

საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტი

ხელნაწერის უფლებით

თამრიკო ხობელია

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

სადოქტორო პროგრამა - ქიმიური და ბიოლოგიური ინჟინერია
შიფრი - 0711

დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად
წარდგენილი დისერტაციის

ავტორეფერატი

თბილისი

2023 წელი

სამუშაო შესრულებულია შემდეგ დაწესებულებებში

საქართველოს ტექნიკურ უნივერსიტეტი
ქიმიური ტექნოლოგიისა და მეტალურგიის ფაკულტეტი
ქიმიური და ბიოლოგიური ტექნოლოგიების დეპარტამენტი,
საგანმანათლებლო - სამეცნიერო ბიოსამედიცინო ცენტრი „ბიომედი“

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი
პათოფიზიოლოგიის, ექსპერიმენტალური და კლინიკური ანატომიის დეპარტამენტი

საქართველოს აგრარულ უნივერსიტეტი
სერგი დურმიშიძის ბიოქიმიისა და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტი

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: პროფ. ედიშერ კვესიტაძე

რეცენზენტები: -----

დაცვა შედგება ----- წლის ”-----“ -----, -----საათზე
საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტის ქიმიური ტექნოლოგიისა და
მეტალურგიის ფაკულტეტის სადისერტაციო ნაშრომის დაცვის კოლეგიის
სხდომაზე,

კორპუსი -----, აუდიტორია -----

მისამართი: 0160, თბილისი, მ. კოსტავას ქ. 69.

დისერტაციის გაცნობა შეიძლება სტუ-ის ბიბლიოთეკაში, ხოლო
ავტორეფერატისა – ფაკულტეტის ვებგვერდზე

ფაკულტეტის სწავლული მდივანი -----

შესავალი

თემის აქტუალობა: სიმსივნე ავადობის და სიკვდილიანობის ერთერთი წამყვანი მიზეზია მსოფლიოში. სიმსივნის შედეგად გარდაცვლილთა რიცხვი დღითი დღე მატულობს. ყოველწლიურად იზრდება ფილტვის, ღვიძლის, კუჭის, ძუძუს და კოლორექტული კიბოს შემთხვევები.

თანამედროვე მედიცინაში სიმსივნის სამკურნალოდ ფართოდ გამოიყენება ქირურგიული მეთოდები, ქიმიოთერაპია, რადიოთერაპია, იმუნოთერაპია, ჰორმონებზე დაფუძნებული თერაპია და სხვა. ამის მიუხედავად, ონკოპაციენტთა მკურნალობა კვლავ აქტუალურ პრობლემად რჩება, ვინაიდან მკურნალობის ყველა ზემოთხამოთვლილ მეთოდებს თან ახლავს გვერდითი ეფექტები (ნეირო-, ჰეპატო- და კარდიოტოქსიკურობა, იმუნოსუპრესიით განვითარებული ინფექციები, 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 გამოყენებულ იქნეს ისეთი ბუნებრივი წყაროები, როგორცაა: ფერმენტები, ფერმენტების ინჰიბიტორები და სხვადასხვა მიკროორგანიზმებიდან მიღებული ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთები, რომელთაც სავარაუდოდ, გააჩნიათ სიმსივნის საწინააღმდეგო (სიმსივნური უჯრედების ზრდის დამორგუნველი, 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 მკვეთრმატებას, რითაც თავის მხრივ, მონაწილეობენ სიმსივნის განვითარების და გავრცელების პროცესში (ინვაზია, ანგიოგენეზი, მეტასტაზირება და სხვა). ამიტომ, ამ ტიპის ფერმენტების ინჰიბიტორები შეიძლება ჩაითვალოს როგორც ერთ-ერთი 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 სტრუპტომიცეტებში.

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

სამუშაოს მიზანია:

- 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

მიზნის განსახორციელებლად შესრულებული გარკვეული ამოცანები:

1. საქართველოს შერჩეული რეგიონიდან გამოიყო მიკროსკოპული სოკოები.
2. გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოებიდან მიღებულ იქნა სუფთა კულტურები და განხორციელდა ზრდისთვის საჭირო ოპტიმალური პირობების შერჩევა.
3. მიკროსკოპული სოკოების სუფთა კულტურებიდან გამოიყო ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების შემცველი უჯრედშიდა ლიზატი.
4. შეიქმნა ერლიხის კარცინომის in vivo მოდელი
5. ერლიხის კარცინომით დასნებოვნებულ თაგვებზე გამოიკადა მიღებული ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებები (პირველ ეტაპზე მოხდა დაკვირვება სიცოცხლის ხანგრძლივობაზე, სიმსივნის არეალის გაფართოების ან შემცირების ეფექტზე)
6. ბიოლოგიურად აქტიურ ნაერთებში სპეციფიური პროტეაზების დეტექციისთვის შემუშავდა პროტეოლიზური ფერმენტების აქტივობის განსაზღვრის კოლორიმეტრული მეთოდი.
7. განისაზღვრა პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორების და პროტეოლიზური ფერმენტების აქტივობა კოლორიმეტრული და რადიალური დიფუზიის მეთოდების გამოყენებით.
8. იდენტიფიცირდა მიკროსკოპული სოკოების შტამი,
9. ბიო-ინჟინრული მეთოდით, კერძოდ მუტაგენეზის გზით მივიღეთ აქტიური თვისებების მქონე გაძლიერებული მიკროორგანიზმი.
10. კვლევის ფარგლებში მიღებული შედეგების საფუძველზე შემოთავაზებულია პრეპარატის მიღების პრინციპიალური ტექნოლოგიური სქემა.

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, რომელებიც გამოიცადა ექსპერიმენტში ერლიხის კარცინომის in vivo მოდელზე. კვლევის შედეგად გამოვლინდა სიმსივნური ზრდის პროცესის შეფერხების ტენდენცია და სიმსივნის ცხოველების სიცოცხლის ხანგრძლივობის ზრდა საკონტროლო ჯგუფთან 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.

