მიელინის ფუძე ცილის მუხტით განპირობებული იზომერებისა და გლუტამატის გავლენა მაკროფაგთა პოლარიზაციაზე

ელენე წიწილაშვილი

სადისერტაციო ნაშრომი წარმოდგენილია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის საბუნებისმეტყველო მეცნიერებებისა და მედიცინის ფაკულტეტზე სიცოცხლის შემსწავლელ მეცნიერებათა დოქტორის აკადემიური ხარისხის მინიჭების მოთხოვნის შესაბამისად

სიცოცხლის შემსწავლელ მეცნიერებათა სადოქტორო პროგრამა

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: ასოც. პროფ. ლალი შანშიაშვილი, ბიოლოგიურ მეცნიერებათა დოქტორი

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი

თბილისი, 2019

გ ა ნ ა ც ხ ა დ ი

როგორც წარდგენილი სადისერტაციო ნაშრომის ავტორი (მიელინის ფუძე ცილის მუხტით განპირობებული იზომერებისა და გლუტამატის გავლენა მაკროფაგთა პოლარიზაციაზე), ვაცხადებ, რომ ნაშრომი წარმოადგენს ჩემს ორიგინალურ ნამუშევარს და არ შეიცავს სხვა ავტორების მიერ აქამდე გამოქვეყნებულ, გამოსაქვეყნებლად მიღებულ ან დასაცავად წარდგენილ მასალებს, რომლებიც ნაშრომში არ არის მოხსენიებული ან ციტირებული სათანადო წესების შესაბამისად.

ელენე წიწილაშვილი

17.04.2019

აბსტრაქტი

თანამედროვე მედიცინის ყურადღების სფეროში ექცევა ისეთი მომიჯნავე პათოლოგიური პროცესები, როგორიცაა ნერვული სისტემის დაზიანებით მიმდინარე დაავადებები და იმუნური უჯრედების მიერ ინიცირებული ანთებითი პროცესები. სხვადასხვა სისტემების ურთიერთგავლენის შესწავლა განსაკუთრებულ მნიშვნელობას იძენს გაფანტული სკლეროზის მსგავსი დაავადებების კვლევის პროცესში, რომელთა ეტიოლოგიისა და პათოფიზიოლოგიის ბოლომდე ახსნა მეცნიერებისთვის დღემდე დაუძლეველ ამოცანად რჩება.

თემის აქტუალობიდან გამომდინარე გადავწყვიტეთ შეგვესწავლა ნეირონების მიელინის გარსის დაზიანებისას გარსიდან მიკროგარემოში დისოცირებული მიელინის ფუძე ცილის გავლენა მაკროფაგების აქტივობაზე.

მიელინის ფუძე ცილა ერთ-ერთი ყველაზე უკეთ შესწავლილი და ცენტრალური ნერვული სისტემის უმნიშვნელოვანესი ცილოვანი კომპონენტია. იგი მიელინის ცილების 30%-ს შეადგენს და მასში კონცენტრირებული დადებითი მუხტების მეშვეობით, ფოსფოლიპიდების უარყოფით მუხტებთან წარმოქმნილი კავშირების გამო, უმნიშვნელოვანეს როლს თამაშობს მიელინის გარსის სტრუქტურის ფორმირებაში. თუმცა, უახლეს კვლევებში მისი სტრუქტურული ფუნქციიდან მკვლევართა ყურადღება გადატანილია ცნს-ის პლასტიურობაში, აქსონის მეტაბოლიზმსა და ნეიროიმუნური სიგნალების წარმოქმნის პროცესში მის ჩართულობაზე.

მიელინის გარსის დაზიანებისას (რის ერთ-ერთ მიზეზსაც შესაძლოა წარმოადგენდეს პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციით - დეიმინირებით, მიელინის ფუძე ცილაში შემავალი ამინომჟავა არგინინის ციტრულინად გარდაქმნის გამო, მიელინის ფუძე ცილის დადებითი მუხტის შემცირება), მიელინის ფუძე ცილა დისოცირდება მიელინის გარსიდან და ააქტიურებს იმუნური სისტემის უჯრედებს (სავარაუდოდ, αMβ2 (Mac 1, CD11b/CD18) ინტეგრინთან დაკავშირების გზით).

განსაკუთრებით საინტერესოა აღნიშნული მექანიზმით მაკროფაგების გააქტივების პროცესის შესწავლა, რადგან მაკროფაგებს გააჩნიათ პლასტიურობის თვისება - მიკროგარემოში არსებული სიგნალების მიხედვით ანთებითი და ანთების საწინააღმდეგო იზოფორმების ერთმანეთში გარდაქმნის უნარი.

ჩვენს მიერ ჩატარებული კვლევების საფუძველზე გამოვლინდა, რომ მიელინის ფუძე ცილის მუხტით განპირობებული სხვადასხვა იზომერები (C8 - დადებით მუხტის ყველაზე ნაკლებად მატარებელი და ყველაზე მეტად მოდიფიცირებულ ფორმა, და C1 - ყველაზე კათიონური და, შესაბამისად, ყველაზე ნაკლებად მოდიფიცირებულ ფორმა) განაპირობებენ მაკროფაგთა განსხვავებულ პოლარიზაციას.

აღმოჩნდა, რომ C1 იზომერი ზრდის არგინაზა-1-ის (მაკროფაგების ანთების საწინააღმდეგო ფორმის - M2-ის მარკერი), და ამცირებს iNOS-ს (მაკროფაგების ანთების გამომწვევი ფორმის - M1-ის მარკერი) ექსპრესიას. გარდა ამისა, არ ცვლის HMGB1-ის (ანთებითი ციტოკინი) ექსპრესიას, თუმცა საგრძნობლად ზრდის RAGE-ს (HMGB1-ის ძირითადი სამიზნე რეცეპტორი) ექსპრესიასა და Rac-ის (GTPაზა, რომელიც გარკვეული კვლევების მონაცემებით აკონტროლებს მაკროფაგების პოლარიზაციას M2 ფენოტიპისკენ) აქტივობას. მეორე მხრივ, ძლიერ მოდიფიცირებული, დეიმინირებული C8 იზომერი ზრდის HMGB1-ის, მაგრამ არ ცვლის არც არგინაზა-1-ისა და არც RAGE-ს შემცველობას.

გარდა ზემოთ აღწერილი მექანიზმისა, ჩვენ, ასევე, ვცადეთ შეგვესწავლა ანთებითი მიკროგარემოს დამახასიათებელი კიდევ ერთი კომპონენტის - გლუტამატისა და მისი შეთვისების მექანიზმში ჩართული მიკროგლიასა და მაკროფაგებში ნანახი რეცეპტორის - mGluR5-ის, გავლენა მაკროფაგთა პოლარიზაციაზე.

აღოჩნდა, რომ უჯრედგარე გლუტამატი და mGluR5 შესაძლოა მონაწილეობდნენ მაკროფაგების პლასტიურობაში ტრანსკრიფციული ფაქტორის PPAR-γ-სა და ტრანსპორტერი EAAT2-ის ექსპრესიის გაზრდის გზით. ასევე, კვლევით დასტურდება, რომ მაკროფაგების გლუტამატური რეგულაცია მონაწილეობს მაკროფაგების პოლარიზაციის M2 ფენოტიპისკენ გადახრის პროცესში.

ნაშრომში წარმოდგენილი კვლევების შედეგები შესაძლოა გამოყენებულ იქნას ცნს-ის დაზიანებით მიმდინარე დაავადებების თანმხლები ანთებითი პროცესების მართვაში.

ძირითადი საძიებო სიტყვები: მიელინის ფუძე ცილა, მაკროფაგები, ანთება, ნეიროდეგენერაციული დაავადებები.

Abstract

Contemporary science pays special attention to the cross-linked pathologies similar to neurological disorders and inflammation initiated by immune cells. Studying different systems interaction is most important in the diseases, like multiple sclerosis, that have unclear etiology and pathophysiology.

Because of the importance of this topic we decided to study how myelin basic protein dissociates from the myelin sheet during neuronal injury and acts in a free manner influencing macrophages' activity.

Myelin basic protein (MBP) is one of the most studied and most important proteins in CNS. It constitutes 30% of myelin sheet proteins and plays a key role in the formation of myelin sheet structure, through the interactions formed between its positively charged residues and phospholipids' negatively charged groups. But, in the latest scientific researches scientists' attention is shifted from MBP's structural role to its functions in CNS plasticity, in axons metabolism and in the formation of neuro-immune signals.

During the neuronal injury (the reason of which could be losing the positive charge of MBP by conversion of an amino acid arginine into citrulline - the process of posttranslational modification, known as deimination), MBP dissociates from myelin sheet and activates cells of the immune system (most probably through binding with αMβ2 (Mac 1, CD11b/CD18) integrins).

Activation of macrophages via refered mechanism is most interesting one, because in these immune cells plasticity was observed, which means that depending on the micro environmental signals, macrophages can exist in the inflammatory isoform as well as in the anti-inflammatory one.

We showed that different charge isomers of the MBP (C8 - that is least positively charged and most modified isomer and C1 - that is least modified and most positively charged isomer) induce different polarization of macrophages: C1 isomer increases arginase-1 (marker of M2 - anti-inflammatory isofor of macrophages') and decreases iNOS (marker of M1 - inflammatory isoform of macrophages') expression. Moreover, increases RAGE (receptor for HMGB1) expression and Rac (GTPase which, according to some studies, can induce M2

polarization of macrophages) activity, but does not change HMGB1 (inflammatory citokin) expression itself; On the other hand, most modified isomer C8 increases content of HMGB1 but does not influence content of arginase-1 or RAGE.

Except for the mechanisms described above, we also tried to study the influences on macrophage polarization by one more component of the inflammatory microenvironment - glutamate - and its receptor - mGluR5, that is found in microglia and macrophages.

We showed that extracellular glutamate and mGluR5 could be involved in macrophage plasticity by increasing the expression of transcription factor PPAR-γ and EAAT2 transporter. From the same experiments, we can deduce that regulation by glutamate shifts macrophage polarization to the M2 isoform.

The results from these works can be used as a tool of an inflammation management strategy in the treatment of neurodegenerative disorders.

Key Words: Myelin basic protein, Macrophages, Inflammation, Neurodegenerative diseases.

მ ა დ ლ ო ბ ა

წარმოდგენილი სადისერტაციო კვლევა შესრულებულია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის, ქიმიური ბიოლოგიის ინსტიტუტში. დისერტაციაზე მუშაობის პერიოდში უნივერსიტეტის თითოეული თანამშრომლისგან ვგრძნობდი მხარდაჭერას და ხელშეწყობას როგორც პროფესიული, ასევე, პიროვნული თვალსაზრისით, რისთვისაც მინდა უღრმესი მადლობა გადავუხადო მათ.

განსაკუთრებული მადლობა მინდა გადავუხადო ჩემს ხელმძღვანელს ასოც. პროფ. ლალი შანშიაშვილს. ქნ. ლალისთან მუშაობა იყო უდიდესი გამოცდილება და ლაბორატორიაში მუშაობის ევროპული მოდელის გაცნობის შანსი. მადლობას ვუხდი მას გაწეული უდიდესი შრომისა და თეორიული თუ პრაქტიკული გამოცდილების დაუნანებლად გაზიარებისათვის.

ასევე, გასაკუთრებულ მადლობას ვუხდი ქიმიური ბიოლოგიის ინსტიტუტის დირექტორს, აკადემიკოს ბნ. დავით მიქელაძეს, რომელმაც მომცა საშუალება მემუშავა ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის მაღალპროფესიულ და კოლეგიალურ გუნდთან ერთად. მისი უშუალო მეთვალყურეობითა და ხელმძღვანელობით კვლევის შედეგი დროში ეფექტურად იქნა მიღწეული, რისთვისაც უღრმეს მადლობას ვუხდი მას.

მადლობას ვუხდი ი. ბერიტაშვილის ექსპერიმენტული ბიომედიცინის ცენტრის ბიოქიმიის დეპარტამენტის თანამშრომლებს, რომლებიც მეხმარებოდნენ ხარის თავის ტვინიდან მიელინის ფუძე ცილის იზოლაციაში.

სარჩევი

სარჩევი----------viii

ილუსტრაციების ჩამონათვალი----------xi

აბრევიატურის ჩამონათვალი----------xiv

შესავალი----------1

სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა ----------4

თავი 1 მიელინის ფუძე ცილა----------4

1.1. სტრუქტურა და ფუნქცია----------4

1.2. მფც-ს ციტრულინირება (დეიმინირება)----------6

1.3. მიელინის ფუძე ცილა და გაფანტული სკლეროზი----------8

1.4. ინტეგრინები----------12

1.5. GTP-აზა - Rac----------14

თავი 2 მაკროფაგები----------17

2.1. მაკროფაგების კლასიფიკაცია----------17

2.2. მაკროფაგების პოლარიზაციის მარკერები----------23

2.3. მაკროფაგების ციტოკინური პროფილი და ტრანსკრიფციის ფაქტორები----------24

2.4. პეროქსისომების პროლიფერატორით აქტივირებადი რეცეპტორი γ ----------27

2.5. გალექტინ-3----------29

თავი 3 გლუტამატი და გლუტამატის რეცეპტორები----------31

3.1. გლუტამატის რეცეპტორების დახასიათება----------31

3.2. გლუტამატის ტრანსპორტერები----------40

მასალა და მეთოდები ----------42

1.1 მასალა----------42

1.2. მიელინის ფუძე ცილის მუხტით განპირობებული იზომერების გამოყოფა და გასუფთავება----------42

1.3. უჯრედული კულტურა----------43

1.4. მაკროფაგების პოლარიზაცია----------43

1.5. უჯრედების ტრანსფექცია----------44

1.6. პოსტტრანსფექციური ანალიზი----45
1.7. ვესტერნ ბლოტინგი----46
1.8. აზოტის ოქსიდის განსაზღვრა----46
1.9. ციტოკინებისა და გლუტამატის დეტექცია----47
1.10. ინდუცირებადი აზოტის ოქსიდის სინთაზასა და არგინაზა-1-ის რაოდენობრივი ანალიზი----47
1.11. RAC-ის აქტივაციის რაოდენობრივი განსაზღვრა----48
1.12. სტატისტიკური ანალიზი----48
მიღებული შედეგები----48
თავი 1. მეტაბოტროპული გლუტამატის რეცეპტორ-5-ის გავლენა მაკროფაგთა პლასტიურობაზე----48
1.1. LPS-ის და IL-10-ის გავლენა mGluR5-ის ექსპრესიაზე ტრანსფექცირებულ (RAW-mGluR5) და არატრანსფექცირებულ (RAW-NT) მაკროფაგებში----48
1.2. LPS-ის და გლუტამატის გავლენა NO-სა და IL-10-ის სეკრეციაზე----50
1.3. mGluR5-ის ტრანსფექციის გავლენა EAAT-2 ცილის ექსპრესიაზე----52
1.4. mGluR5-ის ტრანსფექციის გავლენა RAW 264.7 მაკროფაგების მიერ გლუტამატის შთანთქმაზე----53
1.5. mGluR5-ის ტრანსფექციის გავლენა PPAR-γ-ს ექსპრესიაზე----54
1.6. mGluR5-ის ტრანსფექციის გავლენა HMGB1 სეკრეციაზე----55
1.7. mGluR5-ის ტრანსფექციის გავლენა Gal-3-ის სეკრეციაზე----58
თავი 2. მფც-ს C1 და C8 მუხტისმიერი იზომერების გავლენა RAW 264.7 მაკროფაგების პლასტიურობაზე----59
2.1. მიელინის ფუძე ცილის მიღება----59
2.2. მფც-ს C1 და C8 მუხტისმიერი იზომერების გავლენა RAW 264.7 მაკროფაგებში iNOS-სა და არგინაზა-1-ის ექსპრესიაზე----60
2.3. მფც-ს C1 და C8 მუხტისმიერი იზომერების გავლენა საკონტროლო არა-პოლარიზებულ RAW 264.7 მაკროფაგებში HMGB1-სა და RAGE-ს ექსპრესიაზე----64
2.4. მფც-ს C1 და C8 მუხტისმიერი იზომერების გავლენა საკონტროლო არა-პოლარიზებულ RAW 264.7 მაკროფაგებში Rac-ის აქტივაციაზე----66

შედეგების განხილვა----------67

თავი 1. მეტაბოტროპული გლუტამატის რეცეპტორ-5-ის გავლენა მაკროფაგთა პლასტიურობაზე----------67

თავი 2. მფც-ს C1 და C8 მუხტისმიერი იზომერების გავლენა RAW 264.7 მაკროფაგების პლასტიურობაზე----------72

დასკვნები ----------75

გამოყენებული ლიტერატურა---------- ----------75

ილუსტრაციების ჩამონათვალი

სურათი 1: მფც-ს პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციები ---------- 5

სურათი 2: არგინინის გარდაქმნა ციტრულინად ფერმენტული სისტემის პეპტიდილ-არგინინ დეიმინაზას მოქმედებით ---------- 7

სურათი 3: ინტეგრინების კლასიფიკაცია ლიგანდის მიმართ სპეციფიკურობის ან იმ უჯრედის ტიპის მიხედვით, რომელზეც არიან ექსპრესირებული ----------13

სურათი 4: არგინინის მეტაბოლიზმი ძუძუმწოვრებში და კავშირი პროლინისა და გლუტამატის წარმოქმნასთან ----------24

სურათი 5: mGluR-ის ურთიერთქმედება უჯრედშიდა სასიგნალო მოლეკულებთან ----------34

სურათი 6: BioLux Gaussia Luciferase Assay ნაკრების მოქმედების მექანიზმი----------45

სურათი 7: mGluR5-ის ექსპრესია საკონტროლო, არატრანსფექცირებულ (RAW-NT) და mGluR5-ტრანსფექცირებულ (RAW-mGluR5) მაკროფაგებში----------49

სურათი 8: ლუციფერაზული აქტიობის ცვლილება დროში, BioLux Gauassia Luciferase Assay Kit–ის გამოყენებით----------50

სურათი 9: LPS-ის და გლუტამატის გავლენა NO-ს სეკრეციაზე არატრანსფექცირებულ და ტრანსფექცირებულ RAW 264.7 მაკროფაგებში----------51

სურათი 10: LPS-ის და გლუტამატის გავლენა IL-10-ის სეკრეციაზე არატრანსფექცირებულ და ტრანსფექცირებულ RAW 264.7 მაკროფაგებში----------51

სურათი 11: EAAT-2-ის ექსპრესია საკონტროლო, არატრანსფექცირებულ (RAW-NT) და mGluR5-ტრანსფექცირებულ (RAW-mGluR5) მაკროფაგებში----------53

სურათი 12: mGluR5-ის ტრანსფექციის გავლენა RAW 264.7 მაკროფაგების მიერ გლუტამატის შთანთქმაზე----------54

სურათი 13: PPAR-γ-ის ექსპრესია საკონტროლო, არატრანსფექცირებულ (RAW-NT) და mGluR5-ტრანსფექცირებულ (RAW-mGluR5) მაკროფაგებში----------55

სურათი 14: HMGB1-ის ექსპრესია საკონტროლო, არატრანსფექცირებულ (RAW-NT) და mGluR5-ტრანსფექცირებულ (RAW-mGluR5) მაკროფაგებში----------57

სურათი 15: mGluR5-ის ტრანსფექციის გავლენა HMGB1-ის სეკრეციაზე----------57

სურათი 16: mGluR5-ის ტრანსფექციის გავლენა Gal-3-ის სეკრეციაზე---------- 58

სურათი 17: მფც-ს მჟავაში ხსნადი ფრაქციის CM-52 ცელულოზის კათიონ-ცვლად სვეტზე ქრომატოგრაფიისა და პოლიაკრილამიდის გელზე ელექტროფორეზის შედეგები----------59

სურათი 18: RAW 264.7 მაკროფაგებში არგინაზა-1-ისა ექსპრესიის ცვლილება მფც-ს C8 და C1 იზომერების გავლენით----------61

სურათი 19: RAW 264.7 მაკროფაგებში iNOS-ს ექსპრესიის ცვლილება მფც-ს C8 და C1 იზომერების გავლენით----------62

სურათი 20: IFN-γ/ LPS-ითა და IL-4/IL-10-ით სტიმულირებულ მაკროფაგებში მფც-ს C1 და C8 იზომერების გავლენა არგინაზა-1-ის (M2 მარკერი) პროდუქციაზე---------62

სურათი 21: IFN-γ/ LPS-ითა და IL-4/IL-10-ით სტიმულირებულ მაკროფაგებში მფც-ს C1 და C8 იზომერების გავლენა iNOS-ს (M1 მარკერი) პროდუქციაზე----------63

სურათი 22: RAW 264.7 მაკროფაგებში HMGB1-ის ექსპრესიის ცვლილება მფც-ს C8 და C1 იზომერების გავლენით----------65

სურათი 23: RAW 264.7 მაკროფაგებში RAGE-ს ექსპრესიის ცვლილება მფც-ს C8 და C1 იზომერების გავლენით----------66

სურათი 24: RAW 264.7 მაკროფაგებში Rac-ის აქტივობის ცვლილება მფც-ს C8 და C1 იზომერების გავლენით----------67

აბრევიატურების ჩამონათვალი

მფც - მიელინის ფუძე ცილა

PAD - პეპტიდილარგინინ დეიმინაზა

TCR - T უჯრედების რეცეპტორის

VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) - ენდოთელური ციტოკინდამოკიდებული ადჰეზიური მოლეკულები

GTP-აზა - გუანოზინ ტრიფოსფატაზა

EAE - ექსპერიმენტული აუტოიმუნური ენცეფალომიელიტი

IFN-γ - ინტერფერონ-γ

TNF - სიმსივნის ნეკროზის ფაქტორი

TLR - Toll-Like Receptor

PAMP (Pathogen-associated molecular patterns) - პათოგენთან ასოცირებული მოლეკულები

OPC (oligodendrocyte progenitor cells) - ოლიგოდენდროციტების პროგენიტორული უჯრედები

LPS - ლიპოპოლისაქარიდი

TAM (tumour-associated macrophages) - სიმსივნესთან დაკავშირებული მაკროფაგები

iNOS - ინდუცირებადი აზოტის ოქსიდის სინთაზა

HMGB1 - მაღალი მობილურობის ჯგუფი-B1 ცილებს

RAGE (receptor for advanced glycation end-products) - ადრეული გლიკაციის საბოლოო პროდუქტის რეცეპტორი

PPAR-γ (peroxisome proliferator-activatedreceptor γ) - პეროქსისომების პროლიფერატორით აქტივირებადი რეცეპტორი γ

Gal-3 - გალექტინ-3

EAAT (Excitatory amino acid transporters) - ნატრიუმ დამოკიდებული ამაგზნებელი ამინმომჟავების ტრანსპორტერები

xc- ან xCT - ნატრიუმ დამოუკიდებელი ცისტინ/გლუტამატ ანტიპორტერი

შესავალი

თანამედროვე მეცნიერების ერთ-ერთ პრიორიტეტულ საკითხად რჩება უცნობი ეტიოლოგიისა და პათოფიზიოლოგიის მქონე დაავადებებში მონაწილე მოლეკულური და ბიოქიმიური მექანიზმების შესწავლა. ექსპერიმენტული მედიცინისთვის განსაკუთრებულ მნიშვნელობას იძენს ყოველი ახალი ბიოქიმიური მექანიზმის აღწერა ისეთი პათოლოგიების არსებობის შემთხვევაში, როდესაც სახეზეა დაავადების მიმდინარეობაში ორგანიზმის რამდენიმე სისტემის ჩართულობა.

აუტოიმუნური დაავადებები წარმოადგენს დაავადებათა მრავალფეროვან ჯგუფს, რომელთა ეტიოლოგია ძირითადად დაუდგენელია, ხოლო პათოფიზიოლოგია კი - ცუდად შესწავლილი. მათ შეიძლება გამოავლინონ გარკვეული ორგანოს მიმართ სპეციფიკურობა ან ჰქონდეთ სისტემური ხასიათი, რამაც შესაძლოა მოგვცეს ერთმანეთს გადამფარავი სიმპტომატიკის სურათი.

კვლევათა დიდი უმრავლესობა ადასტურებს ფაქტს, რომ ავტოიმუნური დაავადებებთან (რევმატოიდული ართრიტი, აუტოიმუნური თიროიდული დაავადება, ავთვისებიანი ანემია) კორელაციაში ხშირად ვხვდებით ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში მიმდინარე პათოლოგიურ პროცესებს (Brinar et al. 2006). აღნიშნულმა ფაქტმა თანამედროვე მეცნიერებს მისცა საფუძველი, ჩართულიყვნენ კვლევებში, რომლებიც ორიენტირებულია იმუნური სისტემის უჯრედებსა და ცნს-ის უჯრედებს (განსაკუთრებით კი მათი მიელინის გარსს) შორის კავშირების მექანიზმების მოძიებაზე.

უმაღლესი ხერხემლიანების ტვინის თეთრი ნივთიერების 50%-ზე მეტს **მიელინი** წარმოადგენს. მიელინის ძირითადი ფუნქცია აქსონის იზოლაცია, ნერვული იმპულსის გატარების დაჩქარება და იონური ნაკადების შენარჩუნებაა. ამის გამო, ონტოგენეზის პროცესში მიელინის წარმოქმნაში დაშვებულ შეცდომებს, ან უკვე ჩამოყალიბებულ ნერვულ სისტემაში მისი სტრუქტურის ცვლილებას, მივყავართ მძიმე ნევროპათიებამდე.

მიელინური მემბრანებისათვის დამახასიათებელია გლიკოლიპიდების მაღალი შემცველობა (ლიპიდები მიელინის მშრალი მასის 70-85%-ს შეადგენს) და შედარებით მცირე რაოდენობით ცილების არსებობა (Kirschning et al. 1998). მიელინის სტაბილურობის ერთ-ერთ განმაპირობებელ ფაქტორს წარმოადგენს მის შემადგენელ ლიპიდებსა და ცილებს შორის ურთიერთქმედება, რასაც საფუძვლად უდევს უარყოფითად დამუხტულ ფოსფოლიპიდებსა და დადებითი მუხტის მატარებელ ცილებს, ძირითადად კი **მიელინის ფუძე ცილას (მფც)** შორის წარმოქმნილი იონური კავშირები, ან მარილის ხიდაკები (Folch P. 1973). პოსტ-ტრანსლაციური მოდიფიკაციების (მაგ. დეიმინირების/ციტრულინირების) შედეგად მცირდება მფც-ს კათიონურობა და ფერხდება ცნს-ის უჯრედების მემბრანის ჩამოყალიბება, რაც პროტეაზებისგან დაუცველს ტოვებს მემბრანასთან დაკავშირებულ ცილაში არსებულ იმუნოდომინანტურ ეპიტოპს. მფც სწყდება პლაზმურ მემბრანას და თავისუფალი ლიგანდის სახით უკავშირდება ნერვული დაზიანებისას ცნს-ში შეჭრილ იმუნურ უჯრედებს (Tsitsilashvili et al. 2019).

ანთებითი პროცესის თანხლებით მიმდინარე აუტოიმუნური დაავადებების შესწავლისას თანამედროვე მეცნიერების კვლევის ერთ-ერთ ძირითად ობიექტს იმუნური უჯრედების ჯგუფიდან წარმოადგენენ **მაკროფაგები**. აღნიშნულის მიზეზია გაფანტული სკლეროზით დაავადებულ პაციენტებში ნაჩვენები როგორც ცნს-ის ბინადარი მაკროფაგების პოპულაციის (მიკროგლიის) გააქტივება, ასევე, მონოციტებისგან წარმოქმნილი მაკროფაგების ინფილტრაცია დაზიანების არეში (Samuel S et al., 2014; Ajami B et al., 2011), რაც მიუთითებს დაავადების პროგრესირებაში მათ განსაკუთრებულ როლზე. უკანასკნელ წლებამდე ტექნიკურ სირთულეს წარმოადგენდა მაკროფაგებისა და აქტივირებული მიკროგლიის ერთმანეთისგან გარჩევა, თუმცა დღესდღეობით თანამედროვე ტექნოლოგიების გამოყენებით შესაძლებელი გახდა აღნიშნული პრობლემის გადალახვა და დადგინდა, რომ ცნს-ში მიკროგლიური უჯრედების სუბპოპულაცია აქტიურდება დაავადების ადრეულ სტადიაზე, სანამ მოხდება დაავადების კლინიკური სიმპტომების გამოვლენა და მონოციტების/მაკროფაგების ცნს-ში ინფილტრაცია (Samuel S et al., 2014; Ponomarev E. D. et al., 2005). გარდა დემიელინიზაციის

პროცესებში მათი დადასტურებული როლისა, მაკროფაგების მიმართ ინტერესს ამძაფრებს მათი პლასტიურობის თვისება, რაც გამოიხატება შესაბამისი მიკროგარემოს მიხედვით მაკროფაგების M1 (ანთებით) და M2 (ანთების საწინააღმდეგო) ფენოტიპად არსებობის შესაძლებლობასა და მათი ერთმანეთში ტრანსფორმირების უნარში. აღნიშნული კი საინტერესოს ხდის ანთებითი დემიელინიზაციის პროცესის მიმდინარეობისას არსებული მიკროგარემოს მარკერების მიხედვით მაკროფაგების პოლარიზების მექნიზმების შესწავლას.

ვინაიდან ანთების პროცესში იმუნური უჯრედების მხრიდან აქტიურად მიმდინარეობს გლუტამატის გამოთავისუფლება მიკროგარემოში (Piani D, 1991, Gupta R, 2009) და გლუტამატის შეთვისების მექანიზმში ჩართულია მიკროგლიასა (Byrnes KR 2009; Loane DJ 2012) და მაკროფაგებში (Chiocchetti A et al. 2006) ნანახი რეცეპტორი mGluR5, ჩნდება ვარაუდი, რომ ეს რეცეპტორი მონაწილეობას უნდა ღებულობდეს მაკროფაგთა ფენოტიპურ ცვლილებებში.

აღნიშნული ნაშრომის ძირითად მიზანს წარმოადგენს ყველაზე მეტად მოდიფიცირებული ანუ დადებითი მუხტის ყველაზე ნაკლებად მატარებელი მფც-ს C8 იზომერის და ყველაზე ნაკლებ მოდიფიცირებული ანუ დადებითი მუხტის ყველაზე მეტად მატარებელი მფც-ს C1 იზომერის გავლენის შესწავლა იმუნური სისტემის უჯრედებზე, კერძოდ კი - მაკროფაგების პოლარიზაციის ხარისხზე. გარდა ამისა, ვცადეთ შეგვესწავლა GluR5 რეცეპტორის როლიც მაკროფაგების პლასტიურობაში.

აღნიშნული კვლევის შედეგებმა შესაძლოა შექმნას საფუძველი დემიელინიზაციის არეში ანთებითი იმუნური უჯრედების შემცირებისა და პროცესის მიელინის გარსის აღდგენის მხარეს გადახრის მექანიზმის მოძიების კუთხით.

სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა

თავი 1 მიელინის ფუძე ცილა

1.1. სტრუქტურა და ფუნქცია

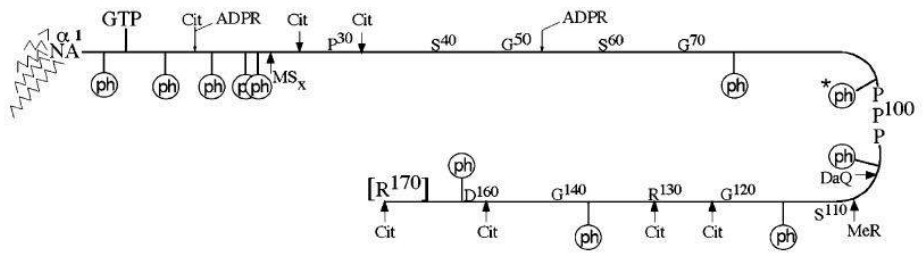
მიელინის ფუძე ცილა (მფც) ცნს-ში ერთ-ერთი ყველაზე უკეთ შესწავლილი ცილაა, თუმცა უახლეს კვლევებში ნერვული უჯრედების აქსონების იზოლაციასთან ერთად, მკვლევართა ინტერესს იწვევს მისი როლი ნეიროიმუნური სიგნალების წარმოქმნაში, პლასტიურობასა და აქსონის მეტაბოლიზმში (Siu C. et al. 2015). გამოყოფენ მფც-ს ორ ძირითად ოჯახს: კლასიკური მფც, რომელიც გვხვდება მომწიფებულ ოლიგოდენდროციტებში და აუცილებელია აქსონების იზოლაციისა და მიელინის გარსის ფორმირებისთვის (Wake H. et al. 2011) და Golli-მფც, რომელიც გვხვდება განვითარების ადრეულ სტადიაზე ოლიგოდენდროციტებში, ნეირონებსა და იმუნურ უჯრედებში (T უჯრედებში); მისი ფუნქცია ძირითადად შემოიფარგლება ოლიგოდენდროციტების პროლიფერაციისა და მიგრაციის რეგულირებით (Paez P.M. et al. 2011). მართალია Golli-მფც არ მონაწილეობს მიელინის გარსის ფორმირებაში, თუმცა იგი მნიშვნელოვან როლს ასრულებს მიელინიზაციის პროცესის ფიზიოლოგიურად წარმართვის პროცესში (Jacobs E.C. et al. 2005).

მოცემულ ნაშრომში საუბარი იქნება კლასიკურ მფც-ზე.

მფც (რომელსაც A1 ცილასაც უწოდებენ) ცენტრალური ნერვული სისტემის ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი ცილოვანი კომპონენტია, რომელიც მიელინის ცილების 30%-ს შეადგენს (Mateu L., 1996). მფც-ს პირველადი სტრუქტურა ნათლად მიუთითებს იმაზე, რომ ცილა დადებითად დამუხტულ მრავალ ამინომჟავურ ნაშთს შეიცავს. სწორედ ეს ძირითადი თვისება განაპირობებს მის გაადვილებულ ურთიერთობას უარყოფითად დამუხტულ ლიპიდებთან. მიელინის ფუძე ცილა წარმოადგენს 170 ამინომჟავისგან შემდგარ ერთჯაჭვიან პროტეინს. ვინაიდან, მფც არ შეიცავს

ცისტეინს, მას არ შეუძლია დისულფიდური ბმების წარმოქმნა და შედეგად აქვს მოქნილი, შედარებით არასტაბილური სტრუქტურა, რომლის საშუალებითაც გარემო პირობების ცვლილებებს ეგუება კონფორმაციული ადაპტაციის გზით (Moscarello M. et al. 2007). ანუ მფც იმ ცილათა ჯგუფის წარმომადგენელია, რომლებიც თავისი ბუნებით ითვლებიან მოუწესრიგებელ ცილებად და, შესაბამისად, ახასიათებთ საგრძნობი კონფორმაციული მოქნილობა (აღნიშნული საკითხი განსაკუთრებით დაწვრილებითაა შესწავლილი Harauz-ის მიერ (Harauz G et all., 2004).

მფც-ს უმნიშვნელოვანესი თავისებურებაა მისთვის დამახასიათებელი პოსტ-ტრანსლაციური მოდიფიკაციების მრავალფეროვნება (სურ. 1) (Moscarello M. et al. 2007).



