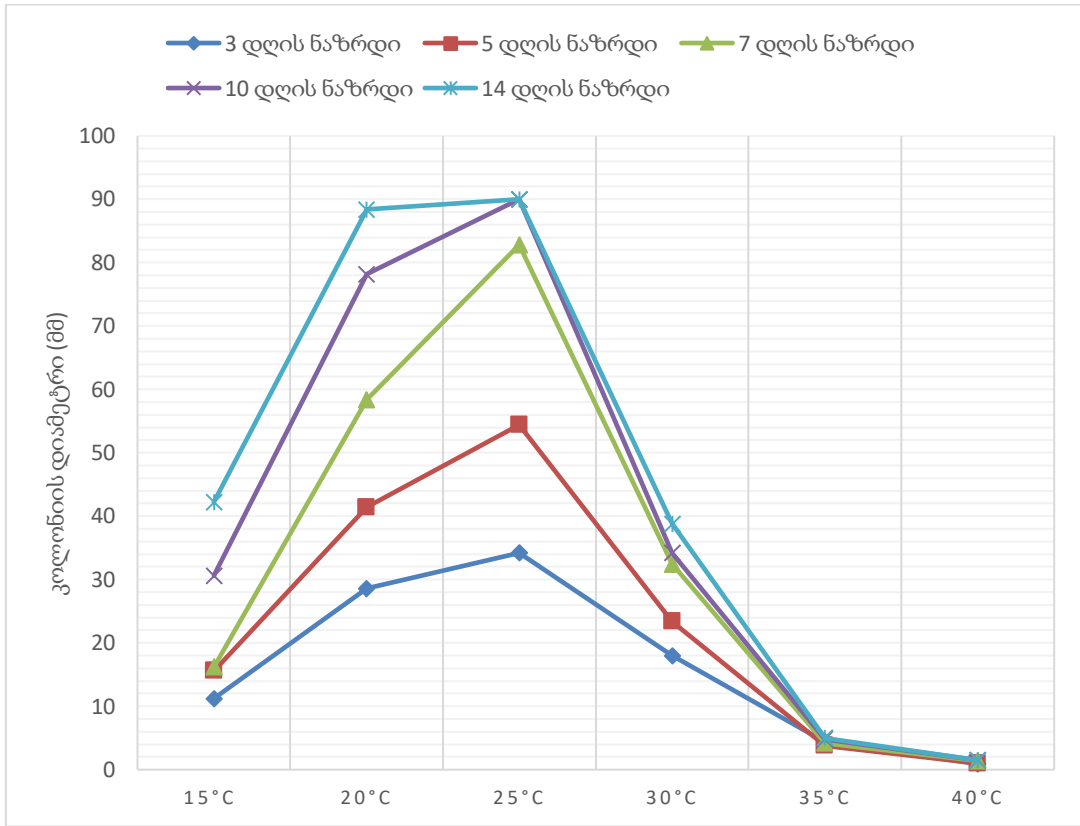
გრაფიკი 15. უნივერსალურ საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული M II-12 მიკროსკოპული სოკო

ცხრილი 6. სხვადასხვა საკვებ ნიადაგზე კულტივირებულ Gz 9-6 მიკროსკოპული სოკო

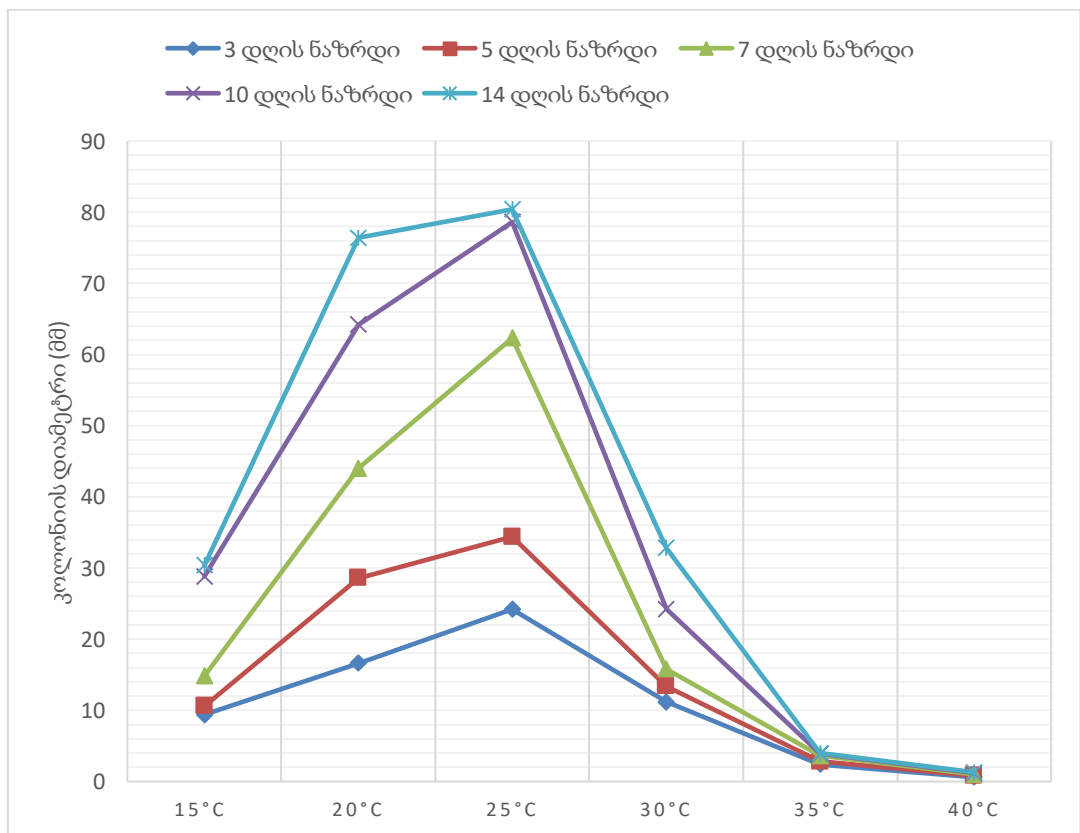
დასახელება	ტემპერატურა	3 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	5 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	7 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	10 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	14 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ
ჩაპეკის საკვები არე	15°C	10.2	14.4	24.2	28.6	32.2
	20°C	20.6	38.4	54.4	68.2	86.4
	25°C	22.2	44.8	72.4	90	90
	30°C	11.2	13.4	15.8	24.2	32.8
	35°C	3.4	3.8	4.2	4.8	5.0
	40°C	0.8	1.0	1.1	1.2	1.2
საბუროს საკვები არე	15°C	11.2	15.6	16.2	30.6	42.2
	20°C	28.6	41.4	58.4	78.2	88.4
	25°C	34.2	54.4	82.8	90	90
	30°C	18.0	23.4	32.4	34.2	38.8
	35°C	4.4	3.8	4.2	4.8	5.0
	40°C	0.9	1.0	1.4	1.5	1.5
უნივერსა ლური საკვები არე	15°C	9.4	10.6	14.8	28.8	30.4
	20°C	16.6	28.6	44	64.2	76.4
	25°C	24.2	34.4	62.3	78.6	80.4
	30°C	11.2	13.4	15.8	24.2	32.8
	35°C	2.4	2.8	3.6	3.9	4.0
	40°C	0.6	0.8	1.0	1.2	1.3



გრაფიკი 16. ჩაპეკის საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული Gz 9-6 მიკროსკოპული სოკო



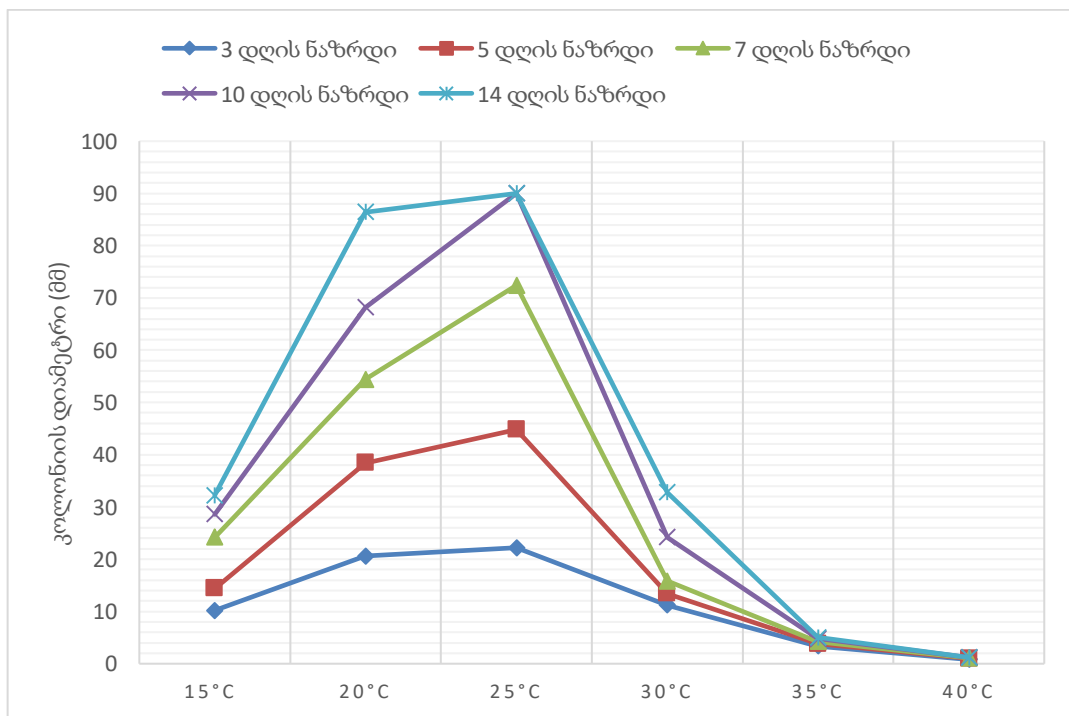
გრაფიკი 17. საბუროს საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული Gz 9-6 მიკროსკოპული სოკო



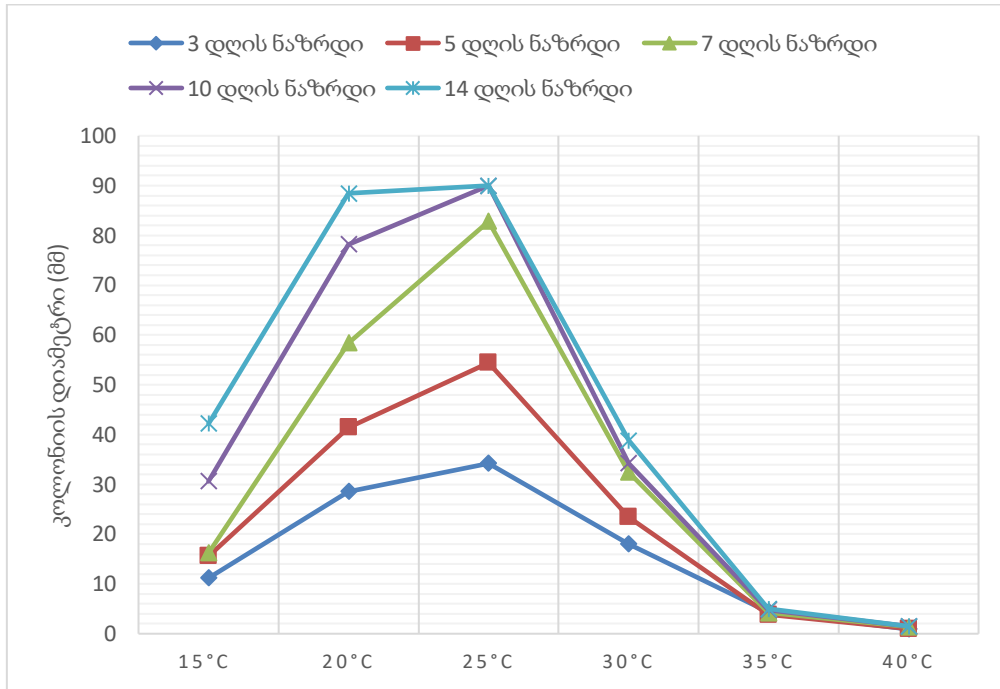
გრაფიკი 18. უნივერსალურ საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული T1 მიკროსკოპული სოკო

ცხრილი 7. სხვადასხვა საკვებ ნიადაგზე კულტივირებულ Gz 9-10 მიკროსკოპული სოკო

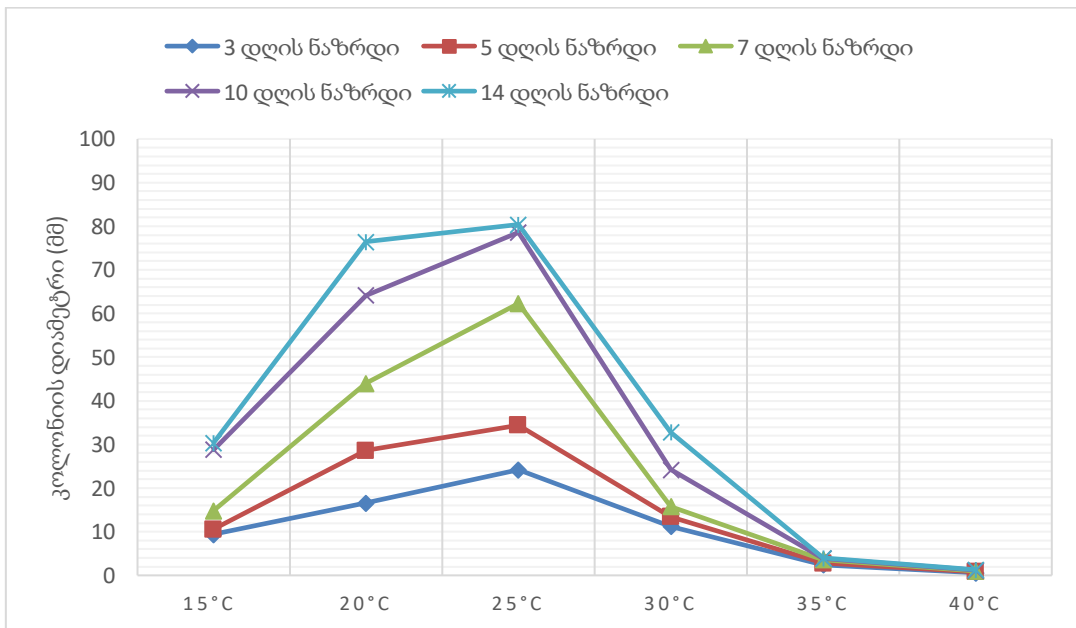
დასახელება	ტემპერატურა	3 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	5 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	7 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	10 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ	14 დღის ნაზრდი კოლონიის დიამეტრი მმ
ჩაპეკის საკვები არე	15°C	8.4	13.4	28.8	42.6	72.2
	20°C	14.8	35.8	40.2	58.8	90
	25°C	20.2	40.2	68.6	90	90
	30°C	7.8	8.8	11.2	12.6	15.6
	35°C	3.2	4.2	4.8	5.2	5.8
	40°C	1.4	1.8	2.1	2.2	2.2
საბუროს საკვები არე	15°C	9.2	14.4	30.6	44.8	62.2
	20°C	16.8	34.6	44.2	68.4	90
	25°C	24.6	46.8	74.8	90	90
	30°C	9.4	10.8	33.2	38.4	56.6
	35°C	4.2	4.4	4.8	5.2	5.4
	40°C	1.1	1.2	1.4	1.8	1.8
უნივერსა ლური საკვები არე	15°C	7.4	13.2	24.8	34.4	52.2
	20°C	12.4	28.4	38.6	48.8	68.0
	25°C	18.8	39.4	44.6	56.2	74.2
	30°C	8.8	9.8	12.2	14.6	16.2
	35°C	4.2	5.2	5.8	5.9	5.10
	40°C	0.89	1.1	1.3	1.4	1.4



გრაფიკი 19. ჩაპეკის საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული Gz 9-10 მიკროსკოპული სოკო



გრაფიკი 20. საბუროს საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული Gz 9-10 მიკროსკოპული სოკო



გრაფიკი 21. უნივერსალურ საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული Gz 9-10 მიკროსკოპული სოკო

ზემოთმოცემული მონაცემების საფუძველზე კვლევისთვის შეირჩა მიკროსკოპული სოკოების ზრდისთვის საჭირო ოპტიმალური პირობები:

- T1 - ჩაპეკის მოდიფიცირებული არე, 7 დღე, 30°C.
- K1- ჩაპეკის მოდიფიცირებული არე, 7 დღე, 30°C.
- NL 50 - ჩაპეკის მოდიფიცირებული არე, 10 დღე, 30°C.

- NL 51 - საბუროს საკვები არე 10 დღე, 30°C.
- M II-12 - საბუროს საკვები არე 10 დღე, 25°C.
- Gz 9-6 - საბუროს საკვები არე 10 დღე, 25°C.
- Gz 9-10 - საბუროს საკვები არე 10 დღე, 25°C.

3.3. მიკროსკოპული სოკოებიდან გამოყოფილი პრეპარატი

მიკროსკოპული სოკოების ზრდის ოპტიმალური პირობების დადგენის შემდგომ მოხდა მათი კულტივირება და უჯრედშიდა ლიზატის გამოყოფა. პრეპარატი გამოყოფილ იქნა შემდეგი შტამებიდან: T1, K1, NL-50, NL-51, Gz 9-6, Gz 9-10 M II-12 და დაიტესტა ერლიხის კარცინომის in vivo მოდელზე.

3.4. ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებებში ცილების საერთო რაოდენობის განსაზღვრა ბიურეტის მეთოდით

კვლევის ფარგლებში გვსურდა უჯრედშიდა ლიზატში ცილების საერთო რაოდენობის განისაზღვრა, რათა მოგვეხდინა საინექციო ხსნარების სტანდარტიზაცია ცილის მიხედვით. აღნიშნული გვესაჭიროებოდა იმისთვის, რომ საკვლევ თაგვებში შეგვეყვანა ერთიდა იგივე ცილის რაოდენობა. სინჯებში ცილის კონცენტრაცია განისაზღვრა ხარის შრატის ალბუმინის სტანდარტული ხსნარებით (0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 მგ/მლ) აგებულ საკალიბრო მრუდზე. საანალიზო ხსნარებში დაფიქსირდა განსხვავებული ცილის კონცენტრაცია (იხ. ცხრილი 8).

ცხრილი 8. მიკროსკოპული სოკოების მყარფაზოვანი ფერმენტაციის შედეგად მიღებულ უჯრედშიდა ლიზატში ბიურეტის მეთოდით განსაზღვრული ცილის კონცენტრაცია.

საკვლევი სინჯები	ცილის კონცენტრაცია მგ/მლ
T1	4.5
K1	7.5
NL-50	7
NL-51	5.5
Gz 9-6	7
Gz 9-10	6
M II-12	7.5

ბიურეტის მეთოდით შემდგომ საკვლევ სინჯებში, ცილის უმნიშვნელო რაოდენობის დასადგენად გამოვიყენეთ უფრო მგრძობიარე ბრედფორდის მეთოდი, რადგან კვლევისთვის შესაძლოა ზუსტ კონცენტრაციას დიდი მნიშვნელობა ქონდეს გარკვეული პასუხის მიღებისთვის.

3.5. ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებებში ცილების საერთო რაოდენობის განსაზღვრა ბრედფორდის მეთოდით

ბრედფორდის მეთოდის საშუალებით განისაზღვრა ცილის კონცენტრაცია სპექტრომეტრულად 578 ნმ-ზე (ცხრილი 9). საკვლევ სინჯებში ცილის კონცენტრაცია განისაზღვრა ხარის შრატის ალბუმინის სტანდარტული ხსნარებით (0.03, 0.062, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 მგ/მლ) აგებულ საკალიბრო მრუდზე. კვლევისთვის საინექციოდ გამოყენებულ იქნა 200 მკლ სინჯები, ცილის კონცენტრაციით 2 მგ/მლ

ცხრილი 9. მიკროსკოპული სოკოების მყარფაზოვანი ფერმენტაციის შედეგად მიღებულ უჯრედშიდა ლიზატში ბრედფორდის მეთოდით განსაზღვრული ცილის კონცენტრაცია.

საკვლევი სინჯები	ცილის კონცენტრაცია მგ/მლ
T1	5
K1	7.9
NL-50	7.4
NL-51	5.8
Gz 9-6	7
Gz 9-10	6.6
M II-12	7.92

3.6. ავთვისებიანი სიმსივნის in vivo მოდელირება ლაბ. თაგვებში

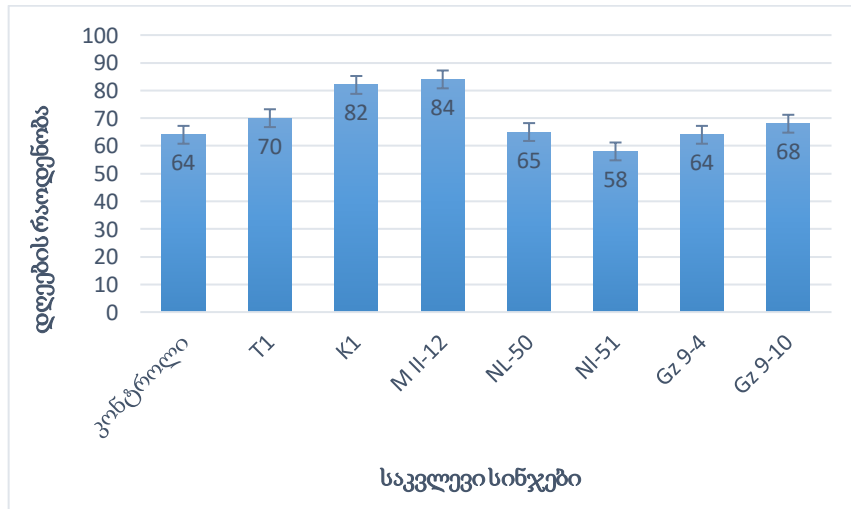
საკვლევ ცხოველებში ერლიხის ასციტური კარცინომის გადანერგვიდან 7-10 დღეს თაგვებს განუვითარდათ სიმსივნური წარმონაქმნი (იხ. სურათი 2) თითოეული საკვლევ სინჯისთვის ასევე საკონტროლო ნიმუშისთვის გადაირჩა 8-8თაგვი. საკონტროლო სამოდელო სისტემა ინექცირებულ იქნა 200 მკლ ფიზიოლოგიური ხსნარით, ხოლო საკვლევი ცხოველები მიკროსკოპული სოკოებიდან გამოყოფილი სინჯებით.