სამუშაოს პრაქტიკული მნიშვნელობა: 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

კვლევის ობიექტი: კვლევის ობიექტს წარმოადგენდა მიკროსკოპული სოკოების უჯრედშიდა ლიზატიდან გამოყოფილი ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებები, რომელთა ბიოქიმიური შედგენილობის და მათი ზეგავლენის

შესწავლა კარცინომის in vivo მოდელზე მოხერხდა სხვადასხვა მეთოდების გამოყენებით:

კვლევის მეთოდოლოგიური ეტაპები:

I ეტაპზე გამოიყო მიკროსკოპული სოკოები. შეირჩა ოპტიმალური პირობები და საკვები არეები, საკვლევ პრეპარატების გამოყოფის მიზნით.

შეიქმნა ერლიხის კარცინომის in vivo მოდელი, გამოიცადა კვლევის ფარგლებში მიღებულ უჯრედშიდა ლიზატში ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებები და განისაზღვრა მათი თვისებები შემდეგნაირად:

- პრეპარატის სიმსივნის ზრდის საწინააღმდეგო თვისებების შესასწავლად კვლევები ჩატარდა 20-25 გ მასის მამრ, უჯიშო თეთრ თაგვებზე. ავთვისებიანი სიმსივნის მოდელირება მოხდა ერლიხის ასციტური კარცინომის 2×10^6 უჯრედის გადანერგვით ლაბ. თაგვების ბექქვეშა მიდამოში. საინექციო სიმსივნური უჯრედების დასათვლელად, უჯრედები შეიღებება ტრიპანის ლურჯით და დაითვალა ჰემოციტომეტრის საშუალებით
- ცილების რაოდენობა განისაზღვრა ბიურეტისა და ბრედფორფდის მეთოდით ფოტოკოლორიმეტრულად
- სიმსივნური ქსოვილის მოცულობის გაზომვა მოხდა კალიპერით. საშუალო ზომა გამოითვალა ფორმულით $V = a \times b^2 \times \pi/6$, სადაც V არის სიმსივნური ქსოვილის მოცულობა, a - სიმსივნური ქსოვილის სიგრძე, b- სიგანე,

II ეტაპზე, შემუშავდა კოლორიმეტრული მეთოდი საკვლევ ლიზატში საერთო პროტეოლიზური აქტივობის დადგენის მიზნით.

III ეტაპზე განისაზღვრა:

- პროტეოლიზური ფერმენტების და მათი ინჰიბიტორები კოლორიმეტრული და რადიალური დიფუზიის მეთოდების გამოყენებით
- პოლიფენოლური ნაერთები სფექტროფოტომეტრულად, ფოლინ-ჩიკოლტეს მეთოდის საშუალებით

IV ეტაპზე იქნა გამოყენებული ბიოინჟინრული მეთოდი, კერძოდ მუტაგენეზი რათა მოგვეხდინა მიკროსკოპულ სოკოებში ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების ეფექტის გაძლიერება. მუტაგენეზი ჩატარდა 240 ნმ-ზე დროის

სხვადასხვა დიაპაზონში (2.5, 5, 10, 15, 20, 30, 40 წთ), სხვადასხვა დამორებაზე (5, 10, 15, 20, 25 სმ).

V ეტაპზე შემუშავდა მიკროსკოპული სოკოების უჯრედშიდა ექსტრაქტის/პრეპარატის მიღების ტექნოლოგიური სქემა.

სამუშაოს აპრობაცია: სადისერტაციო ნაშრომის ძირითადი დებულებები მოხსენებული იყო შემდეგ კონფერენციებზე:

1. საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტის 100 წლის იუბილესადმი მიძღვნილი საერთაშორისო კონფერენცია „მულტიდისციპლინარული სამეცნიერო კვლევების გლობალური პრაქტიკა“. თბილისი 2022 წ. თ.ხობელია, ქ. მუსელიანი, ე. კვესიტაძე. „კოლორიმეტრული ანალიზით საერთო პროტეოლიზური აქტივობის დადგენა“.
2. აკადემიკოს გივი ცინცაძის დაბადებიდან 90 წლისადმი მიძღვნილი საერთაშორისო სამეცნიერო-კონფერენცია „ქიმია-მიღწევები და პერსპექტივები“. თბილისი 2023 წ. თ.ხობელია, ე. კვესიტაძე, ქ. მუსელიანი. „პროტეოლიზური ფერმენტების გავლენა ერლიხის კარცინომის ზრდაზე“.

სამუშაოს მოცულობა და სტრუქტურა: სადისერტაციო ნაშრომი შედგება შემდეგი ნაწილებისაგან: შესავალი, ლიტერატურის მიმოხილვა, მეთოდოლოგიური კვლევა, შედეგები და მათი განსჯა, დასკვნა და ციტირებული ლიტერატურის ნუსხა. ნაშრომი წარმოდგენილია 136 ფურცელზე. შეიცავს რეზიუმეს, 9 სურათს, 23 გრაფიკს, 24 ცხრილს, 13 დიაგრამას, 4 სქემას, დასკვნას და 199 ციტირებულ ლიტერატურას.

სადისერტაციო ნაშრომის შინაარსი

სადისერტაციო ნაშრომის შესავალში წარმოდგენილია სადისერტაციო თემის აქტუალობა, დასახულია მიზანი, რომლის მისაღწევად ჩატარდა სადოქტორო კვლევა. მოკლედია მიმოხილული კვლევის ფარგლებში მიღწეული შედეგები და სამომავლო გეგმები.

ლიტერატურის მიმოხილვა შეეხება: სიმსივნეს და მის გამომწვევ მიზეზებს, სიმსივნის მკურნალობის მეთოდებს და მკურნალობასთან დაკავშირებულ

პრობლემებს, ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების (პროტეოლიზური ფერმენტების, პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორების) გავლენას სიმსივნეზე, პროტეოლიზური ფერმენტების აქტივობის განსაზღვრის მეთოდებს და მათთან დაკავშირებულ პრობლემებს, მიკროსკოპულ სოკოებს, მუტაგენებსა და ფენოლურ ნაერთებს.