-Acylation
GTP -Binding Site
ph -Phosphorylation (PKC) *ph -MAP Kinase (F_A/GSK-3)
Cit -Citrulline
ADPR -ADP Ribosylation
MS_x -Methionine Sulfoxide
DaQ -Glutamine Deamidation
MeR -Methyl Arginine
$[R^{170}]$ -Arginine Loss

სურათი 1.მფც-ს პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციები

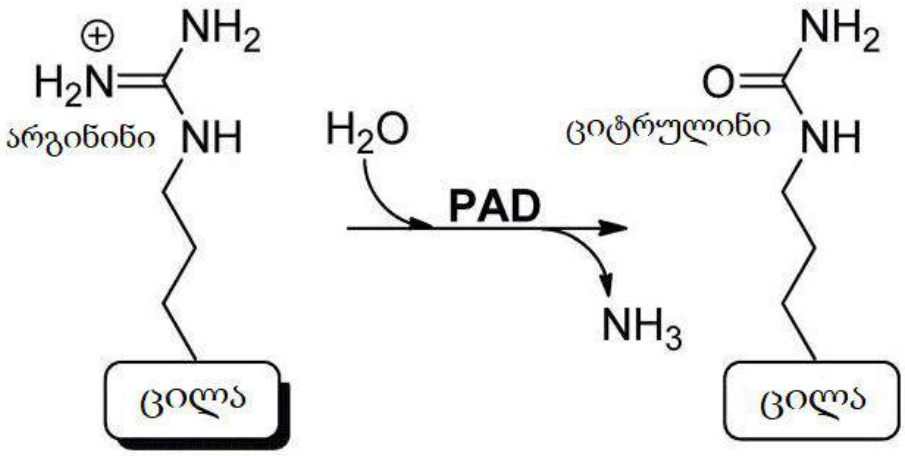
სწორედ პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციებით წარმოშობილი მუხტისმიერი იზომერებისთვის მინიჭებულია შემდეგი დასახელებები: C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 და C8, რაც განპირობებულია კათიონცვლადი სვეტიდან აღნიშნული კომპონენტების ელუირების თანამიმდევრობით pH 10.5-ის პირობებში. C1კომპონენტი არის ყველაზე ნაკლებად მოდიფიცირებული და ფუძე თვისების

ყველაზე მეტად მატარებელი, ანუ დადებითი მუხტი ყველაზე მეტად მასშია თავმოყრილი. მომდევნო კომპონენტები ხასიათდებიან დადებითი მუხტის თანდათან შემცირებით. C8 არის მფც-ს იზომერი, რომელიც საერთოდ არ უკავშირდება გელს და პირველი ელუირდება კათიონცვლად გელზე ქრომატოგრაფიის დროს. იგი საკმაოდ მოდიფიცირებულია და შეიცავს ციტრულინის ნაშთებს.

1.2. მფც-ს ციტრულინირება (დეიმინირება)

მფც-ს ციტრულინირება წარმოადგენს მფც-ს იმ მოდიფიკაციას, რომლითაც განსაკუთრებით დაინტერესებულნი არიან თანამედროვე მეცნიერები. ზოგადად ციტრულინირების პროცესებით დაინტერესება გამოწვეულია აღნიშნული პოსტ-ტრანსლაციური მოდიფიკაციის მონაწილეობით ფიზიოლოგიური და პათოლოგიური პროცესების დიდ უმრავლესობაში. ციტრულინირების პროცესს მნიშვნელოვანი როლი აკისრია ისეთი ფიზიოლოგიური პროცესების განხორციელებაში როგორიცაა: იმუნური სისტემის ნორმალური ფუნქციონირება, კანის კერატინიზაცია, ცნს-ის პლასტიურობა და ნეირონების აქსონების გარსის ფორმირება (Zsuzsanna B. et al. 2012). არასათანადოდ წარმართული ციტრულინირების პროცესი კიგვხვდება ისეთ პათოლოგიებში, როგორიცაა რევმატოიდული ართრიტი, გაფანტული სკლეროზი, ალცჰაიმერის დაავადება და, კვლევის თანამედროვე მონაცემების მიხედვით, სიმსივნური წარმოშობის პათოლოგიებიც კი (Zsuzsanna B. et al. 2012). მიუხედავად ამისა, დღემდე არაა დადგენილი ციტრულინირების პროცესი წარმოადგენს ზემოთ ჩამოთვლილი პათოლოგიების გამომწვევ მიზეზს, თუ ის უბრალოდ დაავადებების თანმხლები პროცესია.

ციტრულინირება კატალიზდება კალციუმ დამოკიდებული ფერმენტული სისტემის პეპტიდილ-არგინინ დეიმინაზას (PAD - ფ.კ. 9.17.3.1.10) ჯგუფით, რომლებიც ცილაში დადებითად დამუხტულ არგინინს გარდაქმნიან დაუმუხტავ ციტრულინად (სურ. 2). (Vossenaar ER et al. 2003).



სურ. 2. არგინინის გარდაქმნა ციტრულინად ფერმენტული სისტემის პეპტიდილ-არგინინ დეიმინაზას მოქმედებით.

სხვადასხვა ქსოვილებში ექსპრესიის კუთხით ცნობილია PAD-ის 5 იზოფორმა. PAD1-ის ექსპრესია ხდება ეპიდერმისში; PAD3 ლოკალიზებულია თმის ფოლიკულებში, ხოლო PAD4 ძირითადად ექსპრესირდება ჰემატოპოეზური წარმოშობის უჯრედებში. ასევე, სავარაუდოა, PAD4-ის მონაწილეობა გენების რეგულაციასა და კიბოს განვითარებაში. PAD6 აღმოჩენილია ემბრიონსა და საკვერცხეებში. იგი PAD2-სა და PAD4-თან შედარებით ნაკლებად შესწავლილი ფერმენტია (Zsuzsanna B. et al. 2012). რაც შეეხება PAD2-ს, იგი აღმოჩენილია კუნთოვან ქსოვილსა და ცნს-ში. ცნს-ში PAD2, ძირითადად, ექსპრესირდება ოლიგოდენდროციტებში, მიკროგლიასა და ასტროციტებში. სხვა ცილებთან ერთად, ფერმენტი ახორციელებს მფც-სა და გლიის ფიბრილური მჟავა პროტეინის ციტრულინირებას (György B et al, 2006). გამოთქმულია მოსაზრება, რომ მფც-ს ციტრულინირება წამყვანი ფაქტორია ისეთ ფიზიოლოგიურ პროცესში, როგორიცაა ცნს-ის პლასტიურობის შენარჩუნება ადრეულ ასაკში: ამ მოსაზრებას საფუძვლად უდევს ის ფაქტი, რომ ციტრულინირებული და ყველა იზომერის ჯამური რაოდენობის ფარდობა სწრაფად იცვლება პოსტნატალური პერიოდის შემდეგ (György B et al, 2006). მაგრამ, ამავე დროს,სწორედ PAD2-ით წარმართულ

ციტრულინირების პროცესს თვლიან გაფანტული სკლეროზისა და ალცჰაიმერის პათოგენეზში მონაწილე მექანიზმად (Vossenaar ER et al., 2003).

1.3. მიელინის ფუძე ცილა და გაფანტული სკლეროზი

გაფანტული სკლეროზი არის უცნობი ეტიოლოგიისა და ჰეტეროგენული კლინიკური სიმპტომების მქონე პათოლოგია. მისთვის დამახასიათებელია ცენტრალური ნერვული სისტემის (ცნს) ქრონიკული ანთებითი კერების არსებობა და ამასთან ერთად, წარმოადგენს აუტოიმუნურ დაავადებას (Weiner. 2004), რომელიცმიმდინარეობს მიელინის გარსის დაზიანებით.

გაფანტული სკლეროზის გამომწვევი მიზეზები მეცნიერთათვის დღემდე ამოუცნობ ამოცანად რჩება. მრავალი წლის მანძილზე ჩატარებულმა კვლევებმა დაავადების ეტიოლოგიასთან დაკავშირებულ კითხვებს ვერ გასცა კონკრეტული პასუხები, თუმცა, გამოიკვეთა ეტოლოგიის რამდენიმე ფაქტორი:

- არსებობს ვარაუდი, რომ გაფანტული სკლეროზის განვითარებაზე გავლენას ახდენს *გეოგრაფიული ფაქტორი,* რადგან აღნიშნული დაავადების გავრცელება სჭარბობს ცივ ზონებში, სადაც დაფიქსირებულია მზის სხივების და შესაბამისად D ვიტამინის დეფიციტი (Vukusic S et al., 2007). დადასტურებულია ფაქტი, რომ ვიტამინ D-ს ხელოვნური მიწოდება ამცირებს დაავადების განვითარების რისკს (Ramagopalan SV et al., 2010). ასევე, უახლესმა კვლევებმა, რომლებიც ჩატარდა ქრომატინის იმუნოპრეციპიტაციითა და შემდეგ მისი სექუენირებით აჩვენეს, რომ ვიტამინ D-ს რეცეპტორს მნიშვნელოვანი როლი ენიჭება აუტოიმუნურ დაავადებებში მონაწილე რამდენიმე გენის ტრანსკრიფციის მოდულაციაში (Huynh J.L et al. 2013).
- დაავადების განვითარებაზე გავლენას ახდენს *სქესობრივი ფაქტორიც.* გაფანტული სკლეროზით ორჯერ მეტად ავადდებიან ქალები, ვიდრე მამაკაცები. დაავადების გამოვლენის ასაკი ძირითადად 15-55 წელს შორის მერყეობს (Love S. 2006).

- დაავადების პათოგენეზში მნიშვნელოვან როლს თამაშობს *გენეტიკური და ეპიგენეტიკური ფაქტორებიც.* თანდათანობით აშკარა ხდება, რომ გაფანტულისკლეროზი წარმოადგენს გარემო პირობების ზეგავლენისა და ინდივიდუალური გენეტიკური მგრძნობელობის ერთობლივად მოქმედების შედეგს. ბირთვული ჰისტონების პოსტ-ტრანსლაციური მოდიფიკაციები, დნმ-ის მეთილირება და მიკრო-რნმ-ით განპირობებული რეგულაციები კი წარმოადგენენ იმ ეპიგენეტიკურ მოლეკულურ მექანიზმებს, რომელთა საშუალებითაც გარემოდან მომავალი სიგნალები (კვება, მწეველობა, მედიკამენტების ბოროტად გამოყენება) გარდაიქმნება ექსპრესირებულ გენებად (Huynh J.L. et al., 2013).
- ყველაზე მნიშვნელოვან ეტიოლოგიურ ფაქტორად მიჩნეულია *ნეიროდეგენერაციული ფაქტორების და იმუნური სისტემის არასწორი აქტივირების ერთობლივი მოქმედება.* გაფანტული სკლეროზით დაავადებულ პაციენტთა თეთრ ნივთიერებაში დადასტურებულია ოლიგოდენდროციტების აპოპტოზური კვდომა ლიმფოციტებისა და მიელინური ფაგოციტების არარსებობის პირობებში, რაც სავარაუდოს ხდის, რომ დაავადება პირველადად იწყება ნეიროდეგენერაციული მექანიზმით, რომელსაც მოსდევს აუტოიმუნური პასუხის განვითარება. ნეიროდეგენერაციის ინიცირება შესაძლოა გამოიწვიოს მიელინის გარსის შემადგენელ კომპონენტებში მეტაბოლურმა ცვლილებებმა, რასაც მოჰყვება მემბრანის დესტაბილიზაცია და მიელინის დეგრადაცია (Moscarello M.A. et al., 2007). მიელინის გარსისგან იზოლირებული მფც-ს (აუტოანტიგენი) სისხლში გადასვლამ შესაძლოა გამოიწვიოს T-უჯრედების სენსიტიზაცია (Moscarello M.A. et al., 2007), რადგან მფც-ის მაკოდირებელი გენის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა ემსგავსება წითელას და ჰერპეს (EBV ანუ HHV-4; HHV-6) ვირუსული ანტიგენის სეგმენტის (ეპიტოპის) ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობას, რომელსაც გააჩნია ჯვარედინი რეაქტიულობის თვისება (Libbey JE et al., 2007; Fujinami RS et al. 2006). ნახსენები ეპიტოპები წარმოადგენენ ვირუსული ანტიგენის სეგმენტებს, რომელთაც შეუძლია როგორც B უჯრედების, ასევე მათი MHC ცილებით

(ჰისტოშეთავსებადობის მთავარი კომპლექსის ცილები) T-უჯრედებისათვის წარდგენისას $CD4^+$ ან $CD8^+$ ფენოტიპის აქტივირება. იმუნური პასუხის მსგავსი მექანიზმით წარმოქმნა და საბოლოოდ ანთებითი ციტოკინების გამოთავისუფლება ფიზიოლოგიური პასუხია ორგანიზმის ვირუსთან ბრძოლაში, მაგრამ თუ ორგანიზმში შეჭრილი უცხო ანტიგენი ამინომჟავური თანმიმდევრობით, ან სტრუქტურით,ორგანიზმში არსებული ცილების (ამ შემთხვევაში მფც-ს) ჰომოლოგიურია (რასაც მოლეკულური მიმბაძველობა ეწოდება), ადგილი აქვს გახანგრძლივებულ ანთებით პასუხს, რომელიც ასოცირდება აუტოიმუნური დაავადებების ინიცირებასა და გართულებასთან (Cusick M. et al., 2012; Fujinami R. et al., 1983).

გაფანტული სკლეროზის პათოგენეზში სამიზნე უჯრედად ითვლება მიელინის წარმომქმნელი უჯრედები, აუტოანტიგენად - მფც, ხოლო ჯვარედინი რეაქტიულობის თვისების მქონე ეპიტოპებად, როგორც უკვე აღვნიშნეთ, წითელას და ჰერპეს (EBV ანუ HHV-4; HHV-6) ვირუსების ანტიგენური სეგმენტები.

მოლეკულური მიმბაძველობის ერთ-ერთ მიზეზად ასევე შეიძლება ჩაითვალოს T უჯრედების რეცეპტორის (TCR) -ის პოლისპეციფიკურობა, ანუ უნარი დაუკავშირდეს ამინომჟავური თანმიმდევრობით ან სტრუქტურით მსგავს მრავალ ანტიგენს (Wucherpfennig KW et al., 2007; Libbey JE et al., 2010; Plot L et al., 2009).

როგორც ზემოთ აღვნიშნეთ მიელინის გარსში მეტაბოლურმა ცვლილებებმა შესაძლოა გამოიწვიოს მისი დეგრადაცია და მფც-ს თავისუფალი ეპიტოპის სისხლში გადასვლა. აღნიშნულ პროცესში განსაკუთრებული როლი ენიჭება ზემოთ აღწერილ მფც-ს პოსტტრანსლაციურ მოდიფიკაციას - ციტრულინირებას.

გაფანტულ სკლეროზში ციტრულინირების როლის შესწავლის ინტერესი პირველად წარმოიქმნა კვლევების შედეგად, რომლებმაც გამოავლინეს პაციენტებში მფც-ის ციტრულინირებული ფორმის მაღალი კონცენტრაციის შემცველობა (Moscarello M.A. et al., 2007). ჩვეულებრივ არადაავადებულ ადამიანთა მფც-ში 19 შესაძლოდან

მაქსიმუმ 6 არგინინია დეიმინირებული ციტრულინად და მთელი მფც-ს მხოლოდ 20%-ია მოდიფიცირებული (რაც წარმოადგენს ფიზიოლოგიურ რეგულატორულ მექანიზმს მიელინის გარსის ჩამოყალიბებაში). მაშინ როცა გაფანტული სკლეროზის მქონე ავადმყოფებში ცილის თითქმის 45%-ია მოდიფიცირებული და, ასევე, იზრდება თვით ცილის მოლეკულაში არსებული ციტრულინების რიცხვი.ამინომჟავა ციტრულინი ცილის მოლეკულაში არც თუ ისე ხშირად გვხვდება. როგორც ზემოთ აღვნიშნეთ, ცნს-ში იგი წარმოიქმნება PAD2 ფერმენტული სისტემის მოქმედების შედეგად (Algeciras et al., 2008).

მფც ყოველი დეიმინირებული არგინინის წილად ერთ დადებით მუხტს კარგავს. დადებითი მუხტის დაკარგვა ამცირებს ცილის ელექტრული ურთიერთქმედების უნარს უარყოფითად დამუხტულ ჯგუფებთან, განსაკუთრებით ნუკლეინის მჟავებისა და ფოსფოლიპიდების ფოსფატის ჯგუფებთან. ლიტერატურული მონაცემების მიხედვით, დადასტურებულია, რომ ყველაზე მეტად მოდიფიცირებული მფც-ს იზომერს, C8-ს, არ აქვს უნარი მოახდინოს ლიპიდური შრის ორგანიზება კომპაქტურ, მრავალშრიან სტრუქტურად, რაც მარტივად მიიღწევა ყველაზე ნაკლებ ციტრულინირებული მფც-ს დამუხტული იზომერის - C1-ის მეშვეობით (Moscarello M.A. et al., 2007, Shanshiashvili et al. 2003; Shanshiashvili et al. 2012). შესაბამისად, არგინინის ციტრულინად გარდაქმნა აფერხებს ცნს-ის უჯრედების მემბრანის ჩამოყალიბების პროცესს და მემბრანასთან დაკავშირებულ ცილაში არსებულ იმუნოდომინანტურ ეპიტოპს დაუცველს ტოვებს ისეთი პროტეაზებისგან, მაგალითად, როგორიცაა მიელინთან ასოცირებული ფერმენტი კატეპსინ D (Pritzker LB et al., 2000). მფც, რომელიც შეიცავს 6 ციტრულინის ნაშთს იხლიჩება 4-ჯერ უფრო სწრაფად, ვიდრე არადეიმინირებული მფც. მფც, რომელიც შეიცავდა 18 ციტრულინის ნაშთს იხლიჩებოდა 45-ჯერ უფრო სწრაფად, ვიდრე ჯანმრთელი ტვინისგან მიღებული მფც. აღნიშნულ სტრუქტურულ ცვლილებას საბოლოო შედეგადშესაძლოა მოჰყვეს მფც-ს ეპიტოპის მემბრანისგან ჩამოშორება და მისი სისხლში გადანაცვლება (Moscarello M.A. et al., 2007).

კვლევებმა აჩვენეს, რომ მფც წარმოადგენს $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18, Mac-1) ინტეგრინის ძლიერ და სპეციფიკურ ლიგანდს (Stapulionis R et al. 2008). $\alpha_M\beta_2$ ინტეგრინი

ძირითადად ექსპრესირდებამიელოიდურ უჯრედებზე და მონაწილეობს ანთებითი პროცესის დროს ლეიკოციტების ადჰეზიურ რეაქციებში (Prince JE, 2001).

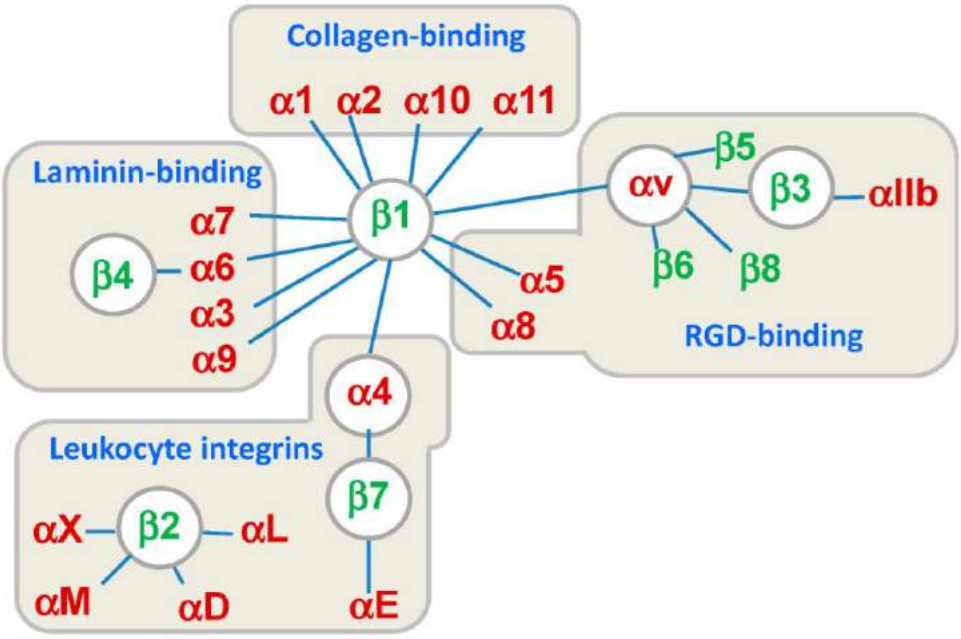
1.4. ინტეგრინები

ინტეგრინები წარმოადგენენ ადჰეზიურ რეცეპტორებს, რომელთაც შეუძლიათ უჯრედშორისი და ასევე, უჯრედსა და მატრიქს შორის დინამიკურ ადჰეზიური კავშირების წარმოქმნა, თუმცა გარდა ამისა მათ აქვთ უნარი დაიკავშირონ ლიგანდი და მისი ქიმიური და ფიზიკური თვისებების მიხედვით გადასცენ ინფორმაცია უჯრედის შიგნით, რათა დაარეგულირონ უჯრედთა მიგრაცია, ზრდა, პროლიფერაცია, სიცოცხლისუნარიანობა და გარკვეული გენების ექსპრესიაც კი (Hynes R.O. 2002).

ფიზიოლოგიურ მდგომარეობაში ინტეგრინებს ახასიათებთ დაბალი აფინურობა მათი ენდოგენური ლიგანდების მიმართ, თუმცა, მათ შეუძლიათ მრავალი სტიმულის საპასუხოდ განიცადონ სწრაფი აქტივირება (Kim C. 2011, Shattil, S.J.; 2010). ინტეგრინების აქტივაციისთვის საჭიროა უჯრედშიდა („შიგნიდან-გარეთ“) სიგნალის არსებობა, თუმცა, ვინაიდან ისინი წარმოადგენენ სიგნალის ორმხრივი გატარების უნარის მქონე რეცეპტორებს, მათ ასევე შეუძლიათ უჯრედგარე ლიგანდების დაკავშრება და „გარედან-შიგნით“ სიგნალის გატარება, რომელსაც მოყვება უჯრედთა ფორმის, მიგრაციის, ზრდისა და დიფერენციაციის რეგულირება (Tolomelli A et al. 2017).

ინტეგრინების უნარი დაუკავშირდნენ უჯრედგარე მატრიქსის გარკვეულ კომპონენტებსა და ლიგანდებს, მჭიდროდაა დამოკიდებული მათი α და β სუბერთეულების კონფორმაციაზე. ორივე სუბერთეული ტრანსმემბრანული გლიკოპროტეინია, რომლებიც ერთმანეთთან დაკავშრებულია არაკოვალენტური ბმებით. ნაჩვენებია, რომ გლიკოზილირებული საიტების რაოდენობა მკვეთრად მერყეობს ინტეგრინების სხვადასხვა ტიპს შორის, თუმცა, გარდა გლიკოზილირებული საიტების რაოდენობისა, ცალკეული ინტეგრინები

ერთმანეთისგან ასევე განსხვავდებიან სხვადასხვა ლიგანდებთან დაკავშრების უნარით (სურ. 3) (Tolomelli A et al. 2017).



სურათი 3. ინტეგრინების კლასიფიკაცია ლიგანდის მიმართ სპეციფიკურობის ან იმ უჯრედის ტიპის მიხედვით, რომელზეც არიან ექსპრესირებული.

ლიგანდის მიმართ სპეციფიკურობის კუთხით განსაკუთრებული მნიშვნელობა აქვს α სუბერთეულს, რომელიც განსაზღვრავს სხვადასხვა ლიგანდების მიმართ სპეციფიკურობას. RGD აღნიშნავს Arg-Gly-Asp-ის მოტივების მიმართ სპეციფიკურ ინტეგრინების ოჯახს. ლეიკოციტური ინტეგრინების ოჯახიდან კი განსაკუთრებული ყურადღება მიიქციეს $\alpha_L\beta_2$ (LFA-1, CD11a/CD18), $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18, Mac-1), $\alpha_4\beta_7$ (LPAM) და $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4)-მა, რადგან წარმოადგენენ დაბალმოლეკულური ლიგანდებისმიერი იმუნომოდულაციის გამომწვევ ფაქტორებს. გარდა ამისა, $\alpha_4\beta_1$ ინტეგრინს წამყვანი როლი აკისრია ენდოთელური ციტოკინდამოკიდებულ ადჰეზიურ მოლეკულებთან (VCAM-1 - vascular cell adhesion molecule) დაკავშრებაში, რაც მნიშვნელოვანი მექანიზმია გაფანტული სკლეროზის დროს T ლიმფოციტების ჰემატოენცეფალური ბარიერისკენ მიზიდვის პროცესში (იხ. ქვემოთ).

ნაჩვენებია, რომ $\alpha_M\beta_2$ ინტეგრინის მოქმედების მექანიზმი მოიცავს RhoA ან Rac-ის აქტივაციის გზებს (Dupuy A. et al. 2008).

*1.5. GTP-აზა - **Rac***

გუანოზინ ტრიფოსფატაზების (GTP-აზა) Ras სუპეროჯახის წარმომადგენელია Rho GTP-აზების ქვეჯგუფი. ციტოჩონჩხის გადაწყობისა და აქტინზე დამოკიდებული სხვა უჯრედული ფუნქციების რეგულირების გარდა, დღესდღეობით ცნობილია, რომ Rho GTP-აზები მონაწილეობენ სხვადასხვა მემბრანული რეცეპტორებისგან (მათ შორის თიროზინკინაზას, ინტეგრინების და T- და B- უჯრედების რეცეპტორებისგან) მიღებული სიგნალების გადაცემასა და უჯრედშიდა გადაწყობის პროცესებში (Paia S. et al. 2010).

ამინომჟავური თანმიმდევრობის, პროტეინული დომეინისა და ფუნქციის მიხედვით Rho GTP-აზები თავის მხრივ, შესაძლოა დაიყოს 6 ქვეჯგუფად, რომელთაგანაც ყველაზე მეტად შესწავლილებია Rac, RhoA და Cdc42 (Bosco E. E. et al. 2009; Hall A. 1998). Rac GTP-აზას (ცხოველურ ორგანიზმში არსებობს მისი სამი იზოფორმა Rac1, Rac2, Rac3). არააქტიური ფორმა დაკავშირებულია GDP-სთან, ხოლო აქტიური ფორმა GTP-სთან. GTP-სთან დაკავშირებული Rac ურთიერთქმედებს მრავალ სპეციფიკურ ეფექტორთან, რათა წარმოქმნას სხვადასხვა უჯრედული პასუხები. მაგალითად, მრავალი უჯრედგარე სიგნალის მიღებით აქტივირებული რეცეპტორული კინაზები, G ცილებთან გაწყვილებული რეცეპტორები, ან ინტეგრინები ააქტიურებენ GEF-ს, რომელიც გადასცემს ინფორმაციას Rac1-ს, ახდენსმის GTP-თან დაკავშირებასა და მისი სიგნალის გამტარებელი ფუნქციის ინდუცირებას. GTP-თან დაკავშირებული Rac1 იძენს აქტიურ კონფორმაციას, რომელსაც შეუძლია დაუკავშირდეს ისეთ ეფექტორულ მოლეკულებს როგორებიცაა IQGAP, IRSp53/WAVE, PAK, MLK2/3 და p67phox. აღნიშნული ეფექტორები კი არეგულირებენ ისეთ უჯრედულ ფუნქციებს, როგორებიცაა ციტოჩონჩხის გადაწყობა, მიკრომილაკების სტაბილურობის შენარჩუნება, გენების ტრანსკრიპცია და სუპეროქსიდის წარმოქმნა (Bosco E. E. et al. 2009).

ჰემატოენცეფალური ბარიერი ნეიროდეგენერაციული პროცესების (მათ შორის გაფანტული სკლეროზი) მიმდინარეობაში მნიშვნელოვანი ფაქტორია ჰემატოენცეფალური ბარიერის დაზიანებას. აღნიშნული ბარიერის შესწავლა მნიშვნელოვანია დაავადების პათოგენეზის კვლევისთვის. ჰემატოენცეფალური ბარიერი წარმოადგენს ფუნქციურ და ანატომიურ ბარიერს, რომელიც ცნს-ში ნეირონებს გამოყოფს სისხლისგან. ის შედგება, როგორც ვასკულარული კედლისა და ცნს-ის ასტროციტებისგან, ასევე, მათ შორის არსებული პერივასკულარული სივრცისგან. ჰემატოენცეფალურ ბარიერს რამდენიმე მნიშვნელოვანი ფუნქცია აქვს, რომელთა შორისაცაა დინამიკური რეგულაციის გზით ცნს-ში სათანადო იონური კონცენტრაციის შენარჩუნება და იმუნური ზედამხედველობა (Høglund R. A. et al. 2014; Engelhardt B. 2008).

დადასტურებულია ფაქტი, რომ ჰემატოენცეფალური ბარიერის დისფუნქციას მივყავართ ცნს-ში ანთებით ცვლილებებამდე, რასაც შეუძლია ნეიროდეგენერაციულ პროცესებზე გავლენის მოხდენა. ცხადია, რომ ჰემატოენცეფალური ბარიერის დისფუნქციის შედეგად მარტივდება გარკვეული იმუნური უჯრედებისა და ანთებითი მედიატორების შეღწევა ცნს-ში, რასაც შედეგად მოჰყვება ლოკალური ანთებითი პროცესების დამძიმება. დღესდღეობით საკმარისი მტკიცებულება არსებობს იმისათვის, რომ ჰემატოენცეფალური ბარიერის სტრუქტურულ პათოლოგიებთან ასოცირებულ იქნას ნეიროდეგენერაციული დაავადებები. მაგნიტურ-რეზონანსული ტომოგრაფიით ჩატარებულმა კვლევებმა აჩვენა, რომ გაფანტული სკლეროზით დაავადებული პაციენტები ავლენენ ცვლილებებს ჰემატოენცეფალური ბარიერის როგორც ლოკალურ, ასევე, დიფუზურპათოლოგიებში. ცნს-იდან წარმოქმნილი ანტიგენის წინააღმდეგ აუტოიმუნური T უჯრედების პასუხებს შეუძლია გამოიწვიოს ანთებითი პროცესები თავის ტვინში, რასაც მოჰყვება რამდენიმე ნეიროდეგენერაციული დაავადების, მათ შორის გაფანტული სკლეროზის, განვითარება. ანთებითი პროცესების დროს ხდება მიელინ სპეციფიკური T უჯრედების აქტივირება, რომლებსაც შეუძლიათ ჰემატო-ენცეფალური ბარიერის გადალახვა და სპეციფიკური აქსონური დემიელინიზაციის გამოწვევა (Fakhoury M, 2015; Erickson MA et al., 2013; Vos CM et al 2005).

ფიზიოლოგიურ პირობებში, აქტივირებულ ლიმფოციტებს ცნს-ში მაღალი იმუნური ზედამხედველობის უნარი არ აქვთ. ცნს-ში მათი დაბალი შეღწევადობა გამოწვეულია არა იმდენად ვასკულარული ბარიერის არსებობით, რამდენადაც ენდოთელური ციტოკინდამოკიდებული ადჰეზიური მოლეკულების (CAMs - Cell adhesion molecules) დაბალი ექსპრესიით, რადგან CAM-ები წარმოადგენს აუცილებელ კომპონენტს ენდოთელიუმის მიერ სისხლიდან ლეიკოციტების შებოჭვისათვის. ენდოთელიუმის აქტივირება შესაძლებელია მასზე TNF-α, IFN-γ, IL-17, IL-22 და IL-1b ციტოკინების ზემოქმედებით, რასაც შედეგად მოჰყვება CAM-ების ექსპრესიის აღმარეგულაცია და ლეიკოციტების ჰემატოენცეფალური ბარიერისკენ მიზიდვა (Norma Y et al., 2013; Frischer S. et al., 2009). უფრო მეტიც, აქტივირებულ T უჯრედებს შეუძლიათ ცნს-ის რამდენიმე ტიპის უჯრედებზე მოქმედების გზით მოახდინონ ხსნადი მედიატორების გამოთავისუფლება, რომლებიც თავის მხრივ, სხვა ანთებითი უჯრედების ცნს-ისკენ მიგრირებას უზრუნველყოფენ. დღესდღეობით მიღებულია თეორია, რომ ცნს-ზე T უჯრედების ურთიერთქმედება წარმართავს თანდაყოლილი იმუნური სისტემის პასუხებს (Goverman J. 2009).

გაფანტული სკლეროზის პათოგენეზში T უჯრედების როლი ყოველთვის ცენტრალურად იყომიჩნეული, რაც, მოდელურ ცხოველებზე კარგად იქნა ნანახი: აქტივირებული მიელინ სპეციფიკური $CD4^+$ T უჯრედების ცნს-ში გადატანას შეუძლია ექსპერიმენტული აუტოიმუნური ენცეფალომიელიტის (EAE-Experimental autoimmune encephalomyelitis) გამოწვევა (Ben-Nun A. et al., 1981). თუმცა, უკანასკნელი წლების მანძილზე აშკარა გახდა, რომ გაფანტული სკლეროზის პათოგენეზში ჩართულია იმუნური სისტემის მრავალი უჯრედი როგორც თანდაყოლილი, ასევე, ადაპტური იმუნიტეტიდან და იმუნური უჯრედების-მაკროფაგების მსგავსი გლიური უჯრედებიც. შესაბამისად, დღესდღეობით მეცნიერების ყურადღება გადატანილია გაფანტულისკლეროზის პროგრესირებასა და შესუსტებაშიისეთი იმუნური და გლიური უჯრედების ჩართულობაზე, როგორიცაა: მაკროფაგები/მიკროგლია, ასტროციტები, ოლიგედენდროციტები, NK უჯრედებიდა სხვა (Samuel S et al., 2014). მაკროფაგების როლს ანთებით პროცესებში განსაკუთრებული ყურადღება მიექცა მას შემდეგ, რაც დადგინდა რომისინი T და B

უჯრედებთან ამყარებენ კავშირებს როგორც უჯრედ-უჯრედული კონტაქტებისგზით, ასევე, სეკრეტორული მოლეკულების გზითაც: გამოათავისუფლებენ ციტოკინებს, ქემოკინებს, ფერმენტებს, არაქიდონის მჟავას მეტაბოლიტებს და თავისუფალ რადიკალებს (Gordon S. 2003; Stout R.D. 2004; Duffield J. S. 2003).

თავი 2 მაკროფაგები

2.1. მაკროფაგების კლასიფიკაცია

მაკროფაგები წარმოადგენენ ფაგოციტურ უჯრედებს, რომლებსაც ფიზიოლოგიურ პირობებში შეუძლიათ ფუნქციონირება სხვა იმუნური უჯრედებისგან დამოუკიდებლად. ჰომეოსტაზის პირობებში მაკროფაგები დღეში გადაამუშავებენ 2×10^{11} ერითროციტების რაოდენობას, უჯრედების დაპროგრამებული სიკვდილის მექანიზმით (აპოფტოზით) წარმოქმნილ ფრაგმენტებს, ქსოვილების განახლების პროცესში წარმოქმნილ ნარჩენებსა და ა.შ. (Mosser D.M. 2008).

მაკროფაგებს ახასიათებთ არა მხოლოდ განსხვავებულ პირობებში განსხვავებული მოქმედების მექანიზმი, არამედ უჯრედულ პოპულაცებს შორის საგრძნობი მრავალფეროვნებაც. შემოთავაზებულია მათი სხვადასხვა კლასიფიკაციის მექანიზმები, რომელთა შორის ვხვდებით ლოკაციის მიხედვით სხვადასხვა ქსოვილებში დიფერენცირებული მაკროფაგების კლასიფიკაციას. მაგ: ალვეოლური მაკროფაგები (ფილტვებში), ჰისტიოციტები (შემაერთებელ ქსოვილში), კუფერის უჯრედები (ღვიძლში), მიკროგლია (ცნს-ში), ოსტეოკლასტები (ძვალში) და ა.შ. (Gautier E.L et al. 2012).

მრავალფეროვანია მაკროფაგების წარმოშობის მექანიზმებიც. მაგალითად მიკროგლია მონონუკლეური ფაგოციტური სისტემისგან ონტოგენურად განსხვავებული პოპულაციაა, თუმცა ვხვდებით მაკროფაგების წარმოქმნის

შემთხვევებს თვითგანახლების მექანიზმითაც, რაც განსაკუთრებით აქტუალურია გარკვეული ტიპის ანთებითი პროცესების მიმდინარეობისას (Ginhoux F. et al. 2014). მაგრამ უნდა აღინიშნოს, რომ მიუხედავად თვითგანახლების შესაძლებლობისა, როდესაც საქმე გვაქვს მაკროფაგების საგრძნობ დანაკარგთან (განსაკუთრებით ანთების პირველ ფაზაში), დანაკარგის კომპენსირება შესაძლებელია მხოლოდ ანთების კერაში სისხლის მონოციტების მოზიდვით და, შესაბამისად, პროცესში წამყვანი როლი მათგან წარმოქმნილ მაკროფაგებს ენიჭებათ (Italiani P. 2014; Barth M.W. 1995).