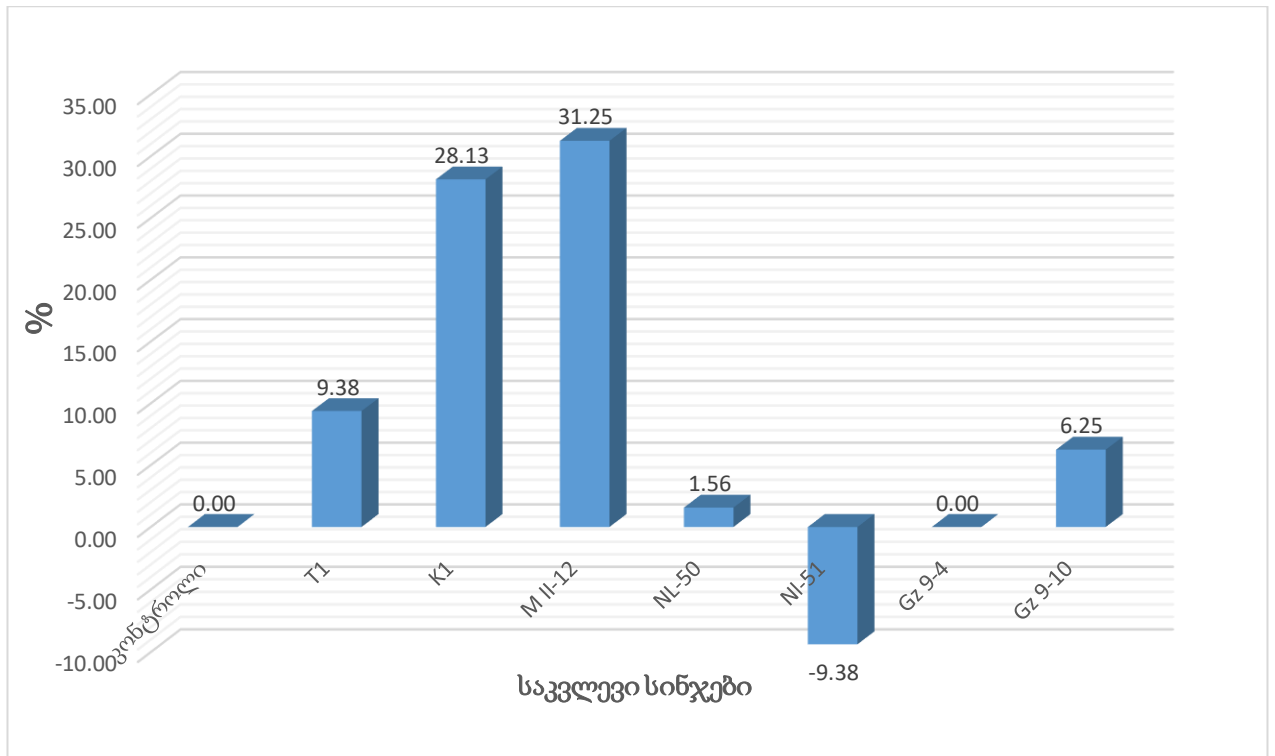
სურათი 2. A სურათზე გამოსახულია საკონტროლო თაგვი, B სურათზე ერლიხის კარცინომით დასნებოვნებული თაგვი

3.6.1. დაკვირვება სიცოცხლის ხანგრძლივობაზე

ერლიხის კარცინომის in vivo მოდელში სატესტო ხსნარების ინექციის შემდეგ დაკვირვება მოხდა სიცოცხლის ხანგრძლივობაზე. მიღებული იქნა განსხვავებული შედეგები (იხ. დიაგრამა 1). **K1**, **T1**, **M II-12**, **Gz 9-10** სინჯებით ზემოქმედების შედეგად საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით გაიზარდა თაგვების სიცოცხლის უნარიანობა. საკონტროლო ჯგუფმა საშუალოდ იცოცხლა 64 დღე, **Gz 9-10** სინჯს ინექციის შედეგად თაგვების სიცოცხლის უნარიანობა გაიზარდა 4 დღით, **K1**-ის შემთხვევაში 6 -ით, **T1**-ის შემთხვევაში 18-ით, ხოლო **M II-12** სინჯის ზეგავლენით 20 დღე. საპირისპირო ეფექტი დაფიქსირდა **NL-51** სინჯის გავლენის შედეგად, ისინი კონტროლთან შედარებით უფრო ადრე დაიღუპნენ. სიცოცხლის ხანგრძლივობამ შეადგინა 58 დღე.



დიაგრამა 1. კარცინომიანი თაგვის სიცოცხლის ხანგრძლივობა საკვლევი სინჯების: T1, K1, M II-12, NL-50, NL-51, Gz 9-4, Gz 9-10 ზეგავლენის შედეგად.



დიაგრამა 2. ერლიხის კარცინომით დასნებოვნებული თავგების სიცოცხლის მაჩვენებლის პროცენტული გამოსახულება საკვლევი სინჯების ზეგავლენის შემდგომ

ზემოთ აღნისშნული მონაცემების საფუძველზე (იხ. დიაგრამა 2) ასევე გამოთვლილ იქნა სიცოცხლის გახანგრძლივების პროცენტული მაჩვენებელი (გრაფიკი 9). **T1** სინჯით ნამკურნალევ თავგებში საკონტროლო ჯგუფის თავგებთან შედარებით სიცოცხლის უნარიანობა გახანგრძლივდა 9.38 %-ით ($p<0.01$), **K1** -ს შემთხვევაში - 28,13 %-ით ($p<0.01$), **M II-12** - 31.25 % ($p<0.01$), **NL 50** - 1.56% ($p<0.01$), **Gz 9-4** -0 %, **Gz 9-10** კი 6.25 %-ით ($p<0.01$), რაც შეეხება **NL 51**-ით საკვლევი ნიმუშის გავლენით, თავგების სიცოცხლის ხანგრძლივობა კონტროლთან შედარებით 9,38 %-ით ($p<0.01$) შემცირდა.

3.6.2. დაკვირვება სიმსივური ქსოვილის ზრდის დინამიკაზე

საკვლევ ობიექტებში ერლიხის კარცინომის მოდელის შექმნის შემდგომ 7-10-ე დღეს მოხდა პრეპარატების შეყვანა და დაკვირვება სიმსივური ქსოვილის ზრდის დინამიკაზე. კალიპერის საშუალებით იზომებოდა ცდის პერიოდში მიღებული სიმსივური ქსოვილის მოცულობა, ფორმულის საშუალებით კი გამოთვლილ იქნა საშუალო ზომა (იხილეთ ცხრილი 10 - 16).

ცხრილი 10. საკონტროლო ჯგუფის სიმსივური ქსოვილის ზრდის დინამიკა.

თაგვების რაოდენობა	I კვირა. სიმსივნის მოცულობა (სმ ³)	II კვირა. სიმსივნის მოცულობა (სმ ³)	III კვირა. სიმსივნის მოცულობა (სმ ³)
1	0.75	0.75	1.58
2	0.69	0.69	2.92
3	2.2	2.2	5.78
4	0.62	0.62	0
5	1.12	1.12	0
6	1.04	1.04	0
7	1.87	1.87	0
8	2.22	2.22	0
საშუალო მონაცემი	1.31	1.31	3.43

ცხრილი 11. K1 სინჯის გავლენა სიმსივური ქსოვილის ზრდის დინამიკაზე.

თაგვების რაოდენობა	I კვირა. სიმსივნის მოცულობა (სმ ³)	II კვირა. სიმსივნის მოცულობა (სმ ³)	III კვირა. სიმსივნის მოცულობა (სმ ³)
1	1.83	2.57	0.61
2	0.89	1.49	2.34
3	0.52	0.62	3.00
4	0.89	1.12	2.92
5	1.12	1.42	4.78
6	1.12	2.39	4.16
7	1.19	0.83	0
8	0.52	1.19	0
საშუალო მონაცემი	1.01	1.45	2.73

ცხრილი 12. T1 სინჯის გავლენა სიმსივური ქსოვილის ზრდის დინამიკაზე

თაგვების რაოდენობა	I კვირა. სიმსივნის მოცულობა (სმ ³)	II კვირა. სიმსივნის მოცულობა (სმ ³)	III კვირა. სიმსივნის მოცულობა (სმ ³)
1	0.83	2.40	3.75
2	0.88	0.52	6.24
3	0.75	2.10	3.94
4	1.12	3.00	0.62
5	1.31	0.81	0.49
6	1.3	1.49	0
7	1.19	0	0
8	0.81	0	0
საშუალო მონაცემი	1.02	1.67	2.8

ცხრილი 13. M II-12 სინჯის გავლენა სიმსივური ქსოვილის ზრდის დინამიკაზე.

თაგვების რაოდენობა	I კვირა. სიმსივნის მოცულობა (სმ ³)	II კვირა. სიმსივნის მოცულობა (სმ ³)	III კვირა. სიმსივნის მოცულობა (სმ ³)
1	0.89	1.12	1.6
2	0.97	1.09	1.09
3	1.12	2.1	1.49
4	1.05	1.19	1.49
5	0.97	1.31	2.40
6	0.81	1.49	1.8
7	0.62	1.19	0
8	1.3	1.3	0
საშუალო მონაცემი	0.96	0.99	1.23

ცხრილი 14. NL 51 სინჯის გავლენა სიმსივური ქსოვილის ზრდის დინამიკაზე.

თაგვების რაოდენობა	I კვირა. სიმსივნის მოცულობა (სმ ³)	II კვირა. სიმსივნის მოცულობა (სმ ³)	III კვირა. სიმსივნის მოცულობა (სმ ³)
1	1.83	2.40	5.0
2	1.19	1.34	4.04
3	2.1	2.10	0
4	0.4	3.00	0
5	1.4	1.98	0
6	0.98	2.7	0
7	1.04	0	0
8	0	0	0
საშუალო მონაცემი	1.27	2.2	4.5

ცხრილი 15. NL 50 სინჯის გავლენა სიმსივური ქსოვილის ზრდის დინამიკაზე.

თაგვების რაოდენობა	I კვირა. სიმსივნის მოცულობა (სმ ³)	II კვირა. სიმსივნის მოცულობა (სმ ³)	III კვირა. სიმსივნის მოცულობა (სმ ³)
1	0.66	4.38	3.72
2	0.82	2.79	3.87
3	2.1	1.13	2.92
4	0.75	2.1	2.34
5	1.31	2.69	0
6	1.04	0	0
7	2.1	0	0
8	0	0	0
საშუალო მონაცემი	1.25	2.6	3.2

ცხრილი 16. Gz 9-10 სინჯის გავლენა სიმსივეური ქსოვილის ზრდის დინამიკაზე

თავგების რაოდენობა	I კვირა. სიმსივნის მოცულობა (სმ ³)	II კვირა. სიმსივნის მოცულობა (სმ ³)	III კვირა. სიმსივნის მოცულობა (სმ ³)
1	1.05	1.75	4.36
2	0.93	1.13	1.52
3	1.59	2.106	3.7
4	1.2	1.87	3.3
5	1.2	2.12	2.8
6	1.05	0.52	0
7	1.27	0	0
8	1.2	0	0
საშუალო მონაცემი	1.19	1.93	3.1

ცხრილი 17. Gz 9-4 სინჯის გავლენა სიმსივეური ქსოვილის ზრდის დინამიკაზე

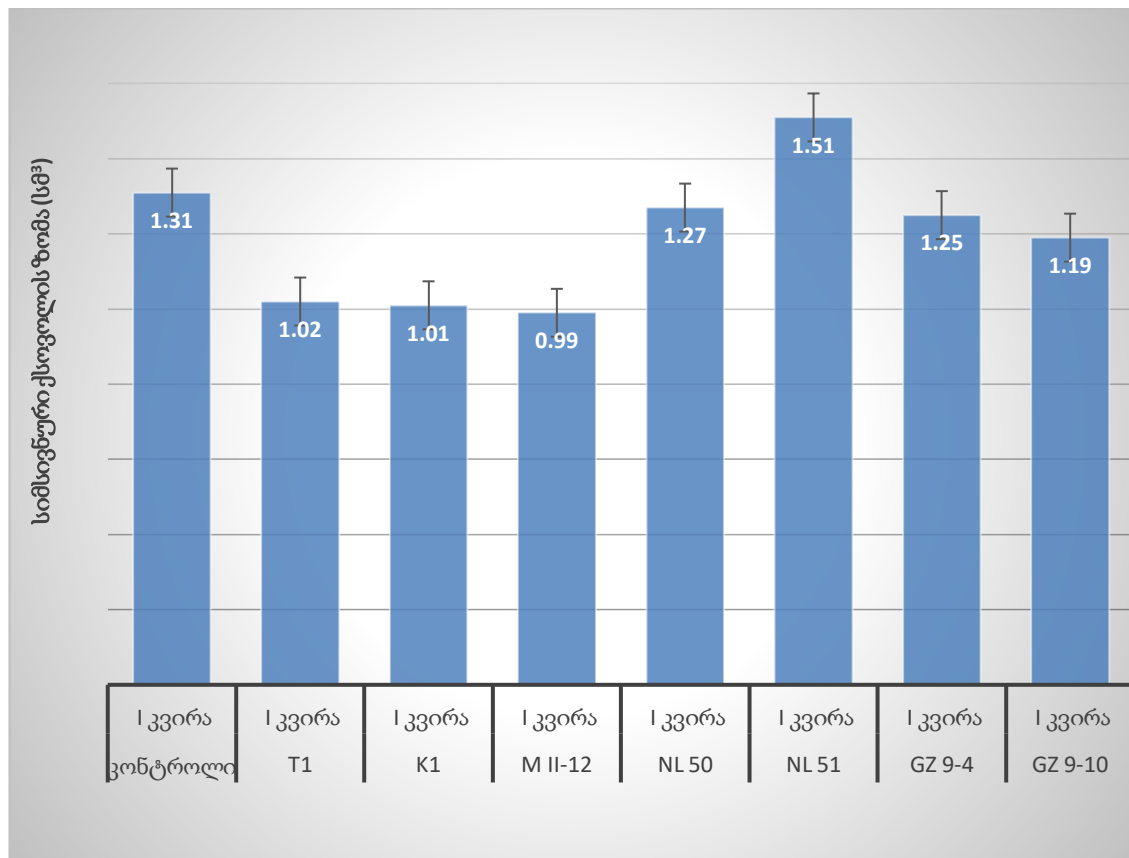
თავგების რაოდენობა	I კვირა. სიმსივნის მოცულობა (სმ ³)	II კვირა. სიმსივნის მოცულობა (სმ ³)	III კვირა. სიმსივნის მოცულობა (სმ ³)
1	1.3	2.40448	2.574
2	1.66	2.12	3.87
3	2.13	2.69	0
4	1.04	3.0056	0
5	1.37	0	0
6	1.58	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
საშუალო მონაცემი	1.51	2.1	3.1

ერლიხის კარცინომის in vivo მოდელზე საკვლევი პრეპარატების გავლენის შემდგომ მიღებული სიმსივეური ქსოვილის მოცულობა გამოისახა გრფიკულად (იხ. დიაგრამა 3,4,5), სადაც ასახულია დროის განსხვავებულ პერიოდში საკვლევი სიჯნჯების გავლენა სიმსივეულ წარმონაქმნზე. I კვირას საკონტროლო ჯგუფის სიმსივეური ქსოვილის მოცულობა წარმოადგენდა 1.31 სმ³-ს, **T1**- სინჯის ზეგავლენის შემდგომ -1.02 სმ³-ს, **K1**-ის შემთხვევაში 1.01-ს, ხოლო **M II-12** -ის მოქმედებით 0.99 სმ³-ს. როგორც მონაცემებიდან ჩანს **K1**, **T1**, **M II-12** სინჯების გავლენით, კონტროლთან შედარებით შეიმჩნევა სიმსივეური ქსოვილის ზრდის შენელება. მოცემულ შტამებზე იგივე ეფექტი დაფიქსირდა II და III კვირასაც. ყველაზე კარგი პასუხი მივიღეთ **M II-12** - ით ზემოქმედების

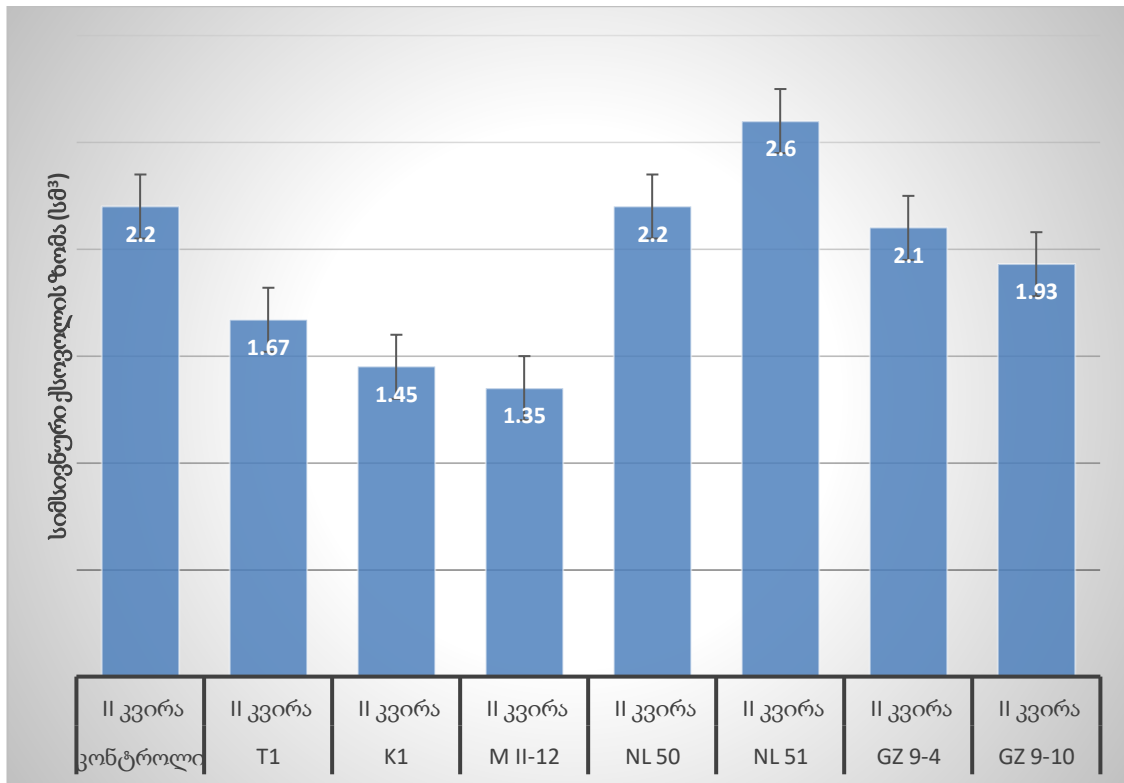
შემთხვევაში.

NL 50, Gz 9-4 სა და Gz 9-10 საკვლევი ხსნარების ზემოქმედებით კი ზემოთაღნიშნულ სინჯებთან შედარებით მიღებულია უფრო ნაკლები ცვლილება, Gz 9-10 სინჯის ზეგავლენით სიმსივნის მოცულობამ I კვირას შეადგინა 1.19 სმ³. II კვირას 1.93, ხოლო III კვირას, 3.1 სმ³.

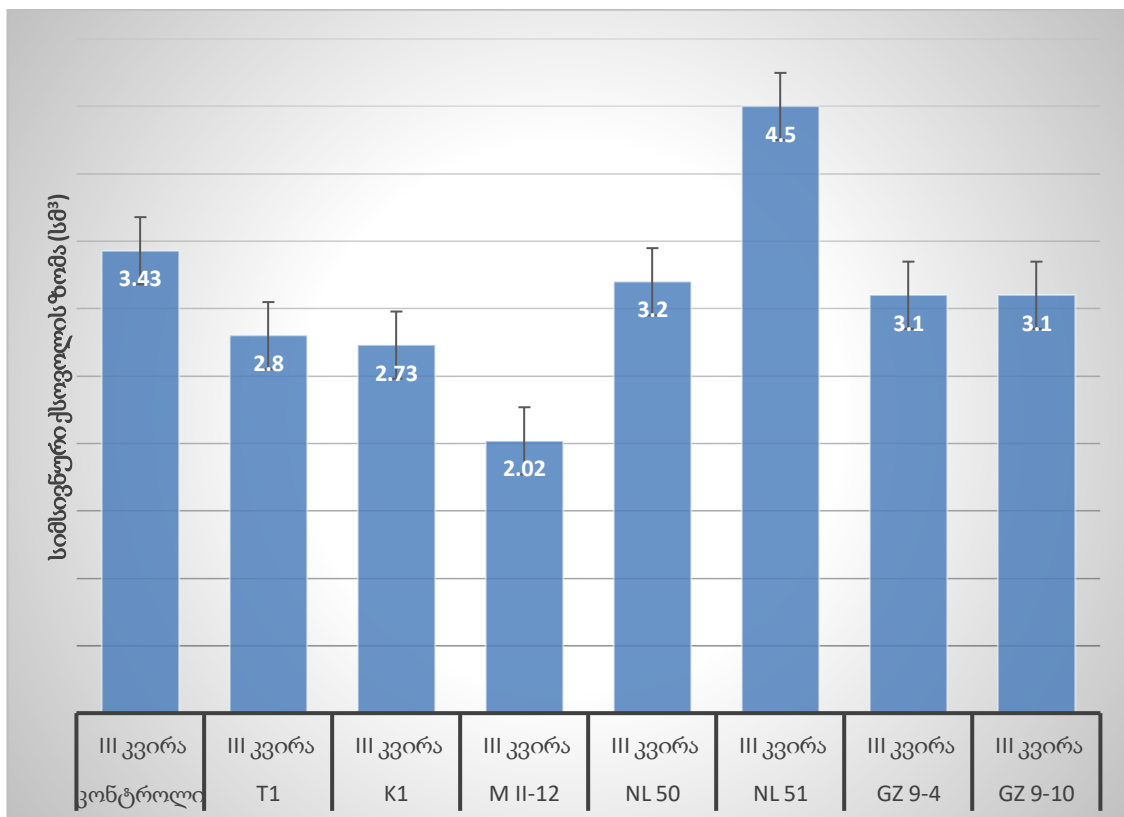
რაც შეეხება NL 51 სინჯს, მისი ზემოქმედების შედეგად დაფიქსირდა საპირისპირო პასუხი, კონტროლთან შედარებით გაიზარდა სიმსივნური ქსოვილის მოცულობა. სამივე კვირის განმავლობაში დაფიქსირდა სიმსივნური ქსოვილის ზრდის ტენდენცია.