მეთოდოლოგიური კვლევაში აღწერილია ყველა ის მეთოდი რაც გამოყენებული იქნა კვლევისთვის. აღნიშნული თავი დაყოფილია 5 ეტაპად. პირველი ეტაპი ეხება მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფას, ზრდისთვის საჭირო ოპტიმალური პირობების დადგენას, მიკროსკოპული სოკოების მყარფაზოვანი კულტივირების გზით უჯრედშიდა ლიზატის მიღებას და გამოცდას ერლიხის კარცინომის in vivo მოდელზე. პრეპარატის ზეგავლენას საცდელი ცხველების სიცოცხლის ხანგრძლივობაზე და სიმსივნური ქსოვილის ზრდის დინამიკაზე დაკვირვებას.

კვლევის მეორე ეტაპში შემუშავდა ახალი კოლორიმეტრული მეთოდი საერთო პროტეოლიზური აქტივობის დადგენის მიზნით.

კვლევის მესამე ეტაპი შეეხება უჯრედშიდა ლიზატში ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების განზაზღვრას, როგორც კოლორიმეტრული ასევე რადიულური დიფუზიის გამოყენებით, მიკროსკოპული სოკოების იდენტიფიკაციას.

კვლევის მეოთხე ეტაპზე ჩატარებულია მიკროსკოპული სოკოების მუტაგენეზი (UV დასხივების გამოყენებით), უფრო აქტიური თვისებების მქონე გაძლიერებული მიკროორგანიზმის მიღების მიზნით.

ნაშრომში წარმოდგენილია ექსპერიმენტული შედეგები და მათი განსჯა. რომელთა საფუძველზე მეხუთე ეტაპზე შემოთავაზებულია კვლევის ფარგლებში მიღებული პრეპარატის ტექნოლოგიური სქემა. დისერტაციის ბოლოს წარმოდგენილია დისკუსია და ციტირებული ლიტერატურის ნუსხა.

წარმოდგენილი კვებითი სამუშაო განხორციელდა შოთა რუსთაველის საქართველოს ეროვნული სამეცნიერო ფონდის ფინანსური მხარდაჭერით, PHDF-22-5398 სადოქტორო გრანტის ფარგლებში.

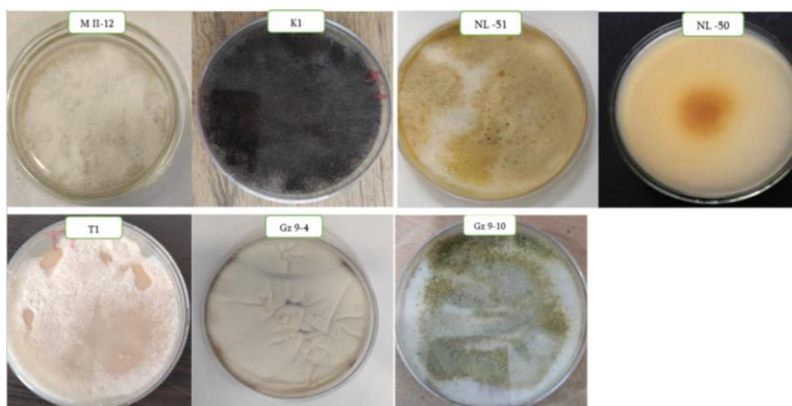


ექსპერიმენტული კვლევის შედეგები და მათი განსჯა

კვლევის პირველ ეტაპზე გამოიყო მიკროსკოპული სოკოები, შერჩეულ იქნა ოპტიმალური პირობები და საკვები არე (იხ სურათი 1):

- 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.

ზემოთაღნიშნული მიკროსკოპული სოკოების მყარფაზოვანი ფერმენტაციის შედეგად გამოყოფილ იქნა უჯრედშიდა ლიზატები- T1, K1, NL-50, NL-51, Gz 9-6, Gz 9-10, M II-12. აღნიშნული სინჯები დაიტესტა ანტისიმსივნური ეფექტის კვლევისთვის.



სურათი 1. მიკროსკოპული სოკოები.

მიკროსკოპული სოკოებიდან გამოყოფილი უჯრედშიდა ლიზატის ანტისიმსივნური ეფექტის დადგენის მიზნით შეიქმნა ერლიხის კარცინომის in vivo მოდელი, რომელზეც გამოიცადა მიღებული ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებები.

საწყისს ეტაპზე გვსურდა უჯრედშიდა ლიზატში ცილების საერთო რაოდენობის განისაზღვრა, რათა მოგვეხდინა საინექციო ხსნარების სტანდარტიზაცია ცილის მიხედვით. აღნიშნული გვესაჭიროებოდა იმისთვის, რომ საკვლევ თაგვებში შეგვეყვანა პრეპარატი ერთიდა იგივე ცილის რაოდენობით.

ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებებში ცილების საერთო რაოდენობის განსაზღვრა ბრედფორდის მეთოდით

ბრედფორდის მეთოდის საშუალებით განისაზღვრა ცილის კონცენტრაცია სპექტრომეტრულად 578 ნმ-ზე. 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. დადგინდა საკვლევ სინჯებში ცილის შემდეგი კონცენტრაცია: T1-5 მგ/მლ, K1-7.9 მგ/მლ, NL-50-7.4 მგ/მლ, NL-51-5.8 მგ/მლ, Gz 9-6-7 მგ/მლ, Gz 9-10-6.6 მგ/მლ, M II-1-7.92 მგ/მლ. კვლევისთვის საინექციოდ გამოყენებულ იქნა 200 მკლ სინჯები, ცილის კონცენტრაციით 2 მგ/მლ .