თაგვებზე ჩატარებული კვლევების მიხედვით ანთების საწყის სტადიაზე ქსოვილების ინფილტრაცია ხდება Ly6C+ მონოციტებით, რომელთა დიდი უმრავლესობა წარმოშობს M1 (ანთებით) მაკროფაგებს. მხოლოდ ანთების შემდგომ სტადიებზე ხდება Ly6C+-ის დიფერენცირება Ly6C- მონოციტებად, რომლებიც წარმოქმნიან M2 მაკროფაგების მსგავს პასუხებს (ჰომეოსტაზისადა ქსოვილების აღდგენა) (Arnold L. et al. 2007). ნანახია მონოციტების ანთების ადგილას მიზიდვის სხვა მექანიზმებიც, რომლებიც დამოკიდებულია ანთების ტიპსა და სტადიაზე. მაგალითად მიოკარდიუმის ინფარქტის დროს ანთების პირველ სტადიაზე ხდება Ly6C+-ის ინფილტრაცია ქსოვილში, ხოლო შემდეგ Ly6C--ის დამოუკიდბელი ინფილტრაცია იწყებს ანთების შემდეგ საფეხურს, რაც მდგომარეობს ვასკულარული ენდოთლიუმის ზრდის ფაქტორისა და კოლაგენის გამოთავისუფლების გზით შეხორცების პროცესების ინიცირებაში (Nahrendorf M et al. 2007). ათეროსკლეროზის დროს მიმდინარე ქრონიკული ანთების მსგავს ანთებით პროცესებში კი ნანახია ორივე ტიპის მონოციტის თანადროული ინფილტრაცია ანთების კერაში (Gautier E.L. et al. 2009).

უნდა აღინიშნოს, რომ ზემოთ მოცემული ინფორმაციის ანალიზისას აუცილებელია გათვალისწინებულ იქნას თაგვებისა და ადამიანის მონოციტებს შორის არსებული ფიზიოლოგიური განსხვავებები. მაგალითად, ადამიანის მონოციტების უმრავლესობაზე (თითქმის 90%) ექსპრესირებულია კლასიკური მარკერები ($CD14^{hi}CD16^{-}$), მაშინ როდესაც თაგვების სისხლში თანაბრად გვხვდება როგორც კლასიკური ასევე არაკლასიკური ($CD14^{+}$ $CD16^{+}$) მონოციტები (Passlick B. et al. 1989).

რაც შეეხება კვლევის *in vivo* პირობებს, არსებული კვლევების მიხედვით შეგვიძლია მივიჩნიოთ, რომ მონოციტები იძენენ ფუნქციურ ფენოტიპს მიკროგარემოში არსებული სიგნალების და შესაბამისად ანთების მიმდინარეობის სტადიის მიხედვით (Italiani P. 2014).

მაკროფაგების თვისება, რომ შეძლონ საკუთარი ფენოტიპის ადაპტირება გარემოს სიგნალების, პირველადი და ადაპტაციური იმუნური პასუხების და მათივე მხრიდან წარმოქმნილი სხვადასხვა ფაქტორების მიმართ, ხაზს უსვამს მაკროფაგების საოცარ პლასტიურობას (Mosser D.M. 2008; Gordon S. 2007).

მაკროფაგების კლასიფიკაციის ერთ-ერთი მეთოდი გულისხმობს მათ დაყოფას კლასიკურად აქტივირებად, ჭრილობის შეხორცებაში მონაწილე და მარეგულირებელ (ანთების საწინააღმდეგო) მაკროფაგებად (Mosser D.M. 2008).

მაკროფაგები რომლებიც აქტიურდებიან ინტერფერონ-γ (IFN-γ)-სა და სიმსივნის ნეკროზის ფაქტორის (TNF) მიერ და რომლებიც წარმოქმნიან ანთებით ციტოკინებსა და მედიატორებს იწოდებიან **კლასიკურად აქტივირებად მაკროფაგებად**. მაკროფაგები, რომლებიც აქტიურდებიან IL-4 და IL-13-ით, წარმოქმნიან ანთებითი ციტოკინების მხოლოდ უმნიშვნელო რაოდენობას და უფრო ეფექტურები არიან განკურნებისა და უჯრედგარე მატრიქსის აღდგენის პროცესში, ვიდრე ჟანგბადისა და აზოტის თავისუფალი რადიკალების მეშვეობით პათოგენების განადგურების პროცესში, იწოდებიან **ჭრილობის შეხორცებაში მონაწილე მაკროფაგებად.** უნდა აღინიშნოს, რომ მაშინ როდესაც კლასიკურად აქტივირებადი მაკროფაგების რეგულაციის მოშლა დაკავშრებულია აუტიმუნურ პათოლოგიებთან, ჭრილობის შეხორცებაში მონაწილე მაკროფაგების უკონტროლო გამრავლებამ შესაძლოა ქსოვილების ფიბროზამდე მიგვიყვანოს (Hesse, M. 2001).

რეგულატორული მაკროფაგები წარმოადგენენ მაკროფაგების ჯგუფს, რომლებიც ხასიათდებიან იმუნოსუპრესიული ციტოკინის IL-10-ის წარმოქმნითა და IL-12-ის დაღმა რეგულაციით და რომლებსაც ანთების საწინააღმდეგო პასუხის წარმოსაქმნელად ესაჭიროებათ ორი სიგნალის (იმუნური კომპლექსების, პროსტაგლანდინების, ადენოზინისა ან აპოპტოზური უჯრედებისა და TLR (Toll-Like Receptor)-ის ლიგანდების თანადროული არსებობა). (Tsitsilashvili et al. 2016).

აღნიშნული რეცეპტორი მრავალფუნქციურია. ის ყველაზე ხშირად ექსპრესირდება ანტიგენწარმდგენი უჯრედების მიერ, როგორიცაა მაკროფაგები და დენდრიტული უჯრედები (Jarrossay D. et al., 2001) და, ასევე, B უჯრედების მიერ (Dorner M. et al., 2009). TLR ჩართულია პათოგენთან ასოცირებული მოლეკულების (Pathogen-associated molecular patterns-PAMP) ამოცნობაში, რაც იწვევს ანთებითი ციტოკინების, ქემოკინებისა და თანამასტიმულირებელი მოლეკულების მაკოდირებელი გენების ტრანსკრიპციის აქტივაციას, საბოლოოდ კი თანდაყოლილი იმუნური სისტემისა და ანტიგენ-სპეციფიკური ადაპტური იმუნური სისტემის აქტივირებას. ანთებითი ხსნადი ფაქტორები ააქტიურებენ მიკროგლიასა და ენდოთელურ უჯრედებს, იწვევენ ადჰეზიური ფაქტორების აპრეგულაციასა და T უჯრედების ცნს-ისკენ მიზიდვას (Galdiero M. et al., 2004; Akira S. et al., 2003).

უნდა აღინიშნოს, რომ TLR ნანახია არა მხოლოდ იმუნურ უჯრედებზე. 2010 წელს ჩატარებული კვლევების (Sloane J. A. et al., 2010) მიხედვით, ოლიგოდენდროციტების მომწიფების შეჩერება და, შესაბამისად, რემიელინიზაციის პროცესების რეპრესირება მიმდინარეობს TLR-ზე მოქმედების გზით. ნაჩვენებია, რომ TLR2 ექსპრესირდება ოლიგოდენდროციტებში და გაფანტული სკლეროზით დაავადებულთა დაზიანების უბნებში აღინიშნება მისი აპრეგულაცია. გარდა ამისა, დადასტურდა, რომ TLR2-ს ახასიათებს ჰიალურონის მჟავას რეცეპტორის მსგავსი თვისებები, რაც ვლინდებაოლიგოდენდროციტების პროგენიტორული უჯრედების (OPC-oligodendrocyte progenitor cells)-ის მომწიფებისა და რემიელინიზაციის პროცესებზე რეპრესიულ მოქმედებაში. გაზრდილიჰიალურონის მჟავას შემცველობა დადასტურებულია, როგორც EAE მოდელის დაზიანებულ უბნებში, ასევე, გაფანტული სკლეროზით დაავადებული პაციენტების სრულად დემიელინიზირებულ უბნებში (Hanafy K. A. et al., 2011). არსებობს თეორიები, რომელთა მიხედვითაც ჰიალურონის მჟავას შეცვლილი სინთეზის პროცესი, მისი ნაწილობრივი დეგრადაცია, ან ოლიგოდენდროციტებზე TLR2-ის სტიმულაცია, ის ძირითადი ფაქტორებია, რომლებიც განაპირობებენ რემიელინიზაციის პროცესების ბლოკადას (Hanafy K. A. et al., 2011; Back S. A. et al., 2005). მეორეს მხრივ, არსებობს მონაცემები, რომ TLR3-ის სტიმულაცია წარმოქმნის ნეიროპროტექტორულ პასუხებს

ასტროციტებში, განაპირობებს ნეირონული წინამორბედი უჯრედებისა და აქსონის ზრდას (Wolf N.A. et al., 2007). TLR7 კი ცნობილია მისი პათოგენური როლითაუტოიმუნურ დაავადებებში, რადგან ასტიმულირებს B ლიმფოციტების მომწიფებასა და იმუნოგლობულინების წარმომქმნელ უჯრედებად დიფერენციაციის პროცესს (Giacomini E. et al., 2013).

ზემოთ მოყვანილი ფაქტების მიხედვით შეიძლება ითქვას, რომ TLR შესაძლოა წარმოადგენდეს ერთ-ერთ ყველაზე მნიშვნელოვან ფაქტორს ცნს-ის დაავადებების ანთებითი პროცესების ჩამოყალიბებაში და საჭიროა დამატებით კვლევები ცნს-ში მისი კონკრეტული ფუნქციების შესასწავლად.

მაკროფაგების კლასიფიკაციის კიდევ ერთი პოპულარული მოდელი გულისხმობს მათ დაყოფას M1 და M2 მაკროფაგებად, რომელშიც იდენტიფიცირებულია შესაბამისი ქვეჯგუფებიც.

M1a მაკროფაგები, რომლებიც შეესაბამებიან კლასიკურად აქტივირებადი მაკროფაგების ჯგუფს, წარმოიქმნებიან IFN-γ-სა (რომელიც ძირითადად წარმოიქმნება Th1 უჯრედების, CD8+ ციტოტოქსიკური ლიმფოციტების, NK უჯრედებისა და ანტიგენ-წარმდგენი უჯრედებისგან) და მიკრობებისგან წარმოქმნილი ისეთი პროდუქტების კომბინაციით, როგორიცაა LPS (Lipopolysaccharide - ლიპოპოლისაქარიდი, გრამ-უარყოფითი ბაქტერიების გარეთა მემბრანის შემადგენელი კომპონენტი, რომლის აღქმაშიც მონაწილეობს TLR4-ის შემცველი მემბრანული რეცეპტორული კომპლექსი) (Adams D. O. 1989). M1a მაკროფაგები ფუნქციურად ხასიათდებიან გაძლიერებული ენდოციტური აქტივობით და უჯრედშიდა პათოგენების განადგურების მაღალი უნარით (Ezekowitz R.A. 1984; Mosser, D. M 1992). აღნიშნული ბაქტერიოციდული აქტივობა მოიცავს ისეთ მექანიზმებს როგორიცაა რკინისა და საკვების შეზღუდვა მიკროორგანიზმებისთვის, ფაგოსომაში მჟავიანობის გაზრდა, თავისუფალი რადიკალებისა და (Gruenheid S. & P 2000; Carlin J. M. 1989) და აზოტის ოქსიდის (NO) წარმოქმნით (MacMicking J. 1997).

რაც შეეხება M1b სახეობას, მას უწოდებენ ბუნებრივად აქტივირებად მაკროფაგებს, რადგან აღნიშნული ფორმა წარმოიქმნება პათოგენური მოლეკულური თანმიმდევრობის მაკროფაგების რეცეპტორებზე (მაგ. TLR) უშუალო მოქმედების

შედეგად. კლასიკურად აქტივირებადი M1a ფორმისგან განსხვავებით M1b-ს არ ახასიათებს გაზრდილი ფაგოციტური აქტივობა (Oneissi F.M. et al. 2008).

ალტერნატიულად აქტივირებადი მაკროფაგები იყოფიან M2a, M2b, M2c და M2d ქვეჯგუფებად და აქტივირდებიან: M2a - IL-4 ან IL-13-ის მოქმედების შედეგად, M2b - LPS და IL-1β–ს მოქმედების შედეგად, M2c - IL-10, TGF-β-სადა გლუკოკორტიკოიდების მოქმედების შედეგად, ხოლო M2d- IL-6, ლეიკემიის დამთრგულველი ფაქტორის და სიმსივნეებისგან წარმოქმნილი ფაქტორების მოქმედების შედეგად.

M2 მაკროფაგების ქვეჯგუფებთან დაკავშირებით საინტერესოა აღინიშნოს, რომ M2a ქვეჯგუფის ანთების საწინააღმდეგო მოქმედების მექანიზმად საკმაოდ დიდი ხნის მანძილზე ითვლებოდა მხოლოდ ანთებითი მედიატორების (IL-1 beta, IL- 6, IL-8, IL-12, TNF alpha, IFN-γ..) დაღმავალი რეგულაცია, თუმცა შემდეგ ნაჩვენებ იქნა, რომ მათგან ხდება ისეთი მნიშვნელოვანი მოლეკულების ექსპრესიის რეგულირება, როგორიცაა MHC-II და beta2 ინტეგრინები (Mantovani A. et al. 2002), ასევე, გარდა ფიბრონექტინ 1-ს და ბეტაIG-H3-სა, რომელიც ხელს უწყობს ფიბროგენეზს (Gratchev A. et al. 2001) M2a უჯრედები წარმოქნიან სისხლის შედედების ფაქტორ XIII-ს და ინსულინის მსგავს ზრდის ფაქტორ 1-ს, რომელიც განაპირობებენ ქსოვილების აღდგენასა და პროლიფერაციას (Torocsik D. et al. 2005). M2b მაკროფაგების შესახებ შეიძლება ითქვას, რომ მათ ახასიათებთ ფუნქციურად M1 უჯრედების შებრუნებული მოქმედება (Anderson C. F 2002). M2c მაკროფაგებს კი ხშირად დეაქტივირებულ მაკროფაგებად მოიხსენიებენ, რადგან ხასიათდებიან ანთებითი ციტოკინების დაღმავალი რეგულაციით, ნარჩენების ალაგების ტენდენციითა და შეხორცების მოსამზადებელი პერიოდის ინიცირებით (Oneissi F.M. et al. 2008). M2d მაკროფაგებსფუნქციურად აიგივებენ სიმსივნესთან ასოცირებულ მაკროფაგებთან (TAMs (tumour-associatedmacrophages)) (Duluc D. 2007).

მიუხედავად იმისა, რომ დღეს საკმაოდ გაზრდილია დაინტერესება მაკროფაგების პოლარიზაციის საკითხის მიმართ, უნდა აღინიშნოს რომ თაგვის მოდელებზე ჩატარებული კვლევების პირდაპირი გადატანა ადამიანის ორგანიზმზე არასასურველი იქნებოდა, რადგან მაგალითად გარკვეული კვლევები აჩვენებს, რომ

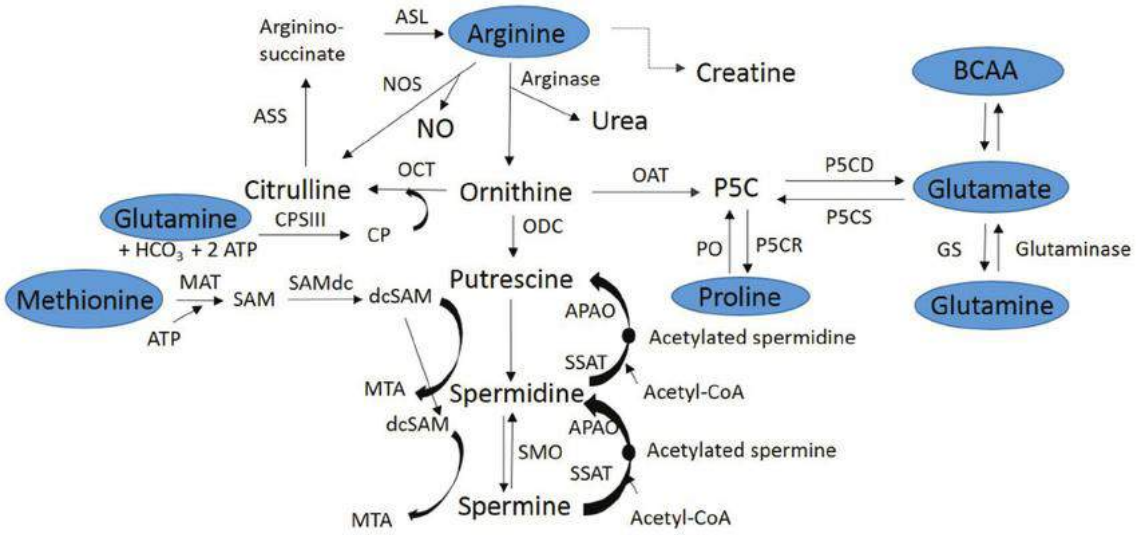
ადამიანის ორგანიზმში არსებულ M2a მაკროფაგებში IL-4/IL-13 მოქმედებით არ წარმოქმნება თაგვის მაკროფაგების ისეთი ალტერნატიული აქტივაციის მარკერების ჰომოლოგები, როგორიცაა არგინაზა 1, Fizz1, MMP-1 და Ym1 (Scotton, C. J. et al. 2005; Mantovani A. et al. 2004), გარდა ამისა, ადამიანის M2a-ში წარმოდგენილია ისეთი გენები (მაგ. თრომბოციტებთან დაკავშრებული ზრდის ფაქტორი C), რომლებიც ალტერნატიული აქტივაციის დროს არ გვხვდება თაგვის მაკროფაგებში (Oneissi F.M. et al. 2008).

2.2. მაკროფაგების პოლარიზაციის მარკერები

M1 მაკროფაგების კლასიკურ მახასიათებელს წარმოადგენს L-არგინინიდან აზოტის ოქსიდის (NO) წარმოქმნა. აღნიშნული რეაქცია მიმდინარეობს მაკროფაგების მიმართ სპეციფიკური IFN-γ-ს მასტიმულირებელი NO სინთაზას იზოფორმის (**iNOS - ინდუცირებადი აზოტის ოქსიდის სინთაზასა**)-ს მოქმედების შედეგად, რომელიც წარმოადგენს M1 მაკროფაგების კლასიკურ მარკერს (MacMicking J. 1997).

M1 მაკროფაგებისგან განსხვავებით M2 მაკროფაგები არ წარმოქმნიან iNOS-ს, თუმცა ახასიათებთ **არგინაზა-1**-ის მაღალი შემცველობა, რომელიც წარმოადგენს M2 მაკროფაგების მარკერს.

არგინაზა-1 გადახრის მეტაბოლურ გზას ისეთი ზრდის ხელშემწყობი ფაქტორების სინთეზისკენ, როგორიცაა პოლიამინები პუტრესცინი, სპერმიდინი და სპერმინი (Mills C.D. 2012; Mills C.D. et al. 2000). გარდა აღნიშნული პოლიამინებისა, მოცემულ მეტაბოლურ გზაში წარმოიქმნება ამინომჟავები პროლინი და გლუტამატი რაც ხელს უწყობს კოლაგენის ფორმირებასა და შესაბამისად ქსოვილების აღდგენის პროცესს (Morris S.M 2007; Gotoh T. et al. 1996). (სურ. 4 - Research Gate uploaded by Synne Marte Andersen).



სურათი 4. არგინინის მეტაბოლიზმი ძუძუმწოვრებში და კავშირი პროლინისა და გლუტამატის წარმოქმნასთან. არგინინისგან არგინაზას მოქმედების შედეგად წარმოიქმნება ორნიტინი, რომელიც შეიძლება გარდაიქმნას პოლიამინებად (პუტრესინი, სპერმიდინი და სპერმინი) ან ჩაერთოს პროლინისა და გლუტამატის სინთეზში.NO – აზოტის ოქსიდი, NOS – NO სინთაზა, OCT - ორნიტინ არბამოილ ტრანსფერაზა, ASS – არგინინოსუქცინატ სინთაზა, ASL – არგინინოსუქცინატ ლიაზა, OAT – ორნიტინამინოტრანსფერაზა, P5C – პიროლინ-5-კარბოქსილატი, P5CR – P5C რედუქტაზა, P5CS – P5C სინთაზა, P5CD – P5C დეჰიდროგენაზა, PO – პროლინ ოქსიდაზა, CP – კარბამოილ ფოსფატი, CPSIII – CP სინთაზა III, ODC – ორნიტინ დეკარბოქსილაზა, MTA – 5'მეთილთიოადენოზინი, MAT – მეთიონინ ადენოზინ ტრანსფერაზა, SAM – S-ადენოზილმეთიონინი, SAMdc – SAM დეკარბოქსილაზა, dcSAM – დეკარბოქსილირებული SAM, SAH–S-ადენოზილჰომოცისტეინი, SMO – სპერმინ ოქსიდაზა, SSAT – სპერმიდინ/სპერმინ აცეტილტრანსფერაზა, APAO – აცეტილირებული პოლიამინ ოქსიდაზა.

2.3. მაკროფაგების ციტოკინური პროფილი და ტრანსკრიფციის ფაქტორები

ფიზიოლოგიურ პირობებში მაკროფაგური ფაგოციტოზის პროცესს თან არ სდევს იმუნური მედიატორების გამოთავისუფლება, ან მათი სეკრეცია ხდება მხოლოდ

უმნიშვნელოდ (Kono H. et al. 2008). აღნიშნულის მიზეზს წარმოადგენს ის, რომ ფიზიოლოგიურ ფაგოციტოზში ჩართული რეცეპტორები (ფოსფატიდილსერინის, თრომბოსპონდინის, ინტეგრინები, კომპლემენტის ცილები და scavenger რეცეპტორები) ან არ ატარებენ ციტოკინების გენების ტრანსკრიპციის განმაპირობებელ სიგნალებს, ან პირიქით, წარმოქმნიან მაინჰიბირებელ ციტოკინებსა და სიგნალებს (Mosser D.M. et al. 2008; Erwig L.P. et al. 2007). მეორე მხრივ, ტრავმისა და სტრესის შემდგომი ნეკროზის დროს უჯრედული ნარჩენები მდიდარია ბირთვული ფაქტორებით, როგორიცაა დნმ და სხვა ნუკლეოტიდები, ჰისტონები, მაღალი მობილურობის ჯგუფი-B1 ცილები და ა.შ.), ასევე სითბური შოკის პროტეინებით და უჯრედული პროტეაზების მოქმედების შედეგად წარმოქმნილი უჯრედგარე მატრიქსის კომპონენტებით, რაც განაპირობებს მაკროფაგების მხრიდან ციტოკინებისა და ანთებითი მედიატორების სეკრეციას (Mosser D.M. et al. 2008; Zhang X. et al. 2008).

M1 მაკროფაგები წარმოქმნიან ისეთ ანთებით ციტოკინებს როგორებიცაა IL-1-ბეტა, IL-15, IL-18, TNF-ალფა და IL-12. IL-12 ჰეტეროდიმერია, რომელიც შედგება დაახლოებით 35kDa (p35 ანუ IL-12alpha) და 40kDa (p40 ანუ IL-12beta) ჯაჭვებისგან. შესაბამისად, ზოგიერთ შემთხვევაში, TLR-ის აქტივირების შემდეგ არასაკმარისი რაოდენობით p40-ისწარმოქმნისას, შესაძლებელია IL-12-ის სინთეზის შეზღუდვა (Oneissi F.M. et al. 2008).

M2 მაკროფაგების მოქმედება გამოიხატება IL-12-ის მცირე რაოდენობით წარმოქმნასა და IL-10-ის მაღალი რაოდენობით გამოთავისუფლებაში (Anderson C. F. et al. 2002).

რაც შეეხებაHMGB1 (მაღალი მობილურობის ჯგუფი-B1 ცილებს),როგორც ზემოთ აღვნიშნეთ, მიკროგარემოს სხვა ფაქტორებთან ერთად მათ შეუძლიათ შეასრულონ, როგორც მაკროფაგების ჰომეოსტაზის მოდულატორის როლი (Andersson U et al. 2000), ასევე, სხვადასხვა სტიმულის საპასუხოდ, HMGB1 შესაძლებელია აქტიურად სეკრეტირდებოდეს უჯრედშორის სივრცეში და შეასრულოს ციტოკინის როლიც (Lee SA 2014).

HMGB1 წარმოადგენს მაღალ კონსერვატულ, არა-ჰისტონურ ქრომოსომულ ცილას, რომელსაც აკისრია მრავალფეროვანი როლი უჯრედშიდა და უჯრედგარე

პროცესების წარმართვაში. HMGB1 წარმოდგენილია ბირთვის შიგნით და მონაწილეობს ნუკლეოსომის სტრუქტურის შენარჩუნებასა და გარკვეული გენების ტრანსკრიპციის რეგულირების პროცესში (Thomas JO. 2001). გარდა ამისა, პათოგენების არსებობით, დაზიანებული უჯრედების დეტექციით ან ციტოკინებით აქტივირებული მიელოიდური უჯრედების მხრიდანაც შესაძლებელია HMGB1 სეკრეტირება. უჯერდგარე HMGB1 მიჩნეულია მნიშვნელოვან ანთებით ფაქტორად, რომელიც მონაწილეობს უჯრედების დიფერენციაციაში, მიგრაციაში, სიმსივნეების მეტასტაზირებასა და აუტოიმუნურ დაავადებებში (Harris HE. et al. 2012; Shanshiashvili et al. 2008). ის ააქტიურებს ისეთ პროცესებს, როგორებიცაა პროლიფერაცია, ანთება: TLR4-PI3Kγ-Erk1/2 გზით HMGB1 ხელს უწყობს მაკროფაგების პოლარიზებას ანთებითი (M1) ფენოტიპისკენ (Su Z. et al. 2016), ენერგიის მეტაბოლიზმი და ანგიოგენეზი, ხოლო აინჰიბირებს მასპინძელი ორგანიზმის მხრიდან კიბოს საწინააღმდეგო იმუნური პასუხის ინიცირების პროცესს, რომელსაც სავარაუდოდ საფუძვლად უდევსIL-1/TLR-ის აქტივაცია (Sims GP. et al. 2010). უკანასკნელმა კვლევებმა აჩვენა, რომ HMGB1 ახორციელებს იმუნიტეტის დათრგუნვას მიელოიდური ხაზის უჯრედების მიერIL-10-ის გამოთავისუფლების გზით (Parker KH. et al. 2014).

HMGB1 ცილების წარმოქმნა შეუძლია აქტივირებულ მიკროგლიასაც, რომელსაც აქვს ანთების განვითარების პოტენციალი და შეუძლია ოლიგოდენდროციტებისა და ნეირონების დაზიანება. აღნიშნული ჯგუფის ცილები გამოიყოფა ნერვული უჯრედების აპოპტოზისა და ნეკროზის პროცესების მიმდინარეობისას და მათი დონე ცნს-ში კორელაციაშია ნეიროპათიების აქტიური საიტების არსებობასთან (Bell CW et al. 2006; Andersson A. et al. 2008). აქედან გამომდინარე, სხვადასხვა ნეიროპათოლოგიების დროს HMGB1 ცილების დონის მნიშვნელოვანმა ზრდამ შესაძლოა გამოიწვიოს დადებითი უკუკავშირი, რომელიც ახდენს ანთებითი პასუხის ამპლიფიკაციას და წარმოქმნის ანთებითი პროცესის მეორე ტალღას. ადრეული გლიკაციის საბოლოო პროდუქტის რეცეპტორი, რომელიც აღინიშნება აბრევიატურით - **RAGE (receptor for advanced glycation end-products),** წარმოადგენს HMGB1-სანთებითი აქტივობის ძირითად სამიზნეს მაკროფაგებში (Kokkola R. et al.

2005). აღნიშნული რეცეპტორი ხელს უწყობს მაკროფაგების დიფერენცირებას ანთებით ფენოტიპად ნაწილობრივ NF-κB მექანიზმის ჩართულობით (Jin X. et al. 2015; Liu T. et al. 2017). NF-κB წარმოადგენს სტიმულირებას ტრანსკრიფციის ფაქტორს, რომელსაც აქტივირების შემდეგ შეუძლია თავის მხრივ გააააქტიუროს სხვადასხვა გენები და მოახდინოს ანთების პროცესის რეგულირება. NF-κB გავლენას ახდენს ანთებით პროცესებზე არა მხოლოდ უშუალოდ ანთებითი ციტოკინების, ქემოკინებისა და ადჰეზიის ფაქტორების წარმოქმნით, არამედ არეგულირებს უჯრედების პროლიფერაციას, აპოპტოზს, მორფოგენეზს და დიფერენციაციას.

HMGB1-ს ანთებითი მოქმედების გარდა, არსებობს კვლევები, რომლებიც ადასტურებენ, რომ HMGB1-ს შეუძლია დადებითად იმოქმედოს წინასწარი მოსამზადებელი სტიმულის სახით და განაპირობოს ბაქტერიული ტოქსინების მიმართ ტოლერანტობა (Klune et al., 2008). ზემოთ მოცემულის მიხედვით, შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ცნს-ის დაავადებების პათოფიზიოლოგიაში HMGB1-ის როლის შესახებ არსებული მონაცემები ურთიერთსაწინააღმდეგოა და საჭიროებს დამატებით კვლევას, რათა ნათელი გახდეს ნერვულ უჯრედებზე მისი დამაზიანებელი მოქმედების თუ მოსამზადებელი, დადებითი ეფექტის მექანიზმი.

მაკროფაგების აქტივირების პროცესში სხვა სასიგნალო მოლეკულებთან ერთად მნიშვნელოვანი როლი ენიჭება პეროქსისომების პროლიფერატორით აქტივირებად რეცეპტორს.

2.4. პეროქსისომების პროლიფერატორით აქტივირებადი რეცეპტორი γ (peroxisome proliferator-activatedreceptor γ (PPAR-γ))

ძუძუმწოვრებში PPAR-ის სამი ტიპი არსებობს: PPARα (NR1C1), PPARγ (NR1C3) და PPARδ (NR1C2), რომელსაც ზოგჯერ მოიხსენიებენ როგორც β-ს. ისინი ექსპრესირებულია სხვადასხვა ქსოვილებსა და უჯრედებში, როგორებიცაა ეპითელური, ენდოთელური და იმუნური უჯრედები (Kliewer SA. et al. 1994).

PPAR-ები წარმოადგენენ ტრანსკრიფციულ ფაქტორებს, რომელთაც გადამწყვეტი როლი ენიჭებათ ცხიმოვანი მჟავების ტრანსპორტირებაში, სინთეზში, დამარაგებაში, მობილიზაციაში, აქტივაციასა და დაჟანგვაში. თუმცა, უკანასკნელი წლების მანძილზეაქტიურად შეისწავლება PPAR-ების როლი მაკროფაგების აქტივაციასა და ანთებითი პროცესების დათრგუნვაში. როგორც ზემოთ აღვნიშნეთ, IL-4 და/ან IL-13 გადახრის მაკროფაგების პოლარიზაციას ანთების საწინააღმდეგო ფენოტიპისკენ. აღნიშნული მოქმედების მექანიზმი მდგომარეობს შემდეგში: IL-4 და/ან IL-13 თავიანთ რეცეპტორებთან (IL-4Rα/IL-2Rγc ან IL-13Rα1/IL-4Rα) დაკავშრების შემდეგ წარმოქმნიან ციტოზოლურ სასიგნალო კასკადს, რომელიც სრულდება ტრანსკრიფციის ფაქტორი STAT6-ის თიროზინის ფოსფორილირებით. ფოსფორილირებული STAT6 დიმერიზაციას განიცდის და გადაინაცვლებს ბირთვისკენ, სადაც ის ახდენს სამიზნე გენების ექსპრესიას. სამიზნე გენები მოიცავს მაკროფაგების ალტერნატიული აქტივაციის მარკერებსა (Arg1, Chi3l3, Mrc1, Mgl1 და Retnla) და ანთების საწინააღმდეგო ფენოტიპის ხანგრძლივი შენარჩუნებისთვის საჭირო რეგულატორებს (Pparγ, Pparδდა PGC-1β). ანთების საწინააღმდეგო მაკროფაგების ფენოტიპის შენარჩუნება განპირობებულია იმით, რომ Pparγ და კოაქტივატორი პროტეინი PGC-1β გადახრიან ენერგეტიკულ მეტაბოლურ პროცესებს ჟანგვითი ფოსფორილირებისკენ, მაშინ როდესაც კლასიკურად აქტივირებადი მაკროფაგებისთვის წამყვანი მეტაბოლოური პროცესი ანაერობული გლიკოლიზია (Chawla A. 2010). გარდა მეტაბოლური ცვლილებების გზით მაკროფაგების ანთების საწინააღმდეგო ფენოტიპად პოლარიზებისა, PParγ ასევე მონაწილეობს ანთებითი გენების უშუალო დათრგუნვაში. მოსვენებულმდგომარეობაში მაკროფაგებში ანთებითი გენები (NF-κB და AP1) დათრგუნულია NCoR (nuclear receptor corepressor) და SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors) კომპლექსებისგან. შესაბამისად, ანთების პროვოცირებისთვის საჭიროა ორი საფეხურის განხორციელება: ანთებითი გენების დამთრგუნველი კომპლექსების ჩამოშორება და სიგნალის სპეციფიკურობის მიხედვით ტრანსკრიპციული აქტივატორების მოქმედება. აღმოჩნდა, რომ Pparγ აინჰიბირებს NCoR / SMRT ანთებითი გენებისგან ჩამოშორების პროცესს (Pascual G. et al. 2005). აღნიშნული ორი მექანიზმის მიხედვით

შეიძლება ითქვას, რომ Pparγ-ის შესწავლა წარმოადგენს მნიშვნელოვან ფაქტორს ანთებისა და მაკროფაგების პოლარიზაციის კვლევის კუთხით.

2.5. გალექტინ-3 (Gal-3)

გალექტინ-3 (Gal-3) მაკროფაგების პოლარიზაციის კიდევ ერთ მარკერს.წარმოადგენს გალექტინები წარმოადგენენ ევოლუციურად შენახული ცილების ჯგუფს, რომლებიც გვხვდება ხერხემლიანებსა და სოკოებში (Vasta G. R. et al. 1999). მათ ახასიათებთ ნახშირწყლების ამომცნობი დომენის (CRD - Carbohydrate Recognition Domain) არსებობა, რომელიც შედგება 130 ამინომჟავური თანმიმდევრობისგან და რომელსაც აქვს უნარი დაიკავშიროს β-გალაქტოზიდი (Vasta G. R. 2012). დღესდღეობით ძუძმწოვრებში ნანახი 15 ტიპის გალექტინი შეიძლება სტრუქტურულად დაიყოს სამ ჯგუფად: პროტოტიპული გალექტინები, რომლებსაც აქვთ ერთი CRD (გალექტინ 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 და 15), ტანდემური გალექტინები, რომლებსაც ახასიათებთ ორი ჰომოლოგიური CRD (გალექტინ 4, 6, 8, 9 და 12) და ქიმერული გალექტინი, რომელსაც ჰყავს ჯგუფის მხოლოდ ერთ წარმომადგენელი გალექტინ-3 და რომელიც ხასიათდება არა მხოლოდ C ტერმინალზე არსებული CRD დომენით, არამედ მოცულობითი N ტერმინალითაც, რომლებიც ქმნიან ცილასთან დამაკავშრებელ დომენს (Nio-Kobayashi J. 2017).

Gal-3 ორგანიზმში ფართოდაა გავრცელებული და გვხვდება ისეთ ქსოვილებში, როგორებიცაა საჭმლის მომნელებელი სისტემა, უროგენიტალური ტრაქტი, ფილტვები, სისხლი, თირკმელები და გული. Gal-3 მაღალი ექსპრესიით ხასითდებიან მიელოიდური უჯრედები (მონოციტები, მაკროფაგები, დენდრიტული უჯრედები, ნეიტროფილები და ა.შ.), ფიბრობლასტები, ეპითელიური და ენდოთელური უჯრედები. უჯრედულ დონეზე კი Gal-3 გვხვდება როგორც ციტოპლაზმაში და ბირთვში, ასევე, მემბრანებში. გარდა ამისა, Gal-3 შესაძლოა სეკრეტირდეს უჯრედგარე სივრცეში სხვადასხვა სტიმულის (მაგ. LPS, IFN-γ) საპასუხოდ (Fritsch K. et al.2016; Kang H. G. et al. 2016). Gal-3-ის უჯრედგარე სეკრეტირებას შესაძლოა

ადგილი ჰქონდეს როგორც ფიზიოლოგიურ ასევე პათოლოგიურ მდგომარეობაში. შესაბამისად, Gal-3 შესაძლოა პასიურად გამოათავისუფლოს დაზიანებულმა უჯრედმა სიკვდილისას ან, ადგილი ჰქონდეს მის აქტიურ გამოთავისუფლებას აქტივირებული უჯრედებიდან. უჯრედგარე სივრცეში გამოთავისუფლებულმა Gal-3-მა შესაძლოა შეასრულოს რამდენიმე ფუნქცია, როგორებიცაა: ნიმუშის ამომცნობი რეცეპტორული (PRR - Pattern-recognition receptor) ფუნქცია, თანდაყოლილი იმუნიტეტის იმუნური უჯრედების გამააქტივებელ-რეგულატორული ფუნქცია და დაზიანებასთან ასოცირებული მოლეკულური ნიმუშები (DAMP - Damage-associated molecular pattern) ფუნქცია (Sato S. et al. 2009).