დიაგრამა 3. კარცინომის in vivo მოდელზე პრეპარატების 1 კვირის ზემოქმედების შედეგად მიღებული სიმსივნური ქსოვილის მოცულობა

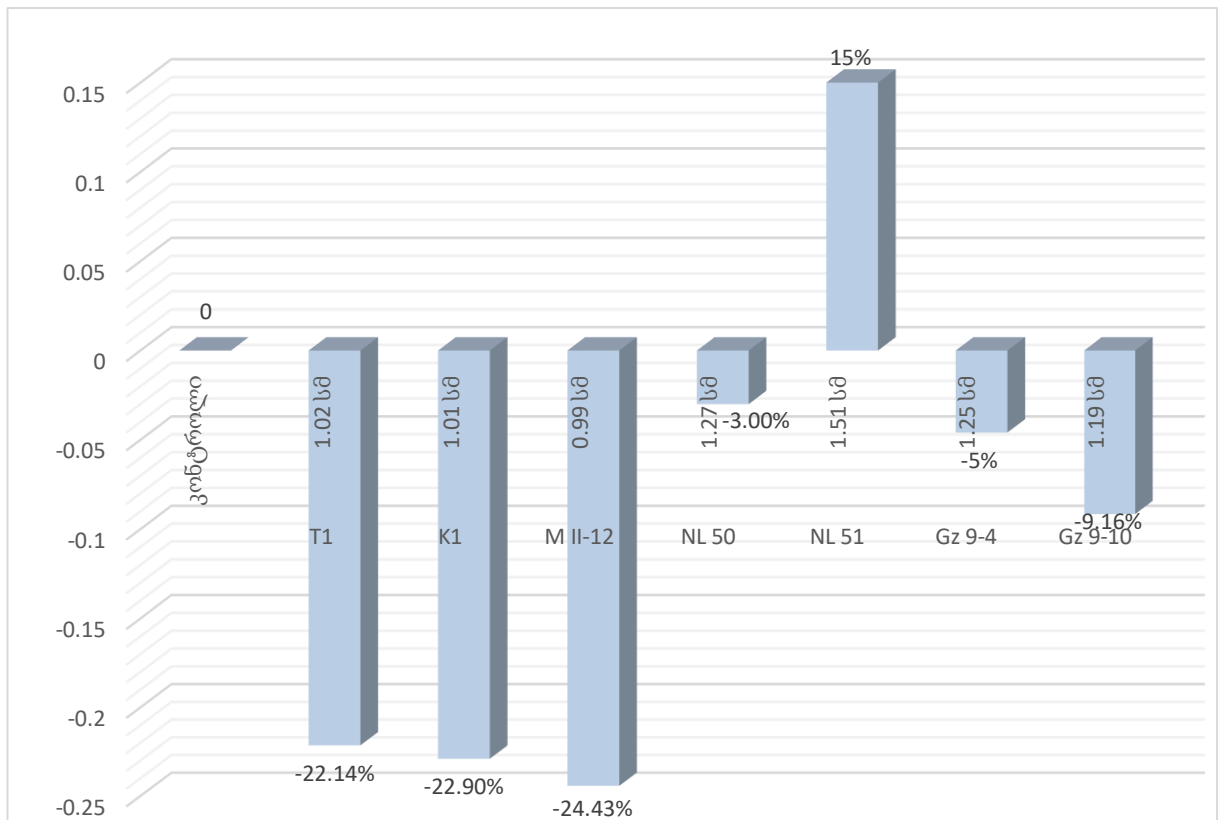


დიაგრამა 4. კარცინომის in vivo მოდელზე პრეპარატების 2 კვირის ზემოქმედების შედეგად მიღებული სიმსივნური ქსოვილის მოცულობა

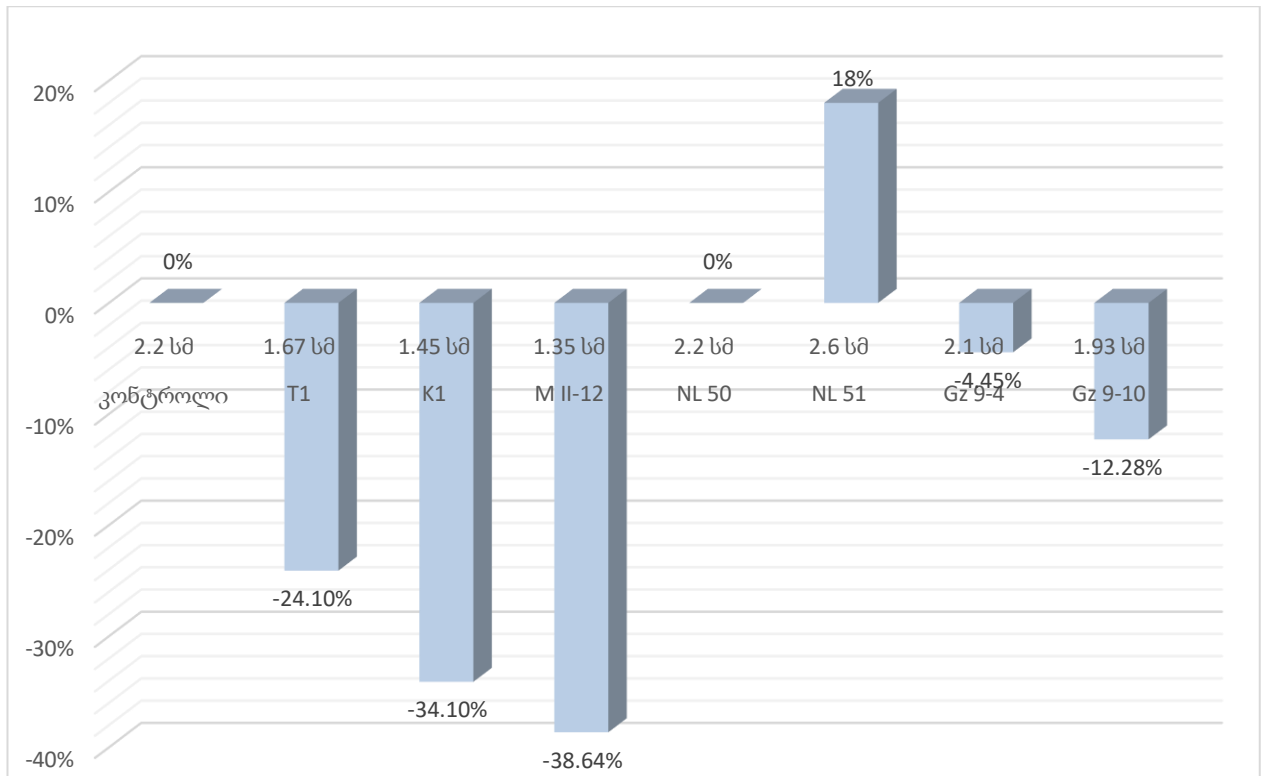


დიაგრამა 5. კარცინომის in vivo მოდელზე პრეპარატების 3 კვირის ზემოქმედების შედეგად მიღებული სიმსივნური ქსოვილის მოცულობა

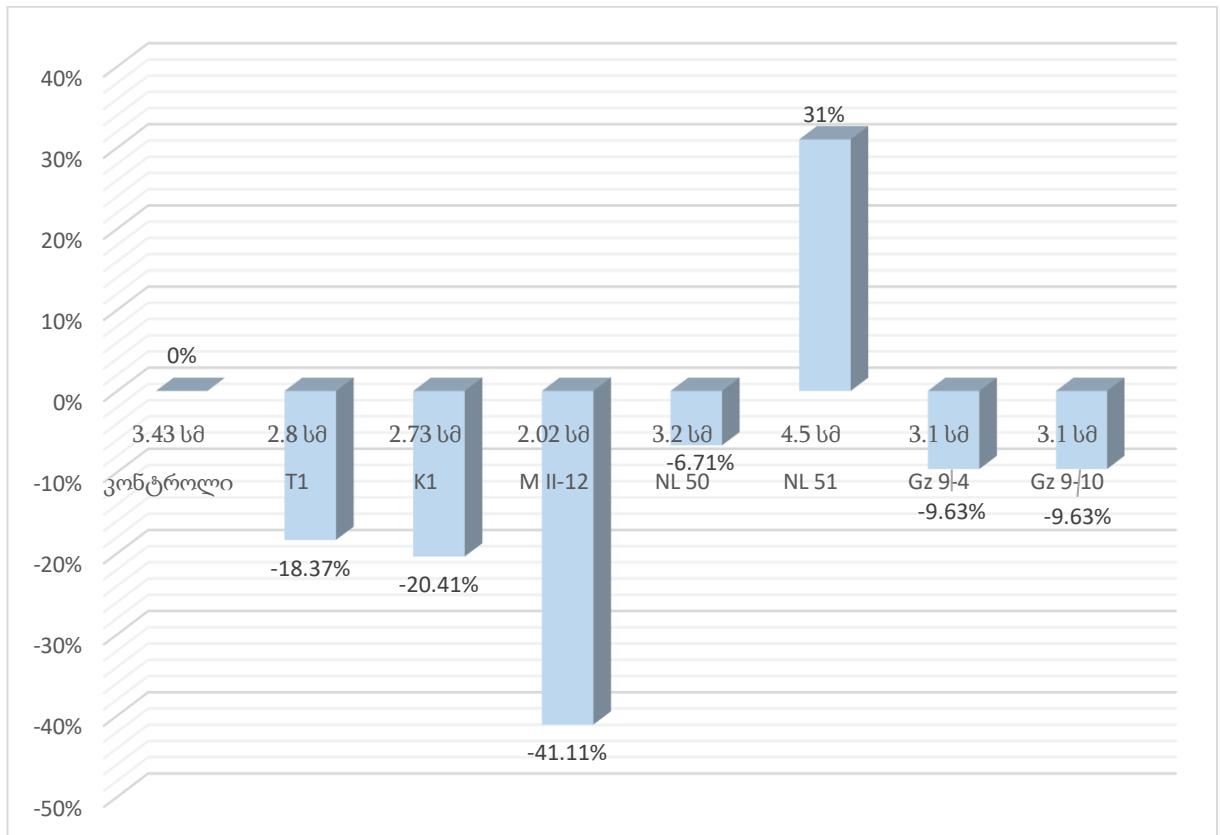
მონაცემების გაანალიზებისა და შედარებისთვის გრაფიკულად ასევე გამოვსახეთ სიმსივნური ქსოვილის ზრდის და შემცირების პროცენტული მაჩვენებელი (იხ. დიაგრამა 6,7,8). როგორც მონაცემებიდან ჩანს **M II-12** სინჯის შემთხვევაში მე-3 ე კვირას დაფიქსირდა ყველაზე კარგი შედეგი, სიმსივნური ქსოვილის მოცულობა შემცირდა 41 %-ით. ხოლო **NL-51** ის შემთხვევაში გაიზარდა 31 %-ით.



დიაგრამა 6. I კვირის სიმსივნური ქსოვილის ზრდის და შემცირების პროცენტული მაჩვენებელი



დიაგრამა 7. II კვირის სიმსივნური ქსოვილის ზრდის და შემცირების პროცენტული მაჩვენებელი



დიაგრამა 8. III კვირის სიმსივნური ქსოვილის ზრდის და შემცირების პროცენტული მაჩვენებელი

ზემოთაღნიშნული შედეგებიდან ცალსახად უნდა ითქვას, რომ მიკროსკოპული სოკოებიდან გამოყოფილ სინჯებს გააჩნიათ როგორც სიმსივნის მაპროვოცირებელი ასევე გარკვეულწილად მაინჰიბირებელი თვისება, რაც საბოლოოდ აისახა საცდელი თავგების სიცოცხლის ხანგრძლივობასა და სიმსივნის ზომაზე. **K1, T1, NL 50, M II-12, NL 50, Gz 9-4** სა და **Gz 9-10** სინჯების ზეგავლენით დაფიქსირდა როგორც სიცოცხლის გახანგრძლივების შედეგი ასევე სიმსივნური წარმონაქმნის ზრდის ტენდენციის შენელება. აღნიშნული სინჯებიდან ყველაზე კარგი ეფექტი დაფიქსირდა T1, K1, M II-12. ყველაზე მკვეთრი ეფექტი დაფიქსირდა M II-12 -ის ზეგავლენით, საკონტროლო ცხოველებთან შედარებით სიცოცხლის უნარიანობა გაიზარდა 31.25 % -ით, ხოლო სიმსივნური ქსოვილის ზომა შემცირდა 41.11% ით

რაც შეეხება NL-51 , მისი გავლენით მივიღეთ საპირისპირო ეფექტი, გაიზარდა სიმსივნური ქსოვილის მოცულობა, რაც აისახა სიცოცხლის ხანგრძლივობაზეც. საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით 15 % გაიზარდა სიმსივნური წარმონაქმნის მოცულობა, ხოლო სიცოცხლის ხანგრძლივობა შემცირდა 9,38 %-ით.

თავისთავად დადგა საკითხი, რომ გაგვერკვია, თუ რას შეიძლებოდა ქონოდა აღნიშნული ეფექტი, ლიტერატურულ წყაროებზე დაყრდნობით საკვლევ ექსტრაქტებში K1, T1, NL-50, NL-51, M II-12, Gz 9-10, Gz 9-6, განისაზღვრა ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთები: პროტეოლიზური აქტივობა (სხვადასხვა მეთოდებით), ჩატარდა პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორების სკრინინგი და სამომავლო კვლევებისთვის - ფენოლური ნაერთი ანალიზი.

(სადისერტაციო თემის ფარგლებში ჩატარებული კვლევის მეორე ეტაპის შედეგები და მათი განსჯა)

3.7. კაზეინის უხსნადი ნაწილიდან ფერმენტული რეაქციის შედეგად მიღებული ხსნადი ფრაგმენტების გაზომვა.

იმისათვის, რომ დაგვემტკიცებინა კაზეინის ხსნადი ნაწილის დანაკარგის

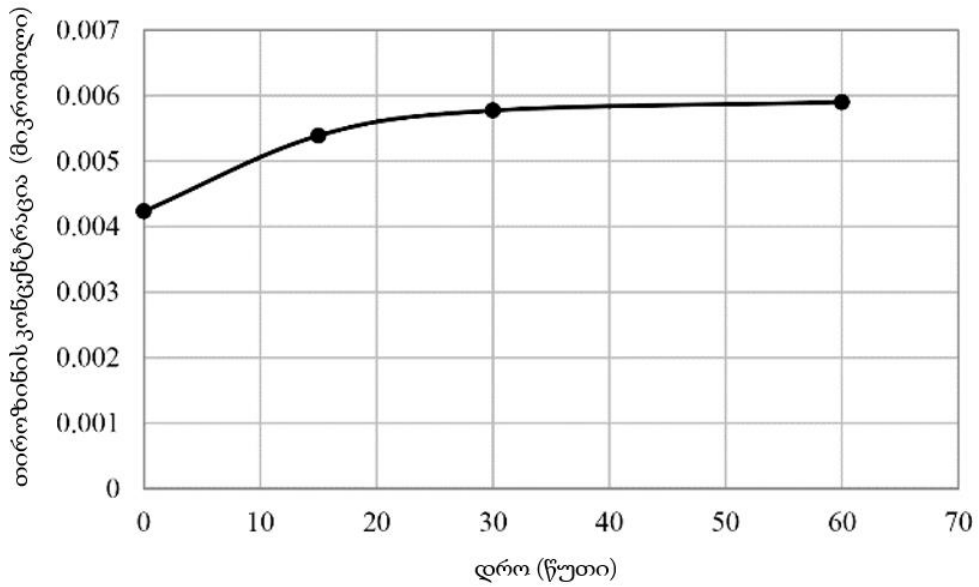
არსებობა ჩავატარეთ ცდა კაზეინზე ფოლინ/ჩიკოლტეს მეთოდის საშუალებით, მოცემული ცდისთვის იქნა აღებული 0,6 % კაზეინი და კომერციული ფერმენტი (ქიმორალი) 10 მკლ . მიღებული ცდის პასუხი ასახულია ცხრილი 18-ზე №2 სქემის მიხედვით, სადაც ხსნადი კაზეინის ცილის რაოდენობა თიროზინზე გადათვლით 30 წუთში წარმოადგენს 0,018 მიკრომოლს, ხოლო კაზეინზე ფერმენტის დამატების შედეგად მიღებულ პასუხს წარმოადგენს 0.081 მიკრომოლ თიროზინს. კაზეინის უხსნადი ნაწილიდან ფერმენტული რეაქციის შედეგად მიღებული ხსნადი ფრაგმენტების რაოდენობა წარმოადგენს solution 2-ის მაჩვენებელს გამოკლებული solution 1-ის მაჩვენებელი, რაც შეესაბამება 0,063 მიკრომოლ თიროზინს [187].

ცხრილი 18. თიროზინის რაოდენობა გაზომილი ხსნარის 1-ისა და 2-ის სუპერნატანტებში 1-ლი სქემის მიხედვით Folin & Ciocalteu-ს მეთოდით

დასახელება	თიროზინი (მიკრომოლი) 0 წთ	თიროზინი (მიკრომოლი) 30 წთ	თიროზინი (მიკრომოლი) Δ
კაზეინი (ხსნარი 1)	0,071	0,089	0,018
კაზეინის+ფერმენტი (ხსნარი 2)	0,075	0,156	0,081

3.8. EWMP სუბსტრატის დახასიათება

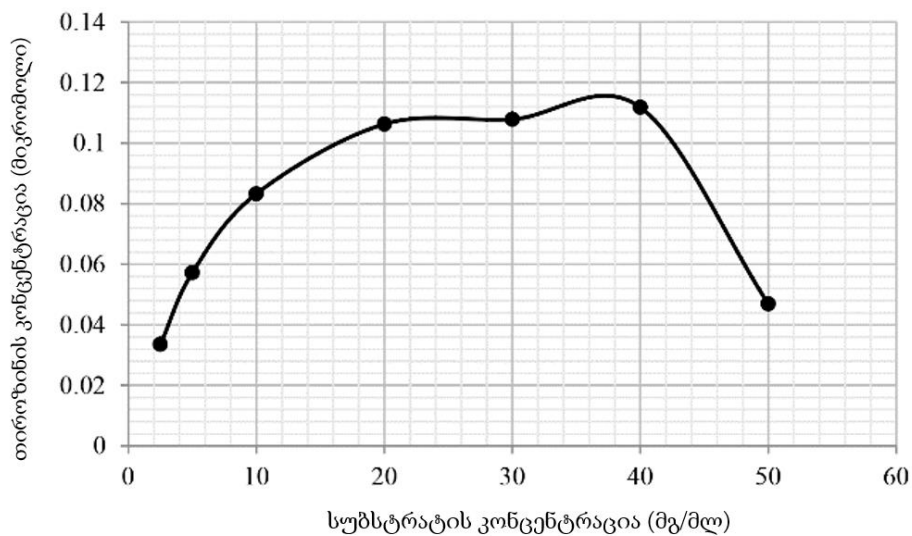
ცდისთვის სუბსტრატად გამოყენებული იქნა EWMP და გაიზომა მისი უხსნადობის მაჩვენებელი. გრაფიკ 22-ზე ნაჩვენებია ფერმენტის ზემოქმედების გარეშე სუბსტრატის ხსნადობა დროის სხვადასხვა დიაპაზონში. 30 წთ შერჩეულ იქნა, როგორც პროტეოლიტიკური აქტივობის ინკუბაციის დრო.



გრაფიკი 22. EWMP სუბსტრატის უხსნადობის მაჩვენებელი დროის ინტერვალში

3.9. ფერმენტ-სუბსტრატული დამოკიდებულების შესწავლა

ცდის ფარგლებში შესწავლილ იქნა ფერმენტ სუბსტრატული დამოკიდებულება EWMP სუბსტრატზე, რისთვისაც აიგო მიხაელის-მენტენის გრაფიკი 23, სადაც ნაჩვენებია სუბსტრატის კონცენტრაციის გავლენა რეაქციის სიჩქარეზე [195]. ფერმენტების წყაროდ გამოვიყენეთ კომერციული ფერმენტები Chymoral 10 მკლ.



გრაფიკი 23. რეაქციის სიჩქარისა და სუბსტრატის კონცენტრაციის დამოკიდებულება.

3.10. სხვადასხვა ბიოლოგიური ობიექტებიდან მიღებული პროტეოლიზური ფერმენტების აქტივობის განსაზღვრა

კვლევის ფარგლებში გამოყენებულ იქნა EWMP- სუბსტრატი, რომელიც გამოირჩევა განსაკუთრებული მდგრადობით, კერძოდ მისი ხსნადობა მეტად უმნიშვნელოა. ჩვენი მონაცემებით 30 წუთის განმავლობაში, რაც სავსებით საკმარისია აქტივობის განსაზღვრად) ცილის რაოდენობა თიროზინზე გადათვლით 30 წუთში წარმოადგენს 0.0057 მიკრომოლს. ეს მაჩვენებელი მეტად დაბალია, ამიტომ იგი შესაძლოა ჩაითვალოს საბაზო ან ნულოვან წერტილად პროტეაზული აქტივობის გასაზოვისას. ნულოვანი წერტილის დევიაცია იმდენად მცირეა, რომ პრაქტიკულად შესაძლებელია მისი უგულვებელყოფა. იმისათვის, რომ შეგვემოწმებინა სუბსტრატის უნივერსალურობა ჩვენ გადავამოწმეთ სხვადასხვა ბიოლოგიური ობიექტებიდან მიღებული პროტეაზები (იხ. ცხრილი 19) .