ავთვისებიანი სიმსივნის მოდელირება ლაბ. თაგვებში

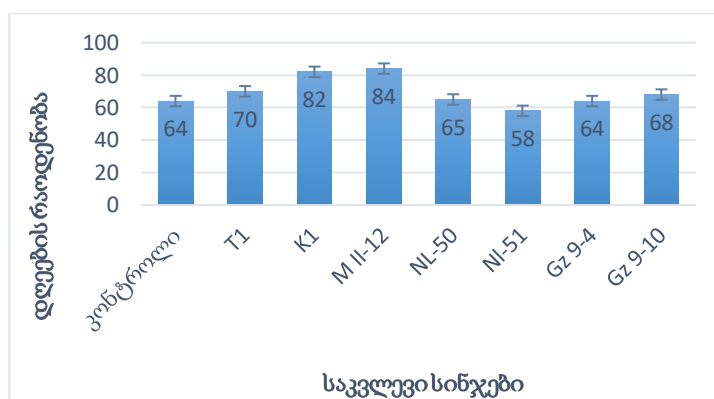
საკვლევ ცხოველებში ერლიხის ასციტური კარცინომის გადანერგვიდან 7-10 დღეს თაგვებს განუვითარდათ სიმსივნური წარმონაქმნი (იხ. სურათი 2). თითოეული საკვლევები სინჯისთვის ასევე საკონტროლო ნიმუშისთვის გადაირჩა 8 – 8 თაგვი. საკონტროლო სამოდელი სისტემა ინექცირებულ იქნა 200 მკლ ფიზიოლოგიური ხსნარით, ხოლო საკვლევ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



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

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 თავების სიცოცხლის უნარიანობა. საკონტროლო ჯგუფმა საშუალოდ იცოცხლა 64 დღე, **Gz 9-10** სინჯს ინექციის შედეგად თავების 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.

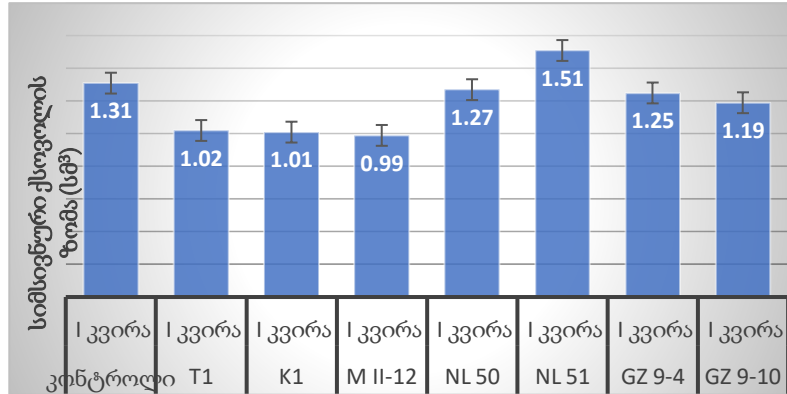


დიაგრამა 1. კარცინომიანი თავის სიცოცხლის ხანგრძლივობა საკვლევი სინჯების: T1, K1, M II-12, NL-50, NL-51, Gz 9-4, Gz-9-10 ზეგავლენის შედეგად

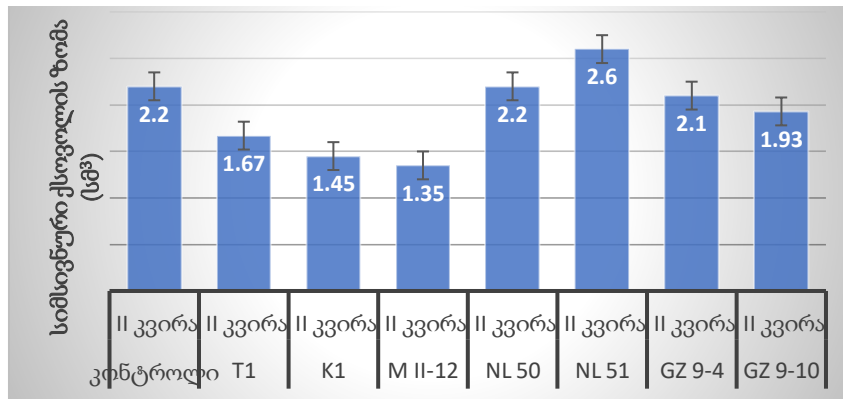
დაკვირვება სიმსივური ქსოვილის ზრდის დინამიკაზე

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

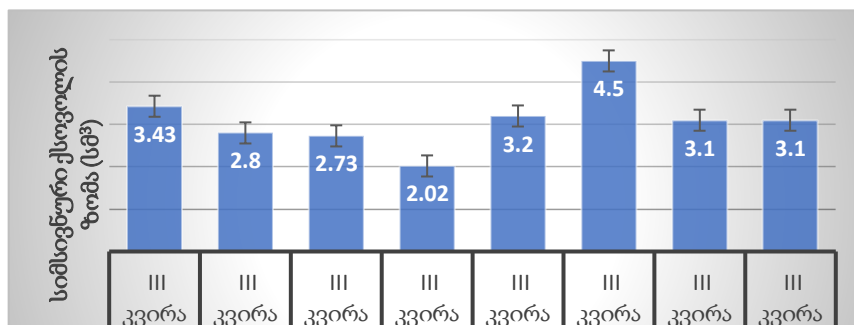
ერლიხის კარცინომის *in vivo* მოდელზე საკვლევი პრეპარატების გავლენის შემდგომ მიღებული სიმსივნური ქსოვილის მოცულობა გამოისახა გრფიკულად (იხ. დიაგრამა 2,3,4), სადაც ასახულია დროის განსხვავებულ პერიოდში საკვლევი სიჯნჯების გავლენა სიმსივნულ წარმონაქმნზე.



დიაგრამა 2. კარცინომის *in vivo* მოდელზე პრეპარატების 1 კვირის ზემოქმედების შედეგად მიღებული სიმსივნური ქსოვილის მოცულობა



დიაგრამა 3. კარცინომის *in vivo* მოდელზე პრეპარატების 2 კვირის ზემოქმედების შედეგად მიღებული სიმსივნური ქსოვილის მოცულობა



დიაგრამა 4. კარცინომის *in vivo* მოდელზე პრეპარატების 3 კვირის ზემოქმედების შედეგად მიღებული სიმსივნური ქსოვილის მოცულობა

I კვირას საკონტროლო ჯგუფის სიმსივნური ქსოვილის მოცულობა წარმოადგენდა 1.31 სმ³-ს, T1- სიჯნჯის 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 სიმსივნური 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.