Gal-3 ორგანიზმში მონაწილეობს ისეთი ფუნქციების შესრულებაში როგორებიცაა: უჯრედების ზრდის, დიფერენცირების, აპოპტოზის, მათი მიგრაციისა და, ასევე, საინფორმაციო რნმ-სპლაისინგის რეგულაცია (Dumic J. et al. 2006). უჯრედგარე (მემბრანასთან ასოცირებული ან თავისუფალი) Gal-3 მონაწილეობს პათოგენთან დაკავშირებული იმუნური პასუხების ჩამოყალიბებასა და მწვავე და ქრონიკულ ანთებით პროცესში. უკანასკნელმა კვლევებმა აჩვენა, რომ Gal-3 შესაძლებელია ფუნქციონირებდეს როგორც პათოგენთან ასოცირებული მოლეკულური თანმიმდევრობის ამომცნობი და უშუალოდ იმოქმედოს პროცესების მიმდინარეობაზე პათოგენთან დაკავშირების გზით. მაგალითად, ბაქტერიულ LPS-თან Gal-3-ის დაკავშირება შესაძლოა ახდენდეს LPS-ით გამოწვეული ანთების დაღმა რეგულაციას, რადგან გარკვეული კვლევების მიხედვით Gal-3 დეფიციტური მაკროფაგები LPS-ით სტიმულირების შემდეგ ავლენდნენ ანთებით ციტოკინების გაზრდილი სეკრეციის უნარს. გარდა ამისა, *in vitro* კვლევების მონაცემებით TLR2/1-ის ლიგანდებით სტიმულირებული მონოციტები ავლენენ ანთების საწინააღმდეგო IL-10-ის სეკრეციის გაზრდილ შესაძლებლობას. გარდა უშუალოდ პათოგენთან ასოცირებისა, იმუნური სისტემის საპასუხო რეაქციებში Gal-3-ის როლი განისაზღვრება იმუნური სისტემის უჯრედთა ფუნქციების მოდულირებით. აღნიშნული შესაძლოა განხორციელდეს უჯრედგარე Gal-3-ის მემბრანულ რეცეპტორებთან დაკავშირების გზით, ან უჯრედშიდა Gal-3-ის მიერ უჯრედშიდა ცილების აქტივობის მოდულირების საშუალებით. ასევე ნანახია ისიც, რომ Gal-3

ექსპრესირდება ადამიანის მონოციტების ზედაპირზე და მისი ექსპრესიის დონე იზრდება მონოციტების მაკროფაგებად დიფერენცირების პროცესში (Díaz-Alvarez L. et al. 2017).

განსაკუთრებით საინტერესოა Gal-3-ის როლი მაკროფაგების პოლარიზაციაში. თაგვებში Gal-3-ის დეფიციტისას ნაჩვენებია, რომ IL-4-ით სტიმულაციის საპასუხოდ მაკროფაგები ნაკლებად განიცდიდნენ M2 ფენოტიპისკენ პოლარიზაციას. თავის მხრივ, IL-4-ით სტიმულაცია ზრდის Gal-3-ის ექსპრესიასა და სეკრეციას, რაც უფრო მეტად ადასტურებს მაკროფაგების M2 ფენოტიპად პოლარიზაციის პროცესში Gal-3-ის მნიშვნელოვან როლს (MacKinnon A. C. et al. 2008).

თავი 3 გლუტამატი და გლუტამატის რეცეპტორები

3.1. გლუტამატის რეცეპტორების დახასიათება

ბოლო ათწლეულების მანძლზე კვლევათა დიდი უმრავლესობის მიხედვით ნაჩვენებია, რომ გლუტამატი წარმოადგენს ძირითად აგმზნებ ნეიროტრანსმიტერს თავის ტვინში, სადაც სინაპსების 40 %-ს ახასიათებს გლუტამატის მიმართ აფინურობა (Fairman WA. et al. 1999). თუმცა, გლუტამატს ასევე ახასიათბს ნეიროტოქსიკურობა, რომელმაც შესაძლოა გამოიწვიოს ნეირონების სიკვდილი. ნერვული დაბოლოებებიდან გამოთავისუფლებული გლუტამატი მონაწილეობს სასიგნალო მექანიზმებში სხვადასხვა ტიპის გლუტამატის რეცეპტორებთან დაკავშრების გზით, რის შემდეგაც უნდა მოხდეს გლუტამატის შთანთქმა სინაპსებიდან (Kanai Y et al.. 2003). უჯრედგარე გლუტამატის ჭარბად დაგროვება და მისი იონოტროპული რეცეპტორების ჭარბი სტიმულირება, ზრდის აზოტისა და ჟანგბადის რეაქტიული სახეობების გამოთავისუფლებას, რასაც საბოლოოდ მივყავართ ოქსიდაციურ სტრესამდე და ნერვული უჯრედების სიკვდილამდე (Ganel

R. et al. 1999). გლუტამატის გაზრდილი კონცენტრაცია ასოცირდება ისეთ დაავადებების განვითარებასთან, როგორებიცაა: ეპილეფსია, ინფარქტი და ნეიროდეგენერაციული დაავადებები (Kim K. et al. 2011). შესაბამისად, გლუტამატის რეცეპტორებთან ერთად ძალიან მნიშვნელოვანია განხილულ იქნას გლუტამატის ტრანსპორტერები, რომელთა საშუალებითაც ხდება გლუტამატის შთანთქმა და მისი ფიზიოლოგიური კონცენტრაციის შენარჩუნება.

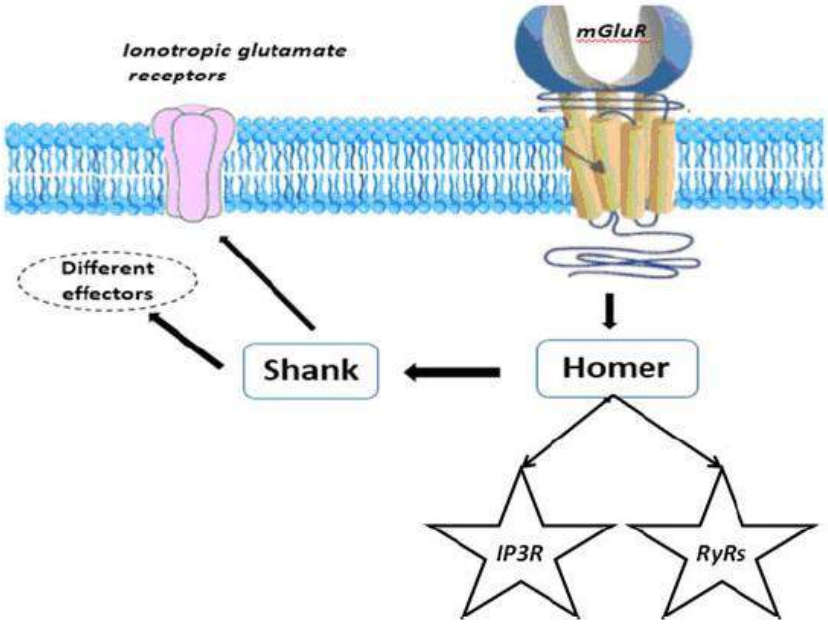
გლუტამატის რეცეპტორები (GluRs) ძუძუმწოვრების ორგანიზმის ცნს-ში ერთ-ერთ ყველაზე მთავარ რეცეპტორების ჯგუფადაა მიჩნეული. ცნს-ში ისინი მონაწილეობენ ამგზნებ ნეიროტრანსმისიაში, სინაპსური გადაცემის პლასტიურ ცვლილებებში (რაც მონაწილეობას ღებულობს მეხსიერებასა და დასწავლის პროცესებში) და ასევე ნერვული უჯრედების აგზნებით სიკვდილში, რასაც ადგილი აქვს გარკვეული მწვავე და ქრონიკული ნევროლოგიური დაავადებების დროს (Seiji O. et al. 1998; Mayer M.L. et al. 1987).

გლუტამატის რეცეპტორები იყოფა ორ ძირითად ჯგუფად: 1. იონოტროპული (iGluR), რომელსაც მიეკუთვნება ისეთი იონური არხულირეცეპტორები როგორიცაა AMPA და NMDA და 2. მეტაბოტროპული რეცეპტორები (mGluR), რომლებიც შეწყვილებულია გტფ-დაკავშირებულ ცილებთან (G-proteins) და რომლებიც არეგულირებენ უჯრედშდა მესენჯერების წარმოქმნას Seiji O. et al. 1998). iGluR წარმოადგენს მულტისუბერთეულოვან იონურ არხებს, რომლებიც მონაწილეობენ სწრაფი სინაპსური პასუხების გადაცემაში, ხოლო mGluR განაპირობებს ნელ სინაპსურ გადაცემას მეორადი მესენჯერების უჯრედშიდა სეკრეციის გზით (Ferraguti F. et al. 2006; Hollmann, M. et al. 1994).

mGluR-ები მიეკუთვნებიან G ცილასთან შეწყვილებული რეცეპტორების (GPCRs) C კლასს და GPCR ჯგუფის ტიპიური ნეიროტრანსმიტერი რეცეპტორების კლასი A-სგან განსხვავდებიან იმით, რომ ახასიათებთ დიდი ზომის უჯრედგარე N-ტერმინალური დომეინი (VFD -Venus Flytrap Domain), რომლის ორი სუბერთეულიც მათი შეერთების ადგილას ქმნის ლიგანდის დამაკავშირებელ საიტს. რეცეპტორის აქტიური კონფორმაცია იქმნება მაშინ, როდესაც მისი აგონისტი (გლუტამატი ან ისეთი კათიონები, როგორიცაა მაგნიუმი და კალციუმი) დაუკავშრდება ერთ (ამ

შემთხვევაში საქმე გვაქვს ღია-დახურულ კონფორმაციასთან) ან ორივე სუბერთეულს (დახურულ-დახურული კონფორმაცია). რაც შეეხება არააქტიურ (ღია-ღია) კონფორმაციას, მისი სტაბილიზება მიიღწევა რეცეპტორის ანტაგონისტებით. კონფორმაციული ცვლილებები, რომელიც შედეგად მოჰყვება ლიგანდის დაკავშრებას, შიდა უჯრედშიდა C დომეინს გადაეცემა ტრანსმემბრანული ამინომჟავა ცისტეინით მდიდარი დომეინის (CRD) მეშვეობით (Niswender M.C. et al. 2010). ვინაიდან mGluR-ების ოჯახი არ ავლენს თანმიმდევრობათა ჰომოლოგიას G ცილასთან შწყვილებული რეცეპტორების სხვა ჯგუფებთან და უფრო მეტიც, ახასიათებს უჩვეულოდ დიდი უჯრედგარე დომეინი, რომელშიც ფიქსირდება გარკვეული თანმიმდევრობების ჰომოლოგიურობა პარათიროიდული ჯირკვლის უჯრედგარე Ca^{2+}-სენსიტიურ რეცეპტორთან (Brown E.M. et al. 1993), შემოთავაზებულ იქნა კლასიფიკაციის გზა, სადაც mGluRs და პარათიროიდული ჯირკვლის უჯრედგარე Ca^{2+}-სენსიტიურ რეცეპტორი კლასიფიცირდებიან G ცილასთან გაწყვილებული რეცეპტორების უნიკალურ სუპეროჯახად, რომელიც ხასიათდება მათი ფუნქციისთვის მნიშვნელოვანი 19 ცისტეინის ნაშთისგან შედგენილი ხისტი სამგანზომილებიანი სტრუქტურული ერთეულით (Seiji O. et al. 1998). რეცეპტორების აღნიშნულ ჯგუფში ასევე გვხვდება უჯრედგარე N-ტერმინალური დაბოლოება, რომელიც შეიცავს გლუტამატის დამაკავშრებელ საიტს და მნიშვნელოვან როლს ასრულებს აგონისტების სელექციის კუთხით (Ferraguti F. et al. 2006; O'Hara P.J. et al. 1993; Seiji O. et al. 1998) და უჯრედშიდა დომენი, რომელიც უშუალო ფიზიკურ კონტაქტშია G ცილებთან, რათა დაიწყოს და, სავარაუდოდ, დაარეგულიროს კიდეც სიგნალის ტრანსდუქცია და განსაზღვროს აგონისტის მოქმედების სიძლიერე (Ferraguti F. et al. 2006; Pin J.P. et al. 1994; Seiji O. et al. 1998). შედარებით ახალმა კვლევებმა აჩვენეს, რომ mGluR რეცეპტორები ინტრაუჯრედული დომენით ასევე ამყარებენ ფიზიკურ კონტაქტს ციტოჩონჩხთან, სასიგნალო და სხვა ტიპის ცილებთან, რომლებიც მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ mGluR-ების სწორად ორიენტირებაში სპეციფიკურსუბუჯრედულკომპარტმენტებში, მის ფუნქციურ გადაწყობაში, ეფექტორულ ცილებთან გაწყვილებასა და შიდაუჯრედული სიგნალების მოდულაციაში (Fagni L. et al. 2004). მაგალითად, ზოგიერთი mGluR-ის

ციტოზოლური C ტერმინალი შეიცავს მოტივებს, რომლებსაც შეუძლიათ ერთი მხრივ, დაუკავშირდნენ IP_3 და რიანოდინის რეცეპტორებთან დაკავშრებულ ჰომერულ ცილებს, მეორე მხრივ კი შანკ ცილებს, რომლებიც თავის მხრივ, წარმოქმნიან კავშირებს სხვადასხვა ეფექტორებთან. გლუტამატერგულ სინაპსებთან ზუსტად აღნიშნული სახით ორგანიზდებიან ნახსენები პოსტსინაპსური მოლეკულები ფუნქციურ ერთეულებად (Ferraguti F. et al. 2006; Sheng M. 2001; Tu J.C. et al. 1999; Tsitsilashvili et al. 2018). (სურ. 5).



სურათი 5. mGluR-ის ურთიერთქმედება უჯრედშიდა სასიგნალო მოლეკულებთან.

არსებობს mGluR-ის რვა სახეობა, რომლებიც ერთმანეთისგან განსხვავდებიან უჯრედშიდა C ტერმინალური დაბოლოების სიგრძით, აგონისტების სელექციით, სიგნალების ტრანსდუქციის მექანიზმებით და ცნს-ში განლაგებით (Nakanishi S. 1992; Seiji O. et al. 1998). აღნიშნული mGluR-ების ქვეტიპები, რომლებიც იზიარებენ ამინომჟავური თანმიმდევრობის დაახლოებით 70%-ს და ავლენენ მსგავსებას სიგნალების ტრანსდუქციის მექანიზმებში კლასიფიცირდება სამ ძირითად კლასად: I ჯგუფი (mGluR1 და mGluR5); IIჯგუფი (mGluR2 და mGluR3); და IIIჯგუფი (mGluR4, mGluR6, mGluR7 და mGluR8) (Pin J.P. et al. 1995). I ჯგუფში mGluRs ძირითადად გაწყვილებულია Gq/11 (ანუ G-ცილა, რომელსაც აქვს α_q ან α_{11} სუბერთეული)-თან და ააქტივებს ფოსფოლიპაზა C (PLC)-ს (Loane D.J. et al. 2012), PLCთავის მხრივ

ფოსფატიდილინოზიტოლს გარდაქმნის DAG-ად და IP3-ად, რომელიც ენდოპლაზმური ბადიდან გამოათავისუფლებს Ca^{2+}-ს და იწვევს პროტეინკინაზა C (PKC)-ს აქტივირებასა და შესაბამისი სუბსტრატების ფოსფორილირებას. აღნიშნული ჯგუფის აგონისტია 3,5-დიჰიდროქსიფენილგლიცინი (3,5-DHPG) (Hollmann M. et al. 1994). II ჯგუფი და III ჯგუფი ერთმანეთისგან განსხვავდებიან აგონისტებით, თუმცა ორივე მათგანი გაწყვილებულია Gi/Go-თან. მოქმედების მექანიზმი კი მდგომარეობს Ca^{2+}-კალმოდულინ დამოკიდებული ადენილატციკლაზას დიმერიზაციის ინჰიბირებაში, რასაც მივყავართ აღნიშნული ფერმენტის ინაქტივაციამდე, cAMP რაოდენობის შემცირებამდე და, შესაბამისად, PKA-ს აქტივობის შესუსტებამდე (Loane D.J. et al. 2012).

I ჯგუფის რეცეპტორები ძირითადად განლაგებულია პოსტსინაპსურად და მათი აქტივირების შედეგად აგზნებადობა იზრდება, როდესაც II/III ჯგუფი რეცეპტორების ლოკალიზაცია როგორც წესი პრესინაპსურია და მათი აქტივირებით ხდება გლუტამატის გამოთავისუფლება და აგზნებადობის შემცირება (Loane D.J. et al. 2012). მიუხედავად იმისა, რომ გლუტამატის რეცეპტორების ძირითად ფუნქციად ცნობილია უჯრედგარე სიგნალების გარდაქმნა უჯრედშიდა პასუხებად, გლუტამატის ზოგიერთი რეცეპტორი გვხვდება ისეთ უჯრედშიდა ორგანელებზე, როგორიცაა ბირთვის შიდა და გარე მემბრანა და ენდოპლაზმური ბადე, სადაც ისინი მონაწილეობენ, როგორც გადამკვეთ, ასევე ინდივიდუალურ სასიგნალო გზებში. მაგალითად ნაჩვენებია, რომ იზოლირებულ ბირთვს შეუძლია უპასუხოს ბირთვული mGluR5-ის უშუალო აქტივაციას Ca^{2+} დამოკიდებული საპასუხო სიგნალებით და აღნიშნული სიგნალების ინჰიბირება შესაძლებელია mGluR 5 რეცეპტორების ისეთი ანტაგონისტებით, როგორიცაა 2-მეთლ-6-ფენილეთინილ-პირიდინი (MPEP). უფრო მეტიც, ნეირონებში ენდოპლაზმური ბადის mGluR5-ის აქტივაციით მიიღწევა ისეთი ფერმენტებისა და ტრანსკრიპციის ფაქტორების აქტივაცია, როგორებიცაა c jun N - ტერმინალური კინაზა (JNK), კალციუმ/კალმოდულინ დამოკიდებული პროტეინ კინაზა IV (CaMK IV) და ტრანსკრიპციის ფაქტორი CREB. თუმცა, უნდა აღინიშნოს, რომ უჯრედშიდა რეცეპტორების არსებობა ნაჩვენებია მხოლოდ ჯგუფი I mGluR-ებისთვის, ხოლო II ჯგუფი და III ჯგუფი გლუტამატური რეცეპტორები ნანახია

ძირითადად პლაზმურ მემბრანაზე. მიუხედავად აღნიშნული შესაძლებლობებისა, ვინაიდან მეტაბოტროპული გლუტამატის რეცეპტორების მთავარი აგონისტი გლუტამატი დამუხტული მოლეკულაა, უჯრედშიდა საპასუხო სიგნალების წარმოსაქმნელად მთავარ გამოწვევად რჩება გლუტამატის ტრანსპორტირება როგორც პლაზმური მემბრანის, ისე უჯრედის ორგანოიდების მემბრანების გავლით, რისთვისაც არებობს რამდენიმე სპეციფიკური სატრანსპორტო სისტემა. მაგ. ნეირონებში ნაჩვენებია რომ I ჯგუფის რეცეპტორებზე მოქმედების შემდეგ გლუტამატის ტრანსპორტირებისთვის არსებობს ორი სატრანსპორტო სისტემა ნატრიუმ დამოკიდებული აღმგზნები ამინო მჟავური ტრანსპორტერები და ცისტინ/გლუტამატის მიმოცვლის სატრანსპორტო სისტემა (Jong Y.J. et al 2014; O'Malley K.L. et al. 2003).

mGluR-ების ორგანიზმში განაწილება შეიძლება შეჯამებულ იქნას შემდეგი სახით: mGluR1, mGluR3, mGluR5 და mGluR7 გვხვდება თავის ტვინის ყველა რეგიონში, ხოლო mGluR2, mGluR4, mGluR8-ის გავრცელება შეზღუდულია თავის ტვინის გარკვეულ რეგიონებში. რაც შეეხება mGluR6-ს, იგი მიჩნეულია სპეციფიკურ რეცეპტორად, რადგან ნანახია არა თავის ან ზურგის ტვინის არეში, არამედ ბადურაზე (Ferraguti F. et al. 2006; Nakajima Y. et al 1993). მიუხედავად იმისა,რომ გლუტამატის რეცეპტორები ძირითადად შესწავლილია ნერვული უჯრედების ფუნქციასა და პათოფიზიოლოგიაში, ასევე საყურადღებოა მათი მონაწილეობანეიროგლიის (ასტროციტები, მიკროგლია და ოლიგოდენდროციტები) მეტაბოლიზმში. განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია გლუტამატის რეცეპტორების ფუნქციის აქტიური შესწავლა ნეიროდეგენერაციულ დაავადებებში, რადგან აღნიშნული პათოლოგიებისას mGluR-ის როლი კომპლექსური და ორსახოვანია იმაზე დამოკიდებულად, თუ კონკრეტულად გლუტამატის რეცეპტორების რომელ სახეობაზე ვსაუბრობთ (Loane D.J. et al. 2012).

ასტროციტები ცნობილია იმით, რომ ახდნენ სხვადასხვა ტიპის mGluR-ების ექსპრესირებას, თუმცა *in vivo* და *in vitro* კვლევებით ნაჩვენებია მათში mGluR5-ის ყველაზე მაღალი შემცველობა (Romano C. et al. 1995). ასევე ნანახია ისიც, რომ ასტროციტებში mGluR5-ის ექსპრესია მცირდება უჯრედების განვითარებისას (Cai Z.

et al. 2000) ხოლო იზრდება ისეთი პათოლოგიების დროს, როგორებიცაა გაფანტული სკლეროზი (MS) (Geurts J.J. et al. 2003) და ამიოტროპული ლატერალური სკლეროზი (ALS). დაავადებული პაციენტების ზურგის ტვინის ნიმუშებში ასტროციტების ნაწილი ასევე შეიცავს mGluR1-ს (Aronica E. et al. 2001). რაც შეეხება II ჯგუფი გლუტამატის რეცეპტორებს, *in vivo* და *in vitro* კვლევებით მათგან ასტროციტებში ნანახია მხოლოდ mGluR3 (Mudo G. et al. 2007; Ohishi H. et al 1998; Petralia R.S. et al. 1996). III ჯგუფი mGluR-ების ასტროციტებში გავრცელების შესახებ ჯერ-ჯერობით არ არსებობს დასაბუთებული მონაცემები, რადგან სხვადასხვა კვლევებით ნაჩვენებია მკვეთრად განსხვავებული მონაცემები (Loane D.J. et al. 2012). თუმცა საინტერესოა ერთ-ერთი კვლევის მონაცემი, რომლის მიხედვითაც კულტივირებულ ასტროციტებში ანთებით ციტოკინების ზემოქმედების შედეგად mGluR4-ის აქტივაციამ გამოიწვია გაფანტული სკლეროზის პათოფიზიოლოგიაში მონაწილე ერთ-ერთი ძირითადი ქემოკინის, RANTES, პროდუქციის შემცირება (Besong G. et al. 2002).

ნაჩვენებია, რომ *მიკროგლია/მაკროფაგები ახდენს* mGluR-ების გარკვეული სახეობების (განსაკუთრებით კი mGluR5-ის) საინფორმაციო რნმ-ისა და თავად ცილის ექსპრესიას. მიკროგლიაში ექსპრესირებული mGluR-ების ძირითად მახასიათებელს წარმოადგენს ის, რომ მათი ექსპრესია კორელაციაშია ცნს-ის დაზიანებასთან. გაფანტული სკლეროზით დაავადებული პაციენტების მიკროგლიაში/მაკროფაგებში ნანახია mGluR2/3, mGluR1αდა mGluR8, მაგრამ არა mGluR4 (Geurts J.J. et al. 2005; Geurts J.J. et al. 2003). mGluR8-ის ექსპრესია განსაკუთრებით შესამჩნევია აქტიური დემიელინიზაციის უბნებში (Loane D.J. et al. 2012). უცნაურია ის ფაქტი, რომ არსებობს მონაცემებიIII ჯგუფი გლუტამატის რეცეპტორების ნეიროპროტექტორული როლის შესახებაც (Pinteaux-Jones F. et al. 2008). თუ გავითვალისწინებთ იმ ფაქტს, რომ გაფანტული სკლეროზით დაავადებული პაციენტების დაზიანებულ უბნებში მიკროგლია/მაკროფაგები რომლებიც ავლენენ სისხლის მაკროფაგების მსგავს ამებოიდურ მორფოლოგიას (აღნიშნულ მორფოლოგიურ მდგომარეობას მიკროგლია იძენს აქტივირების შემდეგ) ახდენენ mGluR8-ის ექსპრესიას, უნდა ვივარაუდოთ რომ III ჯგუფი გლუტამატის

რეცეპტორების როლის შესწავლაც მნიშვნელოვანი საკითხია გაფანტული სკლეროზით დაავადებული პაციენტების მკურნალობაში (Davalos D. et al. 2005; Geurts J.J. et al. 2005; Nimmerjahn A. et al. 2005).

რაც შეეხება ოლიგოდენდროციტებს, აღნიშნულ უჯრედებში კონკრეტული გლუტამატის რეცეპტორების გავრცელების შესახებ არ არსებობს სრულყოფილი *in vivo* და *in vitro* კვლევების მონაცემები, მაინც ნაჩვენებია ის ფაქტი, რომ ოლიგოდენდროციტების განვითარებაში mGluR-ებს ერთ-ერთი წამყვანი როლი აკისრიათ (Deng W. et al 2004; Loane D.J. et al. 2012; Tamaru Y. et al. 2001).

მიუხედავად იმისა, რომ mGluR-ების გავრცელების ძირითადი დამახასიათებელი ლოკაცია ნერვული სისტემაა, ბოლო დროინდელი კვლევების დიდი ნაწილი ხაზს უსვამს აღნიშნული რეცეპტორების (როგორც საინფორმაციო რნმ-ის ასევე თავად ცილის) სხვა ქსოვილებში გავრცელების ფიზიოლოგიურ და პათოლოგიურ როლს (Ferraguti F. et al. 2006). mGluR-ები ნანახია ადამიანისა და მღრღნელების T უჯრედებში (Chiocchetti A. et al. 2006), ხოლო მაკროფაგებში ნაჩვენებია გლუტამატის ტრანსპორტერების შემცველობა, რომელთაც გარკვეული სტიმულების საპასუხოდ შეუძლიათ L-გლუტამატის მაღალი კონცენტრაციების შთანთქმა (Rimanol A.C. et al. 2000).

გლუტამატის რეცეპტორები მნიშვნელოვან ფუნქციას ასრულებენ ნერვული უჯრედების თვითშენარჩუნებისა და თვითაღდგენის პროცესებში (Byrnes K.R. et al. 2009). I ჯგუფი გლუტამატის რეცეპტორებიდან mGluR1-ის აქტივაცია ავლენს ნეიროტოქსიურ ეფექტს ნერვული უჯრედების სიკვდილის (განსაკუთრებით კი ნეკროზული სიკვდილის) დაჩქარების გზით (Allen J.W. et al. 2000), რაც შეეხება mGluR5-ს, როგორც ჩანს, იგი ხასიათდება ნეიროპროტექტორული მოქმედებით, რომელიც ვლინდება კასპაზა დამოკიდებული ნეირონული აპოპტოზის დათრგუნვის გზით (Movsesyan V.A. et al. 2004). მიუხედავად იმისა, რომ ნაჩვენებია mGluR5-ის გარკვეული ანტაგონისტების ნეიროპროტექტორული როლი, ფიქრობენ რომ აღნიშნული ანტაგონისტები ნეიროპროტექტორულ ფუნქციას ავლენენ mGluR5-ზე მოქმედებისგან დამოუკიდებელი მექანიზმებით (Lea P.Mt. et al. 2005). გარდა ამისა,

ნაჩვენებია ისიც, რომ mGluR5-ს გარკვეული ტიპის უჯრედებში შეუძლია ონკოგენის როლის შესრულებაც (Teh JL. et al. 2012).

გლუტამატსა და მის რეცეპტორებს განსაკუთრებით მნიშვნელოვანი როლი ენიჭებათ ანთებითი პროცესების პათოფიზიოლოგიაში. ანთებითი პროცესების მიმდინარეობისას იმუნური უჯრედები გამოათავისუფლებენ ამინომჟავა გლუტამატს, რომელიც ხელს უწყობს ქემოტაქსისს და არეგულირებს ენდოთელიუმის ბარიერულ ფუნქციას (Gupta R. et al. 2009; Piani D. et al. 1991). უჯრედგარე გლუტამატი განაპირობებს იმუნური უჯრედების მიგრაციას, მიკროგლია/მაკროფაგებში ექსპრესირებულ mGluR5-ზე მოქმედების გზით (Loane D.J. et al. 2012; Byrnes KR. et al. 2009; Chiocchetti A. et al. 2006). აღნიშნულ უჯრედებში სელექციური აგონისტებით mGluR5-ის აქტივაცია საგრძნობლად ამცირებს აზოტის მონოქსიდის სინთეზს (Byrnes KR. et al. 2009) და ზრდის ანთების საწინააღმდეგო IL-10-ის პროდუქციას (Werry EL. et al. 2011), რაც მიუთითებს იმაზე, რომ გლუტამატი და მისი mGluR5 შესაძლოა ჩართული იყოს მაკროფაგების იმუნიტეტის დამთრგუნველ ფენოტიპად პოლარიზაციის პროცესში. გარდა ამისა უჯრედშიდა გლუტამატის მაღალ კონცენტრაციას შეუძლია მნიშვნელოვნადშეცვალოს უჯრედის ჟანგვითი სტატუსი გლუტათიონის სინთეზის გზით, რადგან გლუტათიონი გლუტამატის, ცისტეინის და გლიცინის შემცველი ტრიპეპტიდია, რომელიც ძლიერი ანტიოქსიდანტის როლს ასრულებს ორგანიმში. გლუტამატის უჯრედშიდა კონცენტრაციის მატება ასევეარეგულირებს უჯრედის მეტაბოლიზმა გლუტამატ/გლუტამინის ერთმანეთში გარდაქმნის გზით, რადგან აღნიშნული მოდელი მნიშვნელოვან როლს ასრულებს კრებსის ციკლის რეგულაციაში (Jha AK. et al. 2015).

საინტერესოა, რომ მაკროფაგების პოლარიზაცია სიმსივნურ მაკროფაგებად (TAM - Tumor-associated macrophages), მოიცავს ზემოთ აღწერილი ცვლილებების მსგავს გარდაქმნებს (Fraternale A. et al. 2015). ნაჩვენებია ისიც, რომ პლაზმასა და სისხლის შრატში გლუტამატის კონცენტრაციის ზრდა კორელაციაშია იმუნიტეტის დეფიციტთან, ხოლო შემცირება - იმუნური სისტემის ჰიპერ-რეაქტიულობასთან (Xue H. et al. 2011).

3.2. გლუტამატის ტრანსპორტერები

არსებობს გლუტამატის ტრანსპორტირების რამდენიმე სისტემა. მათ შორისაა **ნატრიუმ დამოკიდებულიამაგზნებელიამინმომჟავების ტრანსპორტერები (EAAT - Excitatory amino acid transporters)** და**ნატრიუმ დამოუკიდებელი ცისტინ/გლუტამატ ანტიპორტერი (სისტემა xc- ან xCT)**.

EAAT წარმოადგენს მემბრანასთან დაკავშირებულ ტუმბოს, რომელიც სტრუქტურულად ძალიან წააგავს იონურ არხებს. მათი ძირითადი ფუნქციაა შეინარჩნონ გლუტამატის მცირე უჯრედგარე კონცენტრაცია, რომელიც არ იქნება საფრთხის შემცველი უჯრედების მიმართ ტოქსიკურობის კუთხით. აქსონური პოტენციალის მოქმედების შედეგად გამოთავისუფლებული გლუტამატი შთაინთქმება გლუტამატის ტრანსპორტერების მხრიდან, რითაც მიიღწევა გლუტამატის კონცენტრაციის შემცირება და სინაპსური გადაცემის ტერმინაცია (Beart PM. et al. 2007). EAAT წარმოადგენს აქტიური ტრანსპორტის სიმპორტერის ტიპის ტუმბოს, რომელიც უჯრედგარე სივრციდან გადმოქაჩავს სუბსტრატს (გლუტამატს), აგრეთე სამ ნატრიუმის იონს და წყალბადის პროტონს, რომლებსაც ცვლის კალიუმის ერთ იონზე, ამის შემდეგ იგი იბრუნებს ღია კონფორმაციას უჯრედგარე სივრცისკენ და მზადაა გლუტამატის ახალი მოლეკულის დასაკავშირებლად (Danbolt et al. 1992; Levy et al. 1998; Robinson MB. 1998). მიუხედავად იმისა, რომ ცნს-ის ყველა უჯრედში ექსპრესირებულია გლუტამატის ტრანსპორტერები, გლუტამატის შთანთქმის ფუნქციის მატარებელ მთავარ უჯრედებს მაინც ასტროციტები წარმოადგენენ (Fairman WA. et al. 1999; Kanai Y. et al. 2003). არსებობს EAAT-ს ხუთი ტიპი: EAAT1, EAAT2, EAAT3, EAAT4 და EAAT5, რომელთა შორისაც ზრდასრული ადამიანების უჯრედებში ყველაზე გავრცელებულია EAAT2 (Kim K. et al. 2011). ფიზიოლოგიურ პირობებში იგი ძირითადად ლოკალიზებულია ასტროციტებში, თუმცა ნანახია ოლიგოდენდროციტებსა და ნეირონებშიც (Bar-Peled O. et al. 1997; Furuta A. et al. 1997; Maragakis NJ. et al. 2004; Milton ID. et al. 1997; Sheldon AL. et al. 2007). ფიზიოლოგიურ პირობებში არც მაკროფაგები და არც მიკროგლია არ ახდენს EAAT-ს ექსპრესირებას, თუმცა 1990 წლის მერე მრავალმა კვლევამ აჩვენა, რომ გარკვეულ პირობებში

აღნიშნულ უჯრედებს აქვთ EAAT-ს ექსპრესიის უნარი, მაგრამ მაკროფაგებსა და მიკროგლიაში EAAT-ს კონკრეტული ფუნქციის დადგენა დღემდე ვერ ხერხდება (Gras G. et al. 2012).

xc- სისტემა წარმოადგენს ნატრიუმ დამოუკიდებელ ანტიპორტერს, რომელიც ახორციელებს ცისტინის უჯრედში იმპორტსა და გლუტამატის ექსპორტს 1:1-ზე თანაფარდობით (Bannai S. 1986). უჯრედში ტრანსპორტირებული ცისტინი აღდგება ცისტეინად, რომელიც ასრულებს გლუტათიონის (GSH) პრეკურსორის როლს. შესაბამისად, xc- სისტემა ცნობილია როგორც in vivo ანტი-ოქსიდაციური ფუნქციის მატარებელი ფაქტორი (McBean G.J. 2002; Lewerenz J. et al. 2013), რომელიც წარმოადგენს xCT (SLC7A11) და 4F2hc (SLC3A2)-ისგან შედგენილ ჰეტეროდიმერს. xCT უფრო მეტად სპეციფიკური ჯაჭვია და მისი გენის ექსპრესია ზრდის ცისტინის ტრანსპორტს (Lewerenz J. et al. 2013; Wang H. et al. 2003; Shih A. Y. et al. 2001). xc- სისტემა ცნს-ის გარეთ გვხვდება ისეთ უჯრედებში როგორებიცაა ფიბრობლასტები, მაკროფაგები, ჰეპატოციტები და ენდოთელური უჯრედები, ხოლო ცნს-ის შიგნით - ასტროციტებში, მიკროგლიაში, მოუმწიფებელ კორტიკალურ ნეირონებში და ა.შ. (Bridges R. et al. 2012) xCT ექსპრესიის გაზრდას იწვევს ოქსიდაციური სტრესი (Lewerenz J. et al. 2013; McBean G.J. 2002). გასათვალისწინებელია ისიც, რომ ცისტინის იმპორტის გარდა ამ დროს იზრდება გლუტამატის უჯრედგარე სეკრეციაც რაც ასოცირდება თავის ტვინში გლუტამატის ტოქსიკურობასთან, ანუ ოქსიტოზთან (Lewerenz J. et al. 2013).