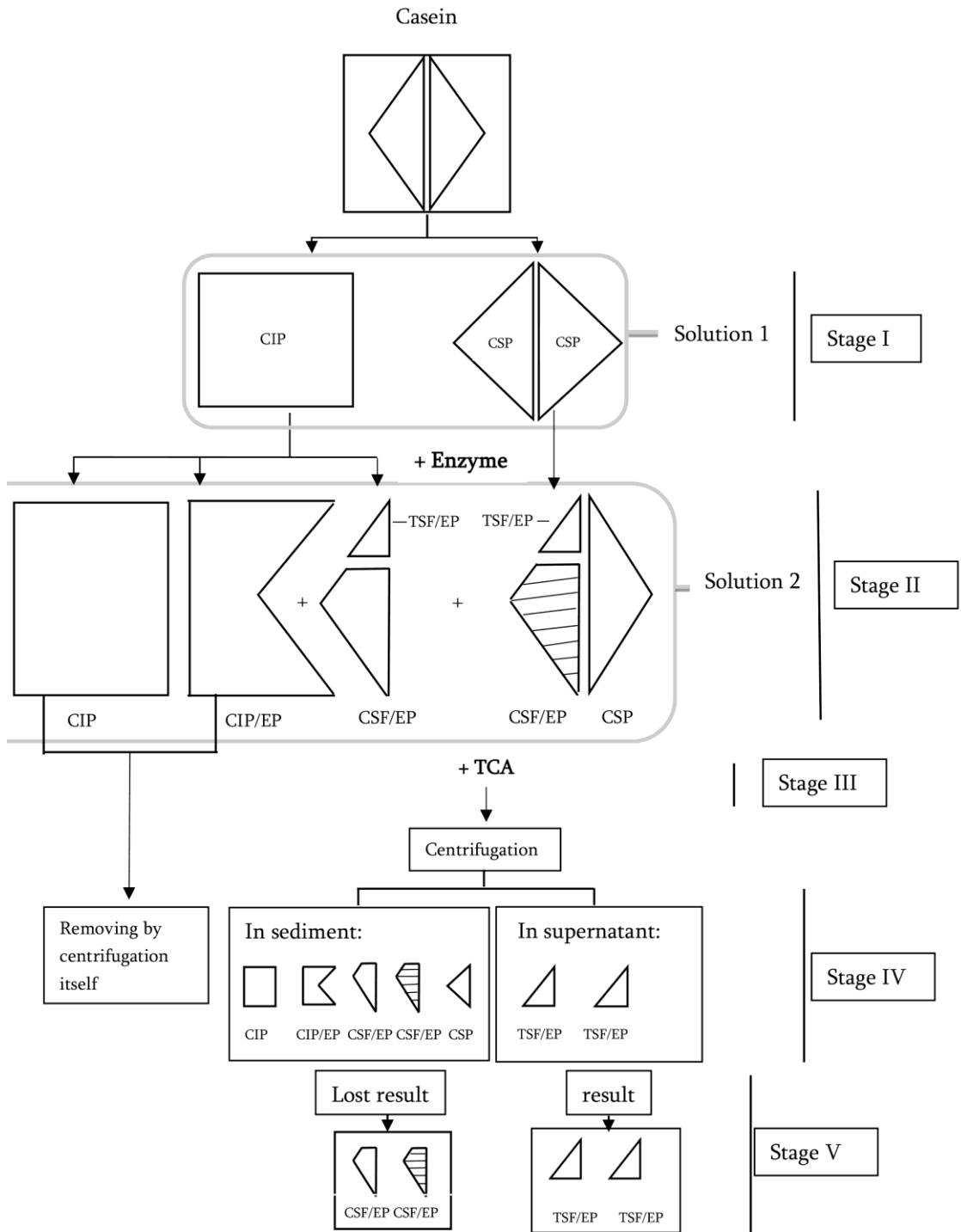
ცხრილი 19. სხვადასხვა ბიოლოგიური ობიექტებიდან მიღებული პროტეაზების აქტივობა

№	დასახელება	A (U/ml) 0 წთ	A (U/ml) 30 წთ	A (U/ml) Δ
1	კომერციული პროტეაზე (ქიმორალი)	0,228	0,428	0,200
2	მცენარეული წარმოშობის პროტეაზე (Galium verum)	0,240	0,356	0,092
3	სოკოვანი წარმოშობის პროტეაზა (Aspergillus Oryzae)	0,920	1,076	0,152

კაზეინისა და EWMP სუბსტრატების შედარება

სქემა 2 წარმოადგენს პროტეოლიტიკური ფერმენტების ზემოქმედების შედეგად ცილების, მათ შორის კაზეინის დეგრადაციის უნივერსალურ სქემას. განვიხილოთ შემთხვევა, როდესაც სუბსტრატს წარმოადგენს ჰემოგლობინი ან ნებისმიერი სხვა ხსნადი ცილა. აღნიშნული პროცესი სქემაზე იწყება პირველი

ეტაპიდან, სადაც სუბსტრატს წარმოადგენს CSP-ს ანალოგი ხსნადი ცილა, ხოლო CNSP-როგორც უხსნადი ცილა და მისი დეგრადაციის გზა ამ შემთხვევაში არ განიხილება. როგორც II-ე ეტაპზეა ასახული CSP-დან ფერმენტული ზემოქმედების შედეგად ხსნარში მიიღება TSF/EP, CSF/EP და CSP, რომელიც III-ეტაპზე სამქლორძმარმჟავას დამატების შემდეგ ცენტრიფუგირების შედეგად იყოფა 2 ნაწილად (ეტაპი IV). პირველ ნაწილს წარმოადგენს სედიმენტი CSP და CSF/EP, რომელიც ილექება და არ ექვემდებარება გაზომვას, ხოლო მეორე ნაწილის სუპერნატანტს წარმოადგენს TSF/EP, რომელიც არის სამქლორძმარმჟავაში ხსნადი პეპტიდი ან ამინომჟავა, რომელის გაზომვითაც ფასდება ფერმენტული აქტივობა. თუმცა ფერმენტული აქტივობა უნდა შეფასდეს V ეტაპის lost result -ში ნაჩვენები ფრაქციითაც CSF/EP, რომელიც ასევე წარმოადგენს ფერმენტული ზემოქმედების შედეგად მიღებულ პროდუქტს. აქედან გამომდინარე სამქლორძმარმჟავას დამატების შედეგად იკარგება ფერმენტული ზემოქმედების შედეგად მიღებულ პროდუქტზე ინფორმაცია, რაც წარმოადგენს fals negative პასუხს.



სქემა 2. კაზეინის ჰიდროლიზის სქემა პროტეოლიზური ფერმენტების ზეგავლენით

უხსნადი სუბსტრატის არსებობის შემთხვევაში, როგორც არის კაზეინი, ასევე ხდება ანალოგიური ინფორმაციის დაკარგვა. კაზეინი, მისი თვისებების გამო ყველაზე ხშირად გამოიყენება პროტეაზული აქტივობის განსაზღვრაში

ფოლინ ჩიკოლტეს მეთოდის გამოყენებით. მოცემულ სქემაზე პირველ I-ეტაპს წარმოადგენს კაზეინის დისოციაცია ორ ნაწილად, ხსნად ნაწილს წარმოადგენს CSP და უხსნადს CNSP (solution 1).

ფერმენტის დამატების შემთხვევაში II ეტაპზე ვღებულობთ I-ლი ეტაპის ხელუხლებელ უხსნად (CNSP) და ხსნადი ბუნების ცილებს (CSP), ასევე კაზეინის უხსნადი ნაწილის დაშლის პროდუქტებს: უხსნად CNSP/EP-ს , ხსნად TSF/EP-სა და CSF/EP-ს. ანალოგიურად კაზეინის ხსნად ნაწილს CSP-სა და დაშლის პროდუქტებს CSF/EP-სა და TSF/EP-ს. TCA დამატების შემდეგ ხსნარიდან ილექება CSP და CSF/EP , TCA -ს მიერ დალექილ ნაწილთან ერთად ილექება კაზეინის უხსნადი ნაწილებიც: CNSP და CNSP/EP. შესაბამისად IV-ე ეტაპის სქემაზე in sediment-ში ნაჩვენებია მთლიანი ნალექის შემადგენლობა, ხოლო result lost-ში sediment-ის ნაწილები CSF/EP , რომელიც არის ფერმენტული ზემოქმედების შედეგად მიღებული დალექილი ცილოვანი ფრაგმენტები, რომლებიც რეზულტატების ასახვაში მონაწილეობას ვერ იღებს ანუ იკარგება. In supernatant-ში ასევე არის ფერმენტული ზემოქმედების შედეგად მიღებული, მხოლოდ დაბალმოლეკულური ცილის ფრაგმენტები TSF/EP (პეპტიდები, ამინომჟავები), რომლებიც აისახება ფერმენტული აქტივობის განსაზღვრაში.

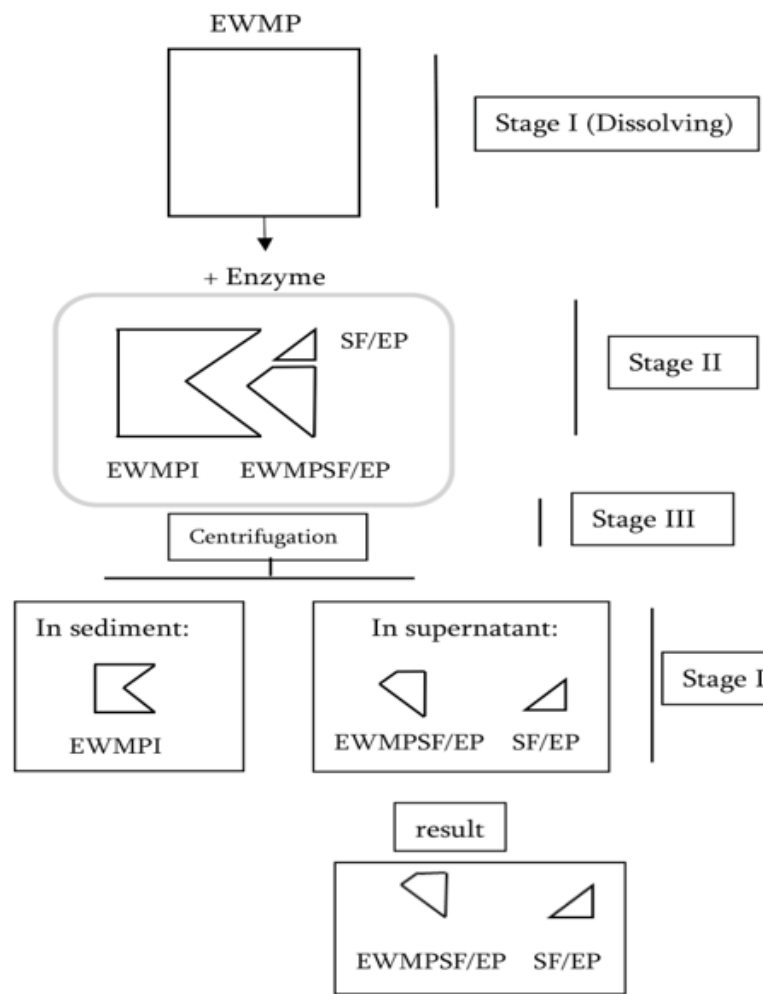
V ეტაპში ნაჩვენებია, რომ lost result-ში ილექება 2 ერთმანეთის მსგავსი ფრაგმენტი, როგორც უხსნადი ასევე ხსნადი სუბსტრატის ნაწილიდან, რომლებიც არ აისახება სპექტრული გაზომვის შედეგად და შესაბამისად აღნიშნული მონაცემები აკლდება ფერმენტის რეალურ აქტივობას.

ზემოთთქმულიდან გამომდინარე პრობლემას წარმოადგენს TCA-ს დამატების აუცილებლობა რათა გამოილექოს კაზეინის ხსნადი CSP ფრაქცია, რათა არ ჩაითვალოს როგორც ფერმენტის ზემოქმედების პროდუქტი. ხოლო TCA-ს დამატება CSP-ს გარდა ლექავს CSF/EP-ს , რომელიც არის ფერმენტის ზემოქმედების პროდუქტი და ეს ორივე არ აისახება პასუხში.

კვლევის შემდგომ მიზანს წარმოადგენდა ისეთი სუბსტრატის არსებობა, რომლებიც ხსნარში არ მოგვცემდა უხსნადი ცილის ნაწილს, ფერმენტების დამატების გარეშე, შესაბამისად აღარ იქნებოდა აუცილებლობა TCA დამატების.

სწორედ ამიტომ შემუშავდა ახალი ტიპის სუბსტრატი- EWMP. როგორც გრაფიკ 22-დან ჩანს სუბსტრატი 30 წუთის განმავლობაში არის მდგრადი ფერმენტის ზემოქმედების გარეშე და არ გამოყოფს ცდისთვის მნიშვნელოვან ხსნადი ცილის ფრაგმენტებს ხსნარში.

სქემა 3-ზე ნაჩვენებია EWMP-ის ბუფერში ხსნადობის მაჩვენებელი, სადაც I ეტაპზე უხსნადი ნაწილი არ წარმოიქმნება. ფერმენტის დამატების შემდგომ II ეტაპზე წარმოიქმნება EWMPNSP და ფერმენტული ზემოქმედების შედეგად მიღებული მაღალმოლეკულური და დაბალმოლეკულური ფრაგმენტები EWMPNSF/EP და SF/EP . III ეტაპს წარმოადგენს ცენტრიფუგირება, რის შედეგადაც შორდება in sediment-ში სუბსტრატის უხსნადი ნაწილი EWMPNSP, ხოლო in supernatant-ში ნაჩვენებია ფერმენტული ზემოქმედების შედეგად მიღებული, როგორც დაბალმოლეკულური პეპტიდები (EWMPNSF/EP) , ასევე ამინომჟავები (SF/EP).



სქემა 3. EWMP ჰიდროლიზის სქემა პროტეოლიზური ფერმენტების ზეგავლენით

თუ შევადარებთ II -სა და III სქემას, ნათლად ჩანს თუ რამდენად გამარტივებულია ფერმენტული ზემოქმედების შედეგად მიღებული პროდუქტების ანალიზი, ვინაიდან EWMP -ის შემთხვევაში არ წამოიქმნება თავისთავად ხსნადი ნაწილი I - ელ ეტაპზე. ფერმენტის დამატების შედეგად ერთადერთი რაც ასრის საჭირო, გახლავთ უხსნადი და ხსნადი ნაწილების ერთმანეთისგან დაშორება ცენტრიფუგირებით, ვინაიდან ხსნად ნაწილს მთლიანად წარმოადგენს ფერმენტული ზემოქმედების შედეგად მიღებული პროდუქტი. დაშორება ხორციელდება მარტივი ცენტრიფუგირებით, ნალექი არ წარმოადგენს ფერმენტული რეაქციის პროდუქტს, ხოლო სუპერნატანტში გვრჩება ფერმენტული ზემოქმედების შედეგად მიღებული პროდუქტი მთლიანად. აღნიშნული გამორიცხავს ცრუ უარყოფითი პასუხის მიღებას იმ მეთოდებთან შედარებით სადაც გამოიყენება სამქლორმმარმჟავა იმისათვის, რომ დავრწმუნებულვიყავით ზემოთმოცემულ მსჯელობაში, ჩვენ ჩავატარეთ პროტეაზული აქტივობის განსაზღვრა სხვადასხვა ორგანიზმებიდან მიღებულ ნიმუშებში, მათ შორის მცენარეულ, ცხოველურ, სოკოვან და ბაქტერიულ ექსტრაქტებში. ზემოთ მოცემული მონაცემები უფლებას გვაძლევს, ჩამოყალიბდეს Total protein activity განსაზღვრის მეთოდი იმ სახით, რა სახითაცაა წარმოდგენილი ჩვენ მიერ მოცემული მასალებსა და მეთოდებში.

სადისერტაციო თემის ფარგლებში ჩატარებული კვლევის მესამე ეტაპის შედეგები და მათი განსჯა

3.11. პროტეოლიზური აქტივობის და ინჰიბიტორის განსაზღვრა კოლორიმეტრული მეთოდით - EWMP სუბსტრატის გამოყენებით

პროტეოლიზური ფერმენტების აქტივობის და ინჰიბიტორის დეტექციისთვის გამოვიყენეთ სადოქტორო თემის ფარგლებში შექმნილი კოლორიმეტრული მეთოდი, სადაც გამოყენებულია ცილოვანი ბუნების სუბსტრატი **EWMP**. სარეაქციოდ დაიტესტა შემდეგი სინჯები: T1, K1, NL-51, Gz 9-6, Gz 9-10, M II-12 (იხ. ცხრილი 20).

ცხრილი 20. საკვლევ სინჯებში განსაზღვრული ფერმენტული აქტივობა.

№	დასახელება	პროტეოლიზური აქტივობა A (U/ml)	ინჰიბიტორული აქტივობა A (U/ml)
1	T1	0	0,020
2	K1	0	0.015
3	NL-50	0	0
4	NL-51	0.148	0
5	Gz 9-4	0	0
6	Gz 9-10	0.02	0
7	M II-12	0.105	0.050

როგორც ცხრილიდან ჩანს მოცემული მეთოდით საანალიზო სინჯებში: **NL-51**, **Gz 9-10** სა და **M II-12** - ში ფიქსირდება პროტეოლიზური აქტივობა.

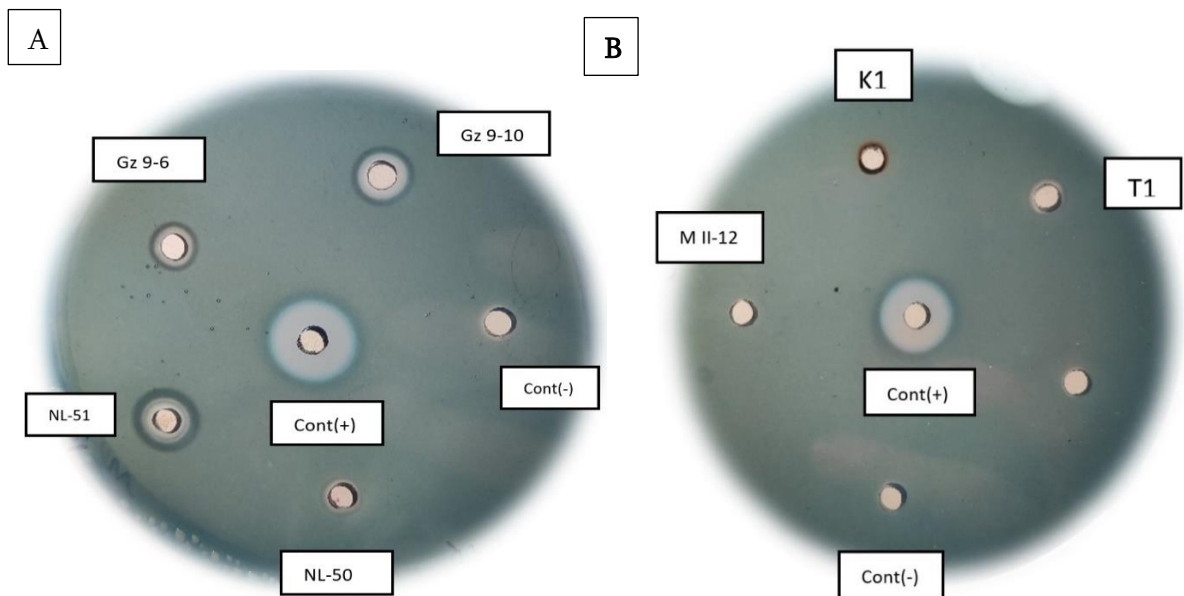
რაც შეეხება ინჰიბიტორულ აქტივობას, სინჯებში T1, K1 სა და M II-12-ში სინთეზირდება ნივთიერება, რომელიც იწვევს პროტეოლიზური აქტივობის ინჰიბირებას. M II-12 სინჯში არსებულ ინჰიბიტორს აქვს განსხვავებული სპეციფიურობა, ვინაიდან აღნიშნული ინჰიბიტორი არ აინჰიბირებს თავისივე ექსტრაქტში არსებულ პროტეაზას, რაც მეტყველებს ინჰიბიტორის სპეციფიურობაზე.

უნდა აღინიშნოს, რომ პრეპარატები, რომლებსაც გააჩნდათ ინჰიბიტორული აქტივობა ახანგრძლივებდნენ თავგების სიცოცხლის უნარიანობას. ხოლო სინჯში- NL 51, რომელზეც დაფიქსირდა მაღალი პროტეოლიზური აქტივობა, გამოიწვია სიცოცხლის უნარიანობის შემცირება.

პროტეოლიზური აქტივობა სევე აღენიშნებოდა **M II-12** სინჯში. თუმცა გამოკვლეული სინჯებიდა ეს იყო ერთ-ერთი შტამის ექსტრაქტი, რომელსაც ასევე გააჩნდა ინჰიბიტორული აქტივობა და ყველაზე მაღალი სიცოცხლის გახანგრძლივების უნარი

3.12. პროტეილიზური აქტივობის დადგენა გელ-დიფუზიური მეთოდით

რადგან პროტეოლიზური ფერმენტები ხასიათდებიან სპეციფიურობით, მათი დეტექციისთვის გამოვიყენეთ გელ-დიფუზიური მეთოდი (იხ. სურათი 3). სუბსტრატად გამოყენებულ იქნა უცხო მო რძის ფხვნილი. გელზე გამჭვირვალე ზონის არსებობა ფერმენტული აქტივობის მაჩვენებელია. დადებითი კონტროლის დიამეტრის ზონა შეადგენდა 1,6 სმ-ს. ექსპერიმენტის შედეგად პროტეოლიზური ფერმენტების არსებობა დაფიქსირდა შემდეგ შტამებზე: Gz 9-10 (დიამეტრი 1.3 სმ), Gz 9-6 (1.15 სმ) , NL-51(1.25). კვალის სახით კი T1-სა და NL-50-ში K1 სა და M II-12 აქტივობა მოცემული მეთოდით არ დაფიქსირდა.



სურათი 3. . პროტეილიზური აქტივობის დადგენა გელ-დიფუზიური მეთოდით

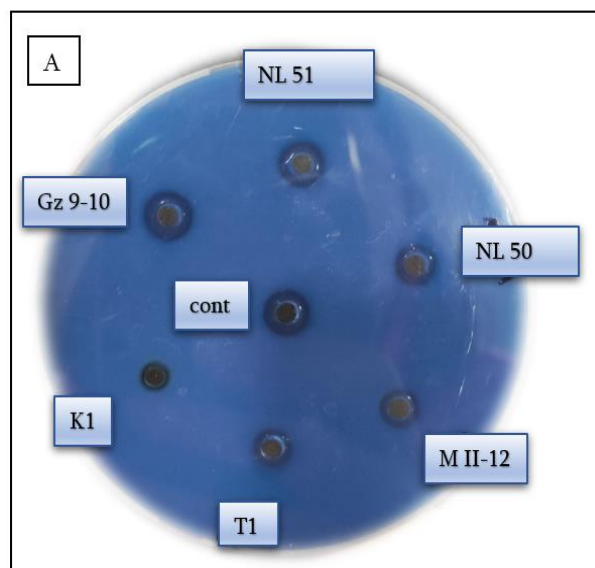
სურათ A-ზე ფიქსირდება პროტეოლიზური აქტივობა შემდეგ შტამებზე: Gz 9-10, Gz 9-6, NL 51, კვალის სახით NL-50-ში. სურათ B-ზე -კვალის სახით T1 შტამზე.