ზემოთაღნიშნული შედეგებიდან ცალსახად უნდა ითქვას, რომ მიკროსკოპული სოკოებიდან გამოყოფილ სინჯებს გააჩნიათ როგორც სიმსივნის მაპროვოცირებელი ასევე გარკვეულწილად მაინჰიბირებელი თვისება, რაც საბოლოოდ აისახა საცდელი თაგვების 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 წარმონაწმის 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 საკვლევი ექსტრაქტებში K1, T1, NI-50, NI-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.

კოლორიმეტრული ანალიზის ახალი მეთოდის შემუშავება საკვლევი ლიზატში საერთო პროტეოლიზური აქტივობის დასადგენად

მყარფაზოვანი ფერმენტაციის შედეგად გამოყოფილ უჯრედშიდა ლიზატი სპეციფიური პროტეაზების დეტექციისთვის სადისერტაციო თემის მეორე ეტაპზე 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.

პროტეოლიზური აქტივობის განსაზღვრა კოლორიმეტრული მეთოდით - EWMP სუბსტრატის გამოყენებით

კვლევის მესამე ეტაპზე პროტეოლიზური ფერმენტების აქტივობის და ინჰიბიტორის დეტექციისთვის გამოვიყენეთ სადოქტორო თემის ფარგლებში შექმნილი კოლორიმეტრული მეთოდი, სადაც გამოყენებულია ცილოვანი ბუნების სუბსტრატი **EWMP**. დაიტესტა შემდეგი სინჯები: T1, K1, NL-51, Gz 9-6, Gz 9-10, M II-12 (იხ. ცხრილი 1)

ცხრილი. 1 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 პროტეილიზური აქტივობის ინჰიბირებას. M II-12 სინჯში არსებულ ინჰიბიტორს აქვს განსხვავებული სპეციფიურობა, ვინაიდან აღნიშნული ინჰიბიტორი არ აინჰიბირებს თავისივე ექსტრაქტში არსებულ პროტეაზას, რაც მეტყველებს ინჰიბიტორის სპეციფიურობაზე.

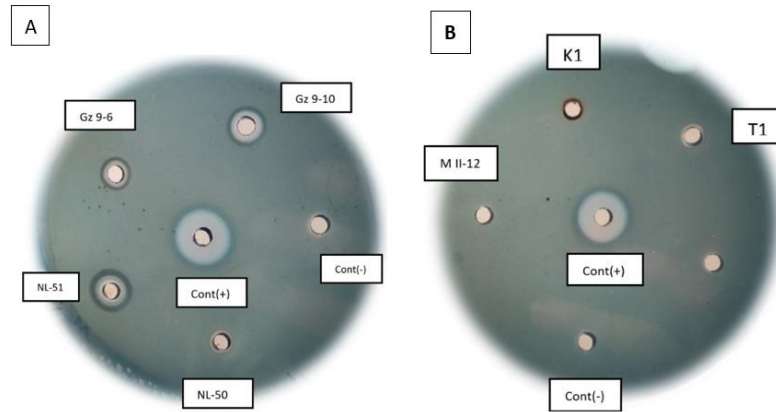
უნდა აღინიშნოს, რომ პრეპარატები, რომლებსაც გააჩნდათ ინჰიბიტორული აქტივობა ახანგრძლივებდნენ თავგების სიცოცხლის უნარიანობას. ხოლო სინჯში- NL 51, რომელზეც დაფიქსირდა მაღალი პროტეოლიზური აქტივობა, გამოიწვია სიცოცხლის უნარიანობის შემცირება.

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

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. პროტეოლიზური 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

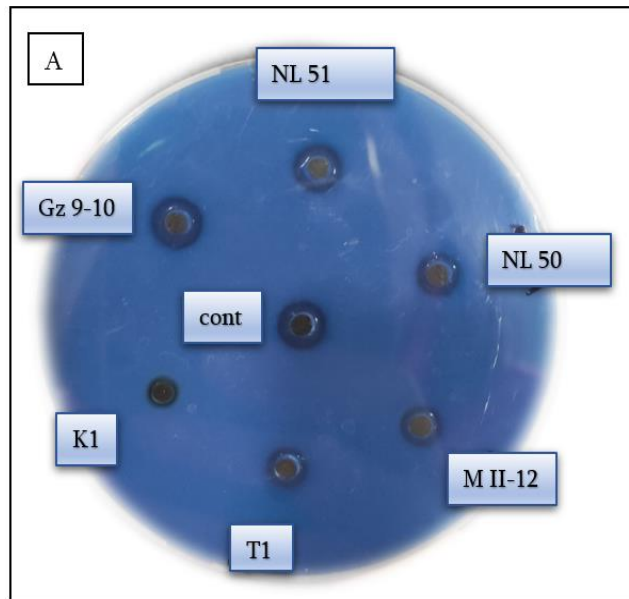
პროტეოლიზური ფერმენტების ინჰიბიტორული ეფექტის დადგენა

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 პროტეოლიზური ფერმენტები ვერ ურთიერთქმედებენ სუბსტრატთან, შესაბამისად არ წარმოიქმნება გამჭვირვალე ზონა.

რადგან ზოგზოგიერთ საანალიზო სინჯს გააჩნია პროტეოლიზური 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 გამჭვირვალე რგოლების

დიამეტრი, რაც მათ ინჰიბიტორულ თვისებაზე მიუთითებს. აღნიშნული ეფექტი კვალის სახით დაფიქსირდება NL 50 სინჯის შემთხვევაში.



სურ 4. საკვლევ სინჯებში პროტეოლიზური 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

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 პროტეოლიზური ფერმენტების და მათი იჰიბიტორების დეტექცია. სინჯებში დაფიქსირდა ორივე ეფექტის არსებობა .

უნდა ითქვას რომ 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.

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.

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** (იხ. სურათი 5).



Mucor sp. M II-12

სურათი. 5. იდენტიფიცირებული მიკროსკოპული სოკო

მეოთხე ეტაპის შედეგები და მათი განსჯა

გამომდინარე იქიდან, რომ მუტაგენუზის შემთხვევაში იცვლება გენეტიკური ინფორმაცია და შესაბამისად ფიზიკო/ქიმიური მახასიათებლები ჩატარდა M II-12 სოკოს მუტაგენუზი.