განსაკუთრებულ ყურადღებას იქცევს xc- სისტემის როლი გაფანტულ სკლეროზში. კვლევებით ნაჩვენებია, რომ ადამიანის აქტივირებული მონოციტები გამოათავისუფლებენ გლუტამატს xc- სისტემის საშალებით და, გარდა ამისა, მონოციტების აქტივირებისას ხდება xCT კატალიზური სუბერთეულის აღმარეგულაცია როგორც ცნს-ში, ასევე, პერიფერიულ სისხლშიც. მონოციტები-მაკროფაგები და მიკროგლია xCT-ის განსაკუთრებით მაღალ ექსპრესიას ავლენენ გაფანტული სკლეროზისა და EAE-ს მიმდინარეობისას. აღნიშნული კი ადასტურებს ფაქტს, რომ იმუნური სისტემის აქტივირება xCT-ის ექსპრესიის გაზრდის გზით შესაძლოა ხელს უწყობდეს გლუტამატის უჯრედგარე სივრცეში გამოთავისუფლების

გაზრდას და ოლიგოდენდროციტების ეგზიტოტოქსიკურ დაზიანებას (Pampliega O. et al. 2011).

მასალა და მეთოდები

1.1 მასალა

ექსპერიმენტები ტარდებოდა Raw 264.7 (ATCC - American Type Culture Collection) მაკროფაგების უჯრედულ ხაზზე.

1.2. მიელინის ფუძე ცილის მუხტით განპირობებული იზომერების გამოყოფა და გასუფთავება

ჩოუს მეთოდის მცირედ მოდიფიცირების შედეგად (Chou FC. et al. 1976) ხდებოდა ხარის ტვინის თეთრი ნივთიერებისგან მიელინის ფუძე ცილის გამოყოფა, რის შემდეგაც ხორციელდებოდა მაღალი წნევის თხევადშრიანი ქრომატოგრაფიული (HPLC) ანალიზი. დასაწყისში მჟავაში ხსნადი ფრაქცია იხსნებოდა გლიცინ-შარდოვანას ბუფერში (pH 9.6) და დაიტანებოდა გლიცინ-შარდოვანას ბუფერით (pH 10.6) გაწონასწორებულ CM-52 ცელულოზის კათიონ-ცვლად სვეტზე (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA). ნიმუშის დატანის შემდეგ, სვეტზე ბუფერის გატარება გრძელდებოდა პირველი პიკის ელუირებამდე. ეს ფრაქცია წარმოადგენს ყველაზე ნაკლებად კათიონურ იზომერს, მფც C8-ს. დარჩენილი კომპონენტების (C7, C6, C5, C4, C3, C2 და C1) სვეტიდან ელუირების მიღწევა ხდებოდა გლიცინ-შარდოვანას ბუფერში (pH 10.6) NaCl-ის წრფივი გრადიენტის (0-0.3M) გამოყენებით. მფც-ს ყველაზე მეტად კათიონურ და ყველაზე ნაკლებად მოდიფიცირებულ იზომერს წარმოადგენს C1, ხოლო ყველაზე მოდიფიცირებულს და დადებით მუხტის ყველაზე

ნაკლებად მატარებელს - C8. აღნიშნული იზომერების გასუფთავების შემდეგი ეტაპი ტარდებოდა მაღალი წნევის თხევადშრიანი ქრომატოგრაფიის (Agilent 1260 infinity;Agilent, Santa Clara, CA, USA) C_{18}-ის სვეტზე (Nova Pak, Waters, IL, USA) ტრიფტორ ძმარმჟავა-აცეტონიტრილის (0.05%) (0%–60%; Sigma-Aldrich Co.) გამხსნელი სისტემის გამოყენებით.

პოლიაკრილამიდის გელზე ელექტროფორეზი გამოყენებულ იქნა იზომერების სისუფთავის დასადგენად.

ხდებოდა გასუფთავებული ცილების ლიოფილიზაცია და გამოყენებამდე შენახვა -20 °C-ზე ტემპერატურული რეჟიმის პირობებში.

ცილების კონცენტრაციას ვსაზღვრავდით BCA protein assay (Pierce) ნაკრების საშუალებით.

1.3. უჯრედული კულტურა

ექსპერიმენტებისათვის ვიყენებდით თაგვის RAW 264.7 მაკროფაგების უჯრედულ ხაზს (ATCC - American Type Culture Collection). გაყინულ უჯრედებს ვადნობდით და ვთესავდით სპეციალურ პლასტიკურ კონტეინერში (Greiner Bio One). არედ ვიყენებდით Dulbecco's Modificationof Eagle's Medium (DMEM; ATCC), რომელიც გამდიდრებულ იყო 10% (v/v) ინაქტივირებული ხარის შრატით (Sigma) და რომელშიც ასევე დამატებული იყო პენიცილინის 100 ერთეული/მლ (Gibco® by Life Technologies) და სტრეპტომიცინის 100 მიკროგრამი/მლ (Gibco® by Life Technologies). ინკუბაციას ვახდენდით 37 °C და 5% CO_2/95%. კვლევისთვის ვიყენებდით მე-5- მე-15 გადათესვის RAW 264.7 მაკროფაგების უჯრედებს.

1.4. მაკროფაგების პოლარიზაცია

ვახდენდით RAW 264.7 მაკროფაგების პოლარიზაციას. ამისათვის მათ ($5\text{-}10^5$ უჯრედი) ვამუშავებდით 20 ნგ/მლ IFN-γ-ითა (Abcam, Cambridge) და 100 ნგ/მლ LPS-ით (Sigma-Aldrich Co.) M1 პოლარიზაციის მისაღწევად. M2 პოლარიზაციისათვის კი

უჯრედებს ვამუშავებდით 20 ნგ/მლ IL-4 (Abcam)-ითა და 10 ნგ/მლ IL-10-ით (eBioscience). ცდების სხვა სერიაში პოლარიზაციის დროს უჯრედებს ასევე ვამატებდით მფც C8 და C1 იზომერებს (0.5 μM). 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ უჯრედებსა და მათ არეებს ვაშორებდით ცენტრიფუგირებით და ვიყენებდით შემდგომი ექსპერიმენტებისათვის.

უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას ვამოწმებდით Trypan blue (Bio-Rad, Hercules, CA) საღებავით შეღებვისა და უჯრედების ავტომატური მთვლელის Cell Counter TC 20TM (Bio-Rad)-ის გამოყენებით.

1.5. უჯრედების ტრანსფექცია

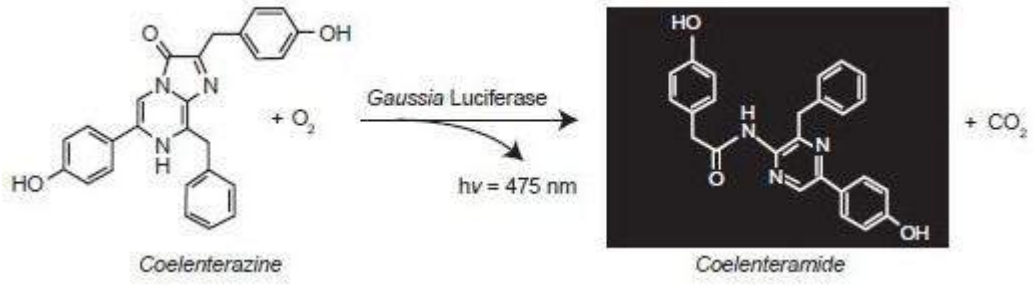
ელექტროპორაციის წინა დღეს ვახდენდით უჯრედული კულტურის გადათესვას. ტრანსფექციისათვის ვიყენებდით სპეციალურ ხელსაწყოს - Gene Pulser Xcell Electroporation System (Bio-Rad). ტრანსფექციის დღეს უჯრედებს კვლავ ვთვლიდით და შესაბამისი რაოდენობით ვათავსებდით სპეციალურ, ელექტროპორაციის ბუფერში (Gene Pulser Electroporation buffer, Bio-Rad). ტრანსფექციისათვის ვიყენებდით 20 მკგ/მლ mGluR5-ის პლაზმიდურ დნმ-ს (Oxford Genetics). რეპორტერ-გენად ვიყენებდით - Gaussia Luciferase-ის გენს. უჯრედული კულტურისა და დნმ-ის ნარევს (100 მკლ) ვათავსებდით ელექტროპორაციის ცივ კიუვეტაში, რომელიც გადაგვქონდა სპეციალურ ერთეულში - ShockPod-ში (Bio-Rad). ელექტროპორაცია ხორციელდებოდა ერთჯერადად 20 მილიწამის განმავლობაში 1750 ვოლტიანი პულსირებით. ტრანსფექციის შემდეგ უჯრედულ კულტურას დაუყოვნებლივ ვთესავდით წინასწარ შემთბარ 6-უჯრედიან თეფშებზე. შედეგების განსაზღვრას ვახდენდით ტრანსფექციიდან 48 საათში. პოსტ-ტრანსფექციული ანალიზისთვის ვიყენებდით BioLux Gauassia Luciferase Assay (New England BioLabs) ნაკრებს და ვესტერნ ბლოტინგის მეთოდს.

იმის დასადასტურებლად, რომ მაკროფაგების პლასტიურობა გამოწვეული იყო მხოლოდ mGluR5-ით და არა ელექტროპორაციის პროცესით, თითოეული

ექსპერიმენტისთვის ასევე ვიყენებდით საკონტროლო სინჯებს. აღნიშნულ სინჯებში, დნმ-პლაზმიდის ნაცვლად ვამატებდით ელექტროპორაციის ბუფერის შესაბამის რაოდენობას.

1.6. პოსტტრანსფექციური ანალიზი

პოსტტრანსფექციული ანალიზისათვის ვიყენებდით BioLux Gaussia Luciferase Assay ნაკრებს (სურ. 6). ლუციფერაზული აქტივობის ცვლილება დროში წარმოადგენს ვალიდურ მახასიათებელს განხორციელებული პროცედურის შესაფასებლად. სუბსტრატის - კოელენტერაზინის დამატების შემდეგ, ლუციფერაზულ აქტიობას ვზომავდით დროში, რაც გამოიხატებოდა ტრანსფექცირებუილი უჯრედების სუპერნატანტებში ლუმინესცენციის ცვლილებით.



სურათი 6. BioLux Gaussia Luciferase Assay ნაკრების მოქმედების მექანიზმი. Gaussia Luciferase წარმოადგენს რეპორტერ-გენს, რომლის ექსპრესიის პროდუქტს ძუძუმწოვრებში შესაბამისი პლაზმიდის გამოყენებისას წარმოადგენს ლუციფერაზა. აღნიშნული ლუციფერაზა არ საჭიროებს ატფ-ის გამოყენებას და აკატალიზებს სუბსტრატ კოელენტერაზინის დაჟანგვას, რომელსაც თან ახლავს სინათლის გამოსხივება.

1.7. ვესტერნ ბლოტინგი

ინკუბაციის შემდეგ უჯრედებს ვხსნიდით და ვრეცხავდით PBS-ით. რის შემდეგაც ვაჰომოგენიოზირებდით ყინულოვანი ლიზის ბუფერით, რომელიც შეიცავდა: 100 mM NaCl-ს, 50 mM Tris–HCl-ს, pH 7.4 და პროტეაზულ ინჰიბიტორებს (1 mM PMSF, 5 მგ/მლ აპროტინინი, 5 მგ/მლ პეპსტატინ A და 5 მგ/მლ ლეუპეპტინი). ლიზისის პროცესის გასაუმჯობესებლად, ჰომოგენატს ვატარებდით ინსულინის შპრიცში. ლიზატების ინკუბაცია ხორციელდებოდა 4°C-ზე 30 წთ-ის განმავლობაში, რის შემდეგაც 15 წთ-ის მანძილზე ხდებოდა მათი ცენტრიფუგირება 13,000 × *g*. ცილების (50 მკგ) 90°C-ზე 5წთ-ის განმავლობაში დენატურაციის შემდეგ, ხდებოდა მათი დაყოფა 15% SDS-პოლიაკრილამიდის გელზე ელექტროფორეზი (PAGE)-ის გამოყენებით. ელექტროფორეზის შემდეგ ცილები გადაგვქონდა ნიტროცელულოზას მემბრანაზე (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Tris–HCl ბუფერში გახსნილი 5%-ინი ხარის ალბუმინისა და 0.05%-იანი ტვინი 20-ის ნარევით მემბრანის ბლოკირების შემდეგ მემბრანების ინკუბაციას ვახდენდით შესაბამის პირველად ანტისხეულებთან ერთად: ანტი-RAGE (Abcam), ანტი-HMGB1 (Santa-Cruz Biotechnology), ანტი-mGluR5 (Abcam), ანტი-EAAT-2 (Abcam), ანტი-HMGB1 (Santa-Cruz Biotechnology) და ანტი-PPAR-γ (Abcam). იმუნორეაქტიულობის განსაზღვრა ხდებოდა გაძლიერებული ქემილუმინესცენციური აუტორადიოგრაფიის სპეციალური ნაკრებით - enhanced chemiluminescenceautoradiography - ECL (Santa-Cruz Biotechnology).

1.8. აზოტის ოქსიდის განსაზღვრა

აზოტის ოქსიდის რაოდენობას ვსაზღვრავდით გრისის რეაქტივით. რეაქციის შედეგად დაგროვებული ნიტრიტის რაოდენობის მიხედვით ვმსჯელობდით NO-ს პროდუქციასა და ზოგადად, ანთებითი აქტიობის ინდექსზე. ამისათვის, უჯრედული არეების ინკუბაციას ვახდენდით ოთახის ტემპერატურზე 15 წუთის განმავლობაში

გრისის რეაგენტის თანაობისას. ნიმუშებს ვამოწმებდით 540 ნმ სიგრძის ტალღების შთანთქმის სპექტრზე.

1.9. ციტოკინებისა და გლუტამატის დეტექცია

IL-10-სა და HMGB1-ის რაოდენობრივ შემცველობას ვსაზღვრავდით ELISA (Abcam) ნაკრების გამოყენებით მწარმოებლის ინსტრუქციის მიხედვით 450 ნმ ტალღის სიგრძეზე, მიკროთეფშების წამკითხავი დანადგარის (Elx808, BioTek) საშუალებით. გლუტამატის რაოდენობრივი შემცველობის განსასაზღვრად ვიყენებდით Glutamate Assay (fluorimetric, Abcam) ნაკრებს. პროცედურა ტარდებოდა მწარმოებლის ინსტრუქციის მიხედვით. ფლუორესცენციის ზრდაზე დაკვირვება ხდებოდა ფლუორესცენტული თეფშის წამკითხველის Twinkle LB970, Berthold technology-ის საშუალებით Ex/Em—530–570 ნმ-ზე.

1.10. ინდუცირებადი აზოტის ოქსიდის სინთაზასა და არგინაზა-1-ის რაოდენობრივი ანალიზი

იმისათვის რომ დაგვედასტურებინა IFN-γ/LPS და IL-4/IL-10-ით დამუშავების შემდეგ მაკროფაგების M1 და M2 ფენოტიპად პოლარიზაცია, ხორციელდებოდა iNOS-ს ექსპრესიის (M1 პოლარიზაციის მაჩვენებელი) და არგინაზა-1-ის ექსპრესიის (M2 პოლარიზაციის მაჩვენებელი) ხარისხის განსაზღვრა.

iNOS-ს ექსპრესიის შესაფასებლად ვიყენებდით Nitric OxideSynthase (MyBioSource) ნაკრებს. ანალიზი ტარდებოდა მწარმოებლის ინსტრუქციის მიხედვით.

არგინაზა-1-ის ექსპრესიის შესაფასებლად კი ვიყენებდით Sandwich ELISA ნაკრებს (LifeSpanBioSciences). ანალიზი ტარდებოდა მწარმოებლის ინსტრუქციის მიხედვით.

1.11. RAC-ის აქტივაციის რაოდენობრივი განსაზღვრა

უჯრედულ ლიზატებში RAC-ის აქტივაციის შესაფასებლად ვიყენებდით G-LISA Rac 1/2/3 Activation Assay (Cytoskeleton, Denver) ნაკრებს. ანალიზი ტარდებოდა მწარმოებლის ინსტრუქციის მიხედვით.

1.12. სტატისტიკური ანალიზი

ყველა მონაცემი წარმოდგენილია ± SEM-ის საშუალებით. სტატისტიკური ანალიზი ხორციელდებოდა one-way ANOVA-ს მიხედვით, რომლის შემდეგაც ვიყენებდით Scheffe's post hoc-ის შესადარებელი ტესტს. სტატისტიკურად სარწმუნო მონაცემად მივიჩნევდით $P<0.05$.

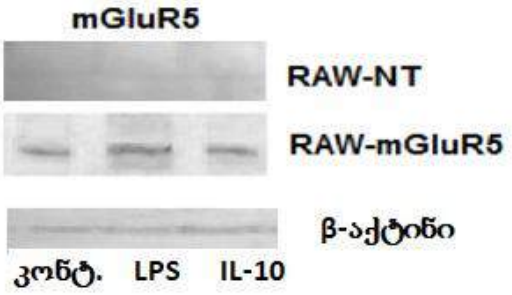
მიღებული შედეგები

თავი 1. მეტაბოტროპული გლუტამატის რეცეპტორ-5-ის გავლენა მაკროფაგთა პლასტიურობაზე

1.1. LPS-ის და IL-10-ის გავლენა mGluR5-ის ექსპრესიაზე ტრანსფექცირებულ (RAW-mGluR5) და არატრანსფექცირებულ (RAW-NT) მაკროფაგებში

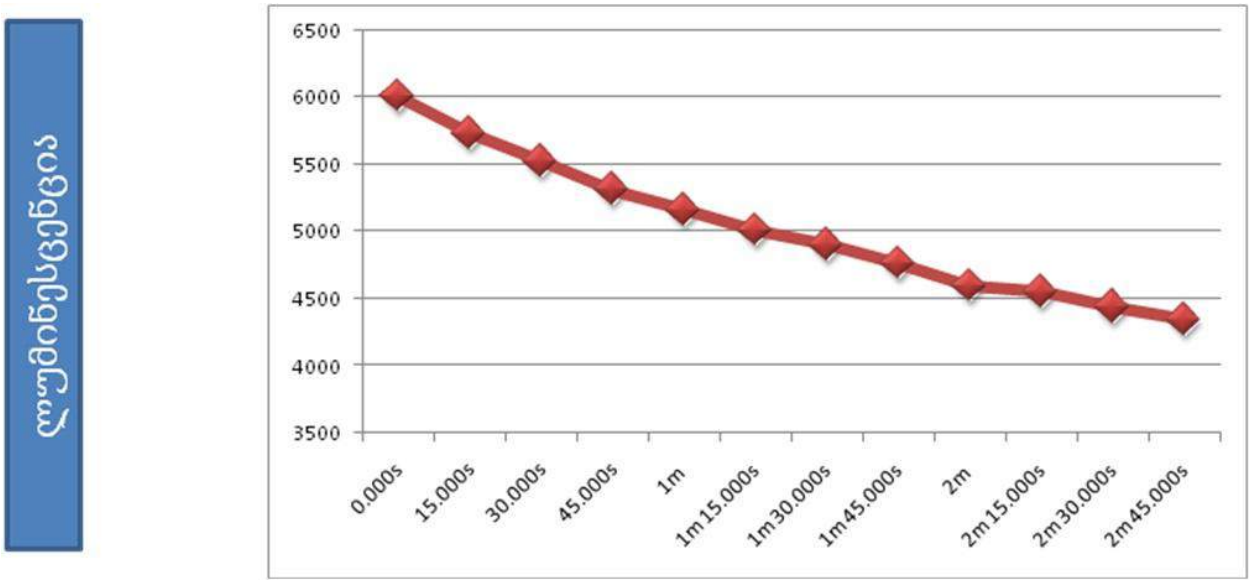
იმისათვის რომ დაგვედგინა mGluR5-ის როლი მაკროფაგების აქტივობაზე, ექსპერიმეტების პირველ სერიაში მოვახდინეთ mGluR5-ის გენის ტრანსფექცია მღრღნელების RAW-264.7 მაკროფაგებში. პოსტტრანსფექციური ანალიზისათვის

გამოვიყენეთ ვესტერნ ბლოტინგის (ანტი-mGluR5-ის თანაობისას) და ლუციფერაზული აქტივობის ცვლილების დამადასტურებელი მეთოდები. არატრანსფექცირებული უჯრედებისგან განსხვავებით, ტრანსფექცირებულ უჯრედებში აღმოჩნდა mGluR5-ის საკმაოდ დიდი რაოდენობა (სურ. 7), რაც მეტყველებს რეცეპტორის გენის გადატანის ეფექტურობაზე. აღსანიშნავია, რომ მისი რაოდენობა მნიშვნელოვნად არ შეცვლილა LPS (100 ნგ/მლ)-თან, ან IL-10 (20 nM)-თან ინკუბაციის შემდეგ.



სურათი 7. mGluR5-ის ექსპრესია საკონტროლო, არატრანსფექცირებულ (RAW-NT) და mGluR5-ტრანსფექცირებულ (RAW-mGluR5) მაკროფაგებში. ვესტერნ ბლოტინგის მეთოდით ვიზუალიზირებული β-აქტინი.

ტრანსფექცირებული და არატრანსფექცირებული უჯრედების სუპერნატანტებში ლუციფერაზული აქტივობის ცვლილების დამადასტურებელი ნაკრების გამოყენებით კიდევ ერთხელ ვაჩვენეთ ტრანსფექციის ვალიდურობა (სურ 8).

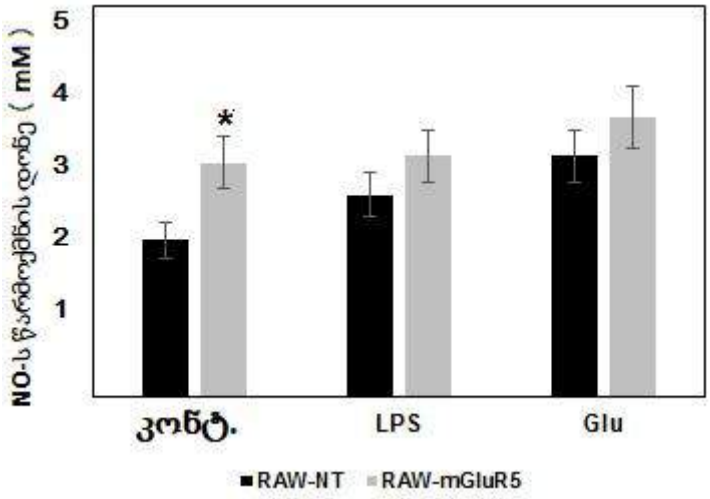


სურათი 8. ლუციფერაზული აქტიობის ცვლილება დროში, BioLux Gauassia Luciferase Assay Kit–ის გამოყენებით. დრო ნაჩვენებია წუთებში, სუბსტრატის დამატების შემდეგ. ლუმინესცენცია იზომებოდა ტრანსფექცირებული უჯრედების სუპერნატანტებში.

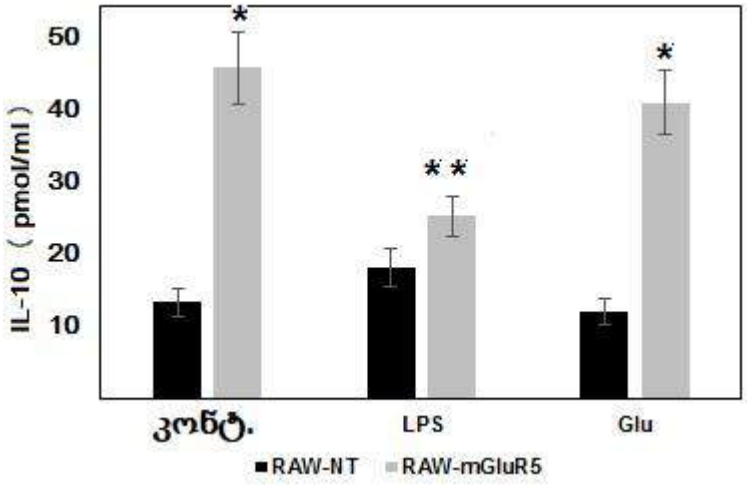
1.2. LPS-ის და გლუტამატის გავლენა NO-სა და IL-10-ის სეკრეციაზე

ექსპერიმენტების შემდგომ სერიაში მაკროფაგებში mGluR5-ის როლის შესასწავლად, მათი LPS-ითა და გლუტამატით დამუშავების შემდეგ, განვსაზღვრეთ NO-სა და IL-10-ის გამოთავისუფლების უნარი (სურ. 9, 10). საკონტროლო უჯრედებში აღმოჩნდა, რომ RAW-mGluR5 (მაკროფაგი გადანერგილი გენით) გამოათავისუფლებდა მეტ IL-10-ს, ვიდრე არატრანსფექცირებული უჯრედები (სურ. 10), მაშინ როდესაც იგივე უჯრედებში, გამოთავისუფლებული NO-ს რაოდენობა ასეთ ეფექტს არ იძლეოდა (სურ. 9). რაც შეეხება გლუტამატს (ჩვენს მიერ გამოყენებული იქნა სისხლის პლაზმაში არსებული კონცენტრაცია - 40 μM), რასაც გავლენა არ მოუხდენია არც IL-10-ის და NO-ს სეკრეციაზე და არც უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე (24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ უჯრედებს ვთვლიდით Trypan blue საღებავით შეღებვისა და უჯრედების ავტომატური მთვლელის Cell Counter TC 20TM-ის გამოყენებით). არატრანსფექცირებულ მაკროფაგებზე LPS-ის

დამატებამ არ შეცვალა IL-10-ის სეკრეციის დონე, მაშინ როდესაც RAW- mGluR5-ზე LPS-ის მოქმედება გამოიხატა აღნიშნული ციტოკინის წარმოქმნის დონის შემცირებაში. მონაცემებმა აჩვენა, რომ მაკროფაგებში mGluR5-ის ჭარბი ექსპრესია ცვლის მხოლოდ IL-10-ის სეკრეციის პროფილს.



სურათი 9. LPS-ის და გლუტამატის გავლენა NO-ს სეკრეციაზე არატრანსფექცირებულ და ტრანსფექცირებულ RAW 264.7 მაკროფაგებში. წარმოდგენილია ოთხი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის მონაცემის საშუალო ± SEM. *P<0.05 RAW-NT უჯრედებთან მიმართებაში.

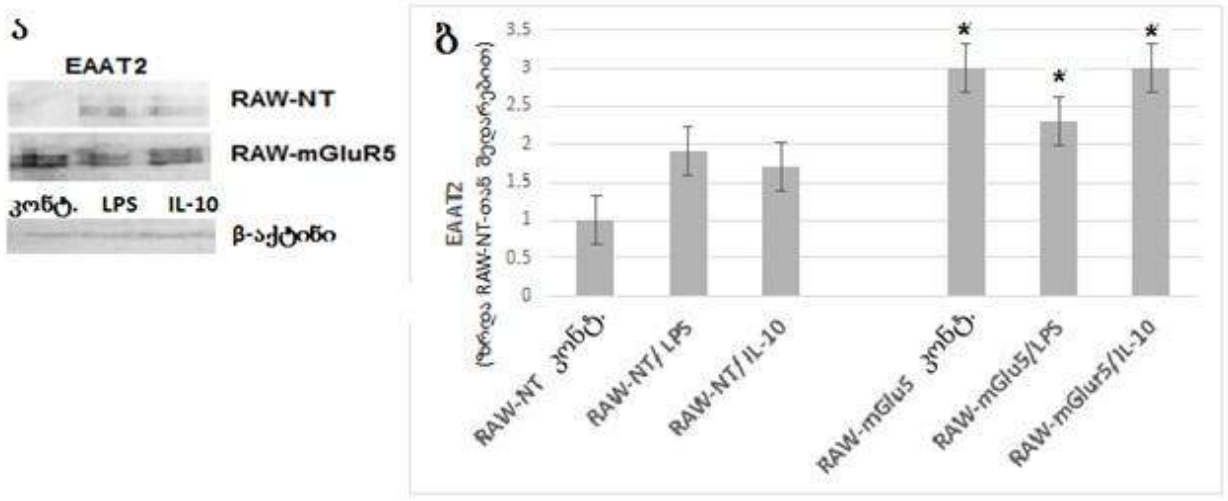


სურათი 10. LPS-ის და გლუტამატის გავლენა IL-10-ის სეკრეციაზე არატრანსფექცირებულ და ტრანსფექცირებულ RAW 264.7 მაკროფაგებში. წარმოდგენილია ოთხი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის მონაცემის საშუალო ± SEM.

*P<0.05 RAW-NT უჯრედებთან მიმართებაში. **P<0.05 RAW- mGluR5 უჯრედებთან მიმართებაში.

1.3. mGluR5-ის ტრანსფექციის გავლენა EAAT-2 ცილის ექსპრესიაზე

ნაჩვენებია, რომ mGluR5-ის 60-70% შესაძლოა ლოკალიზებული იყოს უჯრედშიდა მემბრანებზე, სადაც მათ შეუძლიათ მონაწილეობა მიიღონ უნიკალური სასიგნალო ეფექტების წარმოქმნასა და გავრცელებაში (Jong Y. et al. 2014). მიუხედავად ამისა, უცნობია მაკროფაგებში უჯრედშიდა გლუტამატის მიერ გლუტამატის რეცეპტორის აქტივაციის კონკრეტული მექანიზმი. ცხადია, რომ აღნიშნული რეცეპტორის აქტივაცია დამოკიდებულია უჯრედშიდა გლუტამატის კონცენტრაციაზე, რაც თავის მხრივ რეგულირდება გლუტამატის ტრანსპორტერების მიერ (Jong Y. et al. 2014). EAAT-2 წარმოადგენს მაკროფაგებში გლუტამატის მიწოდების ძირითად ტრანსპორტერს, რომელიც ინარჩუნებს მაღალ კონცენტრაციულ გრადიენტს უჯრედშიდა და უჯრედგარე სივრცეებს შორის (Rimaniol A.C. et al. 2000). იმისათვის, რომ შეგვეფასებინა mGluR5-ის როლი EAAT-ს ექსპრესიაში, მოვახდინეთ RAW 264.7 მაკროფაგების (5-10^5 უჯრედი): RAW-NT და RAW- mGluR5-ის, 24 საათიანი ინკუბაცია 100 ნგ/მლ LPS-თან ან 20 nM IL-10-თან, რის შემდეგაც განვსაზღვრეთ EAAT-2-ის ექსპრესია ვესტერნ ბლოტინგის მეთოდით (ანტი-EAAT-2-ის გამოყენებით). განსაზღვრულ იქნა EAAT-2-ის ექსპრესიის ხარისხი. აღმოჩნდა, რომ RAW-mGluR5 მაკროფაგებში EAAT-2-ის ექსპრესია გაზრდილია (სურ. 11 ა,ბ). მიუხედავად ამისა, საკონტროლო არატრანსფექცირებულ RAW 264.7 მაკროფაგებში მნიშვნელოვანი სხვაობები არ გამოვლენილა LPS-ისა და IL-10-ის ეფექტებს შორის, რადგან LPS-იც და IL-10-იც თანაბრად ზრდის EAAT-2-ის ექსპრესიას.

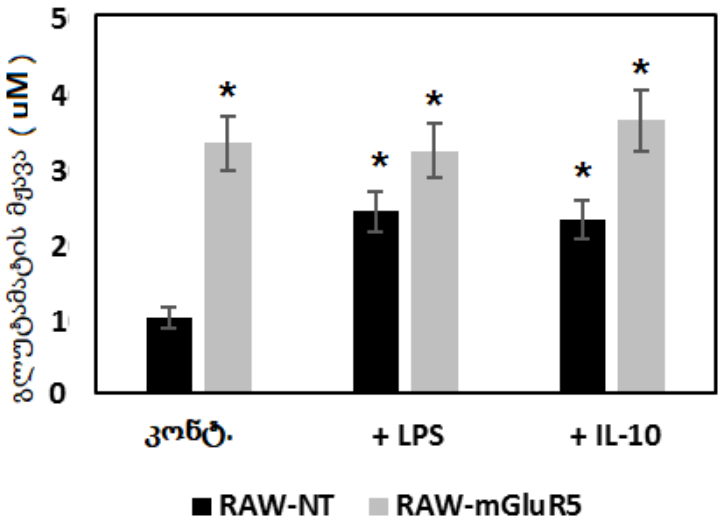


სურათი 11. EAAT-2-ის ექსპრესია საკონტროლო, არატრანსფექცირებულ (RAW-NT) და mGluR5-ტრანსფექცირებულ (RAW-mGluR5) მაკროფაგებში. სამი დამოუკიდებლად ჩატარებული პარალელური ექსპერიმენტიდან მონაცემი წარმოდგენილია საშუალო ± SEM-ით. *P<0.05 RAW-NT უჯრედებთან მიმართებაში.

1.4. mGluR5-ის ტრანსფექციის გავლენა RAW 264.7 მაკროფაგების მიერ გლუტამატის შთანთქმაზე

EAAT-2-ის ექსპრესიის დონე შესაძლოა კორელაციაში იყოს მაკროფაგების მხრიდან გლუტამატის შთანთქმასთან. შესაბამისად, ექსპერიმენტების შემდეგ სერიაში განვსაზღვრეთ გლუტამატის უჯრედშიდა კონცენტრაცია. ამისათვის მოვახდინეთ არატრანსფექცირებული და ტრანსფექცირებული RAW 264.7 მაკროფაგების (5-10^5 უჯრედი) ინკუბაცია 100 ნგ/მლ LPS-თან, ან 20 nM IL-10-თან, რის შემდეგაც უჯრედულ ლიზატებში განვსაზღვრეთ გლუტამატი. შედეგებმა აჩვენა, რომ RAW-mGluR5 უჯრედები შეიცავდნენ უჯრედშიდა გლუტამატის უფრო მაღალ კონცენტრაციას, ვიდრე საკონტროლო არატრანსფექცირებული უჯრედები. გარდა ამისა, ტრანსფექცირებული მაკროფაგების IL-10-ითა და LPS-ით დამუშავებამ გლუტამატის შემცველობა მნიშვნელოვნად არ შეცვალა (სურ. 12). თუმცა, LPS-მაც და

IL-10-მაც მცირედით გაზარდა გლუტამატის შთანთქმის დონე საკონტროლო, არატრანსფექცირებულ მაკროფაგებში, რითაც დასტურდება, რომ შთანთქმული გლუტამატის რაოდენობა მაკროფაგებში კორელაციაშია EAAT-2-ის ექსპრესიის დონესთან.

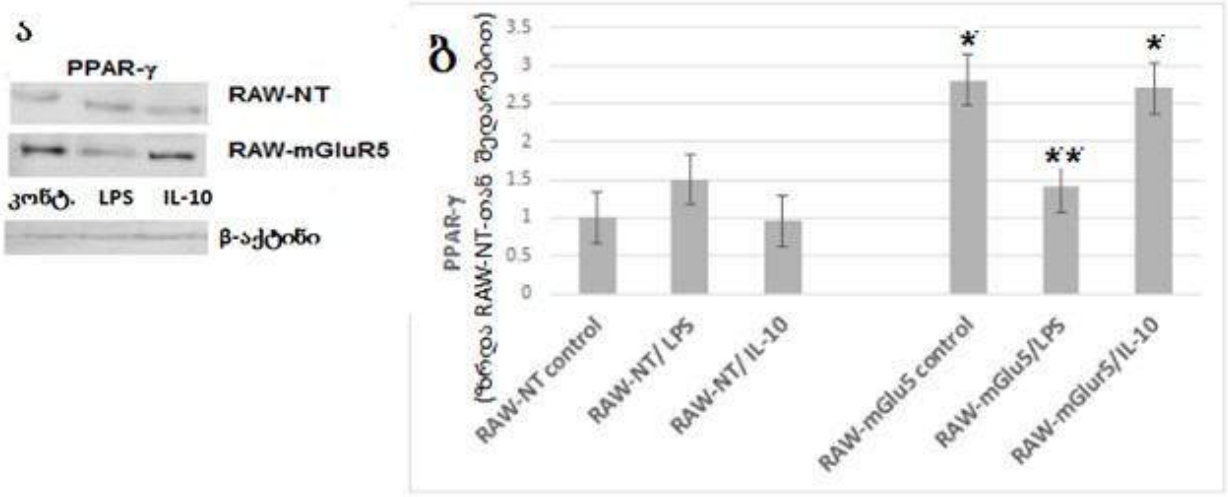


სურათი 12. mGluR5-ის ტრანსფექციის გავლენა RAW 264.7 მაკროფაგების მიერ გლუტამატის შთანთქმაზე. ოთხი დამოუკიდებლად ჩატარებული პარალელური ექსპერიმენტიდან მონაცემი წარმოდგენილია საშუალო ± SEM-ით. *P<0.05 RAW-NT უჯრედებთან მიმართებაში.