3.13. პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორული ეფექტის დადგენა

გამომდინარე იქიდან რომ ზოგიერთი პროტეაზას შესაძლოა გააჩნდეს სიმსივნის მაპროვოცირებელი ეფექტი, კვლევის ფარგლებში მიღებულ შტამებზე, გელ-დიფუზიური მეთოდით განისაზღვრა ინჰიბიტორული აქტივობა. სინჯების 18 საათიანი ინკუბირების შემდგომ გაიზომა რგოლების დიამეტრი (იხ. სურათი 4). შემცირებული გამჭვირვალე რგოლების არსებობა

ინჰიბიტორის არსებობის აღმნიშვნელია, რადგან ინჰიბირებული პროტოლიზური ფერენტები და ვერ ურთიერთქმედებენ სუბსტრატთან, შესაბამისად არ წარმოიქმნება გამჭირვალე ზონა. რადგან ზოგზოგიერთ საანალიზო სინჯს გააჩნია პროტოლიზური აქტივობა მოცემულ მეთოდში გამოყენებულ სუბსტრატზე სინჯები განზავდა რათა არ შესულიყო რეაქციაში უშუალოდ სუბსტრატთან, რის შემდეგაც ჩატარდა ინჰიბიტორული აქტივობა.

როგორც მონაცემებიდან ჩანს, K1, T1, M II-12 სინჯების შემთხვევაში საკონტროლო რგოლთან შედარებით შემცირებულია გამჭირვალე რგოლების დიამეტრი, რაც მათ ინჰიბიტორულ თვისებაზე მიუთითებს. აღნიშნული ეფექტი კვალის სახით ფიქსირდება NL 50 სინჯის შემთხვევაში.



სურათი 4. საკვლევ სინჯებში პროტოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორული ეფექტის დადგენა გელ-დიფუზიური მეთოდით.

საკონტროლო სინჯის დიამეტრი 1.3 სმ, T1-1სმ, K1-0.6სმ, NL 51სმ- 1.3სმ, NL 50სმ- 1.2სმ, Gz 9-10სმ -1.3სმ, M II-12-0.9სმ

უნდა ითქვას, რომ რომ შტამ M II-12-ს რომელზეც დაფიქსირდა სიცოცხლის გახანგრძლივების და სიმსივნური ქსოვილის ზომის შემცირების ტენდენცია

კვლევის ფარგლებში T1, K1, NL-50, NL-51, Gz 9-6, Gz 9-10, M II-12, სინჯებში, როგორც კოლორიმეტრული ასევე გელ დიფუზიური მეთოდებით მოვახდინეთ პროტოლიზური ფერმენტების და მათი იჰიბიტორების

დეტექცია. სინჯებში დაფიქსირდა ორივე ეფექტის არსებობა .

M II-12 სინჯს, რომელზეც დაფიქსირდა სიცოცხლის გახანგრძლივების და სიმსივნური ქსოვილის ზომის შემცირების ტენდენცია მკაფიოდ აღმოაჩნდა, პროტეოლიზური ფერმენტების მაინჰიბირებელი თვისება. სინჯებს K1, T1 რომლებშიც დაფიქსირდა ინჰიბიტორული თვისება, მათი ზეგავლენით გახანგრძლივდა სიცოცხლის უნარიანობა.

ხოლო სინჯებს K1, T1, რომლის ზეგავლენითაც დაფიქსირდა მხოლოდ სიცოცხლის გახანგრძლივების ეფექტი დაფიქსირდა ინჰიბიტორული აქტივობა. M II-12 სინჯში მაინჰიბირებელ თვისებებთან ერთად, როგორც ზემოთ იყო ნაჩვენები გამოვლინდა პროტეოლიზური აქტივობაც.

3.14 უჯრედშიდა ლიზატში საერთო ფენოლური ნაერთების განსაზღვრა

კვლევის სამომავლო გეგმებისთვის ასევე განისაზღვრა საერთო ფენოლური ნაერთების არსებობა ფოლინ-ჩიკოლტეს მეთოდის საშუალებით. ფენოლური ნაერთების არსებობა დაფიქსირდა ყველა საკვლევ შტამში (იხ. ცხრილი 21).

ცხრილი 21. საკვლევი სინჯების ერლიხის კარცინომის *in vivo* მოდელზე ზეგავლენის შედეგად მიღებული პასუხები

საკვლევი სინჯები	ოპტიკური სიმკვრივე
T1	0.150
K1	0.180
NL-50	0.380
NL-51	1.290
Gz 9-6	0.515
Gz 9-10	0.529
M II-12	0.9

3.15 კასპაზა 3-ის განსაზღვრა ფოტოკოლორიმეტრული მეთოდით

კვლევის ფარგლებში, დავაკვირდით რა სახის ზემოქმედებას მოახდენდა საკვლევი სინჯები (M II-12, NL-50, Gz 9-10) აპოპტოზურ აქტივობაზე, რისთვისაც გამოვიყენეთ იმუნოფერმენტული ტესტი. აღნიშნული მეთოდით საკონტროლო ჯგუფის სინჯთან შედარებით არ დაფიქსირდა კასპაზა 3-ის ცვალებადობა.

3.16 მიკროსკოპული სოკოების იდენტიფიცირება

გამომდინარე იქიდან, რომ კვლევის ფარგლებში დატესტილ სინჯში M II-12 გამოვლინდა გარკვეული დადებითი შედეგები (სიმსივნური ქსოვილის მოცულობის კლება და საკვლევ ცხოველების სიცოცხლის გახანგრძლივება) სადოქტორო თემის ფარგლებში ჩატარდა იდენტიფიკაცია აღნიშნული მიკროსკოპული სოკოსი. იდენტიფიცირდა **Mucor sp. M II-12** (იხილეთ სურათ 6).



Mucor sp. M II-12

სურათი 5. იდენტიფიცირებული მიკროსკოპული სოკო

სადისერტაციო თემის ფარგლებში ჩატარებული კვლევის მეოთხე ეტაპის შედეგები და მათი განსჯა

გამომდინარე იქიდან, რომ მუტაგენუზის შემთხვევაში იცვლება გენეტიკური ინფორმაცია და შესაბამისად ფიზიკო/ქიმიური მახასიათებლები თავდაპირველად შეირჩა ოპტიმალური პირობები M II-12 სოკოს მუტაგენუზისთვის, რის შემდეგაც მუტირებული კულტურიდან გამოყოფილ უჯრედშიდა ლიზატში ისევ განისაზღვრა სხვადასხვა პარამეტრები:

- ✓ ცილის კონცენტრაცია
- ✓ პროტეოლიზური ფერმენტების აქტივობა
- ✓ პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორული აქტივობა
- ✓ ერლიხის კარცინომის in vivo მოდელში სიმსივნური ქსოვილის განვითარების შეფასება
- ✓ დაკვირვება სიცოცხლის ხანგრძლივობაზე
- ✓ პრეპარატის მიღების ტექნოლოგიის შემუშავება

ზემოთაღნიშნული პარამეტრების განსაზღვრა საჭირო იყო, რათა შეგვედარებინდა და მუტაგენუზამდე მიღებული პასუხები .

3.17. მუტაგენუზის ოპტიმალური პირობების დადგენა

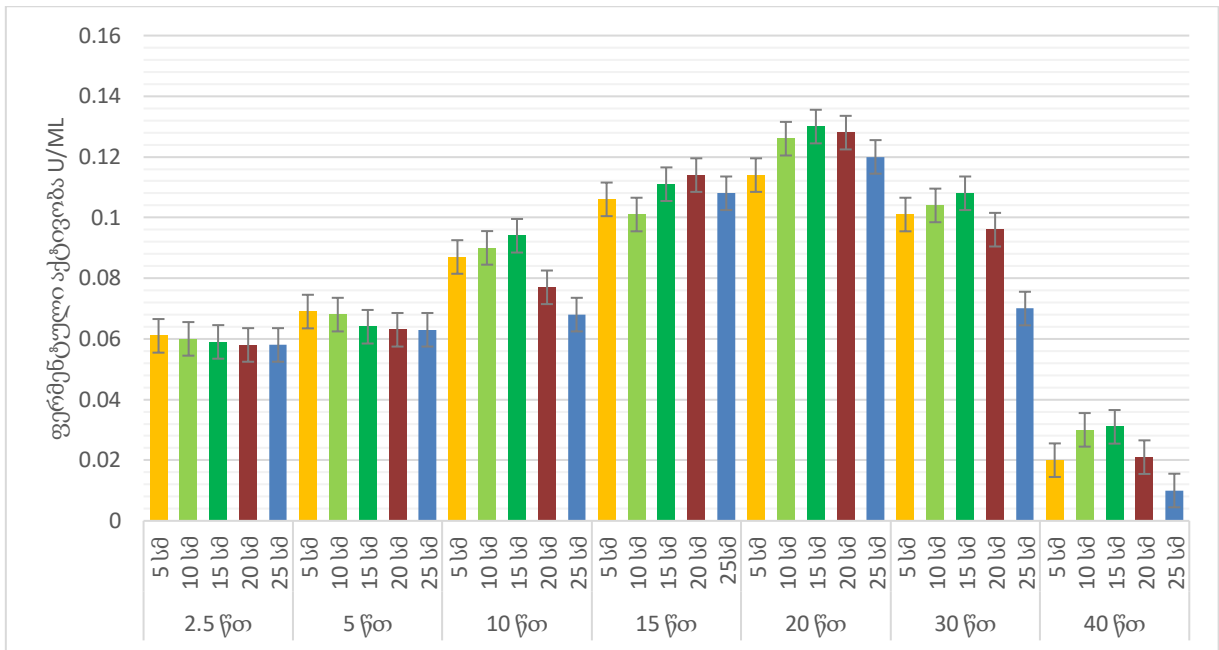
M II-12 მიკროსკოპული სოკოს მუტაცია წარიმართა 240 ნმ-ზე სხვადასხვა დროის დიაპაზონში განსხვავებულ დაშორებებზე. ოპტიმალური პირობები განისაზღვრა პროტეოლიზური აქტივობის მიხედვით რომელის ყველაზე მაღალი მაჩვენებელი დაფიქსირდა 20 წუთიანი დასხივების დროს 15 სმ დაშორების შემთხვევაში (იხ. ცხრილი 22, დიაგრამა 9).

მუტაციის შემდგომ შერჩეული სინჯი ისევ ჩაითესა საკვებ არეზე და განისაზღვრა პროტეოლიზური აქტივობა სადოქტორო ნაშრომის ფარგლებში მოდიფირირებული კოლორიმეტრული მეთოდით

ცხრილი 22. M II-12 მიკროსკოპული სოკოს დასხივება ულტრაიისფერი გამოსხივებით 240 ნანომეტრზე

დრო (წთ)	დაშორება (სმ)	ფერმენტული აქტივობა (U/ml)
----------	---------------	----------------------------

5	5	0.069
	10	0.068
	15	0.064
	20	0.062
	25	0.062
10	5	0.087
	10	0.09
	15	0.094
	20	0.077
	25	0.068
15	5	0.106
	10	0.101
	15	0.111
	20	0.114
	25	0.108
20	5	0.114
	10	0.126
	15	0.130
	20	0.128
	25	0.120
30	5	0.101
	10	0.104
	15	0.108
	20	0.098
	25	0.07
40	5	0.02
	10	0.03
	15	0.031
	20	0.021
	25	0.01



დიაგრამა 9. M II-12 მიკროსკოპული სოკოს დასხივება ულტრაიისფერი გამოსხივებით 240 ნანომეტრზე

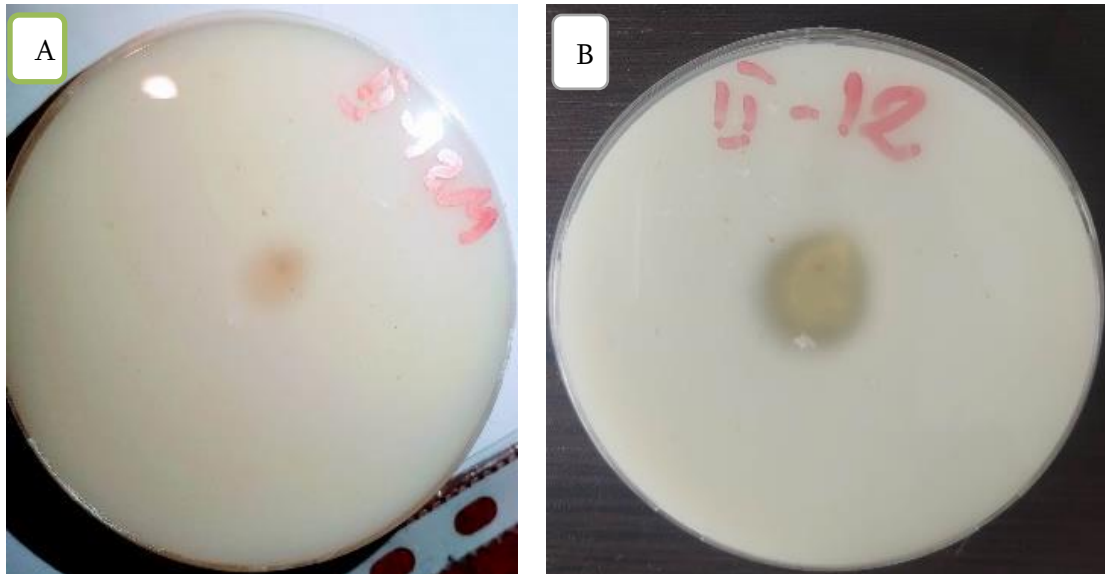
3.18. მუტირებულ სინჯებში ცილის განსაზღვრა ბიურეტის მეთოდით

ბიურეტის მეთოდით 20 წუთიანი მუტირებული შტამებიდან გამოყოფილ ლიზატში განისაზღვრა ცილის კონცენტრაცია 578 ნმ-ზე სპექტრომეტრულად.

M II-12 სინჯში დაფიქსირდა ცილის კონცენტრაცია 20 მგ/მლ

3.19. მუტაგენურ შტამ M II-12 -ში პროტეოლიზური ფერმენტების სკრინინგი

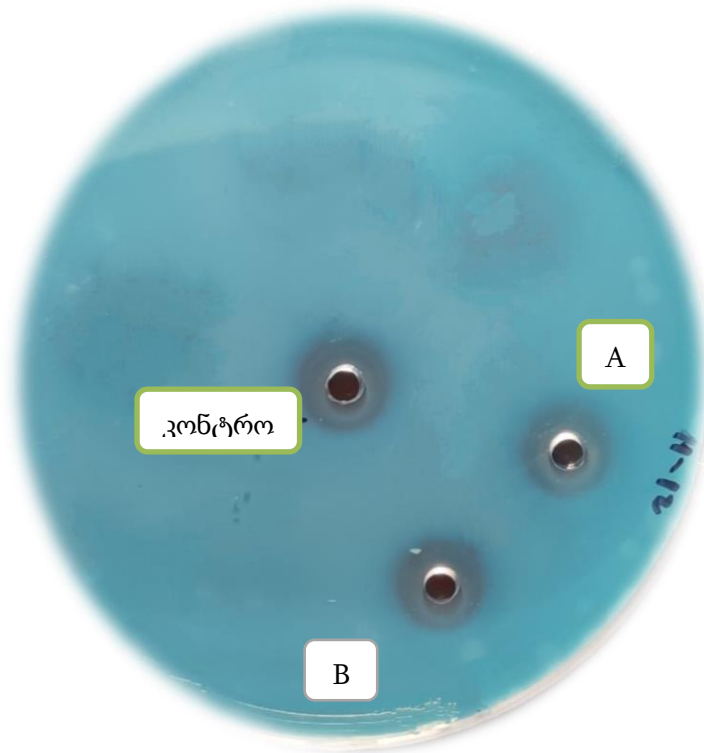
M II-12 შტამის მუტირების შემდგომ გამოყოფილ კულტურაში თავდაპირველად ჩატარდა ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების, კერძოდ პროტეოლიზური ფერმენტების სკრინინგი. უცხიმო რძის აგარის ექსპერიმენტის საფუძველზე შემოწმდა არა მუტირებული და 20 წუთით დასხივების შედეგად მიღებული კულტურები (იხილეთ სურათი 6). არა მუტირებული სინჯის დიამეტრი წარმოადგენდა 10 მმ-ს, ხოლო, მუტირებული სინჯის 25 მმ-ს. უკეთესის პასუხი დაფიქსირებულია 20 წუთიანი მუტირებული შტამის შემთხვევაში.



სურათი 6. A სურათზე გამოსახულია არა მუტირებული შტამის პროტეოლიზური აქტივობა, B სურათზე 20 წუთით დასხივებული შტამების ფერმენტული აქტივობა. საინკუბაციო დრო 48 სთ

3.20. მუტაგენების შედეგად მიღებულ M II-12 შტამში პროტეოლიზური აქტივობის განსაზღვრა გელ დიფუზიური მეთოდით.

მუტაგენების ეფექტრონუს შესამოწმებლად M II-12 შტამიდან გამოყოფილი სინჯი გელ დიფუზიური მეთოდით შევამოწმეთ პროტეოლიზური აქტივობის დასადგენად (იხილეთ სურათი 7). როგორც სურათიდან ჩანს M II-12 შტამიდან გამოყოფილ სინჯში ფიქსირდება პროტეოლიზური აქტივობა. საკონტროლო და 20 წუთიანი მუტირებული სინჯების დიამეტრი წარმოადგენს 1,4 სმ-ს, ხოლო არა მუტირებული სინჯის დიამეტრ- 1.3სმ-ს.

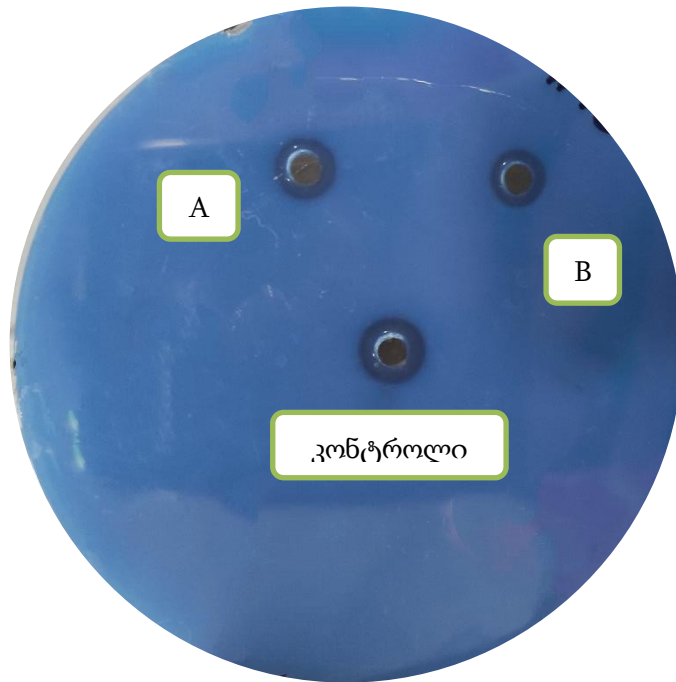


სურათი 7. მუტირებულისინჯის პროტეილიზური აქტივობის დადგენა გელ-დიფუზიური მეთოდით

საკონტროლო ხსნარად გამოყენებულია კომერციული პროტეაზა, შესადარებლად აღებულია არამუტირებული სინჯი A. საკვლევ ხსნარად გამოყენებულია მუტირებული შტამიდან -M II-12 გამოყოფილი სინჯი B- 20 წუთიანი დასხივებით

3.21. მუტაგენების შედეგად მიღებულ M II-12 შტამში პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორის განსაზღვრა.

მუტირებული სინჯების ინჰიბიტორული აქტივობის შესამოწმებლად გამოვიყენეთ გელ დიფუზიური მეთოდი. გამომდინარე იქიდან, რომ აღნიშნულ სინჯებს მოცემულ მეთოდში გამოყენებულ სუბსტრატზე (რძის ფხვნილზე) გააჩნია რეაქცია, სინჯები განვაზავეთ ისე რომ არ მიგველო ცრუ დადებითი პასუხი. განვაზავებლი სინჯები დაემატა კომერციულ პროტეაზას ინჰიბიტორული ეფექტის დასადგენად, როგორც სურათი 8- დან ჩანს 20 წუთიანი მუტაციის შედეგად მიღებულ სინჯს აღმოაჩნდა პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორული თვისება, რადგან სინჯის დიამეტრი უფრო მცირეა საკონტროლო სინჯის პასუხთან შედარებით. საკონტროლო სინჯის დიამეტრია 1.1 სმ, მუტირებული სინჯის 0.9 სმ.



სურათი 8. პროტეოლიზური ფერმენტის ინჰიბიტორული აქტივობის დადგენა გელ დიფუზიური მეთოდით

საკონტროლო ხსნარად გამოყენებულია კომერციული პროტეაზა, საკვლევ ხსნარად გამოყენებულია A-არა მუტირებული შტამიდან გამოყოფილი სინჯი, B - მუტირებული შტამიდან - M II-12 გამოყოფილი სინჯი

3.22. მუტაგენეზის შედეგად მიღებულ სინჯში პროტეოლიზური აქტივობისა და ინჰიბირების განსაზღვრა კოლორიმეტრული მეთოდით

პროტეოლიზური ფერმენტების ან მათი ინჰიბიტორების ზუსტი დეტექტირებისთვის გამოვიყენეთ კვლევის ფარგლებში შექმნილი კოლორიმეტრული მეთოდი რათა მუტაგენეზის შემდგომ მიღებული პასუხები შეგვედარებინა წინა მონაცემებ (იხ. ცხრილი 23).