M II-12 მიკროსკოპული სოკოს მუტაცია წარიმართა 240 ნმ-ზე სხვადასხვა დროის დიაპაზონში განსხვავებულ დამორებებზე. ოპტიმალური პირობები

განისაზღვრა პროტეოლიზური აქტივობის მიხედვით რომელის ყველაზე მაღალი მაჩვენებელი დაფიქსირდა 20 წუთიანი დასხივების დროს 15 სმ დაშორების შემთხვევაში.

მუტირებული კულტურიდან გამოყოფილ უჯრედშიდა ლიზატში ისევ განისაზღვრა სხვადასხვა პარამეტრები რათა შეგვედარებინა და მუტაგენუზამდე მიღებულ პასუხებს .

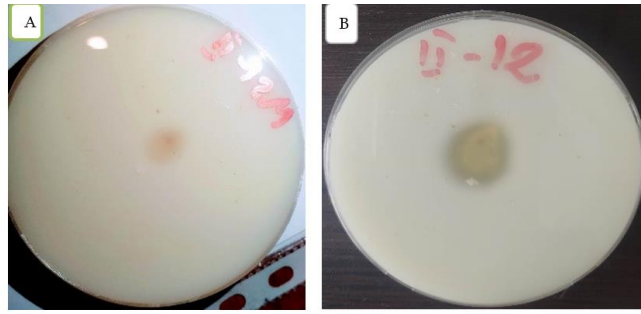
მუტირებულ სინჯებში ცილის განსაზღვრა ბიურეტის მეთოდით

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

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

მუტაგენურ შტამ M II-12 -ში პროტეოლიზური ფერმენტების სკრინინგი

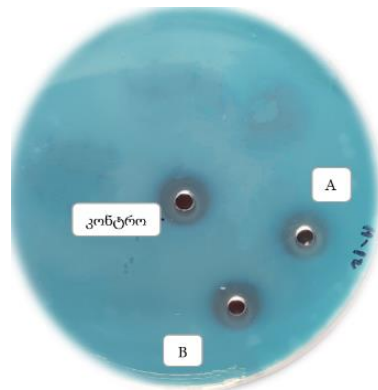
M II-12 შტამის მუტირების შემდგომ გამოყოფილ კულტურაში თავდაპირველად ჩატარდა ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების, კერძოდ პროტეოლიზური ფერმენტების სკრინინგი. უცხიმო რძის აგარის ექსპერიმენტის საფუძველზე შემოწმდა არა მუტირებული და 20 წუთით დასხივების შედეგად მიღებული კულტურები (იხილეთ სურათი 6). არა მუტირებული 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

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

მუტაგენების ეფექტურობას შესამოწმებლად M II-12 შტამიდან გამოყოფილი სინჯი გელ დიფუზიური მეთოდით შევამოწმეთ პროტეოლიზური აქტივობის დასადგენად (იხ. 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 დიამეტრი - 1.3სმ-ს.

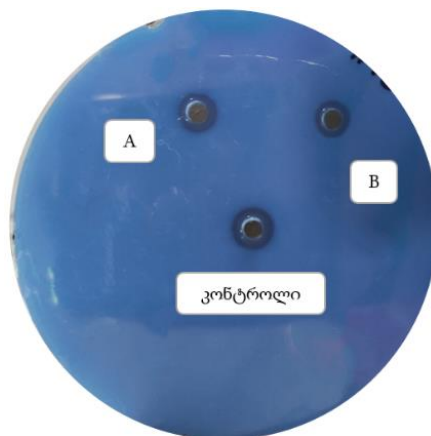


სურათი 7. მუტირებულისინჯის პროტეოლიზური აქტივობის დადგენა გელ-დიფუზიური მეთოდით

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

მუტაგენეზის 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 9- 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 9. 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

მუტაგენეზის შედეგად მიღებულ სინჯში პროტეოლიზური აქტივობისა და ინჰიბირების განსაზღვრა კოლორიმეტრული მეთოდით

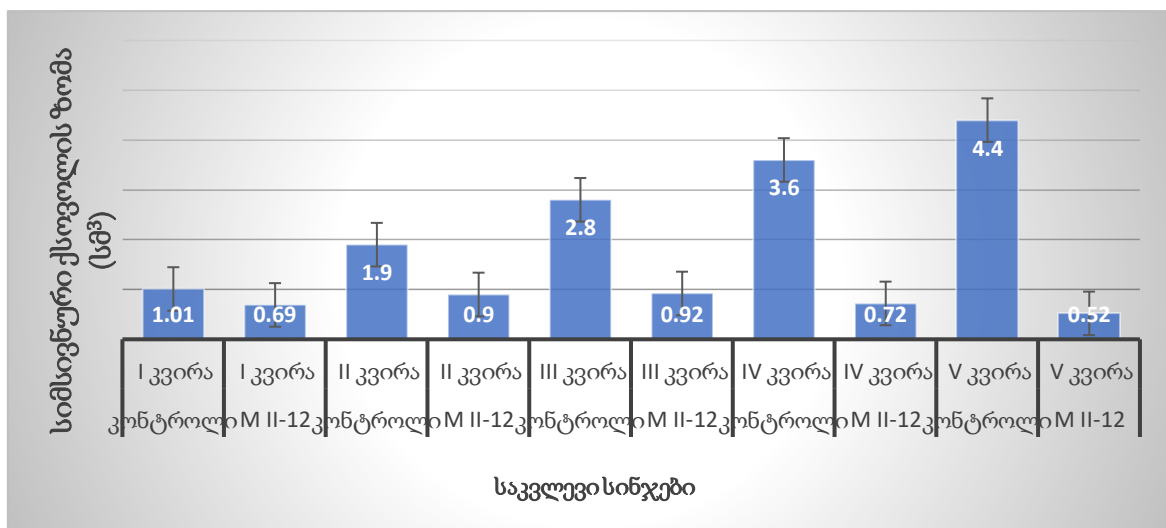
პროტეოლიზური ფერმენტების ან მათი ინჰიბიტორების ზუსტი დეტექტირებისთვის გამოვიყენეთ კვლევის ფარგლებში შექმნილი კოლორიმეტრული

მეთოდი რათა მუტაგენეზის შემდგომ მიღებული პასუხები შეგვედარებინა წინა მონაცემებს. მიღებული პასუხები A (U/ml): M II-12-0.105 (პროტეოლიზური აქტივობა მუტაგენეზამდე, M II-12 - 0.105 (პროტეოლიზური აქტივობა მუტაგენეზის შემდგომ). M II-12 - 0.05 ინჰიბიტორული აქტივობა მუტაგენეზამდე, M II-12-0.08 (ინჰიბიტორული აქტივობა მუტაგენეზის შემდგომ)

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.