1.5. mGluR5-ის ტრანსფექციის გავლენა PPAR-γ-ს ექსპრესიაზე

mGluR1/5-ის აქტივაცია ასტიმულირებს ცილების სინთეზს Ras/ERK-სა და PI3K/mTOR-ის სასიგნალო გზების საშუალებით. mTOR ახდენს სხვადასხვა ტრანსკრიპციული ფაქტორების, მათ შორის კი PPAR-γ-ს, ექსპრესიის გაძლიერებას (Laplante M. et al. 2012), რომელსაც, თავის მხრივ შეუძლია EAAT-2-ის ექსპრესიის გაზრდა (Ching C. et al. 2015). იმისათვის, რომ დაგვედასტურებინა ჩვენი ჰიპოთეზა გლუტამატ-დამოკიდებული EAAT-2-ის ექსპრესიაში PPAR-γ-ის ჩართულობის შესახებ, RAW- mGluR5 და RAW 264.7 მაკროფაგებში განვსაზღვრეთ PPAR-γ-ის

შემცველობა. ამისათვის, RAW-NT და RAW- mGluR5-ის, ინკუბაცია მოვახდინეთ 100 ნგ/მლ LPS-თან, ან 20 nM IL-10-თან 24 საათის განმავლობაში, რის შემდეგაც განვსაზღვრეთ PPAR-γ-ის ექსპრესია ვესტერნ ბლოტინგის მეთოდით. აღმოჩნდა, რომ არატრანსფექცირებული RAW მაკროფაგები მხოლოდ მცირედით ახდენდნენ PPAR-γ-ის ექსპრესიას, მაშინ როდესაც ტრანსფექციის შედეგად, mGluR5 მაკროფაგებში დაფიქსირდა PPAR-γ-ის ექსპრესიის საგრძნობი ზრდა (სურ. 13 ა,ბ). საინტერესოა აღინიშნოს, რომ ტრანსფექცირებულ მაკროფაგებში LPS-მა შეამცირა PPAR-γ-ის ექსპრესია. აღნიშნული მონაცემები მიუთითებს იმაზე, რომ EAAT-ს შეუძლია PPAR-γ-ის აქტივობის ცვლილება.



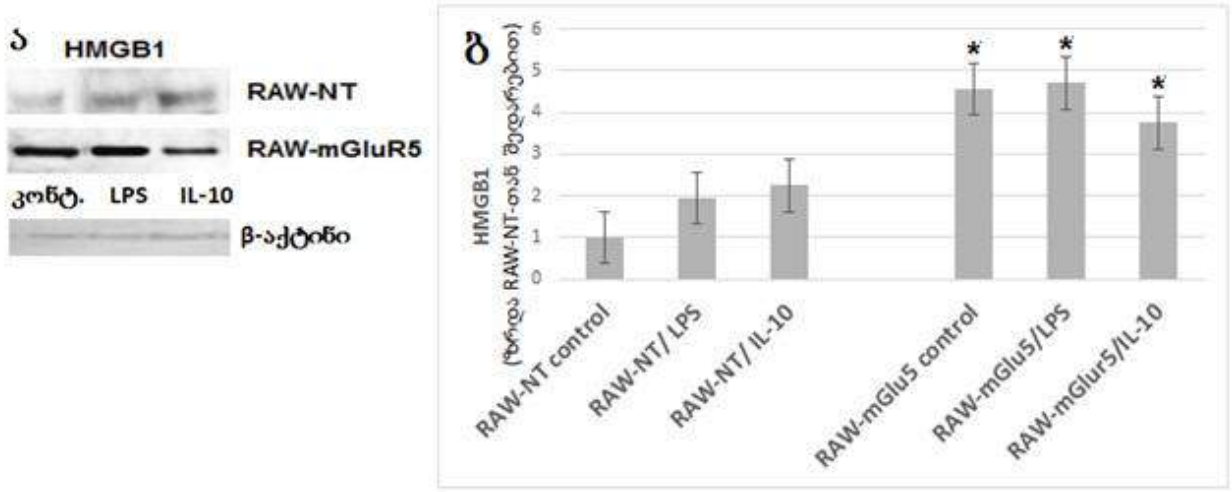
სურათი 13. PPAR-γ-ის ექსპრესია საკონტროლო, არატრანსფექცირებულ (RAW-NT) და mGluR5-ტრანსფექცირებულ (RAW-mGluR5) მაკროფაგებში. სამი დამოუკიდებლად ჩატარებული პარალელური ექსპერიმენტიდან მონაცემი წარმოდგენილია საშუალო ± SEM-ით. *P<0.05 RAW-NT უჯრედებთან მიმართებაში. **P<0.05 ტრანფექცირებული, ანუ mGluR5-მაკროპფაგების კონტროლთან მიმართებაში.

1.6. mGluR5-ის ტრანსფექციის გავლენა HMGB1 სეკრეციაზე

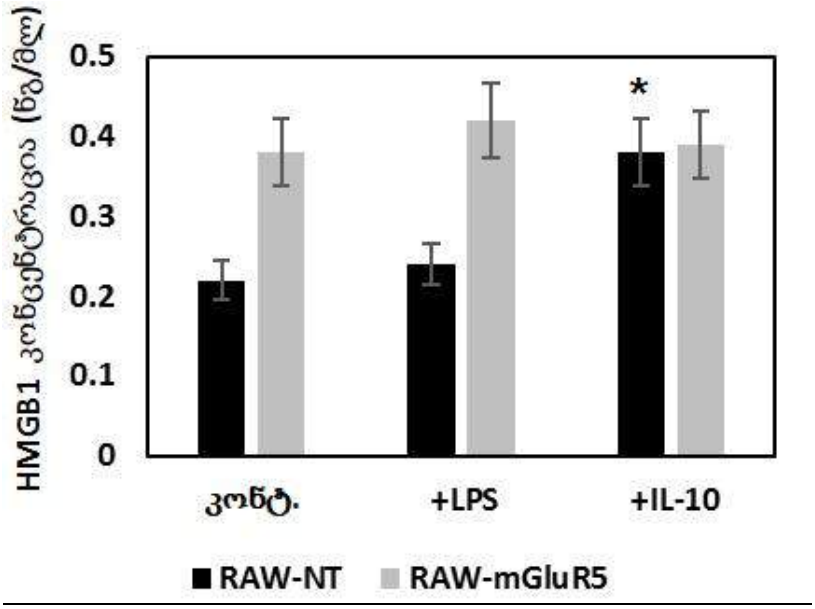
PPAR-γ-ის აქტივაცია ავლენს ანთების საწინააღმდეგო ეფექტს ანთებითი სასიგნალო გზების დათრგუნვის საშუალებით (Chawla A. 2010). HMGB1 კი მაკროფაგებიდან გამოთავისუფლების შემდეგ ასრულებს ციტოკინის მსგავსი ანთებით მედიატორის

როლს (Lee SA. et al. 2014). HMGB1 ასტიმულირებს კავშირის დამყარებას მაკროფაგებსა და მიელოიდური წარმოშობის სუპრესორულ უჯრედებს შორის და ზრდის IL-10-ის სეკრეციის დონეს (Parker KH. et al. 2014). იმისათვის, რომ შეგვესწავლა mGluR5-ის როლი HMGB1-ის გამოთავისუფლების რეგულაციაში, LPS-ითა და IL-10-ით დამუშავების შემდეგ, განვსაზღვრეთ უჯრედშიდა და უჯრედგარე გლუტამატის შემცველობა როგორც RAW-NT, ასევე RAW-mGluR5 მაკროფაგების ლიზატსა და უჯრედული კულტურის არეში. ამისათვის, მოვახდინეთ RAW 264.7 მაკროფაგების ($5\text{-}10^5$ უჯრედი), RAW-NT და RAW- mGluR5-ის ინკუბაცია 24 საათის განმავლობაში 100 ნგ/მლ LPS-თან, ან 20 nM IL-10-თან, რის შემდეგაც განვსაზღვრეთ HMGB1-ის ექსპრესია უჯრედულ ლიზატში ვესტერნ ბლოტინგის მეთოდით, ხოლო უჯრედულ არეში ELISA მეთოდით, შესაბამისი ნაკრების გამოყენებით. აღმოჩნდა, რომ RAW-mGluR5 უჯრედებში (სურ. 14 ა,ბ), ისევე როგორც RAW- mGluR5 უჯრედული კულტურის არეში აღინიშნებოდა საკონტროლო უჯრედებთან შედარებით HMGB1-ის მაღალი კონცენტრაცია (სურ. 15). დაუმუშავებელი უჯრედების სტიმულაციის შემდეგ LPS-ის ზემოქმედებით არ შეცვლილა არც უჯრედშიდა და არც უჯრედგარე HMGB1-ის შემცველობა (სურ.14 ა,ბ; სურ.15); IL-10-მა კი გავლენა არ იქონია HMGB1-ის უჯრედშიდა შემცველობაზე შესაბამის კონტროლებთან მიმართებაში, არც ერთი ტიპის უჯრედებში (სურ.14 ა,ბ; სურ.15).

IL-10-ის გავლენით გაიზარდა HMGB1-ის სეკრეცია მხოლოდ არატრანსფექცირებულ უჯრედებში (როგორც შესაბამის კონტროლთან, ასევე LPS-ით დამუშავებულ უჯრედებთან შედარებით), მაშინ როდესაც უჯრედებში, რომლებშიც mGluR5 ექსპრესირებული იყო მაღალი ხარისხით, IL-10-ის დამატებით HMGB1-ის სეკრეცია თითქმის არ შეცვლილა შესაბამის კონტროლთან შედარებით და დაფიქსირდა კლების ტენდენცია LPS-ით დამუშავებულ RAW-mGluR5 მაკროფაგებთან მიმართებაში, თუმცა მონაცემი სტატისტიკურად არ არის სარწმუნო (სურ. 15). რა თქმა უნდა, IL-10-ის მიმართ მგრძნობელობის დაკარგვა შესაძლოა კავშირში იყოს RAW-mGluR5 მაკროფაგებში PPAR-γ-ის სინთეზთან.



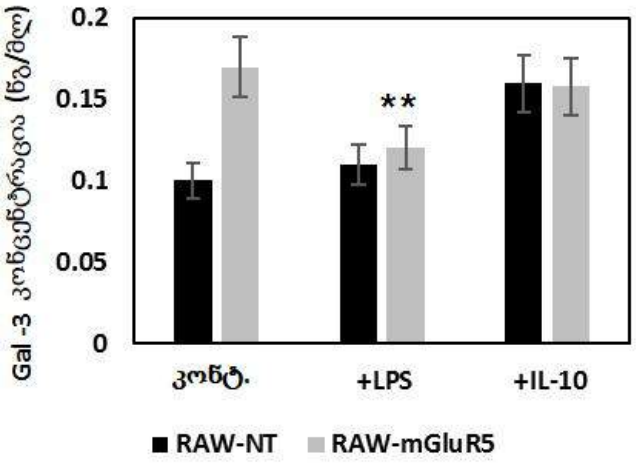
სურათი 14. HMGB1-ის ექსპრესია საკონტროლო, არატრანსფექცირებულ (RAW-NT) და mGluR5-ტრანსფექცირებულ (RAW-mGluR5) მაკროფაგებში. სამი დამოუკიდებლად ჩატარებული პარალელური ექსპერიმენტიდან მონაცემი წარმოდგენილია საშუალო ± SEM-ით. *P<0.05 RAW-NT უჯრედებთან მიმართებაში.



სურათი 15. mGluR5-ის ტრანსფექციის გავლენა HMGB1-ის სეკრეციაზე. ოთხი დამოუკიდებლად ჩატარებული პარალელური ცდიდან მონაცემი წარმოდგენილია საშუალო ± SEM-ით. *P<0.05 RAW-NT უჯრედებთან მიმართებაში.

1.7. mGluR5-ის ტრანსფექციის გავლენა Gal-3-ის სეკრეციაზე

კიდევ ერთი ციტოკინს, რომელიც შესაძლოა განიხილებოდეს როგორც მაკროფაგების ფენოტიპური მახასიათებელი, წარმოადგენს გალექტინ-3. აღნიშნული ლექტინის გამოთავისუფლება ხდება M2 ფენოტიპის მაკროფაგების მიერ და უკუკავშრის გზით ახდენს მაკროფაგების ალტერნატიულ აქტივაციას (MacKinnon AC. et al. 2008). შესაბამისად, მაკროფაგების დიფერენციაციისას გალექტინ-3-ის ექსპრესიის ცვლილება შესაძლოა წარმოადგენდეს მნიშვნელოვან ფაქტორს მაკროფაგების პლასტიურობის რეგულაციაში. იმისათვის, რომ შეგვესწავლა mGluR5-ის როლი გალექტინ-3-ის ექსპრესიაზე, ჩვენ დავამუშავეთ როგორც RAW-mGluR5, ასევე, საკონტროლო RAW მაკროფაგები LPS-ითა ან IL-10-ით და გავზომეთ გალექტინ-3-ის შემცველობა უჯრედულ არეში. აღმოჩნდა, რომ RAW-mGluR5-მა საკონტროლო RAW მაკროფაგებთან შედარებით გამოათავისუფლა გალექტინ-3-ის საგრძნობლად მეტი რაოდენობა. RAW-mGluR5 მაკროფაგებში გალექტინ-3-ის სეკრეცია შემცირდა უჯრედების LPS-ით დამუშავების შემდეგ (სურ. 16). უჯრედების IL-10-ით დამუშავებამ არ შეცვალა გამოთავისუფლებული გალექტინ-3-ის დონე არც RAW მაკროფაგებსა და არც RAW-mGluR5-ში.

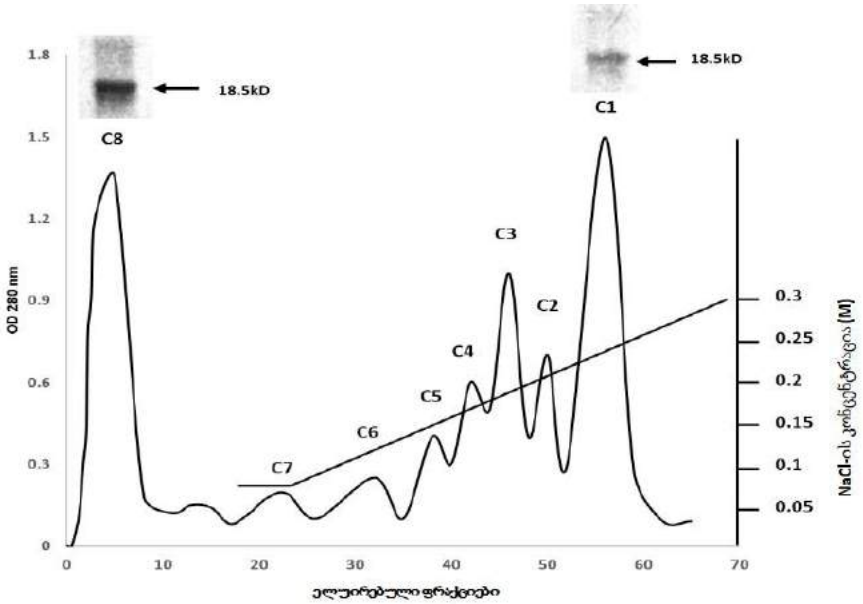


სურათი 16. mGluR5-ის ტრანსფექციის გავლენა Gal-3-ის სეკრეციაზე. ოთხი დამოუკიდებლად ჩატარებული პარალელური ექსპერიმენტიდან მონაცემი წარმოდგენილია საშუალო ± SEM-ით. **P<0.05 RAW-mGluR5-ის საკონტროლო უჯრედებთან მიმართებაში.

თავი 2. მფც-ს C1 და C8 მუხტისმიერი იზომერების გავლენა RAW 264.7 მაკროფაგების პლასტიურობაზე

2.1. მიელინის ფუძე ცილის მიღება

მფც გამოვყავით ხარის ტვინის თეთრი ნივთიერებისგან, რის შემდეგაც მფც-ს იზომერების დასაყოფად მჟავაში ხსნადი ფრაქცია გავხსენით 0.08M გლიცინ-შარდოვანას ბუფერში (pH 9.6), რომელიც შეიცავს 6 M შარდოვანას და დავიტანეთ გლიცინ-შარდოვანას ბუფერით (pH 10.6) გაწონასწორებულ CM-52 ცელულოზის კათიონ-ცვლად სვეტზე. ნიმუშის დატანის შემდეგ, სვეტზე pH 10.6 ბუფერის გატარება გაგრძელდა პირველი პიკის ელუირებამდე. ეს ფრაქცია წარმოადგენს ყველაზე ნაკლებად კათიონურ იზომერს, ციტრულინირებულ მფც C8-ს. დარჩენილი კომპონენტების სვეტიდან ელუირება მოხდა გლიცინ-შარდოვანას ბუფერში (pH 10.6) NaCl-ის წრფივი გრადიენტის (0-0.3M) გამოყენებით. მფც-ს ყველაზე მეტად კათიონური და ყველაზე ნაკლებად მოდიფიცირებული იზომერის - C1-ის სვეტიდან ელუირება მოხდა ყველაზე ბოლოს. ელუირებული ნიმუშების სისუფთავის შწემოწმების მიზნით გამოვიყენეთ ელექტროფორეზი პოლიაკრილამიდის სვეტზე (სურ. 17).



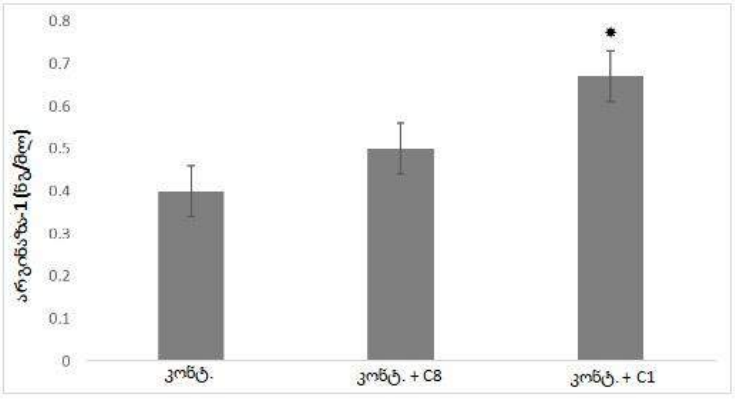
სურათი 17. მფც-ს მჟავაში ხსნადი ფრაქციის CM-52 ცელულოზის კათიონ-ცვლად სვეტზე ქრომატოგრაფიისა და პოლიაკრილამიდის გელზე ელექტროფორეზის შედეგები.

2.2. მფც-ს C1 და C8 მუხტისმიერი იზომერების გავლენა RAW 264.7 მაკროფაგებში iNOS-სა და არგინაზა-1-ის ექსპრესიაზე

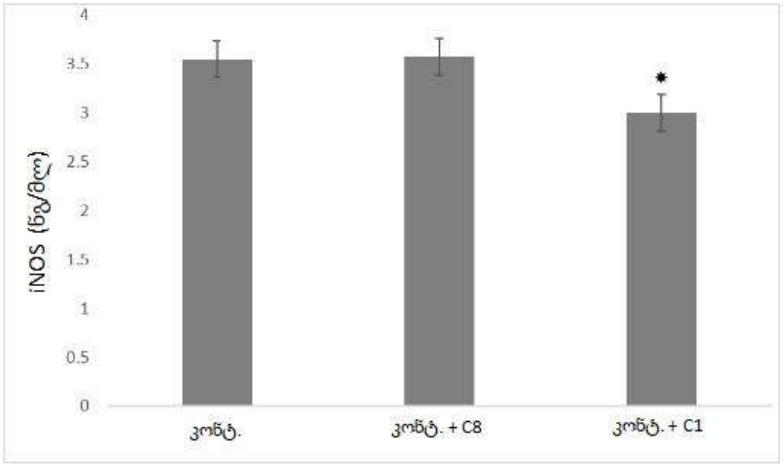
ექსპერიმენტებში გამოვიყენეთ კლასკური მფც-ს (18.5 kDa) C1 და C8 მუხტისმიერ იზომერები. ყველაზე მეტად მოდიფიცირებული და ნაკლებად კათიონური C8 ემთხვევა იმ ცილოვან ნიმუშს, რომელიც არ უკავშირდება CM-52 სვეტს. იმისათვის რომ განგვესაზღვრა მფც-ს იზომერების გავლენა მაკროფაგების პოლარიზაციაზე, RAW 264.7 მაკროფაგების უჯრედულ კულტურას დავამატეთ 0.5 μM მფც-ს იზომერები: ყველაზე მოდიფიცირებული და ყველაზე ნაკლებად კათიონური C8 და ყველაზე ნაკლებად მოდიფიცირებულ და მეტად კათონურ C1. ნიმუშები დავდგით ინკუბაციაზე 24 სთ-ის განმავლობაში (ტემპერატურა 37 °C და 5% CO_2/95%).

ინკუბაციის შემდეგ უჯრედები დავაცენტრიფუგირეთ 500g-ზე 10 წუთის განმავლობაში. დათვლის შემდეგ განვახორციელეთ უჯრედების ლიზისი, ხოლო ცენტრიფუგირების შედეგად მიღებული უჯრედული არე შევინახეთ შემდგომი ექსპერიმენტებისათვის. უჯრედების ლიზისისათვის გამოვიყენეთ სპეციფიური ბუფერი, რომელიც შეიცავდა: 100 mM NaCl-ს, 50 mM Tris–HCl-ს, pH 7.4 და პროტეაზულ ინჰიბიტორებს (1 mM PMSF, 5 მგ/მლ აპროტინინი, 5 მგ/მლ პეპსტატინ A და 5 მგ/მლ ლეუპეპტინი). ლიზატები შევინახეთ საყინულეში შემდგომი ექსპერიმენტებისათვის.

მიელინის ფუძე ცილის იზომერებით გააქტივებული მაკროფაგების პოლარიზაციის ხარისხის დასადგენად, ლიზატებში განვსაზღვრეთ ინდუცირებადი NO-სინთაზასა (M1 მარკერი) და არგინაზა-1-ის (M2 მარკერი) ექსპრესიის ხარისხი.აღმოჩნდა რომ C1-ის თანაობისას არგინაზა-1-ის ექსპრესია საგრძნობლად იყო მომატებული (სურ. 18), მაშინ როცა C1-თან ინკუბაციამ გამოიწვია iNOS-ს ექსპრესიის მცირედით კლება (სურ. 19). ორივე შემთხვევაში მონაცემები სტატისტიკურად სარწუმო აღმოჩნდა. რაც შეეხება C8 იზომერს, მისმა დამატებამ არ გამოიწვია iNOS-სა და არგინაზა-1-ის ექსპრესიის საგრძნობი ცვლილება.

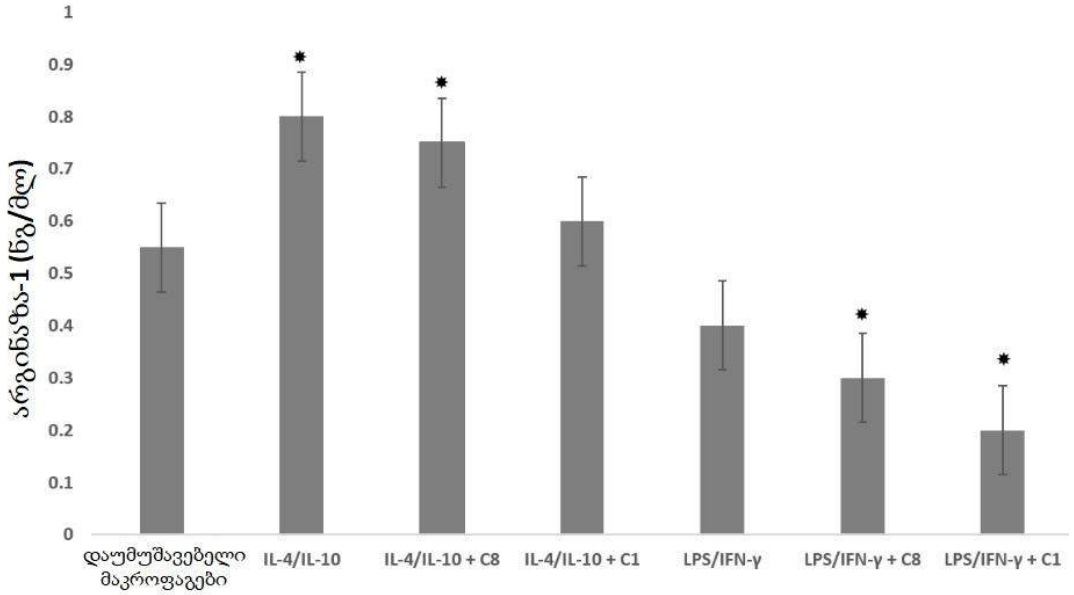


სურათი 18. RAW 264.7 მაკროფაგებში არგინაზა-1-ისა ექსპრესიის ცვლილება მფც-ს C8 და C1 იზომერების გავლენით. ოთხი დამოუკიდებლად ჩატარებული პარალელური ექსპერიმენტიდან მონაცემი წარმოდგენილია საშუალო ± SEM-ით. *P<0.05 შესაბამის საკონტროლო უჯრედებთან მიმართებაში.



სურათი 19. RAW 264.7 მაკროფაგებში iNOS-ს ექსპრესიის ცვლილება მფც-ს C8 და C1 იზომერების გავლენით. ოთხი დამოუკიდებლად ჩატარებული პარალელური ექსპერიმენტიდან მონაცემი წარმოდგენილია საშუალო ± SEM-ით. *P<0.05 შესაბამის საკონტროლო უჯრედებთან მიმართებაში.

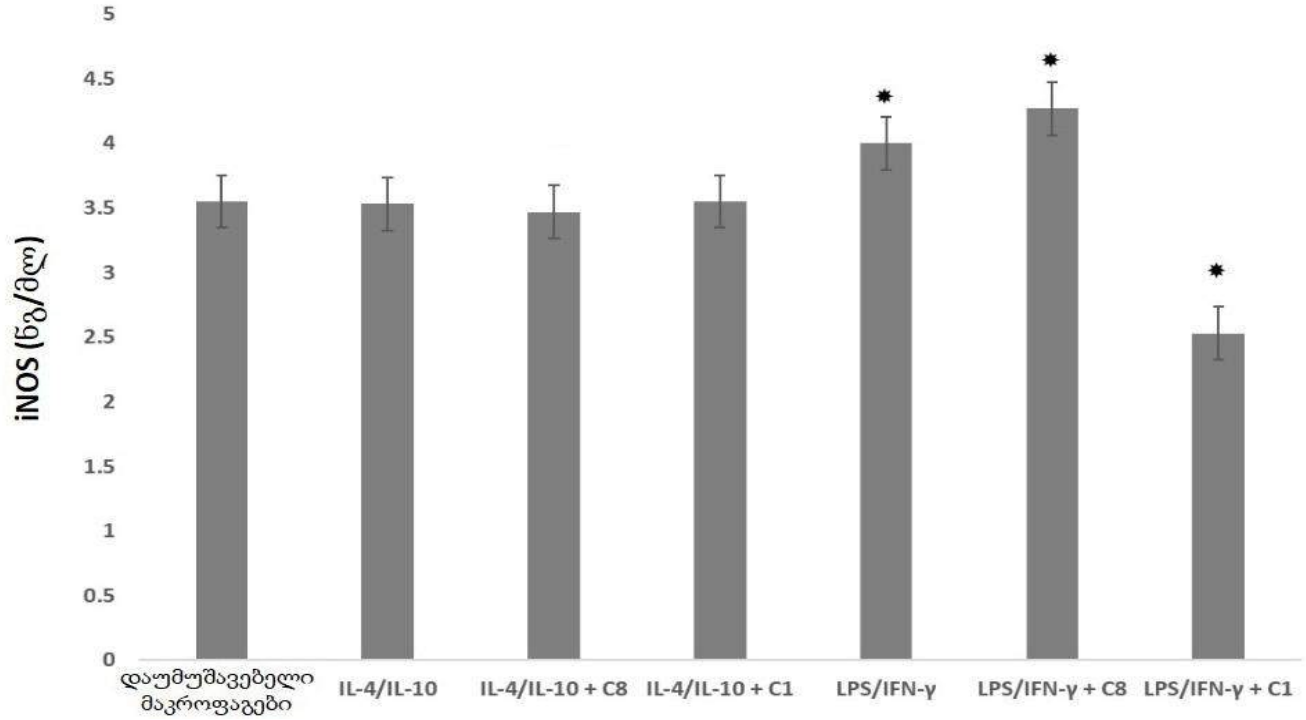
ექსპერიმენტების შემდეგ სერიაში, ინკუბაციის პროცესში მფც-ს იზომერებთან ერთად ვიყენებდით M1/M2 ფენოტიპების სპეციფიურ ციტოკინებს შესაბამისი კონცენტრაციებით: 20 ნგ/მლ IFN-γ და 100 ნგ/მლ LPS (M1 ფენოტიპად პოლარიზაციისთვის) და 20 ნგ/მლ IL-4 და 10 ნგ/მლ IL-10 (M2 ფენოტიპად პოლარიზაციისთვის). აღმოჩნდა, რომ მფც-ს C1 იზომერმა შეამცირა არგინაზა-1-ის ექსპრესია მაკროფაგების როგორც M1, ასევე M2 ფენოტიპში (სურ. 20).



სურათი 20. IFN-γ/ LPS-ითა და IL-4/IL-10-ით სტიმულირებულ მაკროფაგებში მფც-ს C1 და C8 იზომერების გავლენა არგინაზა-1-ის (M2 მარკერი) პროდუქციაზე.

ოთხი დამოუკიდებლად ჩატარებული პარალელური ექსპერიმენტიდან მონაცემი წარმოდგენილია საშუალო ± SEM-ით. *P<0.05 დაუმუშავებელ უჯრედებთან მიმართებაში.

გარდა ამისა, C1 იზომერმა მნიშვნელოვნად შეამცირა iNOS-ს ექსპრესია მაკროფაგების M1 ფეონოტიპში თუმცა, გავლენა არ მოუხდენია მაკროფაგების M2 ფენოტიპზე (სურ. 21). რაც შეეხება მფც-ს C8 იზომერს, მისი გავლენით არგინაზა-1-ის ექსპრესიის ცვლილება შესაბამის დიფერენცირებულ კონტროლთან მიმართებაში არ შეცვლილა M1 და M2 მაკროფაგებში, თუმცა დაუმუშავებელ მაკროფაგებთან მიმართებაში M1-ში შემცირდა და M2-ში კი გაიზარდა (სურ. 20). რაც შეეხება iNOS-ს ექსპრესიას C8 იზომერის ზემოქმედებით, მაკროფაგების M2 ფენოტიპში ცვლილება არ დაფიქსირებულა, ხოლო M1-ში შესაბამის, დიფერენცირებულ კონტროლთან მიმართებაში არ შეცვლილა, ხოლო დაუმუშავებელ უჯრედებთან შედარებით გაიზარდა (სურ. 21).



სურათი 21. IFN-γ/ LPS-ითა და IL-4/IL-10-ით სტიმულირებულ მაკროფაგებში მფც-ს C1 და C8 იზომერების გავლენა iNOS-ს (M1 მარკერი) პროდუქციაზე.

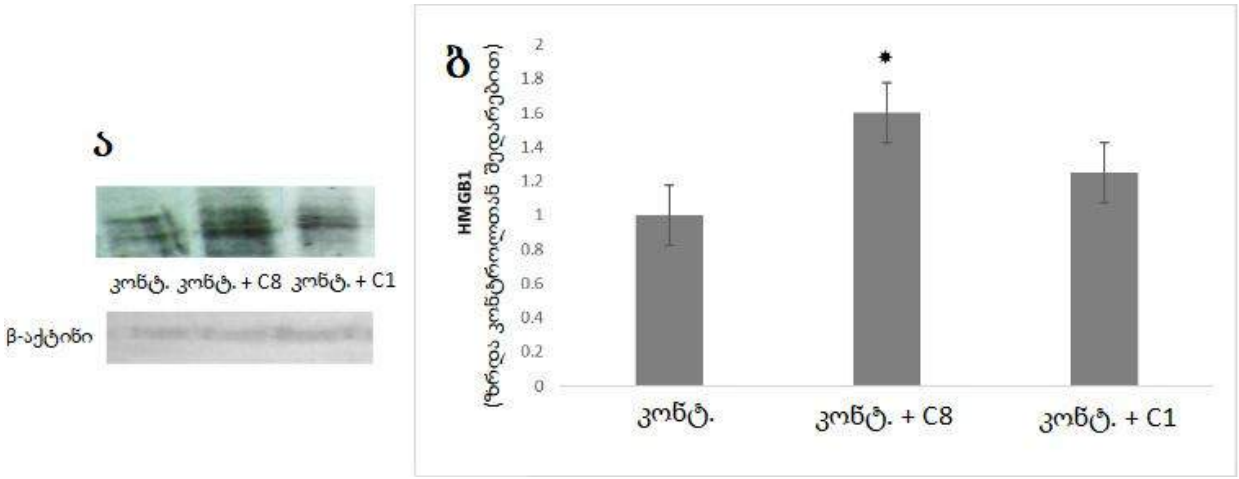
ოთხი დამოუკიდებლად ჩატარებული პარალელური ექსპერიმენტიდან მონაცემი წარმოდგენილია საშუალო ± SEM-ით. *P<0.05 დაუმუშავებელ უჯრედებთან მიმართებაში.

2.3. მფც-ს C1 და C8 მუხტისმიერი იზომერების გავლენა საკონტროლო არა-პოლარიზებულ RAW 264.7 მაკროფაგებში HMGB1-სა და RAGE-ს ექსპრესიაზე

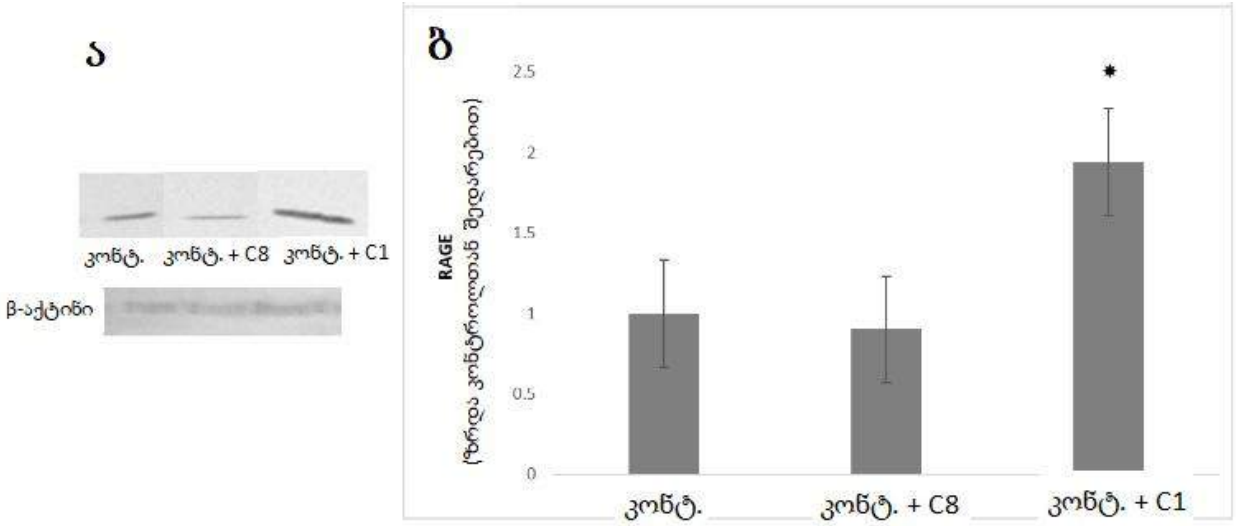
HMGB1 წარმოადგენს მნიშვნელოვან ფაქტორს, რომელიც ჩართულია უჯრედულ დიფერენციაციაში, მიგრაციაში, სიმსივნეების მეტასტაზირებასა და აუტოიმუნური დაავადებების პათოგენეზში (Harris HE. et al. 2012). პათოგენების არსებობით, დაზიანებული უჯრედების აღმოჩენით ან ციტოკინების მოქმედებით აქტივირებული მიელოიდური უჯრედები გამოათავისუფლებენ HMGB1-ს. მეორე მხრივ, TLR4-PI3Kγ-Erk1/2 გზით თავად HMGB1 განაპირობებს მაკროფაგების პოლარიზაციას ანთებითი M1 ფენოტიპისკენ (Su Z. et al. 2016). იმისათვის რომ შეგვესწავლა მფც-ს მუხტისმიერი იზომერების გავლენა HMGB1 ცილების სინთეზზე, უჯრედულ ლიზატებში განვსაზღვრეთ აღნიშნული ცილების რაოდენობა. განხორციელდა RAW 264.7 მაკროფაგების 24სთ-იანი ინკუბაცია 0.5 mM მფც-ს C1 და C8 იზომერებთან, რის შემდეგაც განვსაზღვრეთ HMGB1-ის ექსპრესია ვესტერნ ბლოტინგის მეთოდით. აღმოჩნდა, რომ მხოლოდ C8 იზომერი იწვევს HMGB1-ს ექსპრესიის ზრდას (სურ. 22 ა,ბ). აღნიშნული ცილის რაოდენობის ზრდა კი სავარაუდოდ მიუთითებს იმაზე, რომ მფც-ს C8 იზომერი შესაძლოა იწვევდეს მაკროფაგების M1 ფენოტიპად პოლარიზაციას.