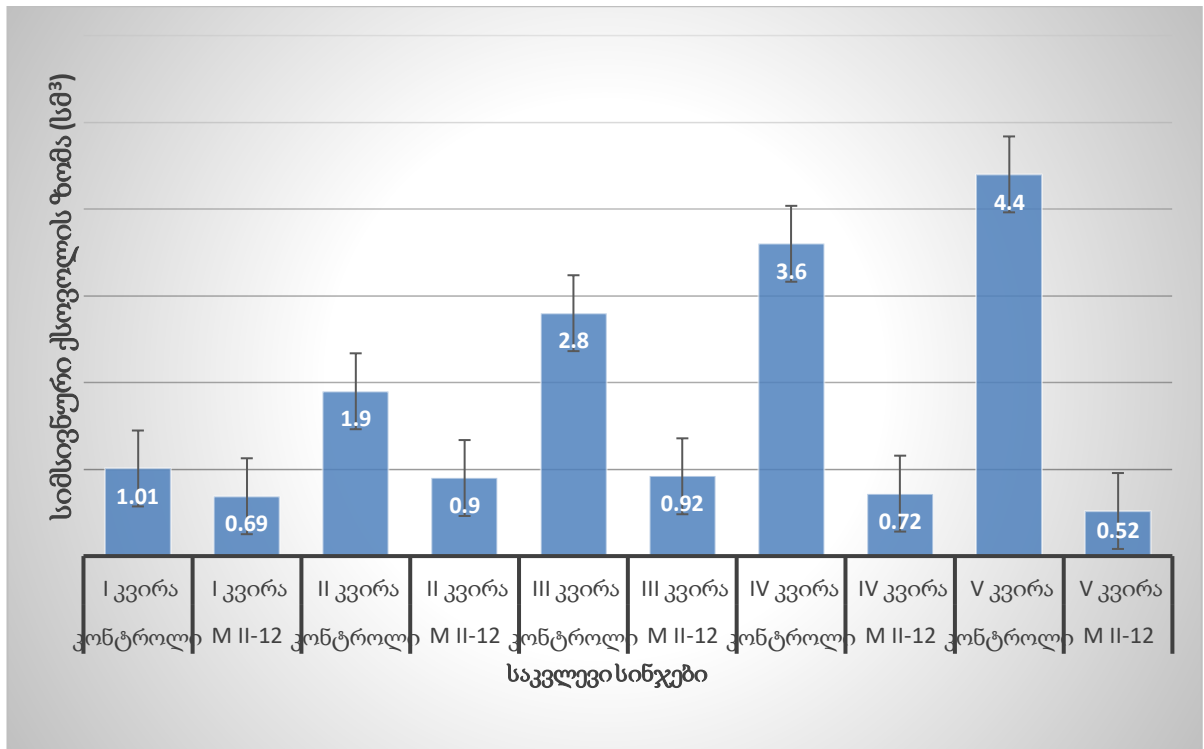
ცხრილი 23. კოლორიმეტრული მეთოდით მუტირებულ სინჯებში პროტეოლიზური ფერმენტების აქტივობისა და ინჰიბირების განსაზღვრა

№	დასახელება	პროტეოლიზური აქტივობა მუტაგენეზის შემდგომ A (U/ml)	ინჰიბიტორული აქტივობა მუტაგენეზის შემდგომ A (U/ml)
1	T1	0	0
2	K1	0	0
3	NL-50	0	0
4	NL-51	0	0
5	Gz 9-4	0	0
6	Gz 9-10	0	0
7	M II-12	0.105	0.05
8	M II-12 (მუტირებული)	0.130	0.08

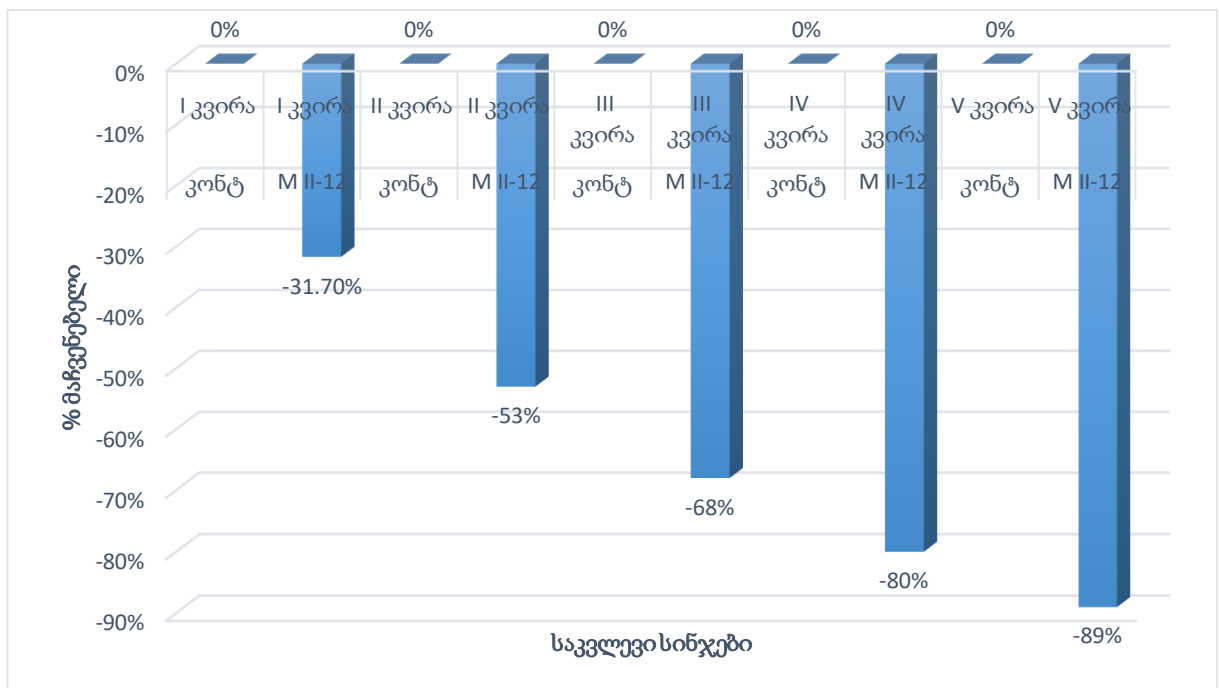
მიღებული პასუხებიდან შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ მუტაგენეზის შედეგად მიღებულ M II-12 სინჯში დაფიქსირდა როგორც პროტეოლიზური ფერმენტების აქტივობის ზრდა ასევე პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორული თვისების არსებობა, თუმცა უნდა ითქვას რომ აღნიშნული ეფექტი სპეციფიურია , სინჯში არსებული ინჰიბიტორები არ მოქმედებენ ამავე სინჯში არსებულ პროტეაზებზე.

3.23. სიმსივნური ქსოვილის განვითარების შეფასება

მუტაგენეზის შემდგომ დავაკვირდით M II-12 შტამიდან გამოყოფილი პრეპარატის გავლენაის სიმსივნური ქსოვილის განვითარებაზე, კალიპერის საშუალებით გაიზომა ცდის პერიოდში მიღებული სიმსივნური ქსოვილის მოცულობა, რომელიც გამოთვლილ იქნა შრეკის ფორმულის საშუალებით , სიმსივნური ქსოვილის ზრდის დინამიკის მაჩვენებელი გამოისახა დიაგრამა 10, 11-ზე.

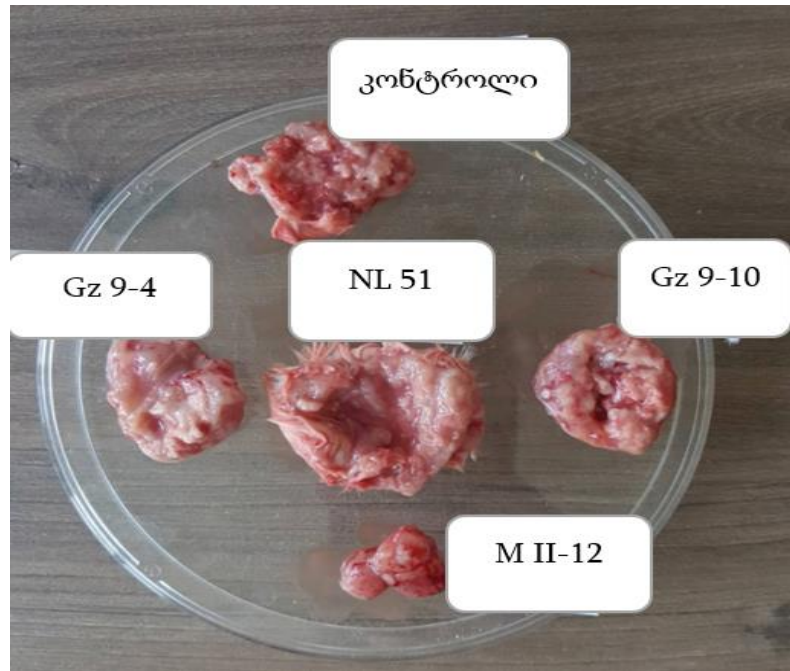


დიაგრამა 10. კარცინომის in vivo მოდელზე პრეპარატების V კვირის ზემოქმედების შედეგად მიღებული სიმსივნური ქსოვილის მოცულობა



დიაგრამა 11. კარცინომის in vivo მოდელზე პრეპარატების V კვირის ზემოქმედების შედეგად მიღებული სიმსივნური ქსოვილის მოცულობის პროცენტული მაჩვენებელი

ვიზუალური შეფასებისთვის ცდის დასრულების შემდგომ საკვლევი ცხოველებიდან მათი ევთანაზიის შემდგომ იქნა ამოკვეთილი სიმსივნური ქსოვილები (იხილეთ სურურათი 9)



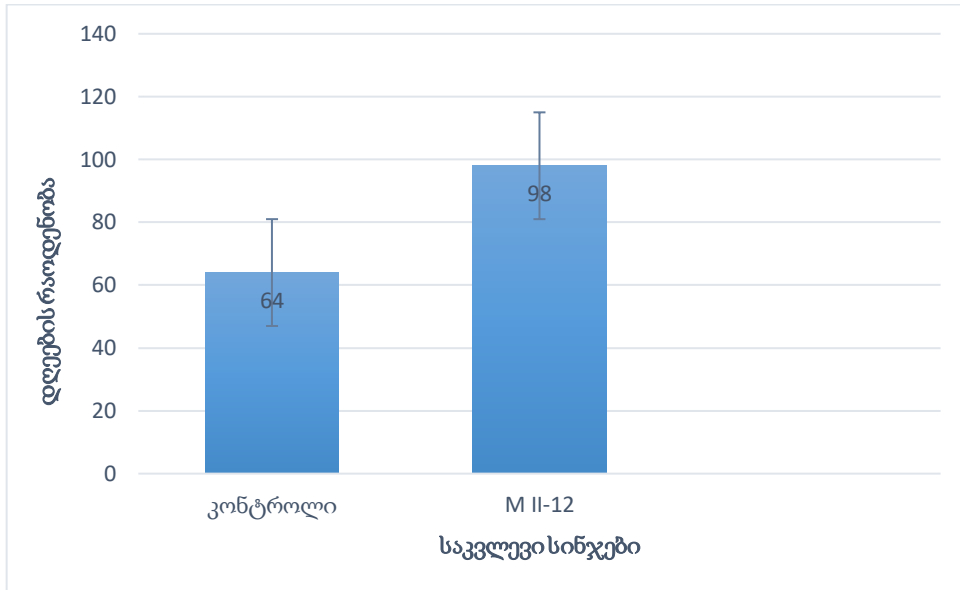
სურათი 9. სხვადასხვა პრეპარატების ზეგავლენის შედეგად მიღებული ქსოვილური ნაზრდი

როგორც სურათიდან ჩანს საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით Gz 9-4, Gz 9-10 დან გამოყოფილი სინჯების ზეგავლენით არ დაფიქსირდა საგრძნობი განსხვავება. M II-12 სინჯის გავლენით ცალსახად უნდა ითქვას, რომ სიმსივნური ქსოვილი ზომაში საგრძნობლად შემცირებულია, ხოლო საპირისპირო პასუხი ფიქსირდება NL-51 შემთხვევაში, სიმსივნური ქსოვილის ზომა ბევრად აღემატება საკონტროლო ქსოვილის.

3.24. დაკვირვება სიცოცხლის ხანგრძლივობაზე მუტაგენური შტამებიდან მიღებული სინჯების ზეგავლენით

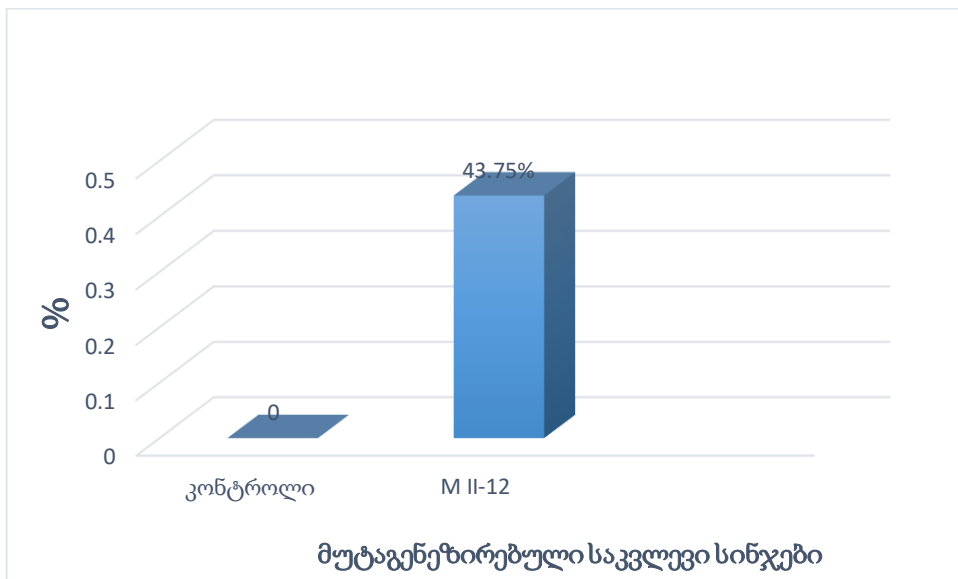
მუტაგენუზის შედეგად მიღებულ საკვლევ სინჯებზე კერძოდ M II-ისევ დავაკვირდით ერლიხის კარცინომის in vivo სიცოცხლის ხანგრძლივობას. კვლევის ფარგლებში მათი სიცოცხლის ხანგრძლივობამ შეადგინა M II- სინჯის

ზეგავლენით 98 დღე (იხ. დიაგრამა 12)



დიაგრამა 12. კარცინომიანი თავვის სიცოცხლის ხანგრძლივობა საკვლევი სინჯის M II-12 ზეგავლენის შედეგად. საკონტროლო სინჯად გამოყენებულ იქნა ფიზიოლოგიური ხსნარი

რაც შეეხება პროცენტულ მაჩვენებელს, საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით M II-12 სინჯის ზეგავლენით სიცოცხლიუნარიანობა გაიზარდა 43.75 პროცენტით. (იხილეთ დიაგრამა 13)



დიაგრამა 13. კარცინომიანი თავვის სიცოცხლის ხანგრძლივობის პროცენტული გამოსახულება საკვლევი სინჯის M II-12 ზეგავლენის შედეგად.

ცხრილი 24. მუტაგენებირებულ და არამუტაგენეზირებული სინჯების გავლენის შედარება სიცოცხლის ხანგრძლივობისა და მოცულობის ცვლილებაზე

სინჯები	სიცოცხლის გახანგრძლივების % მაჩვენებელი საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით (დღეების რაოდენობა)	ზომის შემცირება საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით III კვირის % მაჩვენებელი	პროტეოლიზური ფერმენტული აქტივობა U/ml	პროტეოლიზური ინჰიბიტორული აქტივობა U/ml
არამუტაგენეზირებული სინჯი M II-12	31.75 %	41%	0.105	0.05
მუტაგენეზირებული სინჯი M II-12	43.75 %	68%	0.130	0.08

გამომდინარე იქიდან რომ მუტაგენეზის გამოყენებით მიკროსკოპული სოკოს ინჟინერიით ხდება სხვადასხვა ფიზიკო/ქიმიური ბუნების შეცვლა M II-12-შტამზე განვახორციელეთ აღნიშნული პროცესი. ზემოთმოყვანილი მონაცემებიდან ჩანს, რომ მუტაგენეზის შედეგად მოიმატა როგორც პროტეოლიზური ფერმენტების აქტივობამ ასევე ინჰიბიტორულმა თვისებამაც, ასევე საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით შემცირდა სიმსივნური ქსოვილის მოცულობა და გაიზარდა სიცოცხლის უნარიანობა (იხ. ცხრილი 24).

შესაბამისად უნდა ითქვას, რომ მხოლოდ პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორების არსებობამ გაზარდა სიცოცხლის უნარიანობა , აღნიშნული ეფექტი დაფიქსირდა K1 სა და T1 -ის შემტხვევაში , ხოლო პროტეოლიტიკურმა აქტივობამ ინჰიბიტორთან სინერგიზმში მოგვცა სიმსივნის მკვეთრი შემცირების ეფექტი, რაც დაფიქსირდა M II-12 -ის შემთხვევაში.

3.25. ტექნიკური პრეპარატის მიღების პრინციპიალური ტექნოლოგიური სქემა

სადოქტორო თემის ფარგლებში მიღებული შედეგების საფუძველზე შემოთავაზებულია ტექნოლოგიური სქემა სიმსივნის საწინააღმდეგო

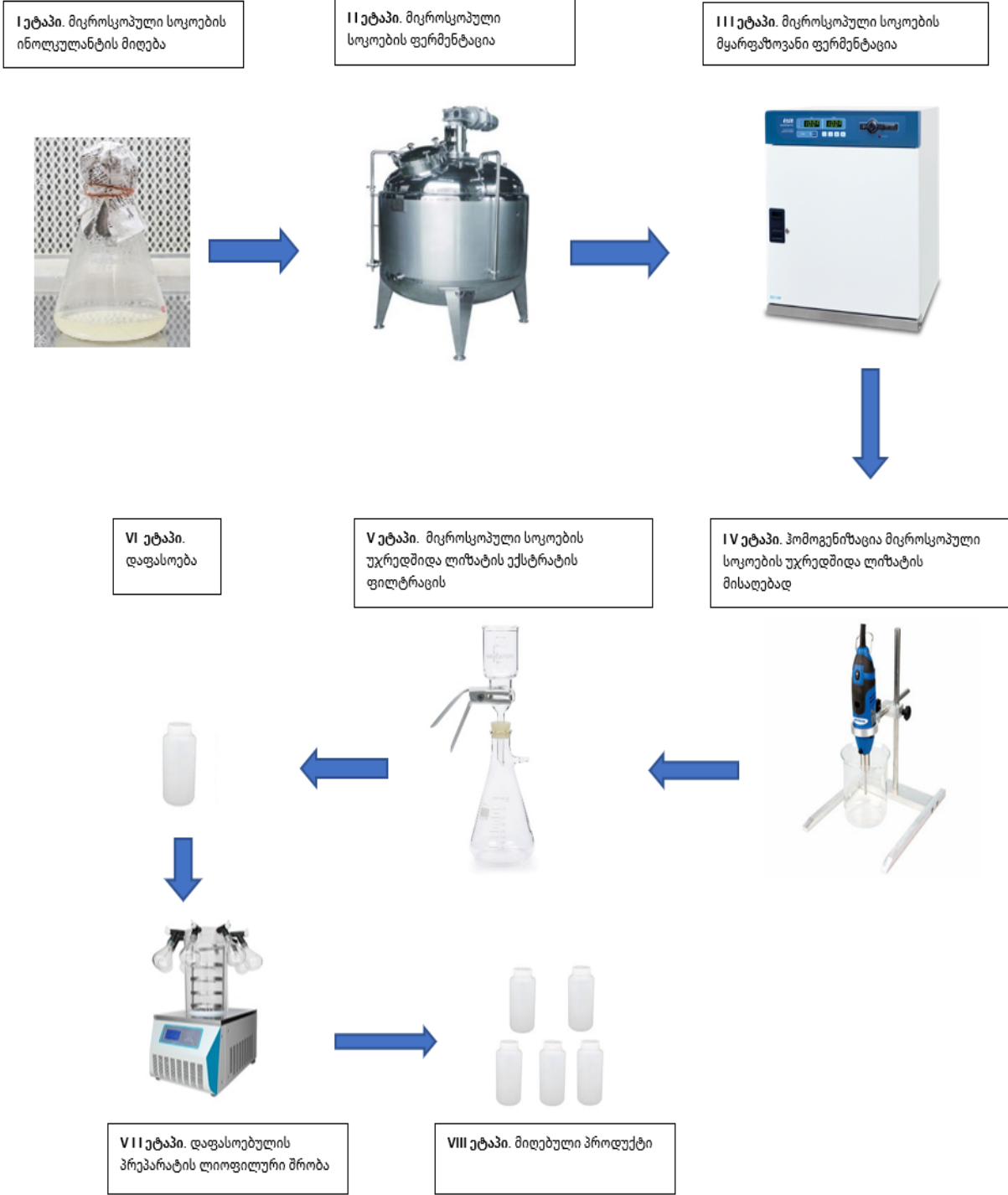
პრეპარატის მისაღებად (იხ. სქემა 4).

საწყის ეტაპზე უნდა მოხდეს მიკროსკოპული სოკოების ინოკულანტის მიღება, ამისთვის სტერილურ საბუროს საკვებ არეზე (აგაროზის გარეშე) სიღრმული კულტივირების პირობებში უნდა ჩაითესოს მიკროსკოპული სოკოების სპორები, სოკოების ზრდა უნდა წარიმართოს 96 საათის განმავლობაში ერლენმეიერის კოლბებში სანჯღრეველიან თერმოსტატში 25°C-ზე. ინკუბაციის დასრულების შემდგომ მიღებული ინოკულანტი უნდა იქნას გადატანილი 30-50 ლიტრიან ფერმენტატორში სათესლე მასალის მოსამზადებლად.

ინოკულანტის ფერმენტიორში შეტანამდე წინასწარ ხდება საბუროს საკვები არის (აგაროზის გარეშე) ორთქლით სტერილიზაცია 0.8 ატმოსფეროზე, 2 საათის განმავლობაში, შემდგომ ხდება ინკუბირება 30 გრადუსზე 24 საათი რის შემდგომაც ხელახლა უნდა ჩატარდეს ორთქლით სტერილიზაცია 0.8 ატმოსფეროზე. შეგრილების შემდგომ ერლენმეიერის კოლბიდან ხდება ინოკულანტის გადატანა ფერმენტიორში. ინკუბაცია წარმოებს 96 სთ 25°C-ზე. 150 rpm ბრუნზე, აერაცია 1 ლიტრ ხსნარზე 12.5 ლ/წთ.