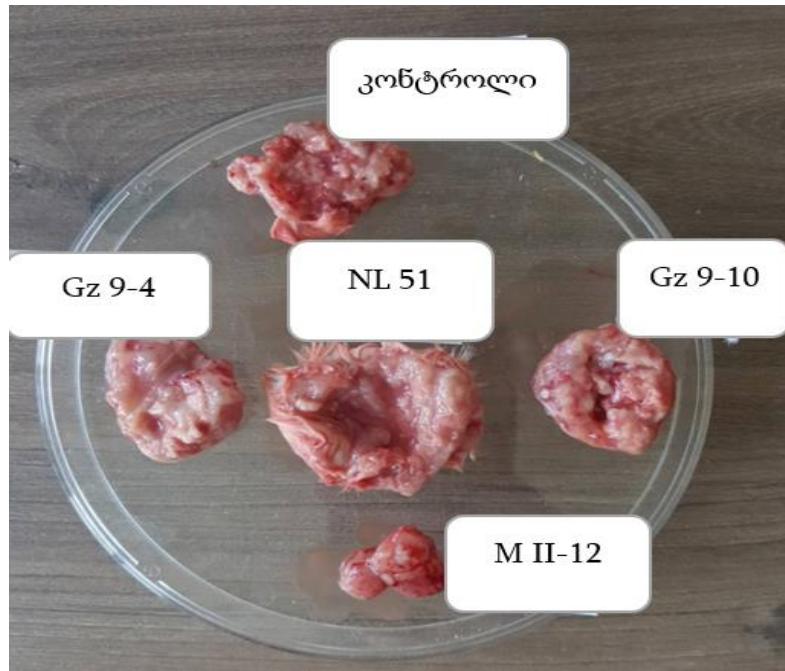
სიმსივნური ქსოვილის განვითარების შეფასება

მუტაგენეზის შემდგომ დავაკვირდით M II-12 შტამიდან გამოყოფილი პრეპარატის გავლენაზე სიმსივნური ქსოვილის განვითარებაზე, კალიპერის საშუალებით გაიზომა ცდის პერიოდში მიღებული სიმსივნური ქსოვილის მოცულობა. სიმსივნური ქსოვილის ზრდის დინამიკის მაჩვენებელი გამოისახა გრაფიკულად (იხ. დიაგრამა 5).



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

ვიზუალური შეფასებისთვის ცდის დასრულების შემდგომ საკვლევი ცხოველებიდან მათი ევტანაზიის შემდგომ იქნა ამოკვეთილი სიმსივნური ქსოვილები (იხ. სურათი 9)

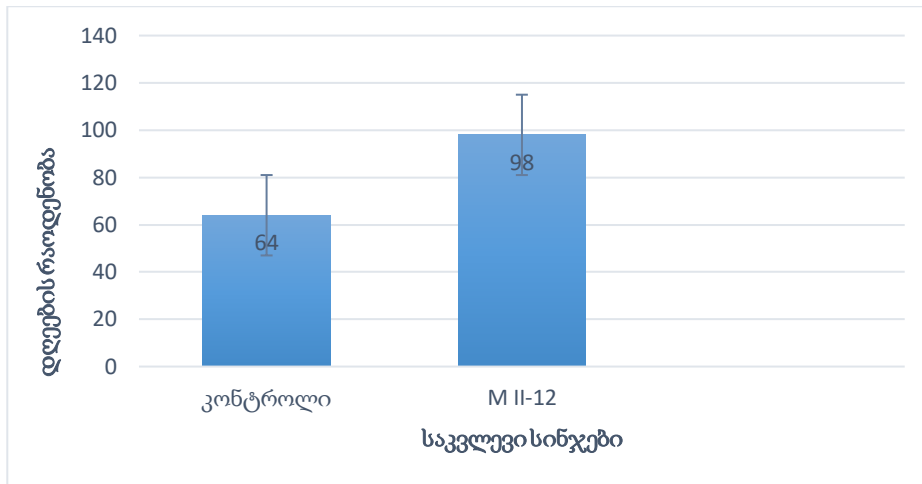


სურათი 9. სხვადასხვა პრეპარატების ზეგავლენის შედეგად მიღებული ქსოვილური ნაზრდი. საკონტროლო თავი ინექცირებული იყო ფიზიოლოგიური ხსნარით.

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.

დაკვირვება სიცოცხლის ხანგრძლივობაზე მუტაგენური შტამიდან მიღებული სინჯების ზეგავლენით

მუტაგენუზის შედეგად მიღებულ საკვლევ სინჯებზე კერძოდ M II-ისევ დავაკვირდით ერლიხის კარცინომის in vivo მოდელის სიცოცხლის ხანგრძლივობას. კვლევის ფარგლებში მათი სიცოცხლის ხანგრძლივობამ შეადგინა M II-სთვის 98 დღე (იხ. დიაგრამა 6).



დიაგრამა 6. კარცინომიანი თავგის სიცოცხლის ხანგრძლივობა საკვლევი სინჯის M II-12 ზეგავლენის შედეგად. საკონტროლო სინჯად გამოყენებულ იქნა ფიზიოლოგიური ხსნარი

მიღებული შედეგების საფუძველზე შევადარეთ მუტირებული და არამუტირებული სინჯების ზეგავლენის პასუხები (იხ. ცხრილი 2).

ცხრილი 2. მუტირებული და არამუტირებული 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.

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

ტექნიკური პრეპარატის მიღების პრინციპიალური ტექნოლოგიური სქემა

სადოქტორო თემის ფარგლებში მიღებული შედეგების საფუძველზე შემოთავაზებულია ტექნოლოგიური სქემა სიმსივნის საწინააღმდეგო პრეპარატის მისაღებად (იხ სურათი 10).