მაკროფაგებში RAGE წარმოადგენს HMGB1-ის ანთებითი აქტივობის ძირითად სამიზნეს (Kokkola R. et al. 2005). აღნიშნული რეცეპტორი განაპირობებს

მაკროფაგების პოლარიზაციას ანთებითი M1 ფენოტიპისკენ ნაწილობრივ მაინც NF-κB გზის საშუალებით (Jin X. et al. 2015). შესაბამისად, ექსპერიმენტების შემდეგ სერიაში, მაკროფაგებში განსაზღვრულ იქნა RAGE-ს ექსპრესია უჯრედების C8 და C1 იზომერებით დამუშავების შემდეგ. განხორციელდა RAW 264.7 მაკროფაგების 24სთ-იანი ინკუბაცია 0.5 mM მფც-ს C1 და C8 იზომერებთან, რის შემდეგაც განვსაზღვრეთ HMGB1-ის ექსპრესია ვესტერნ ბლოტინგის მეთოდით. მოულოდნელი შედეგი იყო, რომ მფც-ს მხოლოდ C1-მა იზომერმა გამოიწვია RAGE-ს ექსპრესია, მაშინ როდესაც C8 იზომერს მის ექსპრესიაზე გავლენა არ მოუხდენია (სურ. 23 ა,ბ). აღნიშნული მონაცემების მიხედვით, სავარაუდოა, რომ C8 იზომერის უჯრედებზე ზემოქმედება არ მოიცავს RAGE-ს ექსპრესიაში ცვლილებებს და მხოლოდ C1 იზომერს შეუძლია იმოქმედოს RAGE-ზე დამოკიდებული მექანიზმით (Rojas A. et al. 2016).



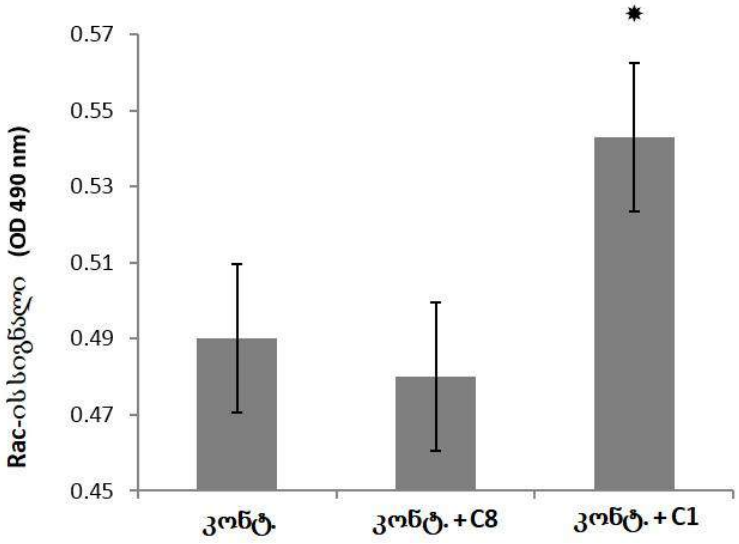
სურათი 22. RAW 264.7 მაკროფაგებში HMGB1-ის ექსპრესიის ცვლილება მფც-ს C8 და C1 იზომერების გავლენით. სამი დამოუკიდებლად ჩატარებული პარალელური ექსპერიმენტიდან მონაცემი წარმოდგენილია საშუალო ± SEM-ით. *P<0.05 საკონტროლო უჯრედებთან მიმართებაში.



სურათი 23. RAW 264.7 მაკროფაგებში RAGE-ს ექსპრესიის ცვლილება მფც-ს C8 და C1 იზომერების გავლენით. სამი დამოუკიდებლად ჩატარებული პარალელური ექსპერიმენტიდან მონაცემი წარმოდგენილია საშუალო ± SEM-ით. *P<0.05 საკონტროლო უჯრედებთან მიმართებაში.

2.4. მფც-ს C1 და C8 მუხტისმიერი იზომერების გავლენა საკონტროლო არა-პოლარიზებულ RAW 264.7 მაკროფაგებში Rac-ის აქტივაციაზე

არსებობს გარკვეული მონაცემები, რომ GTPაზა Rac აკონტროლებს მაკროფაგების პოლარიზაციას M2 ფენოტიპისკენ (Joshi S. et al. 2014; Joshi S. et al. 2017). უჯრედგარე მატრიქსიდან $\alpha_4\beta_1$ ინტეგრინის საშუალებით გადაცემული სიგნალები იწვევს Rac-ის აქტივირებას, რომელიც არეგულირებს მაკროფაგების პოლარიზაციას M2 ფენოტიპისკენ. იმისათვის რომ შეგვესწავლა Rac-ის როლი მფც-ს მუხტისმიერ იზომერებთან კორელაციაში, ვსაზღვრავდით აქტივირებული Rac-ის შემცველობას RAW 264.7 მაკროფაგების ლიზატებში. აღმოჩნდა, რომ RAW 264.7 მაკროფაგებში აქტივირებული Rac-ის შემცველობა იყო უფრო მაღალი უჯრედების მფც C1 იზომერით დამუშავების შემდეგ (სურ. 24).



სურათი 24. RAW 264.7 მაკროფაგებში Rac-ის აქტივობის ცვლილება მფც-ს C8 და C1 იზომერების გავლენით. ოთხი დამოუკიდებლად ჩატარებული პარალელური ექსპერიმეტიდან მონაცემი წარმოდგენილია საშუალო ± SEM-ით. *P<0.05 საკონტროლო უჯრედებთან მიმართებაში.

შედეგების განხილვა

თავი 1. მეტაბოტროპული გლუტამატის რეცეპტორ-5-ის გავლენა მაკროფაგთა პლასტიურობაზე

მაკროფაგები, რომელთა არსებობა დადასტურებულია ორგანიზმის ყველა ქსოვილში, წარმოადგენენ იმუნური სისტემის უჯრედების მნიშვნელოვან ჯგუფს. მათ ორი ძირითადი ფენოტიპი (M1 და M2) ააქტიურებს, თრგუნავს ან არეგულირებს როგორც თანდაყოლილი, ასევე, ადაპტური (შეძენილი) იმუნური სისტემის პასუხებს.

აღნიშნული ფენოტიპები ასრულებენ მნიშვნელოვან როლს კიბოს, აუტოიმუნური დაავადებებისა და მეტაბოლური დარღვევების პათოფიზიოლოგიაში (Murray PJ. et al. 2011). M1 ან M2 ფენოტიპის ჩამოყალიბებას განსაზღვრავს შესაბამისი მიკროგარემო და მათი ურთიერთტრანსფორმირება შესაძლებელია მიკროგარემოში არსებული ახალი სტიმულის საპასუხოდ (Stout RD. et al. 2004; Kasmi KC. et al. 2015). სისხლის პლაზმაში არსებული ციტოკინებსა და მიკროგარემოს სხვა კომპონენტებს შორის, გლუტამატი შესაძლოა წარმოადგენდეს მაკროფაგების/მიკროგლიის პლასტიურობის მარეგულირებელ ერთ-ერთ მნიშვნელოვან ფაქტორს (Jha AK. et al. 2015; Xue H. et al. 2011; David S. et al. 2015). აღნიშნული ამინომჟავა ასრულებს უმნიშვნელოვანეს როლს ამინომჟავათა მეტაბოლიზმში და პლაზმაში მისი კონცენტრაცია ნარჩუნდება 10-50 μM-ის ფარგლებში. პლაზმაში გლუტამატის მომატებული დონე კორელაციაშია ისეთ პათოლოგიებთან, როგორებიცაა: სიმსივნური წარმოშობის დაავადებები და ნევროლოგიური დარღვევები. რაც შეეხება გლუტამატის ნორმაზე დაბალ პლაზმურ კონცენტრაციას, მას უკავშირებენ აუტოიმუნური დაავადებების არსებობას. შესაბამისად, შემოთავაზებულია ჰიპოთეზა, რომ პლაზმური ან შრატში არსებული გლუტამატის კონცენტრაციის ზრდა მიუთითებს იმუნოდეფიციტზე, ხოლო მისი კონცენტრაციის შემცირება იმუნიტეტის ჭარბი აქტივობის მანიშნებელია (Xue H. et al. 2011).

გლუტამატერგული სისტემა შედგება გლუტამატის რეცეპტორებისა და გლუტამატის ტრანსპორტერებისგან - ნატრიუმ დამოკიდებული ამაგზნებელი ამინმომჟავების ტრანსპორტერები (EAAT - Excitatory amino acid transporters) და ნატრიუმ დამოუკიდებელი ცისტინ/გლუტამატ ანტიპორტერი (სისტემა xc- ან xCT) (Rimaniol A.C. et al. 2000). მაკროფაგები ისევე როგორც მიკროგლია, ახდენენ mGluR5-ის ექსპრესიას (Chiocchetti A. et al. 2006), რომლის აქტივაციაც დაფიქსირებულია როგორც ფიზიოლოგიურ, ასევე პათოლოგიურ მდგომარეობებში (Loane D.J. et al. 2012), თუმცა, აღნიშნული სისტემის როლი დღემდე ბუნდოვანია. ნაჩვენებია, რომ mGluR5-ის სელექციური აგონისტები ამცირებენ მიკროგლიის აქტივაციას და ახდენენ ანთებით მედიატორების სეკრეციის დაღმარეგულაციას LPS-ითა და IFN-γ-თ დამუშავებულ უჯრედებში (Byrnes KR. et al. 2009). რა თქმა უნდა, აღნიშნული ეფექტი

დაკავშირებულია მიკროგლიის M1/M2 ფენოტიპებს შორის ბალანსის M2 ფენოტიპისკენ გადახრასთან (Loane D.J. et al. 2014). იმისათვის, რომ დაგვედგინა გლუტამატური სისტემის როლი მაკროფაგების აქტივაციაში, განვახორციელეთ mGluR5-ის დნმ-პლაზმიდის ტრანსფექცია RAW 264.7 მაკროფაგებში. აღმოჩნდა, რომ მაკროფაგები, რომლებშიც mGluR5 ჭარბად იყო ექსპრესირებული, გამოიმუშავებდნენ მეტ IL-10-ს, ვიდრე არატრანსფექცირებული უჯრედები. გარდა ამისა, მაკროფაგებში mGluR5-ის დნმ-პლაზმიდის ტრანსფექციას გავლენა არ მოუხდენია უჯრედების მიერ NO-ს სეკრეციაზე. აღნიშნული მონაცემების მიხედვით, შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ mGluR5-ის ექსპრესია, ნაწილობრივ მაინც, გავლენას ახდენს მაკროფაგების პოლარიზაციაზე M2 ფენოტიპის მიმართულებით.

ნაჩვენებია, რომ mGluR1/5-ს გარკვეულ უჯრედებში შეუძლია შეასრულოს ონკოგენის როლი, შესაბამისად გლუტამატური სისტემის რეგულაცია შესაძლოა წარმოადგენდეს მნიშვნელოვან ფაქტორს სიმსივნეების პროგრესირებაში (Teh JL. et al. 2012). თუმცა, არც სიმსივნურ უჯრედებში და არც მიკროგლია/მაკროფაგებში mGluR5-ის სპეციფიკური სამიზნეები დადგენილი არაა. mGluR1/5-ის აქტივაცია ასტიმულირებს უჯრედშიდა მეტაბოლიზმს და გენების ექსპრესიას Ras/ERK და PI3K/mTOR სასიგნალო გზების მეშვეობით. ვინაიდან, იმუნურ უჯრედებში mTOR სასიგნალო გზა PPAR-γ-ის ექსპრესიისა და აქტივაციის საშუალებით აკონტროლებს მრავალ მეტაბოლურ პროცესს, მათ შორის - მაკროფაგების პოლარიზაციას (Laplante M. et al. 2012; Byles V. et al. 2013), ჩვენ ვივარაუდეთ, რომ შესაძლოა mGluR5-იც იღებდეს მონაწილეობას PPAR-γ-ის ექსპრესიის რეგულაციაში. mGluR5 ტრანსფექცირებულ და არატრანსფექცირებულ მაკროფაგებში PPAR-γ-ის ანალიზმა აჩვენა, რომ mGluR5-ის ჭარბი ექსპრესია ზრდის PPAR-γ-ის რაოდენობას. აღნიშნული მონაცემების მიხედვით შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ mGluR5 შესაძლოა მონაწილეობდეს მაკროფაგების პოლარიზაციაში PPAR-ზე დამოკიდებული ტრანსკრიფციური სისტემების მეშვეობით.

PPAR-γ აკონტროლებს გარკვეული გენების, მათ შორის EAAT2-ის, ექსპრესიას (Ching C. et al. 2015). EAAT2 წარმოადგენს მაკროფაგების გლუტამატით მომარაგების ძირითად ტრანსპორტერს, რომელიც ინარჩუნებს გლუტამატის მაღალ

კონცენტრაციულ გრადიენტს უჯრედშიდა და უჯრედგარე სივრცეებს შორის. EAAT2-ის მეშვეობით უჯრედშიდა არეში ტრანსპორტირებული გლუტამატი წარმოადგენს უშუალო პრეკურსორს გლუტათიონის სინთეზისთვის და ასევე, ხელს უწყობს ცისტეინის უჯრედშიდა სივრცეში ტრანსპორტირებას ცისტინ/გლუტამატ ანტიპორტერული სისტემის (xc-) საშუალებით, რითაც ინარჩუნებს გლუტათიონის უჯრედშიდა კონცენტრაციას და, შესაბამისად, უჯრედის ანტიოქსიდაციურ ბალანსს. გლუტამატის უჯრედგარე კონცენტრაციის მკვეთრი ზრდისას xc- სისტემა მოქმედებს შებრუნებულად და იწყებს გლუტამატის შთანთქმასა და ცისტინის, უჯრედის გარეთ ტრანსპორტირებას, რასაც მივყავართ გლუტანთიონის სინთეზისთვის არასაკმარისი ცისტინის რაოდენობამდე და ოქსიდაციურ სტრესამდე (Rimaniol AC. et al. 2001). ამიტომ, უჯრედის ჟანგვითი სტატუსის აღმგვარი ცვლილებები შესაძლოა გახდეს მაკროფაგების პლასტიურობისა და ფენოტიპის ცვლილების საფუძველი (Brüne B. et al. 2013). ჩვენს მიერ ჩატარებული კვლევის შედეგების მიხედვით ნაჩვენებ იქნა, რომ ტრანსფექცირებული RAW-mGluR5 მაკროფაგებში EAAT2-ისა და შესაბამისად, უჯრედშიდა გლუტამატის შემცველობა იყო უფრო მაღალი, ვიდრე საკონტროლო, არატრანსფექცირებულ RAW მაკროფაგებში. აღნიშნული მონაცემების მიხედვით შესაძლოა ვივარაუდოთ, რომ დაღმარეგულაციის ეფექტორული სისტემების აქტივირების გზით mGluR5 მონაწილეობს PPAR-γ-ზე დამოკიდებულ EAAT2-ის ექსპრესიაში, რაც ზრდის უჯრედების მიერ შთანთქმული გლუტამატის რაოდენობას. გლუტამატის უჯრედშიდა რაოდენობის ზრდა განაპირობებს ცისტინ/გლუტამატ ანტიპორტერული სისტემის შებრუნებულ მოქმედებას, რასაც მივყავართ უჯრედშიდა არეში ცისტინის დეფიციტამდე და გლუტათიონის სინთეზის დაღმარეგულაციამდე. უჯრედში გლუტათიონის შემცირებული რაოდენობით გამოწვეული ოქსიდაციური სტრესი კი შესაძლოა გახდეს მაკროფაგების M2 პოლარიზაციის განმაპირობებელი ფაქტორი (Biswas SK. et al. 2012).

PPAR-γ-ს შეუძლია გააკონტროლოს მაკროფაგების პოლარიზაცია რამდენიმე გზით. სხვა მეტაბოლურ ფაქტორებთან ერთად, PPAR-ებს შეუძლიათ გააძლიერონ NAD^+-ზე დამოკიდებული III კლასის პროტეინული დეაცეტილაზების (SIRT1) გენის ექსპრესია, რომელიც ახდენს HMGB1-ის დეაცეტილირებას მაკროფაგებში (Hwang JS.

et al. 2014). აღნიშნული მოდიფიკაცია ამცირებს LPS-ის მოქმედებით გამოწვეული HMGB1-ის სეკრეციას და ცვლის მაკროფაგების ანთებით პასუხს. მეორე მხრივ, HMGB1 ზრდის მიელოიდური წარმოშობის სუპრესორულ უჯრედებსა და მაკროფაგებს შორის კავშირსა და IL-10-ის სეკრეციას, რაც მიუთითებს მაკროფაგების სიმსივნური ფენოტიპისკენ პოლარიზაციაზე (Parker KH. et al. 2014; Sinha P. et al. 2007). ჩვენს მიერ მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა, რომ mGluR5-ის ტრანსფექციამ გაზარდა როგორც HMGB1-ის უჯრედშიდა კონცენტრაცია, ასევე, მისი სპონტანური გამოთავისუფლება მაკროფაგების მიერ. აღნიშნული შედეგების მიხედვით, შეგვიძლია ვთქვათ, რომ mGluR5-ის ჩართულობით წარმოქმნილი HMGB1 შესაძლოა წარმოადგენდეს წამყვან ფაქტორს მიელოიდური წარმოშობის სუპრესორულ უჯრედებსა და მაკროფაგებს შორის კავშირების დამყარების პროცესში (Parker KH. et al. 2014; Sinha P. et al. 2007).

დღესდღეობით არსებობს კვლევაზე დამყარებული მონაცემების დიდი რაოდენობა, რომელიც მიუთითებს იმუნურ ტოლერანტობასა და ჰომეოსტაზის პროცესებში გალექტინ-3-ის ჩართულობაზე (Rabinovich GA. et al. 2009). ალტერნატიურად აქტივირებული მაკროფაგების იმუნოსუპრესორულ ფენოტიპში ნაჩვენებია გალექტინ-3-ის ექსპრესიის გაცილებით მაღალი დონე, ვიდრე კლასიკურად აქტივირებულ მაკროფაგებში, რაც მიუთითებს გალექტინ-3-ის სპეციფიკური მარკერის როლზე M2 ფენოტიპის მაკროფაგებისთვის . მაკროფაგების კლასიკურად აქტივირება LPS-ით თრგუნავს გალექტინ-3-ის ექსპრესიასა და გამოთავისუფლებას, მაშინ როდესაც მაკროფაგების ალტერნატიული აქტივირება IL-4/IL-13-ით განაპირობებს გალექტინ-3-ის როგორც ბიოსინთეზის, ასევე გამოთავისუფლების გაზრდას (MacKinnon AC. et al. 2008; Novak R. et al. 2011). ჩვენს მიერ ჩატარებული კვლევის შედეგებმა აჩვენა, რომ მაკროფაგებში mGluR5-ის მაკოდირებელი დნმ-პლაზმიდის ტრანსფექციამ გაზარდა გალექტინ-3-ის სეკრეცია, რომელიც განიცდიდა დაღმა რეგულაციას LPS-ის მოქმედების შედეგად. აღნიშნული შედეგები კიდევ ერთხელ ადასტურებს ფაქტს, რომ mGluR5-ის ჭარბი ექსპრესია გადახრის მაკროფაგების პოლარიზაციას M2 ფენოტიპისკენ (Shanshiashvili et al. 2017).

თავი 2. მფც-ს C1 და C8 მუხტისმიერი იზომერების გავლენა RAW 264.7 მაკროფაგების პლასტიურობაზე

ზრდასრულ ადამიანებში მფც-ს ძირითადი კლასიკური ფორმა 18.5 kDa მფც, წარმოადგენს დადებითად დამუხტულ ცილოვან კომპონენტს, რომლის ჯამური მუხტიც შესაძლოა შემცირდეს ისეთ პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციების შედეგად როგორებიცა: დეამიდირება, სერინისა და ტრეონინის ფოსფორილირება და არგინინის დეიმინირება, რომელის პროდუქტსაც წარმოადგენს ციტრულინი (Harauz G. et al. 2004; Harauz G. et al. 2009). კათიონ-ცვლადი სვეტიდან ელუირების თანმიმდევრობის მიხედვით მფც-ს მუხტისმიერი იზომერები დანომრილია C8-დან C1-ის ჩათვლით. აღნიშნულ ნაშრომში ჩვენ შევისწავლეთ კლასიკური 18.5 kDa მფც-ს ორი მუხტისმიერი იზომერის, C8 და C1-ის, გავლენა RAW 264.7 მაკროფაგებში ფენოტიპური მარკერების ექსპრესიის ცვლილებაზე. C1 იზომერი წარმოადგენს მფც-ს ყველაზე კათიონურ და შესაბამისად, ყველაზე ნაკლებად მოდიფიცირებულ ფორმას, მაშინ როდესაც C8 იზომერი ხასიათდება მასში დადებით მუხტის ყველაზე ნაკლებად არსებობით და მიიჩნევა მფც-ს ყველაზე მეტად მოდიფიცირებულ ფორმად. C8 წარმოადგენს მფც-ს ყველაზე მეტად დეიმინირებულ იზომერს, რომელიც C1 იზომერისგან განსხვავდება 6-11 დეიმინირებული არგინინის ანუ ციტრულინის შემცველობით (Wood DD. et al. 1989). ნაჩვენებია, რომ დეიმინირება არღვევს მფც-ს მესამეულ სტრუქტურას (Harauz G. et al. 2007). დეიმინირებული მფც ბუნებრივად არსებულ ფორმასთან შედარებით სტრუქტურულად ნაკლებად მოწესრიგებული და პროტეოლიზური შეტევის მიმართ ნაკლებად რეზისტენტულია (Pritzker LB. et al. 2000). საინტერესოა, რომ C8/C1-ის თანაფარდობა რამდენჯერმე იზრდება ქრონიკული გაფანტული სკლეროზით დაავადებულ პაციენტებში, რაც სავარაუდოს ხდის მფც-ს დეიმინირებისა და დემიელინიზაციით მიმდინარე დაავადებებს შორის კავშირს (Harauz G. et al. 2007, Harauz G. et al. 2009).

მფც-ს შეუძლია კავშირის დამყარება როგორც უჯრედშიდა, ასევე უჯრედის ზედაპირზე ექსპრესირებულ მოლეკულებთან, როგორებიცაა: MARCKS, Kras, 4B, Src, ტუბულინი, კლატრინი, კალმოდულინი, აქტინი და ა.შ. (Boggs JM. 2006).

უკანასკნელი კვლევების მიხედვით მფც წარმოადგენს αMβ2 (Mac 1, CD11b/CD18) ინტეგრინის ძლიერ და სპეციფიკურ ლიგანდს (Stapulionis R. et al. 2008). Mac 1 ძირითადად ექსპრესირდება მიელოიდურ უჯრედებზე და განაპირობებს ანთებითი პროცესების მიმდინარეობისას ლეიკოციტების ადგეზიურ რეაქციებს (Prince JE. et al. 2001). ნაჩვენებია, რომ მფც-ს ყველაზე ნაკლებად ჩაკეცილი კონფორმაციის მქონე სტრუქტურულ ერთეულებს ახასიათებს ყველაზე მაღალი აფინურობა აღნიშნული ინტეგრინის მიმართ (Stapulionis R. et al. 2008). ვინაიდან მფც-ს აფინურობა Mac 1-ის მიმართ დამოკიდებულია მფც-ს მეორეულ/მესამეულ სტრუქტურებზე, ჩვენ ვივარაუდეთ, რომ შესაძლოა აღნიშნული ცილის სხვადასხვა იზომერები მაკროფაგების აქტივობაზე ახდენენ სხვადასხვა გავლენას.

აღმოჩნდა, რომ მფც-ს ყველაზე ნაკლებად მოდიფიცირებული იზომერი C1 ზრდის არგინაზა-1 (M2 მარკერი)-ის, და ამცირებს iNOS (M1 მარკერი) ექსპრესიას. გარდა ამისა, არ ცვლის HMGB1-ის ექსპრესიას, თუმცა საგრძნობლად ზრდის RAGE-ს ექსპრესიასა და Rac-ის აქტივობას. მეორე მხრივ, ძლიერ მოდიფიცირებული, დეიმინირებული C8 იზომერი ზრდის HMGB1-ის, მაგრამ არ ცვლის არც არგინაზა-1-ისა და არც RAGE-ს შემცველობას. აღნიშნული მონაცემები მიუთითებს იმაზე, რომ მფც-ს მუხტისმიერი C8 და C1 იზომერები განსხვავებულად მოქმედებენ RAW 264.7 მაკროფაგების ზედაპირულ ცილებზე (სავარაუდოდ αMβ2 ინტეგრინზე). აქედან გამომდინარე, C8 იზომერი ავლენს RAW 264.7 მაკროფაგების M1 ფენოტიპისკენ პოლარიზების უნარს, ხოლო C1 იზომერი მსგავსი თვისებით არ ხასიათდება, უფრო მეტიც, მისი გავლენით მაკროფაგებში იზრდება M2 ფენოტიპის მარკერების ექსპრესია. C1 იზომერი ასევე განაპირობებს Rac-ის აქტივაციას, რაც შესაძლოა გამოწვეული იყოს αMβ2 ინტეგრინის რეცეპტორზე ზემოქმედების მექანიზმით (Joshi S. et al. 2014). აღნიშნული მცირე GTP-აზა აკონტროლებს როგორც მაკროფაგების M1 და M2 ფენოტიპად დიფერენციაციას, ასევე, მაკროფაგების მეტასტაზური ფენოტიპის *in vivo* ფორმირებას. შესაბამისად, მფც-ს იზომერებს, პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციების, განსაკუთრებით კი დეიმინირების, ინტენსივობის მიხედვით, შეუძლიათ იმოქმედონ როგორც მაკროფაგების ანთებითი პოტენციალის

ინდუცირების, ასევე, მათი იმუნოსუპრესორულ ფენოტიპად დიფერენცირების მიმართულებით.

ჩვენს მიერ ჩატარებული კვლევის შედეგების მიხედვით შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ უჯრედგარე გლუტამატი და mGluR5 შესაძლოა მონაწილეობდნენ მაკროფაგების პლასტიურობაში PPAR-γ-სა და EAAT2-ის ექსპრესიის გაზრდის საშუალებით. მაშინ როდესაც, უჯრედშიდა გლუტამატის კონცენტრაციის ზრდა მაკროფაგების პოლარიზებას შესაძლოა იწვევდეს ოქსიდაციური მეტაბოლიზმის გადაწყობის გზით. იმ შედეგების გათვალისწინებით, რომ mGluR5-ის ტრანსფექცია აძლიერებს IL-10-ის სეკრეციას და ცვლის HMGB1-ისა და გალექტინის სეკრეციის დონეს, ჩვენ ვვარაუდობთ, რომ მაკროფაგების გლუტამატური რეგულაცია მონაწილეობს მაკროფაგების პოლარიზაციის M2 ფენოტიპისკენ გადახრის პროცესში. მაკროფაგების აღნიშნულ ფენოტიპად პოლარიზებამ კი შესაძლოა განაპირობოს ანთების საწინააღმდეგო პასუხის ჩამოყალიბება სიმსივნური დაავადებების მიმდინარეობისას. თუმცა, მხოლოდ სიმსივნური დაავადებები არ მოიაზრება მაკროფაგთა პლასტიურობის სამიზნედ. პოლარიზაცია ასევე შესაძლოა მიმდინარეობდეს სხვადასხვა ნერვული დაავადებების ფონზე. ამის გამო, ექსპერიმენტების მეორე ნაწილი მივუძღვენით ნერვული სისტემის, კერძოდ კი გლიის ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი ცილის - მიელინის ფუძე ცილის მუხტით განპირობებული იზომერების გავლენას მაკროფაგთა პოლარიზაციაზე. ნერვული დაზიანებისას იმუნური უჯრედების დიდი ნაწილი ახერხებს ინფილტრაციას ცნს-ში, დაზიანებულ უბანთან (Plemel JR, 2014). შესაბამისად, დემიელინიზაციის აქტიური უბნები ხასიათდებიან როგორც მიელინის შრისგან დისოცირებული თავისუფალი მფც-ს დემიელინიზაციის მიკროგარემოში გამოთავისუფლებით, ასევე, დემიელინიზაციის უბანში მფც-პოზიტიური მაკროფაგების ინფილტრაციით (Kuhlmann T. et al. 2002). მიელინის გარსის დაზიანების შემდეგ მფც შორდება პლაზმურ მემბრანას და უჯრედგარე მატრიქსში მოქმედებს თავისუფალი ცილის სახით (Boggs JM. 2006). ჩვენ ვასკნით, რომ მიკროგარემოში მფც-ს დეიმინირებული იზომერების, მაგალითად როგორიცაა მფც-ს C8 იზომერი, არსებობა ხელს უწყობს

მიელინის გარსის დაზიანების პროცესების პროგრესირებას. რაც შეეხება მფც-ს ნაკლებად მოდიფიცირებულ იზომერს - C1-ს, მას აქვს პოტენციალი დადებითად იმოქმედოს რემიელინიზაციისა და მიელინის გარსის რესტავრაციის პროცესზე.

დასკვნები

- უჯრედგარე გლუტამატი და mGluR5 შესაძლოა მონაწილეობდნენ მაკროფაგების პლასტიურობაში.
- mGluR5-ის მონაწილეობა მაკროფაგების პლასტიურობაში განპირობებულია PPAR-γ-სა და EAAT2-ის ექსპრესიის გაზრდით.
- მაკროფაგების გლუტამატური რეგულაცია მონაწილეობს მაკროფაგების პოლარიზაციის M2 ფენოტიპისკენ გადახრის პროცესში.
- მიკროგარემოში მფც-ს დეიმინირებული იზომერის - მფც C8-ს არსებობა ხელს უწყობს მიელინის გარსის დაზიანების პროცესების პროგრესირებას.
- მფც-ს ნაკლებად მოდიფიცირებულ იზომერ - C1-ს, შეუძლია დადებითად იმოქმედოს რემიელინიზაციისა და მიელინის გარსის რესტავრაციის პროცესზე.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. Adams D. O. 1989 ,,Molecular interactions in macrophage activation. Immunol Today, 10, 33-5.
2. Ajami B., Bennett J. L., Krieger C., McNagny K. M., and Rossi F.M. V. 2011. “Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool,” Nature Neuroscience, vol. 14, no. 9, pp. 1142–1150.
3. Akira S. and Sato S. 2003. “Toll-like receptors and their signalingmechanisms,” Scandinavian Journal of Infectious Diseases, vol. 35, no. 9, pp. 555–562.

4. Algeciras ME, Takahara H, Bhattacharya SK. 2008. ,,Mechanical stretching elevates peptidyl arginine deiminase 2 expression in astrocytes". Curr Eye Res 33:994 – 1001.
5. Allen J.W., Knoblach S.M. & Faden A.I. 2000. ,,Activation of group I metabotropic glutamate receptors reduces neuronal apoptosis but increases necrotic cell death in vitro". Cell Death Differentiation 7 470–476.
6. Andersson A, Covacu R, Sunnemark D, Danilov AI, Bianco AD, Khademi M, Wallstrom E, Lobell A, Brundin L, Lassmann H, Harris RA. 2008. ,,Pivotal Advance: HMGB1 expression in active lesions of human and experimental multiple sclerosis". J Leukoc Biol. 84(5): 1248-55.
7. Anderson C. F. & Mosser D. M. 2002. ,,A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage". J Leukoc Biol, 72, 101-6.
8. Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, Janson A, Kokkola R, Zhang M, Yang H, Tracey KJ. 2000. ,,High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes". J Exp Med. 192:565–70
9. Arnold L., Henry A., Poron F., Baba-Amer Y., van Rooijen N. and Plonquet A. 2007. ,,Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis". J. Exp. Med. 204 1057–1069.
10. Aronica E., Catania M.V., Geurts J., Yankaya B. & Troost D. 2001. ,,Immunohistochemical localization of group I and II metabotropic glutamate receptors in control and amyotrophic lateral sclerosis human spinal cord: upregulationin reactive astrocytes". Neuroscience 105 509–520.
11. Back S. A., Tuohy T. M. F., Chen H. et al. 2005. "Hyaluronan accumulates in demyelinated lesions and inhibits oligodendrocyte progenitormaturation," Nature Medicine, vol. 11, no. 9, pp. 966– 972.
12. Bannai S. 1986. ,,Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts". J. Biol. Chem. 261, 2256–2263.
13. Barth M.W., Hendrzak J.A., Melnicoff M.J. and Morahan P.S. 1995. ,,Review of the macrophage disappearance reaction". J. Leukocyte Biol. 57 361–367.
14. Bar-Peled O, Ben-Hur H, Biegon A, Groner Y, Dewhurst S, Furuta A, Rothstein JD. 1997. ,,Distribution of glutamate transporter subtypes during human brain development". J Neurochem. 69:2571–2580.

15. Beart PM, O'Shea RD. 2007. „Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement". Br J Pharmacol. 150:5–17.
16. Bell CW, Jiang W, Reich CF, Pisetsky DS. 2006. „The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death". Am J Physiol Cell Physiol 291: C1318-25.
17. Ben-Nun A., Wekerle H., and Cohen I. R. 1981. "The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis," European Journal of Immunology, vol. 11, no. 3, pp. 195–199.
18. Besong G., Battaglia G., D'Onofrio M., Di Marco R., Ngomba R.T., Storto M., Castiglione M., Mangano K., Busceti C.L. & Nicoletti F.R. 2002. Activation of group III metabotropic glutamate receptors inhibits the production of RANTES in glial cell cultures. *J. Neurosci.* 22 5403–5411.
19. Biswas SK, Mantovani A. 2012. „Orchestration of Metabolism by Macrophages". Cell Metab. 15(4):432–7.
20. Boggs JM. 2006. „Myelin basic protein: a multifunctional protein". *Cell Mol Life Sci*. 63(17):1945–1961.
21. Bosco E. E., Mulloy J. C., and Zheng Y. 2009.. „Rac1 GTPase: A "Rac" of All Trades". Cellular and Molecular Life Sciences. 66:370.
22. Bridges R., Natale N., and Patel S. 2012. „System xc cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS". Br J Pharmacol. 165(1):20-34. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01480.x.
23. Brinar V., Petelin Ž., Brinar M., Djaković V., Zadro I., Vranješ V. 2006. „CNS demyelination in autoimmune diseases". Clinical Neurology and Neurosurgery. Volume 108, Pages 318-326.
24. Brown E.M., Gamba G., Riccardi D., Lombardi M., Butters R., Kifor O., Sun A., Hediger M.A., Lytton J. & Hebert S.C. 1993. „Cloning and characterization of an extracellular Ca2+- sensing receptor from bovine parathyroid". Nature 366 575–580.
25. Brüne B, Dehne N, Grossmann N, Jung M, Namgaladze D, Schmid T, von Knethen A, Weigert A. 2013. „ Redox control of inflammation in macrophages". Antioxid Redox Signal. 19(6):595–637.
26. Byles V, Covarrubias AJ, Ben-Sahra I, Lamming DW, Sabatini DM, Manning BD, Horng T. 2013. „The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization". Nat Commun. doi:10.1038/ncomms3834.