ფერმენტაციის შემდგომ სათესლე მასალის ჩათესვა უნდა მოხდეს წინასწარ მომზადებულ მყარფაზოვან არეზე. სადაც აგროზის ნაცვლად შეტანილი იქნება სახამებელი ან სახამებელი ჟელატინით. აღნიშნული მასა უნდა გასტერილდეს და ჩამოისხას საინკუბაციო კასეტებში, რომლებიც შემდგომ უნდა მოთავსდეს წინასწარ გასტერილებული მყარფაზოვანი ფერმენტაციის კარადაში 25°C-ზე 240 საათის განმავლობაში.

მიკროსკოპული სოკოების ზრდის დასრულების შემდეგ უნდა მოხდეს მასალის ექსტრაგირება უჯრედშიდა ლიზატის მისაღებად, ჰომოგენიზაციის ან ულტრაბგერითი დამუშავების გზით. მიღებული მასა უნდა განცალკევდეს ფილტრაციის მეთოდით (ნუჟი ფილტრის გამოყენებით). მიღებული პრეპარატი უნდა ჩამოისხას სტერილურან ტარაში და განხორციელდეს პრეპარატის ლიოფილური შრობა.



სქემა 4. პრეპარატის მიღების ტექნოლოგიური სქემა

დასკვნა

1. სადოქტორო კვლევის ფარგლებში გამოიყო ანტისიმსივნიური თვისებების მქონე პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკო რომლთა უჯრედშიდა ექსტრაქტს გააჩნია ერლიხის კარცინომაზე მოქმედების უნარი.
2. ბიოინჟინრული მეთოდის, კერძოდ მუტაგენეზით მიღებულ იქნა M II-12 მუტაგენი, რომელშიც გაძლიერდა ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების თვისებები.
3. შესწავლილ იქნა M II-12 უჯრედშიდა ლიზატის ფერმენტული სისტემები. სამუშაოს ფარგლებში დადგინდა, რომ პროტეაზის ინჰიბიტორის არსებობა მკვეთრად ზრდის თავგების სიცოცხლის უნარიანობას საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით. აღნიშნული ეფექტი ქონდა არამარტო მუტაგენეზის გზით მიღებულ კულტურას, არამედ კვლევის ფარგლებში გამოკვლეულ სხვა შტამების ექსტრაქტებსაც (T1, K1).
4. საუკეთესო სინმსივნიის საწინააღმდეგო ეფექტი დაფიქსირდა M II-12-ის შემთხვევაში. ინჰიბიტორებთან ერთად შტამ M II-12 ში აღმოჩენილ იქნა განსაკუთრებული სპეციფიურობის მქონე პროტეაზა, რომელთან ერთადაც სინერგიზმში ინჰიბიტორი მკვეთრად ამცირებს ერლიხის კარცინომის მიერ დასნებოვნებულ უჯრედებს
5. შტამ M II-12 ის მიერ სინთეზირებული პროტეაზა არ ინჰიბირდა ამავე შტამის მიერ სინთეზირებული პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორით. რაც მიუთითებს პროტეაზას ასევე ინჰიბიტორის განსაკუთრებულ სპეციფიურობაზე.
6. აღმოჩენილია ერლიხის კარცინომის დამრთგუნველი ფერმენტ-ინჰიბიტორული სინერგეტიკული სისტემა, რომლის პროდუცენტიც იქნა გამოყოფილი. აღნიშნული ეფექტი გაძლიერებულ იქნა ბიოინჟინრული მეთოდით (მუტაგენეზით), რისი საშუალებითაც დაფიქსირდა სიმსივნიური ზრდის კლების მკვეთრი ეფექტი.
7. ჩატარებული კვლევების საფუძველზე შემოთავაზებულია ანტისიმსივნიური პრეპარატის მიღების ტექნოლოგიური სქემა.

ციტირებული ლიტერატურის ნუსხა

1. Hausman, Daniel M. What Is Cancer?. Perspectives in Biology and Medicine, (2019), 62(4), 778–784. doi:10.1353/pbm.2019.0046
2. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell.(2000);100(1):57-70
3. Lum JJ et al. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. Cell. (2005), 120(2):237-248
4. Hahn WC et al. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. Nature Medicine. (1999); 5(10):1164-1170
5. Wu, Lele; Fidan, Kerem; Um, Jae-Young; Ahn, Kwang Seok. Telomerase: key regulator of inflammation and cancer. Pharmacological Research, (2020), 104726–. doi:10.1016/j.phrs.2020.104726
6. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon: International Agency for Research on Cancer; (2020).
7. Hyuna Sung, Jacques Ferlay, Rebecca L Siegel, Mathieu Laversanne, Isabelle Soerjomataram, Ahmedin Jemal, Freddie Bray; Global Cancer Statistics (2020): GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries; CA Cancer J Clin. 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660.
8. Stein, Gary S.; Luebbers, Kimberly P. Cancer (Prevention, Early Detection, Treatment and Recovery); CAUSES OF CANCER. (2019), 10.1002/9781119645214(), 53–74. doi:10.1002/9781119645214.ch3
9. Patel, Aisha; Benign vs Malignant Tumors. JAMA Oncology, (2020). doi:10.1001/jamaoncol.2020.2592
10. Carbone, Antonino. Cancer Classification at the Crossroads. Cancers, (2020), 12(4), 980–. doi:10.3390/cancers12040980
11. Mitra, Sanga, Cancer and Noncoding RNAs; Introduction, (2018). 1–23. doi:10.1016/B978-0-12-811022-5.00001-2
12. Spranger, S., & Gajewski, T. F. (2018). Mechanisms of tumor cell-intrinsic immune evasion. Annual Review of Cancer Biology, 2, 213-228.
13. Kimmelman, A. C. (2017). Preclinical research in cancer drug development: a critical review. Nature Reviews Clinical Oncology, 14(3), 177-183.

14. Frese, K. K., & Tuveson, D. A. (2007). Maximizing mouse cancer models. *Nature Reviews Cancer*, 7(9), 645-658.
15. Whittle, J. R., Lewis, M. T., & Lindeman, G. J. (2015). Visiting the neighbors: transcellular propagation of extracellular matrix remodeling during tumor progression and metastasis. *Cell Adhesion & Migration*, 9(4), 250-259.
16. Weaver, V. M., Petersen, O. W., Wang, F., Larabell, C. A., Briand, P., Damsky, C., & Bissell, M. J. (1997). Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *Journal of Cell Biology*, 137(1), 231-245
17. Ozaslan, M., Karagoz, I.D., Kilic, I.H. and Guldur, M.E., 2011. Ehrlich ascites carcinoma. *African journal of Biotechnology*, 10(13), pp.2375-2378.
18. Mishra, Sneha, Ankit Kumar Tamta, Mohsen Sarikhani, Perumal Arumugam Desingu, Shruti M. Kizkekra, Anwit Shrinivas Pandit, Shweta Kumar, Danish Khan, Sathees C. Raghavan, and Nagalingam R. Sundaresan. "Subcutaneous Ehrlich Ascites Carcinoma mice model for studying cancer-induced cardiomyopathy." *Scientific reports* 8, no. 1 (2018): 5599.
19. Gowda, Nirmala G. Sannappa, Varsha D. Shiragannavar, Samudyata C. Prabhuswamimath, Sunanda Tuladhar, Saravana Babu Chidambaram, and Prasanna K. Santhekadur. "Ehrlich Ascites carcinoma mice model for studying liver inflammation and fibrosis." *Advances in Cancer Biology-Metastasis* 4 (2022): 100029.
20. Sudhakar, Akulapalli ,History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science & Therapy*, (2009). 1(2), i-iv. doi:10.4172/1948-5956.100000e2
21. DeVita VT, Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Research*. (2008); 68(21):8643-8653
22. Chan HK, Ismail S. Side effects of chemotherapy among cancer patients in a Malaysian General Hospital: experiences, perceptions and informational needs from clinical pharmacists. *Asian Pac J Cancer Prev*, (2014). 15(13):5305-9
23. Baskar R et al. Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions. *International Journal of Medical Sciences*. (2012); 9(3):193
24. Dilalla V, Chaput G, Williams T, Sultanem K. Radiotherapy side effects: integrating a survivorship clinical lens to better serve patients. *Curr Oncol*. (2020) Apr;27(2):107-112. doi: 10.3747/co.27.6233.

25. Arruebo M, Vilaboa N, Sáez-Gutierrez B, Lambea J, Tres A, Valladares M, González-Fernández A. Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers (Basel)*. (2011) Aug 12;3(3):3279-330. doi: 10.3390/cancers3033279.
26. Tohme S, Simmons RL, Tsung A. Surgery for Cancer: A Trigger for Metastases. *Cancer Res*. 2017 Apr 1;77(7):1548-1552. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1536.
27. Mohamed, M., Sloane, B. multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, (2006), 764–775. <https://doi.org/10.1038/nrc1949>
28. Eatemadi, Ali; Aiyelabegan, Hammed T.; Negahdari, Babak; Mazlomi, Mohammad Ali; Daraee, Hadis; Daraee, Nasim; Eatemadi, Razieh; Sadroddiny, Esmail. Role of protease and protease inhibitors in cancer pathogenesis and treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, (2017), 86(), 221–231. doi:10.1016/j.
29. Enzyme Inhibitors & Cancer Therapy, *Oncology Times*: October 10, (2003) - Volume 25 - Issue 19 - p 52 doi: 10.1097/01.COT.0000290996.53543.74
30. S. Rakashanda, F. Rana, S. Rafiq, A. Masood, S. Amin, Role of proteases in cancer: a review, *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* (2012), 7 (4) 90–101.
31. Subramaniam S, Selvaduray KR, Radhakrishnan AK. Bioactive Compounds: Natural Defense Against Cancer? *Biomolecules*. (2019), 21;9(12):758. doi: 10.3390/biom9120758.
32. Y. Yang, H. Hong, Y. Zhang, W. Cai, Molecular imaging of proteases in cancer, *Cancer Growth and Metastasis* 2 (2009) 13.
33. U. Verbovšek, C.J. Van Noorden, T.T. Lah, Complexity of cancer protease biology: cathepsin K expression and function in cancer progression, *Semin. Cancer Biol.* (2015) Elsevier.
34. R.G. Boy, M. Knapp, U. Eisenhut, W. Mier, *Enzymes/transporters, Molecular Imaging II*, Springer, (2008), pp. 131–143.
35. M. Egeblad, Z. Werb, New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression, *Nat. Rev. Cancer* 2 (3) (2002) 161–174.
36. J. Kim, W. Yu, K. Kovalski, L. Ossowski, Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay, *Cell*, (1998), 94 (3) 353–362.
37. S.D. Mason, J.A. Joyce, Proteolytic networks in cancer, *Trends Cell Biol.* (2011), 21 (4) 228–237.

38. S. Zucker, J. Cao, W.-T. Chen, Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment, *Oncogene*, (2000), 19 (56) 6642–6650.
39. M.M. Mohamed, B.F. Sloane, Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer, *Nat. Rev. Cancer*, (2006), 6 (10) 764–775.
40. V. Gocheva, J.A. Joyce, Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion, *ABBV Cell Cycle*, (2007), 6 (1) 60–64.
41. C. Jedeszko, B.F. Sloane, Cysteine cathepsins in human cancer, *Biol. Chem.* (2004), 385 (11) 1017–1027.
42. O. Vasiljeva, B. Turk, Dual contrasting roles of cysteine cathepsins in cancer progression: apoptosis versus tumor invasion, *Biochimie*, (2008), 90 (2) 380–386.
43. P. Matarrese, B. Ascione, L. Ciarlo, R. Vona, C. Leonetti, M. Scarsella, A.M. Mileo, C. Catricalà, M.G. Paggi, W. Malorni, Cathepsin B inhibition interferes with metastatic potential of human melanoma: an in vitro and in vivo study, *Mol. Cancer* 9 (2) (2010) 207.
44. J.A. Joyce, D. Hanahan, Multiple roles for cysteine cathepsins in cancer, *ABBV Cell Cycle* 3 (12) (2004) 1516–1519.
45. C. Tu, C.F. Ortega-Cava, G. Chen, N.D. Fernandes, D. Cavallo-Medved, B.F. Sloane, V. Band, H. Band, Lysosomal cathepsin B participates in the podosome-mediated extracellular matrix degradation and invasion via secreted lysosomes in v-Src fibroblasts, *Cancer Res.* 68 (22) (2008) 9147–9156.
46. K. Hirai, M. Yokoyama, G. Asano, S. Tanaka, Expression of cathepsin B and cystatin C in human colorectal cancer, *Hum. Pathol.* 30 (6) (1999) 680–686.
47. P.L. Kandalaf, K.L. Chang, C.W. Ahn, S.T. Traweek, P. Mehta, H. Battifora, Prognostic significance of immunohistochemical analysis of cathepsin D in low-stage breast cancer, *Cancer* 71 (9) (1993) 2756–2763.
48. P. Michl, Targeting cathepsins: a new glimmer of hope for pancreatic cancer therapy? *Gut* 61 (6) (2012) 790–791.
49. Y. Saleh, J. Wnukiewicz, R. Andrzejak, T. Trziszka, M. Siewinski, P. Ziolkowski, W. Kopec, Cathepsin B and cysteine protease inhibitors in human tongue cancer: correlation with tumor staging and in vitro inhibition of cathepsin B by chicken cystatin, *J. Cancer Mol.* 2 (2006) 67–72.

50. N. Fujise, A. Nanashima, Y. Taniguchi, S. Matsuo, K. Hatano, Y. Matsumoto, Y. Tagawa, H. Ayabe, Prognostic impact of cathepsin B and matrix metalloproteinase-9 in pulmonary adenocarcinomas by immunohistochemical study, *Lung Cancer* 27 (1) (2000) 19–26.
51. J.M. Lankelma, D.M. Voorend, T. Barwari, J. Koetsveld, A.H. Van der Spek, A.P. De Porto, G. Van Rooijen, C.J. Van Noorden, Cathepsin L, target in cancer treatment? *Life Sci.* 86 (7) (2010) 225–233.
52. M. Skrzypczak, A. Springwald, C. Latrich, J. Häring, S. Schüler, O. Ortmann, O. Treeck, Expression of cysteine protease cathepsin L is increased in endometrial cancer and correlates with expression of growth regulatory genes, *Cancer Invest.* 30 (5) (2012) 398–403.
53. Y.A. DeClerck, A.M. Mercurio, M.S. Stack, H.A. Chapman, M.M. Zutter, R.J. Muschel, A. Raz, L.M. Matrisian, B.F. Sloane, A. Noel, Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section, *Am. J. Pathol.* 164 (4) (2004) 1131–1139.
54. A. Barrett, D. Cathepsin, Purification of isoenzymes from human and chicken liver, *Biochem. J.* 117 (1970) 601–607.
55. S. Diment, K. Martin, P. Stahl, Cleavage of parathyroid hormone in macrophage endosomes illustrates a novel pathway for intracellular processing of proteins, *J. Biol. Chem.* 264 (23) (1989) 13403–13406.
56. A. Vashishta, S.S. Ohri, V. Vetvicka, Pleiotropic effects of cathepsin D, *Endocrine, Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 9 (4) (2009) 385–391
57. G. Nicotra, R. Castino, C. Follo, C. Peracchio, G. Valente, C. Isidoro, The dilemma: does tissue expression of cathepsin D reflect tumor malignancy? The question: does the assay truly mirror cathepsin D mis-function in the tumor?, *Cancer Biomark. Sect. A Dis. Mark.* 7 (1) (2009) 47–64.
58. E.S. Radisky, D.C. Radisky, Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 15 (2) (2010) 201–212.
59. O. Masson, C. Prébois, D. Derocq, A. Meulle, C. Dray, D. Daviaud, D. Quilliot, P. Valet, C. Muller, E. Liaudet-Coopman, Cathepsin-D, key protease in breast cancer, is up-regulated in obese mouse and human adipose tissue, and controls adipogenesis, *PLoS One* 6 (2) (2011) e16452.

60. J. Rodriguez, J. Vazquez, M. Corte, M. Lamelas, M. Bongera, M. Corte, A. Alvarez, M. Allende, L. Gonzalez, M. Sanchez, Clinical significance of cathepsin D concentration in tumor cytosol of primary breast cancer, *Int. J. Biol. Mark.* 20 (2) (2004) 103–111.
61. A. Vashishta, S.S. Ohri, M. Proctor, M. Fusek, V. Vetvicka, Ribozyme-targeting procathepsin D and its effect on invasion and growth of breast cancer cells: an implication in breast cancer therapy, *Int. J. Oncol.* 30 (5) (2007) 1223–1230.
62. H. Huang, E. Pierstorff, E. Osawa, D. Ho, Protein-mediated assembly of nanodiamond hydrogels into a biocompatible and biofunctional multilayer nanofilm, *ACS Nano* 2 (2) (2008) 203–212.
63. S.S. Ohri, A. Vashishta, M. Proctor, M. Fusek, V. Vetvicka, The propeptide of cathepsin D increases proliferation, invasion and metastasis of breast cancer cells, *Int. J. Oncol.* 32 (2) (2008) 491–498.
64. B.S. Mitchell, The proteasome—an emerging therapeutic target in cancer, *New Engl. J. Med.* 348 (26) (2003) 2597–2598.
65. D. Chen, M. Frezza, S. Schmitt, J. Kanwar, Q. Dou, Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives, *Curr. Cancer Drug Targets* 11 (3) (2011) 239.
66. A. Anastasov, P. Vihinen, J. Nikkola, S. Pyrhonen, T. Vlaykova, Matrix metalloproteinases in development and progression of skin malignant melanoma, *Med. (Baltimore)* 1 (1) (2011).
67. B. Evrosimovska, B. Velickovski, C. Dimova, D. Veleska-Stefkovska, Matrix metalloproteinases (with accent to collagenases), *J. Cell Anim. Biol.* 5 (7) (2011) 113–120.
68. López-Otín C, Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer.* (2007) Oct;7(10):800-8. doi: 10.1038/nrc2228. PMID: 17851543.
69. Tatsuro Maruyama and Nobuo N Noda. Autophagy-regulating protease Atg4: structure, function, regulation and inhibition. *The Journal of Antibiotics* (2018) 71, 72–78; doi:10.1038/ja.2017.104;
70. Chul Won Yun¹ and Sang Hun Lee. The Roles of Autophagy in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018 Nov; 19(11): 3466.
71. LanZhang¹JingjingLia¹LiangOuyang¹BoLiu¹YanCheng¹ b. Unraveling the roles of Atg4 proteases from autophagy modulation to targeted cancer therapy. *Cancer Letters* 373 (2016) 19–26

72. Marino, G. et al. Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/ autophagin-3. *J. Biol. Chem.* (2007), 282, 18573–18583.
73. Soung, Y. H. et al. Somatic mutations of CASP3 gene in human cancers. *Hum. Genet.* 115, 112–115 (2004)
74. Offman, J. et al. Repeated sequences in CASPASE-5 and FANCD2 but not NF1 are targets for mutation in microsatellite-unstable acute leukemia/ myelodysplastic syndrome. *Mol. Cancer Res.* (2005), 3, 251–260.
75. Lee, J. W. et al. Mutational analysis of the CASP6 gene in colorectal and gastric carcinomas. *APMIS* , (2006), 114, 646–650.
76. Soung, Y. H. et al. Inactivating mutations of CASPASE-7 gene in human cancers. *Oncogene* (2003). 22, 8048–8052.
77. Balbin, M. et al. Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nature Genet.* (2003), 35, 252–257.
78. Montel, V. et al. Altered metastatic behavior of human breast cancer cells after experimental manipulation of matrix metalloproteinase 8 gene expression. *Cancer Res.* (2004), 64, 1687–1694.
79. 666. Krista Juurikka,^{1,2} Georgina S. Butler,^{3,4} Tuula Salo,^{1,2,5,6,7,*} Pia Nyberg,^{1,2,8} and Pirjo Åström^{1,2,3,4}The Role .of MMP8 in Cancer: A Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 2019 Sep; 20(18): 4506.
80. Savinov, A. Y. et al. Matrix metalloproteinase 26 proteolysis of the NH2-terminal domain of the estrogen receptor β correlates with the survival of breast cancer patients. *Cancer Res.* (2006), 66, 2716–2724.
81. Gorrin-Rivas, M. J. et al. Mouse macrophage metalloelastase gene transfer into a murine melanoma suppresses primary tumor growth by halting angiogenesis. *Clin. Cancer Res.* (2000), 6, 1647–1654.
82. Houghton, A. M. et al. Macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) suppresses growth of lung metastases. *Cancer Res.* (2006), 66, 6149–6155.
83. Hamano, Y. et al. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV $\alpha 3$ chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via $\alpha V\beta 3$ integrin. *Cancer Cell* 3, (2003), 589–601.

84. Pozzi, A., LeVine, W. F. & Gardner, H. A. Low plasma levels of matrix metalloproteinase 9 permit increased tumor angiogenesis. *Oncogene* , (2002), 21, 272–281.
85. Hamano, Y. et al. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV $\alpha 3$ chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via $\alpha V\beta 3$ integrin. *Cancer Cell*, (2003), 3, 589–601.
86. Balbin, M. et al. Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nature Genet.* (2003), 35, 252–257.
87. Iruela-Arispe, M. L., Carpizo, D. & Luque, A. ADAMTS1: a matrix metalloprotease with angioinhibitory properties. *Ann. NY Acad. Sci.* (2003), 995, 183–190.
88. Ong, Irvine Lian Hao, and Kun-Lin Yang. "Recent developments in protease activity assays and sensors." *Analyst* 142, no. 11 (2017): 1867-1881.
89. U. S. Lathia, O. Ornatsky, V. Baranov and M. Nitz, *Anal Biochem*, 2011, 408, 157-159.
90. H. W. Wang, D. N. Udukala, T. N. Samarakoon, M. T. Basel, M. Kalita, G. Abayaweera, H. Manawadu, A. Malalasekera, C. Robinson, D. Villanueva, P. Maynez, L. Bossmann, E. Riedy, J. Barriga, N. Wang, P. Li, D. A. Higgins, G. H. Zhu, D. L. Troyer and S. H. Bossmann, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2014, 13, 231-240.
91. A. V. Fuchs, N. Kotman, J. Andrieu, V. Mailander, C. K. Weiss and K. Landfester, *Nanoscale*, 2013, 5, 4829-4839
92. L.-J. Ou, X.-Y. Li, L.-J. Li, H.-W. Liu, A.-M. Sun and K.-J. Liu, 3329-3339. *Analyst*, 2015, 140, 1871-1875.
93. Cupp-Enyard, Carrie. "Sigma's non-specific protease activity assay-casein as a substrate." *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 19 (2008): e899.
94. R. Pandey, N. Patil, M. Rao, Proteases and protease inhibitors: implications in antitumorogenesis and drug development, *Int. J. Hum. Genet.* 7 (2007) 67e82
95. B. Doljak, F. Cateni, M. Anderluh, G. Procida, J. Zilic, M. Zacchigna, Glycerolipids as selective thrombin inhibitors from the fungus *Stereum hirsutum*, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 32 (2006) 635e644.
96. F. Cateni, J. Zilic, M. Zacchigna, G. Procida, Cerebrosides with antiproliferative activity from *Euphorbia peplis* L. *Fitoterapia* 81 (2010) 97e103.