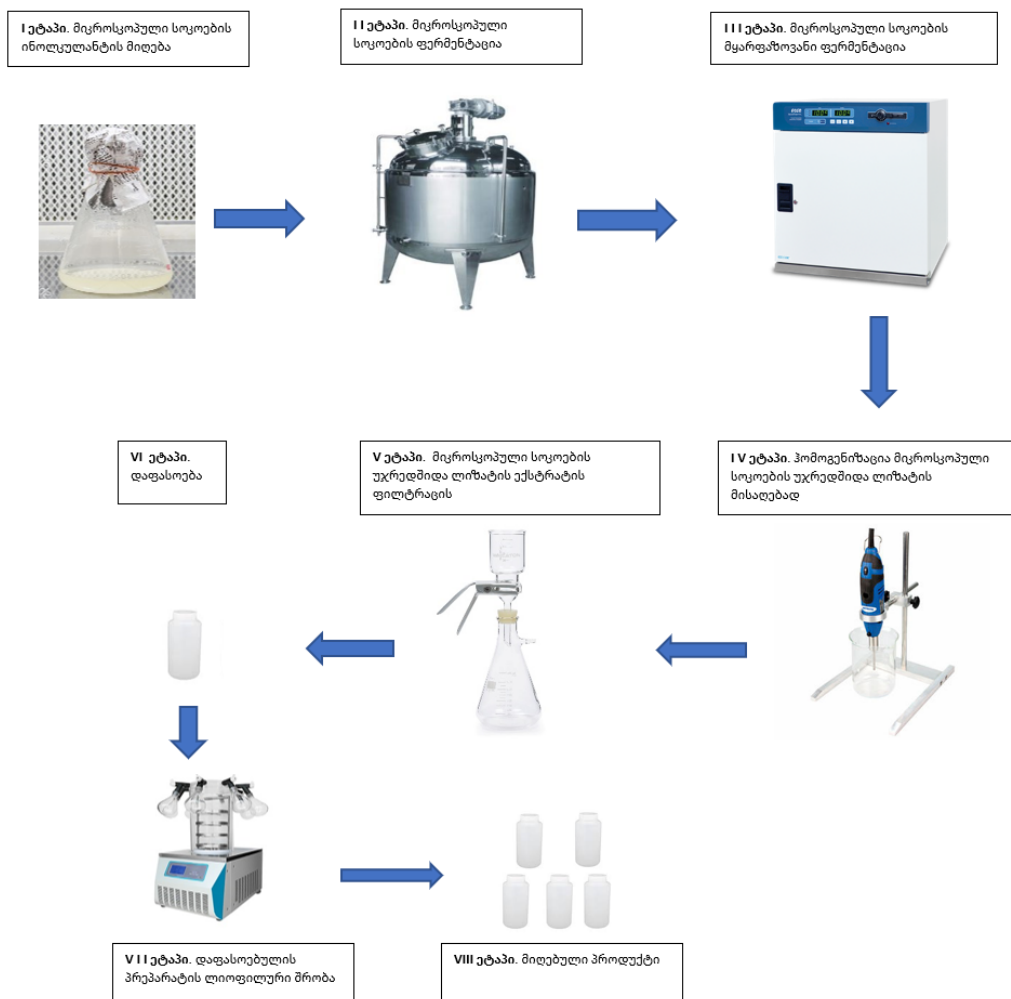
საწყის ეტაპზე უნდა მოხდეს მიკროსკოპული სოკოების ინოკულანტის მიღება, ამისთვის სტერილურ საბუროს საკვებ არეზე (აგაროზის გარეშე) სიღრმული კულტივირების პირობებში უნდა ჩაითესოს მიკროსკოპული სოკოების სპორები, სოკოების ზრდა უნდა წარიმართოს 96 საათის განმავლობაში ერლენმეიერის კოლბებში სანჯღრეველიან თერმოსტატში 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 24-48 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 ნალექისგან ფილტრაციის მეთოდით (ნუჟ ფილტრის გამოყენებით). მიღებული პრეპარატი უნდა ჩამოიხსას სტერილურან ტარაში და განხორციელეს პრეპარატის ლიოფილური შრობა.



სქემა .1 პრეპარატის მიღების ტექნოლოგიური სქემა

დასკვნა

1. სადოქტორო კვლევის ფარგლებში გამოიყო ანტისიმსივნური 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 თაგვების სიცოცხლის უნარიანობას საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით. აღნიშნული ეფექტი ქონდა არამარტო მუტაგენეზის გზით მიღებულ კულტურას, არამედ კვლევის ფარგლებში გამოკვლეულ სხვა შტამების ექსტრაქტებსაც (T1, K1).
4. საუკეთესო სინმსივნის 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 სპეცი-ფიურობაზე.
6. აღმოჩენილია ერლიხის კარცინომის დამრთგუნველი ფერმენტ- ინჰიბიტორული სინერგეტიკული სისტემა, რომლის პროდუცენტიც იქნა გამოყოფილი. აღნიშნული ეფექტი გაძლიერებულ იქნა ბიოინჟინრული მეთოდით (მუტაგენეზით), რისი საშუალებითაც დაფიქსირდა სიმსივნური ზრდის კლების მკვეთრი ეფექტი.
7. ჩატარებული კვლევების საფუძველზე შემოთავაზებულია ანტისიმსივნური პრეპარატის მიღების ტექნოლოგიური სქემა.

სადისერტაციო ნაშრომების ძირითადი შედეგები წარმოდგენილია შემდეგ პუბლიკაციებში:

1. Khobelia, T., Museliani, K., Ninua, T., & Kvesitadze, E. (2022). Colorimetric Assay to Determine Total Proteolytic Activity. Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences, vol. 16(2), 106-114.
2. Khobelia, T.(2022). Effect of microscopic fungi lysates on Ehrlich carcinoma growth. Annals of Agrarian Science 20(3). 97-103.
3. Khobelia, T., Kvesitadze, E., Museliani, K. (2023). Effect of Proteolytic Enzymes on Ehrlich carcinoma growth. Works of GTU. 246-253.

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, NI-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.