97. Dunaevsky, Y.E.; Popova, V.V.; Semenova, T.A.; Beliakova, G.A.; Belozersky, M.A. (2014). Fungal inhibitors of proteolytic enzymes: Classification, properties, possible biological roles, and perspectives for practical use. *Biochimie*, 2013, 101(), 10–20. doi:10.1016/j.biochi.
98. N.D. Rawlings, F.R. Morton, C.Y. Kok, J. Kong, A.J. Barrett, MEROPS: the peptidase database, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) 320e325.
99. K. Maier, H. Müller, H. Holzer, Purification and molecular characterization of two inhibitors of yeast proteinase B, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 8491e8497.
100. Maier, K., Müller, H., Tesch, R., Trolp, R., Witt, I., & Holzer, H. (1979). Primary structure of yeast proteinase B inhibitor 2. *Journal of Biological Chemistry*, 254(24), 12555-12561.
101. J. Brzin, B. Rogelj, T. Popovic, Clitocypin, a new type of cysteine proteinase inhibitor from fruit bodies of mushroom *Clitocybe nebularis*, *J. Biol. Chem.* 275 (2000)
102. T. Saheki, Y. Matsuda, H. Holzer, Purification and characterization of macromolecular inhibitors of proteinase A from yeast, *Eur. J. Biochem.* 47 (1974) 325e332.
103. P. Schu, D.H. Wolf, The proteinase yscA-inhibitor, IA3, gene. Studies of cytoplasmic proteinase inhibitor deficiency on yeast physiology, *FEBS Lett.* 283 (1991) 78e84
104. H. Umezawa, Chemistry of enzyme inhibitors of microbial origin, *Pure Appl. Chem.* 33 (1973) 129e144.
105. Hibbett, David S., Manfred Binder, Joseph F. Bischoff, Meredith Blackwell, Paul F. Cannon, Ove E. Eriksson, Sabine Huhndorf et al. "A higher-level phylogenetic classification of the Fungi." *Mycological research* 111, no. 5 (2007): 509-547.
106. Humber, Richard A. "Fungi: identification." In *Manual of techniques in insect pathology*, pp. 153-185. Academic press, 1997.
107. David Moore; Geoffrey D. Robson; Anthony P. J. Trinci (14 July 2011). *21st Century Guidebook to Fungi*. Cambridge University Press. p. 52. ISBN 978-1-107-00676-8.
108. Gow, Neil A. R.; Gadd, Geoffrey M., eds. (1995). *Growing Fungus*. Springer. ISBN 978-0-412-46600-7.
109. Watkinson, Sarah C.; Boddy, Lynne; Money, Nicholas (2015). *The Fungi* (3rd ed.). Academic Press. ISBN 978-0-12-382035-8.

110. Lutzoni F; et al. (2004). "Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits". *American Journal of Botany*. 91 (10): 1446–80. doi:10.3732/ajb.91.10.1446. PMID 21652303.
111. James TY; et al. (2006). "Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny". *Nature*. 443 (7113): 818–22. Bibcode:2006Natur.443..818J. doi:10.1038/nature05110. PMID 17051209. S2CID 4302864.
112. McCoy, Peter (2016). *Radical Mycology*. Chthaeus Press. ISBN 9780986399602.
113. Jones, E.B. Gareth; Suetrong, Satinee; Sakayaroj, Jariya; Bahkali, Ali H.; Abdel-Wahab, Mohamed A.; Boekhout, Teun; Pang, Ka-Lai (2015). "Classification of marine Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota and Chytridiomycota". *Fungal Diversity*. 73 (1): 1–72. doi:10.1007/s13225-015-0339-4. S2CID 38469033.
114. Krajicek BJ, Thomas CF Jr, Limper AH (2009). "Pneumocystis pneumonia: current concepts in pathogenesis, diagnosis, and treatment". *Clinics in Chest Medicine*. 30 (2): 265–89. doi:10.1016/j.ccm.2009.02.005. PMID 19375633.
115. Betina, V., 1989. *Mycotoxins: Chemical, Biological and Environmental Aspects. Bioactive Molecules 9*. Elsevier, Amsterdam.
116. Beuchat, L.R., 1987. *Food and Beverage Mycology*, second ed. Van Nostrand Reinhold, New York.
117. Carmichael, J.W., Kendrick, W.B., Connors, I.L., Sigler, L., 1980. *Genera of hyphomycetes*. University of Alberta Press, Edmonton.
118. Davenport, R.R., 1981. Yeasts and yeast-like organisms. In: Onions, A.H.S., Allsopp, D., Eggins, H.O.W. (Eds.), *Smith's Introduction to Industrial Mycology*, seventh ed. Edward Arnold, London.
119. Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.H., 1980. *Compendium of Soil Fungi*. Academic Press, London.
120. Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C., Pegler, D.N., 1995. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*, eighth ed. CAB International, Wallingford

121. Kurt T, Marbà-Ardébol AM, Turan Z, Neubauer P, Junne S, Meyer V (August 2018). "Rocking *Aspergillus*: morphology-controlled cultivation of *Aspergillus niger* in a wave-mixed bioreactor for the production of secondary metabolites". *Microbial Cell Factories*. 17 (1): 128. doi:10.1186/s12934-018-0975-y. PMC 6102829. PMID 30129427. S2CID 52053640.
122. Behera BC (November 2020). "Citric acid from *Aspergillus niger*: a comprehensive overview". *Critical Reviews in Microbiology*. 46 (6): 727–749. doi:10.1080/1040841X.2020.1828815. PMID 33044884. S2CID 222319687.
123. Jump up to:a b Samson RA, Houbraken J, Summerbell RC, Flannigan B, Miller JD (2001). "Common and important species of fungi and actinomycetes in indoor environments". *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments*. CRC. pp. 287–292. ISBN 978-0415268004.
124. Singh, Nikita; Gaur, Smriti (2021), Dai, Xiaofeng; Sharma, Minaxi; Chen, Jieyin (eds.), "GRAS Fungi: A New Horizon in Safer Food Product", *Fungi in Sustainable Food Production*, Cham: Springer International Publishing, pp. 27–37, doi:10.1007/978-3-030-64406-2_3, ISBN 978-3-030-64406-2, S2CID 234175577, retrieved 2022-11-16
125. Jump up to:a b Frisvad JC, Møller LL, Larsen TO, Kumar R, Arnau J (November 2018). "Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102 (22): 9481–9515. doi:10.1007/s00253-018-9354-1. PMC 6208954. PMID 30293194.
126. Klich MA (2002). *Identification of common Aspergillus species*. Utrecht, The Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures. ISBN 978-90-70351-46-5.
127. Jump up to:a b Samson, RA, Houbraken JA, Kuijpers AF, Frank JM, Frisvad JC (2004). "New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*" (PDF). *Studies in Mycology*. 50: 45–6.
128. Varga J, Kocsubé S, Tóth B, Frisvad JC, Perrone G, Susca A, et al. (August 2007). "*Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriolate black *Aspergillus* species with world-wide distribution". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57 (Pt 8): 1925–1932. doi:10.1099/ijls.0.65021-0. PMID 17684283.
129. Jump up to:a b Costa CP, Gonçalves Silva D, Rudnitskaya A, Almeida A, Rocha SM (June 2016). "Shedding light on *Aspergillus niger* volatile exometabolome". *Scientific Reports*. 6 (1): 27441. Bibcode:2016NatSR...627441C. doi:10.1038/srep27441. PMC 4893740. PMID 27264696.

130. Jump up to: a b Semova N, Storms R, John T, Gaudet P, Ulyczynj P, Min XJ, et al. (February 2006). "Generation, annotation, and analysis of an extensive *Aspergillus niger* EST collection". *BMC Microbiology*. 6 (1): 7. doi:10.1186/1471-2180-6-7. PMC 1434744. PMID 16457709.
131. "Penicillium Link 1809". MycoBank. International Mycological Association. Retrieved 2011-07-14.
132. Kirk, PM; Cannon, PF; Minter, DW; Stalpers, JA (2008). *Dictionary of the Fungi* (10th ed.). Wallingford, UK: CABI. p. 505. ISBN 978-0-85199-826-8.
133. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*, C.M. Visagie¹, J. Houbraken¹, , , J.C. Frisvad², , , S.-B. Hong³, C.H.W. Klaassen⁴, G. Perrone⁵, K.A. Seifert⁶, J. Varga⁷, T. Yaguchi⁸, R.A. Samson, 22 September 2014,
134. Samson, R.A.; Pitt, J.I. (1985). *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*. Springer. ISBN 978-0-306-42222-5.
135. Pitt, J.I. (1979). *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*. Academic Press. ISBN 978-0-12-557750-2.
136. Haubrich, W.S. (2003). *Medical Meanings: A Glossary of Word Origins* (2nd ed.). Philadelphia, Pennsylvania: American College of Physicians. p. 175. ISBN 978-1-930513-49-5. Retrieved 2013-02-03.
137. Pitt, J. (1985). "A laboratory guide to common *Penicillium* species". 79. doi:10.2307/3807483. JSTOR 3807483. S2CID 84610634.
138. Samson RA, Seifert KA, Kuijpers AF, Houbraken JA, Frisvad JC (2004). "Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Pencillium* using partial beta-tubulin sequences" (PDF). *Studies in Mycology*. 49: 175–200.
139. Pitt JI, Basílico JC, Abarca ML, López C (2000). "Mycotoxins and toxigenic fungi". *Medical Mycology*. 38 (Suppl 1): 41–46. doi:10.1080/714030911. PMID 11204163.
140. Balgrie, B. (2003). *Taints and Off-flavours in Food*. CRC Press. p. 134. ISBN 978-1-85573-449-4. Retrieved 2013-02-03.

141. Valdez JG, Makuch MA, Ordovini AF, Masuelli RW, Overy DP, Piccolo RJ (2006). "First report of *Penicillium allii* as a field pathogen of garlic (*Allium sativum*)". *Plant Pathology*. 55 (4): 583. doi:10.1111/j.1365-3059.2006.01411.x.
142. da Costa, GL; de Moraes, AM; de Oliveira, PC (1998). "Pathogenic action of *Penicillium* species on mosquito vectors of human tropical diseases". *Journal of Basic Microbiology*. 38 (5–6): 337–41. doi:10.1002/(SICI)1521-4028(199811)38:5/6<337::AID-JOBM337>3.0.CO;2-N. PMID 9871331. S2CID 221867835.
143. Fairs, A.; Wardlaw, AJ; Thompson, JR; Pashley, CH (2010). "Guidelines on ambient intramural airborne fungal spores". *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 20 (6): 490–98. PMID 21243933.
144. Chang, JCS; Foarde, KK; Vanosdell, DW. (1995). "Growth evaluation of fungi (*Penicillium* and *Aspergillus* spp.) on ceiling tiles". *Atmospheric Environment*. 29 (17): 2331–37. Bibcode:1995AtmEn..29.2331C. doi:10.1016/1352-2310(95)00062-4.
145. Semenov SA, Gumargalieva KZ, Zaikov GE (2003-08-01). *Biodegradation and Durability of Materials Under the Effect of Microorganisms (New Concepts in Polymer Science)*. V.S.P. Intl Science. pp. 34–35. ISBN 978-90-6764-388-7.
146. Bartnicki-Garcia S, Nickerson WJ (October 1962). "Induction of yeast-like development in *Mucor* by carbon dioxide". *Journal of Bacteriology*. 84 (4): 829–840. doi:10.1128/jb.84.4.829-840.1962. PMC 277966. PMID 13969719.
147. Orłowski M (June 1991). "Mucor dimorphism". *Microbiological Reviews*. 55 (2): 234–258. doi:10.1128/mr.55.2.234-258.1991. PMC 372813. PMID 1886520
148. Howard DH (2003). *Pathogenic Fungi in Humans and Animals* (2nd ed.). Marcel Dekker. ISBN 978-0-8247-0683-8 – via Google Books.
149. Jump up to: a b Leslie, John F.; Summerell, Brett A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. pp. ix-388. doi:10.1002/9780470278376. ISBN 978-0-470-27837-6. OCLC 608623925. S2CID 82470396.
150. Jump up to: a b c Summerell, Brett A.; Salleh, Baharuddin; Leslie, John F. (2003). "A Utilitarian Approach to *Fusarium* Identification". *Plant Disease*. American Phytopathological Society. 87 (2): 117–128. doi:10.1094/pdis.2003.87.2.117. ISSN 0191-2917. PMID 30812915.

151. Watson, Elaine (2021-06-18). "Nature's Fynd receives GRAS no questions letter from FDA for 'Fy' nutritional fungi protein". foodnavigator-usa.com. Retrieved 2022-12-31.
152. Axworthy, Nicole. "This Vegan Fungi Protein Makes Fine-Dining Debut at NYC's Le Bernardin". VegNews.com. Retrieved 2022-12-31.
153. Katona SJ, Kaminski ER (November 2002). "Sensitivity to Quorn mycoprotein (*Fusarium venenatum*) in a mould allergic patient". *Journal of Clinical Pathology*. 55 (11): 876–7. doi:10.1136/jcp.55.11.876-a. PMC 1769805. PMID 12401831.
154. Peraica M, RadicÂ B, LucicÂ A, PavlovicÂ M (September 1999). "Toxic effects of mycotoxins in humans" (PDF). *Bulletin of the World Health Organization*. 77 (7): 754–66. PMC 2557730. PMID 10534900.
155. Benny, Gerald L., Richard A. Humber, and Joseph B. Morton. "Zygomycota: zygomycetes." *Systematics and Evolution: Part A* (2001): 113-146.
156. Berman, Jules J. *Taxonomic Guide to Infectious Diseases || Ascomycota.* , (), 199–208. doi:10.1016/b978-0-12-415895-5.00036-2 (2012).
157. Kiffer, Etienne. *The Deuteromycetes-Mitosporic Fungi: classification and generic keys*. CRC Press, 2011.
158. Hibbett, David S., Manfred Binder, Joseph F. Bischoff, Meredith Blackwell, Paul F. Cannon, Ove E. Eriksson, Sabine Huhndorf et al. "A higher-level phylogenetic classification of the Fungi." *Mycological research* 111, no. 5 (2007): 509-547.
159. Kirk, Paul M., Paul F. Cannon, J. C. David, and Joost A. Stalpers. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. No. Ed. 9. CABI publishing, 2001.
160. Tyszkiewicz, Zofia, and Małgorzata Krasowska. "Micromycetes Communities of Soil Fungi Occurring in the Buffer Zones of Selected Agricultural Catchment". *Journal of Ecological Engineering* 23 no. 1 (2022): 129-136. doi:10.12911/22998993/143906.
161. Dantigny, Philippe, Audrey Guilmart, and Maurice Bensoussan. "Basis of predictive mycology." *International Journal of Food Microbiology* 100, no. 1-3 (2005): 187-196.

162. Gock, Melissa A., Ailsa D. Hocking, John I. Pitt, and Peter G. Poulos. "Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi." *International Journal of Food Microbiology* 81, no. 1 (2003): 11-19.
163. Hoa, Ha Thi, and Chun-Li Wang. "The effects of temperature and nutritional conditions on mycelium growth of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*)." *Mycobiology* 43, no. 1 (2015): 14-23.
164. Powell, Jeff R., and Matthias C. Rillig. "Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi and ecosystem function." *New Phytologist* 220, no. 4 (2018): 1059-1075
165. Anderson, P. (1995). Mutagenesis. *Methods in cell biology*, 48, 31-58.
166. Aneja, K. R., & Mehrotra, R. S. (2011). Fungal diversity and biotechnology. *Fungal Diversity and Biotechnology*.
167. Smith, K. C. (1992). Spontaneous mutagenesis: experimental, genetic and other factors. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 277(2), 139-162.
168. Agrawal, R., Deepika, N. U. A., & Joseph, R. (1999). Strain improvement of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. by induced mutation for biotransformation of α -pinene to verbenol. *Biotechnology and bioengineering*, 63(2), 249-252.
169. Lawrence, C. W., & Christensen, R. (1976). UV mutagenesis in radiation-sensitive strains of yeast. *Genetics*, 82(2), 207-232.
170. Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T., & Newmark, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual review of nutrition*, 21(1), 381-406.
171. Lamoral-Theys, D., Pottier, L., Dufrasne, F., Neve, J., Dubois, J., Kornienko, A., ... & Ingrassia, L. (2010). Natural polyphenols that display anticancer properties through inhibition of kinase activity. *Current medicinal chemistry*, 17(9), 812-825.
172. Ramos, S. (2007). Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *The Journal of nutritional biochemistry*, 18(7), 427-442.
173. Ramos, S. (2008). Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Molecular nutrition & food research*, 52(5), 507-526.

174. Yang, C. S., Wang, X., Lu, G., & Picinich, S. C. (2009). Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nature Reviews Cancer*, 9(6), 429-439.
175. Granado-Serrano, A. B., Martín, M. A., Bravo, L., Goya, L., & Ramos, S. (2006). Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *The Journal of nutrition*, 136(11), 2715-2721.
176. Chauhan, D. P. (2002). Chemotherapeutic potential of curcumin for colorectal cancer. *Current pharmaceutical design*, 8(19), 1695-1706.
177. Oliveira, I., Sousa, A., Morais, J. S., Ferreira, I. C., Bento, A., Estevinho, L., & Pereira, J. A. (2008). Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, 46(5), 1801-1807.
178. Kim, S. K., & Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional foods*, 2(1), 1-9.
179. Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of functional foods*, 18, 820-897.
180. Mapari, S. A., Nielsen, K. F., Larsen, T. O., Frisvad, J. C., Meyer, A. S., & Thrane, U. (2005). Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(2), 231-238.
181. Akilandeswari, P., & Pradeep, B. (2016). Exploration of industrially important pigments from soil fungi. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(4), 1631-1643.
182. Negreiros de Carvalho PL, Silva Ede O, Chagas-Paula DA, Hortolan Luiz JH, Ikegaki M. Importance and Implications of the Production of Phenolic Secondary Metabolites by Endophytic Fungi: A Mini-Review. *Mini Rev Med Chem*. 2016;16(4):259-71. doi: 10.2174/1389557515666151016123923. PMID: 26471971.
183. Pan, F., Su, T. J., Cai, S. M., & Wu, W. (2017). Fungal endophyte-derived *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*: diversity, antioxidant capacities in vitro and relations to phenolic, flavonoid or saponin compounds. *Scientific Reports*, 7(1), 1-14.

184. Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R., & Ferreira, I. C. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food chemistry*, 173, 501-513.
185. Moussa, M., Ebrahim, W., El-Neketi, M., Mándi, A., Kurtán, T., Hartmann, R., ... & Proksch, P. (2016). Tetrahydroanthraquinone derivatives from the mangrove-derived endophytic fungus *Stemphylium globuliferum*. *Tetrahedron letters*, 57(36), 4074-4078.
186. Sapan, Christine V., Roger L. Lundblad, and Nicholas C. Price. "Colorimetric protein assay techniques." *Biotechnology and applied Biochemistry* 29, no. 2 (1999): 99-108.
187. Chang, S. K., & Zhang, Y. (2017). Protein analysis. *Food analysis*, 315-331.
188. Kielkopf, Clara L., William Bauer, and Ina L. Urbatsch. "Bradford assay for determining protein concentration." *Cold Spring Harbor Protocols* 2020, no. 4 (2020): pdb-prot102269.
189. Zitvogel, L., Pitt, J., Daillère, R. et al. Mouse models in oncoimmunology. *Nat Rev Cancer* 16, 759–773 (2016). <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.91>
190. Mishra, S., Tamta, A.K., Sarikhani, M. et al. Subcutaneous Ehrlich Ascites Carcinoma mice model for studying cancer-induced cardiomyopathy. *Sci Rep* 8, 5599 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23669-9>
191. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *CurrProtoc Immunol*. 2001 May; Appendix3:Appendix 3B. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs21. PMID: 18432654.
192. Su, M., Qian, C., Hu, Y., Lu, W., Huang, R., Chen, M., & Chen, J. (2017). Inhibitory effect of the low-toxic exogenous aryl hydrocarbon receptor modulator 3'3-diindolylmethane on gastric cancer in mice. *Oncology Letters*, 14(6), 8100-8105.
193. Chen, S., Yim, J. J., & Bogyo, M. (2019). Synthetic and biological approaches to map substrate specificities of proteases. *Biological Chemistry*, 401(1), 165-182.
194. Steve Kupina, Chris Fields, Mark C Roman, Sharon L Brunelle, Determination of Total Phenolic Content Using the Folin-C Assay: Single-Laboratory Validation, First Action 2017.13, *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, Volume 101, Issue 5, 1 September 2018, Pages 1466–1472, <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0031>

195. Srinivasan, B. (2022). A guide to the Michaelis–Menten equation: steady state and beyond. *The FEBS journal*, 289(20), 6086–6098.
196. Niranjana, J S. “A Comparative Study on Screening Methods for the Detection of Protease Activity Containing Bacteria.” (2020).
197. Zhang X, Shuai Y, Tao H, Li C, He L. Novel Method for the Quantitative Analysis of Protease Activity: The Casein Plate Method and Its Applications. *ACS Omega*. 2021 Jan 25;6(5):3675–3680. doi: 10.1021/acsomega.0c05192. PMID: 33585747; PMCID: PMC7876679.
198. Vijayaraghavan, P. and Vincent, S.G.P. (2013) A Simple Method for the Detection of Protease Activity on Agar Plates Using Bromocresolgreen Dye. *Journal of Biochemical Technology*, 4, 628–630.
199. Mohan M, Kozhithodi S, Nayarisseri A, Elyas KK. Screening, Purification and Characterization of Protease Inhibitor from *Capsicum frutescens*. *Bioinformation*. 2018 Jun 30;14(6):285–293. doi: 10.6026/97320630014285. PMID: 30237674; PMCID: PMC6137568.