27. Byrnes KR, Stoica B, Loane DJ, Riccio A, Davis MI, Faden AI. 2009. ,,mGluR5 activation inhibits microglial associated inflammation and neurotoxicity". Glia. 57(5):550–60.
28. Cai Z., Schools G.P. & Kimelberg H.K. 2000. ,,Metabotropic glutamate receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes: developmental changes of mGluR5 mRNA and functional expression". *Glia* 29 70–80
29. Carlin J. M., Borden E. C. & Byrne G. I. 1989. ,,Interferoninduced indoleamine 2,3-dioxygenase activity inhibits Chlamydia psittaci replication in human macrophages. J Interferon Res, 9, 329-37
30. Chawla A. 2010. ,,Control of macrophage activation and function by PPARs"Circ Res 106(10): 1559–1569. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.216523.
31. Ching C, Amiridis S, Stylli SS, Bjorksten AR, Kountouri N, Zheng Th, Paradiso L, Luwor RB, Morokoff AP, O'Brien TJ, Kaye AH. 2015. ,,The peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist pioglitazone increases functional expression of the glutamate transporter excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2) in human glioblastoma cells". Oncotarget. 6(25):21301–14.
32. Chiocchetti A, Miglio G, Mesturini R, Varsaldi F, Mocellin M, Orilieri E, Dianzani C, Fantozzi R, Dianzani U, Lombardi G. 2006. ,,Group I mGlu receptor stimulation inhibits activation-induced cell death of human T lymphocytes". Br J Pharmacol. 148:760–8.
33. Chou FC, Chou CH, Shapira R, Kibler RF. 1976. ,,Basis of microheterogeneity of myelin basic protein". J Biol Chem. 251(9):2671–2679.
34. Cusick M. Libbey J., and Fujinami R. 2012. ,,Molecular Mimicry as a Mechanism of Autoimmune Disease". Clin Rev Allergy Immunol. February ; 42(1): 102–111. doi:10.1007/s12016-011-8294-7.
35. Danbolt NC, Storm-Mathisen J, Kanner BI. 1992. ,,An [Na+ + K+]coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes". Neuroscience. 51:295–310.
36. Davalos D., Grutzendler J., Yang G., Kim J.V., Zuo Y., Jung S., Littman D.R., Dustin M.L. & Gan, W.B. 2005. ,,ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo". Nature Neurosci. 8 752–758.
37. David S, Greenhalgh AD, Kroner A. 2015. ,,Macrophage and microglial plasticity in the injured spinal cord". Neuroscience. 307:311–8.

38. Deng W., Wang H., Rosenberg P.A., Volpe J.J. & Jensen F.E. 2004. ,,Role of metabotropic glutamate receptors in oligodendrocyte excitotoxicity and oxidative stress". Proc. Natl Acad. Sci. USA 101 7751–7756.
39. Díaz-Alvarez L. and Ortega E. 2017. ,,The Many Roles of Galectin-3, a Multifaceted Molecule, in Innate Immune Responses against Pathogens". Hindawi Mediators of Inflammation Volume 2017, Article ID 9247574. https://doi.org/10.1155/2017/9247574
40. Dorner M., Brandt S., Tinguely M. et al. 2009. "Plasma cell tolllike receptor (TLR) expression differs from that of B cells, and plasma cell TLR triggering enhances immunoglobulin production," Immunology, vol. 128, no. 4, pp. 573–579.
41. Duffield J. S. 2003. ,,The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde". Clin Sci (Lond), 104, 27-38
42. Duluc D. 2007. ,,Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. Blood 110 4319–4330.
43. Dumic J., Dabelic S., and Flogel M. 2006. "Galectin-3: an openended story," Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1760, no. 4, pp. 616–635
44. Dupuy A, CaronE. 2008. ,,Integrin-dependent phagocytosis – spreading from microadhesion to new concepts". Journal of Cell Science. 121(11):1773- 1783.
45. Engelhardt B. 2008. ,,The blood-central nervous system barriers actively control immune cell entry into the central nervous system". Curr Pharm Des. 14: 1555-1565.
46. Erickson MA, Banks WA. 2013. ,,Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease". J Cereb Blood Flow Metab. 33(10):1500-13.
47. Erwig L.P. and Henson P.M. 2007. ,,Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis". Am. J. Pathol. 171 2–8.
48. Ezekowitz R. A. & Gordon S. 1984. ,,Alterations of surface properties by macrophage activation: expression of receptors for Fc and mannose-terminal glycoproteins and differentiation antigens". Contemp Top Immunobiol, 13, 33- 56
49. Fagni L., Ango F., Perroy J. & Bockaert J. 2004. ,,Identification and functional roles of metabotropic glutamate receptorinteracting proteins". Seminars Cell Development Biol. 15 289–298.
50. Fairman WA, Amara SG. 1999 ,,Functional diversity of excitatory amino acid transporters: ion channel and transport modes". Am J Physiol. 277:481–486.
51. Fakhoury M. 2015. ,,Role of Immunity and Inflammation in the Pathophysiology of Neurodegenerative Diseases". Neurodegenerative Diseases; Vol. 0, No. 0, Year (Cover

Date: Online First) Journal Editor: Hock C. (Zürich), Nitsch R.M. (Zürich), Rajendran L. (Zürich) ISSN: 1660-2854 (Print), eISSN: 1660-2862

52. Folch P.J. 1973. Proteolipids In Proteins of the nervous system. Shneider D.J. (ed.). Raven Press, New York, 45-66.
53. Ferraguti F. & Shigemoto R. 2006. ,,Metabotropic glutamate receptors". Cell Tissue Res. 326 483–504
54. Fraternale A, Brundu S, Magnani M. 2015 ,,Polarization and repolarization of macrophages". J Clin Cell Immunol.. doi:10.4172/2155-9899.1000319.
55. Frischer S., Bramow A., Dal-Bianco et al. 2009. "The relation between inflammation and neurodegeneration inmultiple sclerosis brains," Brain, vol. 132, no. 5, pp. 1175–1189.
56. Fritsch K., Mernberger M., Nist A., Stiewe T., Brehm A., and Jacob R. 2016. "Galectin-3 interacts with components of the nuclear ribonucleoprotein complex," BMC Cancer, vol. 16, no. 1, p. 502.
57. Fujinami RS, Oldstone MBA, Wroblewska Z, Frankel ME, Koprowski H. 1983. Molecular mimicry in virus infection: Crossreaction of measles virus phosphoprotein or of herpes simplex virus protein with human intermediate filaments. Proc Natl Acad Sci USA. 80:2346–2350.
58. Fujinami RS, von Herrath MG, Christen U, Whitton JL. 2006. ,,Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease". Clin Microbiol Rev. 19:80–94.
59. Furuta A, Rothstein JD, Martin LJ. 1997. ,,Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development". J Neurosci. 17:8363–8375.
60. Galdiero M., Finamore E. et al. 2004. "Haemophilus infiuenzae porin induces toll-like receptor 2-mediated cytokine production in human monocytes and mouse macrophages," Infection and Immunity, vol. 72, no. 2, pp. 1204–1209.
61. Ganel R., Rothstein JD. 1999. ,,Glutamate transporter dysfunction and neuronal death". In: Hannah, M.; Adelmann, GA.; Peter, J., editors. Ionotropic glutamate receptors in the CNS. Berlin: Springer; p. 472-493.
62. Gautier, E.L., Jakubzick, C. and Randolph, G.J. 2009.,,Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis". Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biol. 29 1412–1418.

63. Gautier E.L., Shay T., Miller J, Greter M., Jakubzick C. and Ivanov S. 2012. „Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages". Nature Immunol. 13 1118–1128.
64. Geurts J.J., Wolswijk G., Bo L., Redeker S., Ramkema M., Troost D. & Aronica E. 2005. Expression patterns of Group III metabotropic glutamate receptors mGluR4 and mGluR8 in multiple sclerosis lesions. J. Neuroimmunol. 158 182–190.
65. Geurts J.J., Wolswijk G., Bo L., van der Valk, P., Polman C.H., Troost D. & Aronica E. 2003. „Altered expression patterns of group I and II metabotropic glutamate receptors in multiple sclerosis". Brain 126 1755–1766.
66. Giacomini E., Severa M., Rizzo F. et al. 2013. "IFN-γ therapy modulates B-cell and monocyte crosstalk via TLR7 in multiple sclerosis patients," European Journal of Immunology, vol. 43, no. 7, pp. 1963–1972.
67. Ginhoux F. and Jung S. 2014. „Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis". Nature Rev. Immunol. 14 392–404.
68. Gordon S. 2003. „Alternative activation of macrophages". Nat Rev Immunol, 3, 23-35
69. Gordon, S. 2007. „The macrophage: past, present and future". Eur.J. Immunol. 37 S9–S17.
70. Gotoh T., Sonoki T., Nagasaki A., Terada K. and Takiguchi M. 1996. „Molecular cloning of cDNA for nonhepatic mitochondrial arginase (arginase II) and comparison of its induction with nitric oxide synthase in a murine macrophage-like cell line". FEBS Lett. 395 119–122.
71. Goverman J. 2009. „Autoimmune T cell responses in the central nervous system". Nat Rev Immunol. 9(6):393-407.
72. Gras G., Samah B., Hubert A., Léone C., Porcheray F., Rimaniol. AC. 2012. EAAT expression by macrophages and microglia: still more questions than answers. Amino Acids. 42(1):221-9. doi: 10.1007/s00726-011-0866-6.
73. Gratchev A., Guillot P., Hakiy N., Politz O., Orfanos C. E., Schledzewski K. & Goerdt S. 2001. „Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein betaIG-H3". Scand J Immunol, 53, 386-92.
74. Gruenheid S. & Gros P. 2000. „Genetic susceptibility to intracellular infections: Nramp1, macrophage function and divalent cations transport". Curr Opin Microbiol, 3, 43-8.
75. Gupta R, Chattopadhyay D. 2009. „Glutamate is the chemotaxis-inducing factor in placental extracts". Amino Acids. 37:359–66.

76. György B, Tóth E, Tarcsa E, et al. 2006. ,,Citrullination: a posttranslational modification in health and disease". Int J Biochem Cell Biol 38:1662–77.
77. Hall A. 1998. ,,Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton". Science 279 509–514.
78. Hanafy K. A. and Sloane J. A. 2011. "Regulation of remyelination in multiple sclerosis," FEBS Letters, vol. 585, no. 23, pp. 3821–3828.
79. Harauz G, Ishiyama N, Hill CMD, Bates IR, Libich DS, Fares C. 2004. ,,Myelin basic protein-diverse conformational states of an intrinsically unstructured protein and its roles in myelin assembly and multiple sclerosis". Micron 35:503–542
80. Harauz G, Libich DS. 2009. ,,The classic basic protein of myelin – conserved structural motifs and the dynamic molecular barcode involved in membrane adhesion and protein-protein interactions". *Curr Protein Pept Sci*. 10(3):196–215.
81. Harauz G, Musse AA. 2007. ,,A tale of two citrullines – structural and functional aspects of myelin basic protein deimination in health and disease". Neurochem Res. 32(2):137–158.
82. Harris HE, Andersson U, Pisetsky DS. 2012. ,,HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease". Nat Rev Rheumatol. 8:195–202.
83. Hesse M. 2001. ,,Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of larginin metabolism". J. Immunol. 167 6533–6544.
84. Hollmann M. & Heinemann S. 1994. ,,Cloned glutamate receptors". A. Rev. Neurosci. 17 31–108.
85. Høglund R. A., Maghazachi A.A. 2014. ,,Multiple sclerosis and the role of immune cells". World J Exp Med. 20; 4(3): 27-37 ISSN 2220-315X.
86. Huynh J. L., Casaccia P. 2013. ,,Epigenetic mechanisms in multiple sclerosis: implications for pathogenesis and treatment". Lancet Neurol 12: 195–206
87. Hwang JS, Lee WJ, Kang ES, Ham SA, Yoo T, Paek KS, Lim DS, Do JT, Seo HG. 2014. ,,Ligand-activated peroxisome proliferator-activated receptor-δ and -γ inhibit lipopolysaccharide-primed release of high mobility group box 1 through upregulation of SIRT1". Cell Death Dis. 5(10):e1432. doi:10.1038/cddis.2014.406.
88. Hynes R.O. 2002. ,,Integrins: Bidirectional, allosteric signalling machines". Cell. 110, 673–687.
89. Italiani P. and Boraschi D. 2014. ,,From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. Frontiers Immunol. 5 514.

90. Jacobs E.C., Pribyl T.M., Feng J.-M., Kampf K., Spreur V., Campagnoni C., et al. 2005. ,,Region-specific myelin pathology in mice lacking the golli products of the myelin basic protein gene". J.Neurosci. 25,7004–7013.doi: 10.1523/JNEUROSCI.0288-05.

91. Jarrossay D., Napolitani G., Colonna M., Sallusto F., and Lanzavecchia A. 2001. "Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells," European Journal of Immunology, vol. 31, no. 11, pp. 3388–3393.

92. Jha AK, Huang SC, Sergushichev A, Lampropoulou V, Ivanova Y, Loginicheva E, Chmielewski K, Stewart KM, Ashall J, Everts B, Pearce EJ, Driggers EM, Artyomov MN. 2015. ,,Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization". Immunity. 42:419–30.

93. Jin X, Tongqing Y, Zhong'e Z, et al. 2015. ,,Advanced Glycation End Products Enhance Macrophages Polarization into M1 Phenotype through Activating RAGE/NF-*κ*B Pathway". BioMed Research International.

94. Jong Y.J., Sergin I., Purgert C.A. & O'Malley K.L. 2014. ,,Location dependent signaling of the group 1 metabotropic glutamate receptor mGlu5". *Molec. Pharmacol.* 86 774–785.

95. Joshi S, Singh AR, Zulcic M, et al. 2014. ,,Rac2 controls tumor growth, metastasis and M1-M2 macrophage differentiation in vivo". PLoS One. 9(4):e95893.

96. Joshi S, Singh AR, Wong SS, et al. 2017. ,,Rac2 is required for alternative macrophage activation and bleomycin induced pulmonary fibrosis; a macrophage autonomous phenotype". Plos One. 12(8):e0182851.

97. Kanai Y, Hediger MA. 2003. ,,The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications". Eur J Pharmacol. 479:237–247.

98. Kang H. G., Kim D. H., Kim S. J. et al. 2016. "Galectin-3 supports stemness in ovarian cancer stem cells by activation of the Notch1 intracellular domain," Oncotarget, vol. 7, no. 42, pp. 68229–68241.

99. Kasmi KC, Stenmark KL. 2015. ,,Contribution of metabolic reprogramming to macrophage plasticity and function". Semin Immunol. 27(4):267–75.

100. Kim K., Lee S., Kegelman T.P., Su Z., Das S.K., Dash R., Dasgupta S., Barral P.M., Hedvat M., Diaz P., Reed J.C., Stebbins J.L., Pellecchia M., Sarkar D., and Fisher P.B. 2011. ,,Role of Excitatory Amino Acid Transporter-2 (EAAT2) and Glutamate in Neurodegeneration: Opportunities for Developing Novel Therapeutics". J Cell Physiol. 226(10): 2484–2493. doi:10.1002/jcp.22609

101. Kim, C., Ye F., Ginsberg M.H. 2011. ,,Regulation of integrin activation". Annu. Rev. Cell Dev. Bi., 27, 321–345.
102. Kirschning E., Rutter G., Hohenberg H. 1998. "High-preesing and freeze-substitution of native rat brain: suitability for preservation and immunoelectron microscopic localization of myelin glycolipids".J.Neurosci.Res, 53:465-474.
103. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. 1994. ,,Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors". Proc Natl Acad Sci U S A 91:7355–7359.
104. Klune JR, Billiar TR, Tsung A. 2008. ,,HMGB1 preconditioning: therapeutic application for a danger signal?" Journal of Leukocyte Biology. 83:558-63.
105. Kokkola R, AnderssonyA, MullinszG, et al. 2005. ,,RAGE is the Major Receptor for the Proinflammatory Activity of HMGB1 in Rodent Macrophages". Scandinavian Journal of Immunology. 61:1–9.
106. Kono H. and Rock K.L. 2008. ,,How dying cells alert the immune system to danger". Nature Rev. Immunol. 8 279–289.
107. Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Bruck W. 2002. ,, Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time". Brain. 125(10):2202–2212.
108. Laplante M, Sabatini DM. 2012. ,,mTOR signaling in growth control and disease". Cell. 149(2):274–93.
109. Lea P.Mt., Movsesyan V.A. & Faden A.I. 2005. ,,Neuroprotective activity of the mGluR5 antagonists MPEP and MTEP against acute excitotoxicity differs and does not reflect actions at mGluR5 receptors". Br. J. Pharmacol. 145 527–534.
110. Lee SA, Kwak MS, Kim S, Shin JS. 2014. ,,The role of high mobility group box 1 in innate immunity". Yonsei Med J. 55(5):1165–76.
111. Levy LM, Warr O, Attwell D. 1998. ,,Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na+-dependent glutamate uptake". J Neurosci. 18:9620–9628.
112. Lewerenz J. et al. 2013. ,,The cystine/glutamate antiporter system x(c)(-) in health and disease: from molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities". Antioxid. Redox Signal. 18, 522–555.
113. Libbey JE, Fujinami RS. 2010. ,,Potential triggers of MS". Results Probl Cell Differ. 51:21–42.

114. Libbey JE, McCoy LL, Fujinami RS. 2007. „Molecular mimicry in multiple sclerosis". Int Rev Neurobiol. 79:127–147.
115. Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S. 2017. „NF-κB signaling in inflammation". Signal Transduction and Targeted Therapy volume2, Article number: 17023.
116. Loane DJ, Stoica BA, Faden AI. 2012. „Metabotropic glutamate receptor-mediated signaling in neuroglia". Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal. 1(2):113–237.
117. Loane DJ, Stoica BS, Tchantchou F, Kumar A, Barrett JP, Akintola T, Xue F, Conn PJ, Faden AI. 2014. „Novel mGluR5 positive allosteric modulator improves functional recovery, attenuates neurodegeneration, and alters microglial polarization after experimental traumatic brain injury". Neurotherapeutics. 11:857–69.
118. Love S. 2006. „Demyelinating diseases". J Clin Pathol. 59(11): 1151–1159.
119. MacMicking J., Xie Q. W. & Nathan C. 1997. „Nitric oxide and macrophage function". Annu Rev Immunol, 15, 323-50
120. MacKinnon A. C., Farnworth S. L., Hodkinson P. S. et al. 2008. "Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3," Journal of Immunology, vol. 180, no. 4, pp. 2650–2658
121. Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P. & Sica A. 2002. „Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. Trends Immunol, 23, 549-55.
122. Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A. & Locati M.. 2004. „The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol, 25, 677-86
123. Maragakis NJ, Dietrich J, Wong V, Xue H, Mayer-Proschel M, Rao MS, Rothstein JD. 2004. „Glutamate transporter expression and function in human glial progenitors". Glia. 45:133–143.
124. Mateu L., Luzzati V., Vonasek E., Borgo M. & Lachapelle F. 1996. "Order-disorder phenomena in myelinated nerve sheaths. VI. The effects of quaking, jimpy and shiverer mutations: an X-ray scattering study of mouse sciatic and optic nerves." J.Mol.Biol. 256 (2), 319-329.
125. Mayer M.L. & Westbrook, G.L. 1987. „The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system". Prog. Neurobiol. 28 (1987b) 197–276.
126. McBean G. J. 2002. „Cerebral cystine uptake: a tale of two transporters". Trends Pharmacol. Sci. 23, 299–302.

127. Mills C.D. 2012. „M1 and M2 macrophages: Oracles of health and disease". Critical Rev. Immunol. 32 463–488.
128. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J. and Hill A.M. 2000. „M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm". J. Immunol. 164 6166–6173.
129. Milton ID, Banner SJ, Ince PG, Piggott NH, Fray AE, Thatcher N, Horne CH, Shaw PJ. 1997. „Expression of the glial glutamate transporter EAAT2 in the human CNS: an immunohistochemical study". Brain Res Mol Brain Res. 52:17–31.
130. Moscarello M., Mastronardi F., Wood D. 2007. „The Role of Citrullinated Proteins Suggests a Novel Mechanism in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis". Neurochem Res. 32:251–25
131. Mosser D. M. & Handman E. 1992. „Treatment of murine macrophages with interferon-gamma inhibits their ability to bind leishmania promastigotes. J Leukoc Biol, 52, 369-76
132. Mosser D.M. and Justin P. Edwards. 2008 „Exploring the full spectrum of macrophage activation". Nature Rev. Immunol. 8 958–969.
133. Morris S.M. 2007. „Arginine metabolism: boundaries of our knowledge". J. Nutr. 137 1602S–1609S.
134. Movsesyan V.A., Stoica B.A. & Faden A.I. 2004. „MGLuR5 activation reduces beta-amyloid-induced cell death in primary neuronal cultures and attenuates translocation of cytochrome c and apoptosis-inducing factor". J. Neurochem. 89 1528–1536
135. Mudo G., Trovato-Salinaro A., Caniglia G., Cheng Q. & Condorelli D.F. 2007. „Cellular localization of mGluR3 and mGluR5 mRNAs in normal and injured rat brain". *Brain Res.* 1149 1–13.
136. Murray PJ, Wynn TA. 2011. „Protective and pathogenic functions o macrophage subsets". Nat Rev Immunol. 11:723–37.
137. Nahrendorf M., Swirski F.K., Aikawa E., Stangenberg L., Wurdinger T. and Figueiredo J.L. 2007. „The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions". J. Exp. Med. 204 3037–3047.
138. Nakanishi S. 1992. „Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function". Science 258 597–603.
139. Nakajima Y., Iwakabe H., Akazawa C., Nawa H., Shigemoto R., Mizuno N. & Nakanishi S. 1993. „Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate". J. Biol. Chem. 268 11868–11873.

140. Nimmerjahn A., Kirchhoff F. & Helmchen F. 2005. „Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo". Science 308 1314–1318.
141. Nio-Kobayashi J. 2017."Tissue- and cell-specific localization of galectins, beta galactose-binding animal lectins, and their potential functions in health and disease," Anatomical Science International, vol. 92, no. 1, pp. 25–36
142. Niswender M.C. & Conn P.J. 2010. „Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease". Pharmacol. Toxicol. 50 295–322.
143. Norma Y et al. 2013. „Initial Immunopathogenesis of Multiple Sclerosis: Innate Immune Response". Hindawi Publishing Corporation Clinical and Developmental Immunology Volume 2013, Article ID 413465
144. Novak R, Dabelic S, Dumic J. 2011. „Galectin-1 and galectin-3 expression profiles in classically and alternatively activated human macrophages". Biochim Biophys Acta. 1820(9):1383–90.
145. O'Hara P.J., Sheppard P.O., Thogersen H., Venezia D., Haldeman B.A., McGrane V., Houamed K.M., Thomsen C., Gilbert T.L. & Mulvihill E.R. 1993. „The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins". Neuron 11 41–52.
146. Ohishi H., Neki A. & Mizuno N. 1998. „Distribution of a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the central nervous system of the rat and mouse: an immunohistochemical study with a monoclonal antibody". Neurosci. Res. 30 65–82.
147. O'Malley K.L., Jong Y.J., Gonchar Y., Burkhalter A. & Romano C. 2003. „Activation of metabotropic glutamate receptor mGlu5 on nuclear membranes mediates intranuclear Ca21 changes in heterologous cell types and neurons". J. Biol. Chem. 278 28210–28219.
148. Oneissi F.M., Sica A., Mantovani A., Locati M. 2008. „Macrophage activation and polarization". Frontiers in Bioscience 13, 453-461.
149. Paez P.M., Fulton D., Spreuer V., Handley V., and Campagnoni A. T. 2011. „Modulation of canonical transient receptor potential channel1 in the proliferation of oligodendrocyte precursor cells by the golli products of the myelin basic protein gene". J.Neurosci. 31,3625–3637.doi:10.1523/JNEUROSCI.4424- 10.
150. Paia S., Kim C., and Williams D.A. 2010. „Rac GTPases in human diseases". Disease Markers 29; 177–187 177

151. Pampliega O., Domercq M., Soria F., Villoslada P., Rodríguez-Antigüedad A., and Matute C. 2011. „Increased expression of cystine/glutamate antiporter in multiple sclerosis". J Neuroinflammation. 3;8:63. doi: 10.1186/1742-2094-8-63.
152. Parker KH, Sinha P, Horn LA, Clements VK, Yang H, Li J, Tracey KJ, Ostrand Rosenberg S. 2014. „HMGB1 enhances immune suppression by facilitating the differentiation and suppressive activity of myeloid-derived suppressor cells". Cancer Res. 74(20):5723–33.
153. Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, Rose DW, Willson TM, Rosenfeld MG, Glass CK. 2005. „A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma". Nature 437:759–763.
154. Passlick B., Flieger D. and Ziegler-Heitbrock H.W. 1989. „Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood". Blood 74 2527–2534.
155. Petralia R.S., Wang Y.X., Niedzielski A.S. & Wenthold R.J. 1996. „The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations". Neuroscience 71 949–976.
156. Piani D, Frei K, Do KQ, Cuenod M, Fontana A. 1991. „Murine brain macrophages induced NMDA receptor mediated neurotoxicity in vitro by secreting glutamate". Neurosci Lett. 133:159–62.
157. Pin J.P. & Duvoisin R. 1995. „The metabotropic glutamate receptors: structure and functions". Neuropharmacology 34 1–26.
158. Pin J.P., Joly C., Heinemann S.F. & Bockaert J. 1994. „Domains involved in the specificity of G protein activation in phospholipase C-coupled metabotropic glutamate receptors". EMBO J. 13 342–348.
159. Pinteaux-Jones F., Sevastou I.G., Fry V.A., Heales S., Baker D. & Pocock J.M. 2008. „Myelin-induced microglial neurotoxicity can be controlled by microglial metabotropic glutamate receptors". J. Neurochem. 106 442–454.
160. Plemel JR, Wee Yong V, Stirling DP. 2014 „Immune modulatory therapies for spinal cord injury – past, present and future". Exp Neurol. 258:91–104.
161. Plot L, Amital H. 2009. „Infectious associations of Celiac disease". Autoimmun Rev. 8:316–319.
162. Ponomarev E. D., Shriver L. P., Maresz K., and Dittel B. N. 2005. "Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity," Journal ofNeuroscience Research, vol. 81, no. 3, pp. 374–389.

163. Prince JE, Brayton CF, Fosset MC, et al. 2001. ,,The differential roles of LFA-1 and Mac-1 in host defense against systemic infection with Streptococcus pneumoniae". J Immunol. 166:7362–7369.
164. Pritzker LB, Joshi S, Gowan JJ, Harauz G, Moscarello MA. 2000. ,,Deimination of myelin basic protein I. Effect of deimination of arginyl residues of myelin basic protein on its structure and susceptibility to digestion by cathespsin D". Biochemistry 39:5324–5381.
165. Rabinovich GA, Toscano MA. 2009. ,,Turning 'sweet' on immunity: galectinglycan interactions in immune tolerance and inflammation". Nat Rev Immunol. 9:338–52.
166. Ramagopalan SV, Heger A, Berlanga AJ, et al. 2010. ,,A ChIP-seq defi ned genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution". Genome Res 20: 1352–60.
167. Rimanol A.C., Haik S., Martin M., Le Grand R., Boussin F.D., Dereuddre-Bosquet N., Gras G. & Dormont, D. 2000. ,,Na+-dependent high-affinity glutamate transport in macrophages". J. Immunol. 164 5430–5438.
168. Rimaniol AC, Mialocq P, Clayette P, Dormont D, Gras G. . 2001. ,,Role of glutamate transporters in the regulation of glutathione levels in human macrophages". Am J Physiol Cell Physiol281:1964–70.
169. Robinson MB. 1998. ,,The family of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on the GLT-1/EAAT2 subtype". Neurochem Int. 33:479–491.
170. Rojas A, Delgado-López F, Perez-Castro R, et al. 2016. ,,HMGB1 enhances the protumoral activities of M2 macrophages by a RAGE-dependent mechanism". Tumour Biol. 37(3):3321–3329.
171. Romano C., Sesma M.A., McDonald C.T., O'Malley K., van den Pol A.N. & Olney J.W. 1995. ,,Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain". J. Comparative Neurol. 355 455–469.
172. Samuel S. Duffy, Justin G. Lees, and GilaMoalem-Taylor. 2014. ,,The Contribution of Immune and Glial Cell Types in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis". Hindawi Publishing Corporation Multiple Sclerosis International Volume 2014, Article ID 285245
173. Sato S., St-Pierre C., Bhaumik P., and Nieminen J. 2009. "Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble betagalactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)," Immunological Reviews, vol. 230, no. 1, pp. 172–187

174. Seiji O., Haruyuki K. & Keisuke, T. 1998. ,,Glutamate Receptors in the mammalian central nervous system". Prog. Neurobiol. 54 581–618.
175. Scotton C. J., Martinez F. O., Smelt M. J., Sironi M., Locati M., Mantovani A. & Sozzani S.. 2005. ,,Transcriptional profiling reveals complex regulation of the monocyte IL-1 beta system by IL-13". J Immunol, 174, 834-45
176. Shanshiashvili L., Suknidze N., Machaidze G., Mikeladze D., Ramsden J. 2003. ,,Adhesion and clustering of charge isomers of myelin basic protein at model myelin membranes". Archives of Biochemistry and Biophysics 419;170–177
177. Shanshiashvili L., Kalandadze I., Ramsden J., Mikeladze D. 2012. ,,Adhesive Properties and Inflammatory Potential of Citrullinated Myelin Basic Protein Peptide 45-89". Neurochem Res. 37:1959–1966 DOI 10.1007/s11064-012-0816-z.
178. Shanshiashvili L., Tsitsilashvili E., Dabrundashvili N., Kalandadze I. and Mikeladze D. 2017. ,,Metabotropic glutamate receptor 5 may be involved in macrophage plasticity". Biol Res. 50:4 DOI 10.1186/s40659-017-0110-2
179. Shanshiashvili L., Shatirishvili M., Kalandadze I. And Mikeladze D. 2008. ,,HMGB1 – protein with dual functions". Journal Biological Physics and Chemistry. 8(4), 50-53.
180. Shattil S.J., Kim C., Ginsberg M.H. 2010. ,,The final steps of integrin activation: The end game". Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11, 288–300.
181. Sheldon AL, Robinson MB. 2007. ,,The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention". Neurochem Int. 51:333–355.
182. Sheng M. 2001. ,,Molecular organization of the postsynaptic specialization". Proc. Natl Acad. Sci. USA 98 7058–7061.
183. Shih A. Y. & Murphy T. H. 2001. ,,xCt cystine transporter expression in HEK293 cells: pharmacology and localization". Biochem. Biophys. Res. Commun. 282, 1132–1137.
184. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. 2010. ,,HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer". Ann Rev Immunol. 28:367–88.
185. Sinha P, Clements VK, Bunt SK, Albelda SM, Ostrand-Rosenberg S. . 2007. ,,Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response". J Immunol179:977–83.
186. Siu C., Balsor J., Jones D., Murphy K. 2015. ,,Classic and Golli Myelin Basic Protein have distinct developmental trajectories in human visual cortex". Frontiers in Neuroscience. DOI: 10.3389/fnins.2015.00138.

187. Sloane J. A., Batt C., Ma Y., Harris Z. M., Trapp B., and Vartanian T. 2010. “Hyaluronan blocks oligodendrocyte progenitor maturation and remyelination through TLR2,” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 107, no. 25, pp. 11555–11560.
188. Stapulionis R, Oliveira CL, Gjelstrup MC, et al. 2008. ,,Structural insight into the function of myelin basic protein as a ligand for integrin alpha M beta 2”. J Immunol. 180(6):3946–3956.
189. Stout RD, Suttles J. 2004. ,,Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments”. J Leukoc Biol. 76:509–13.
190. Su Z, Zhang P, Yu Y, et al. 2016. ,,HMGB1 Facilitated Macrophage Reprogramming towards a Proinflammatory M1-like Phenotype in Experimental Autoimmune Myocarditis Development”. Scientific Reports. 6:21884.
191. Tamaru Y., Nomura S., Mizuno N. & Shigemoto R. 2001. ,,Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR3 in the mouse CNS: differential location relative to pre- and postsynaptic sites”. Neuroscience 106 481–503.
192. Teh JL, Chen S. 2012. ,,Glutamatergic signaling in cellular transformation”. Pigment Cell Melanoma Res. 25:331–42.
193. Tolomelli A., Galletti P., Baiula M., Giacomini D. 2017. ,,Can Integrin Agonists Have Cards to Play against Cancer? A Literature Survey of Small Molecules Integrin Activators”. Cancers. 9(7), 78; doi:10.3390/cancers9070078
194. Thomas JO. 2001. ,,HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins”. Biochem Soc Trans. 29:395–401.
195. Torocsik D., Bardos H., Nagy L. & Adany R. 2005. ,,Identification of factor XIII-A as a marker of alternative macrophage activation”. Cell Mol Life Sci, 62, 2132-9
196. Tsitsilashvili E., Shanshiashvili L., and Mikeladze D. 2018. ,,Some new aspects of metabotropic glutamate receptors”. Journal of Biological Physics and Chemistry 18, 99–105.
197. Tsitsilashvili E., Shanshiashvili L. and Mikeladze D. 2016. ,,Macrophages—cells with broad potential”. Journal of Biological Physics and Chemistry 16. 162–166.
198. Tsitsilashvili E., Sepashvili M., Chikviladze M., Shanshiashvili L., Mikeladze D. 2019. ,,Myelin basic protein charge isomers change macrophage polarization”. Journal of Inflammation Research 12 25–33.

199. Tu J.C., Xiao B., Naisbitt S., Yuan J.P., Petralia R.S., Brakeman P., Doan A., Aakalu V.K., Lanahan A.A., Sheng M. & Worley P.F. 1999. „Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins". *Neuron* 23 583–592
200. Vasta G. R. 2012."Galectins as pattern recognition receptors: structure, function, and evolution," Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 946, pp. 21–36
201. Vasta G. R., Quesenberry M., Ahmed H., and O'Leary N. 1999."C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway," Developmental and Comparative Immunology, vol. 23, no. 4-5, pp. 401–420
202. Vos CM et al. 2005. „Blood-brain barrier alterations in both focal and diffuse abnormalities onpostmortem MRI in multiple sclerosis". Neurobiol Dis, 20:953-960.
203. Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ, et al. 2003. „PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease". Bioessays 25:1106–18.
204. Vukusic S, Van Bockstael V, Gosselin S, Confavreux C. 2007. „Regional variations in the prevalence of multiple sclerosis in French farmers". J Neurol Neurosurg Psychiatry. 78: 707–09.
205. Wang H. et al. 2003. „Expression of the activity of cystine/glutamate exchange transporter, system x(c)(-), by xCT and rBAT". Biochem. Biophys. Res. Commun. 305, 611–618.
206. Wake H., Lee P.R., and Fields R.D. 2011. „Control of local protein synthesis and initial events in myelination by action potentials". Science 333,1647–1651. doi:10.1126/science.1206998.
207. Weiner, H.L., 2004. „Multiple sclerosis is an inflammatory T-cell-mediated autoimmune disease". Arch. Neurol. 61, 1613–1615.
208. Werry EL, Liu GJ, Lovelace MD, Nagarajah R, Nickie IB, Bennett MR. 2011. „Lipopolysaccaride-stimulated interleukin-10 release from neonatal spinal cord microglia is potentiated by glutamate". Neuroscience. 175:93–103.
209. Wolf N. A., Amouzegar T. K., and Swanborg R. H. 2007. "Synergistic interaction between Toll-like receptor agonists is required for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats," Journal of Neuroimmunology, vol. 185, no. 1-2, pp. 115–122.
210. Wood DD, Moscarello MA. 1989. „The isolation, characterization, and lipidaggregating properties of a citrulline containing myelin basic protein". *J. Biol Chem*. 264:5121–5127.

211. Wucherpfennig KW, Allen PM, Celada F, et al. 2007. „Polyspecificity of T cell and B cell receptor recognition". Semin Immunol. 19:216–224.
212. Xue H, Field CJ. 2011. „New role of glutamate as an immunoregulator via glutamate receptors and transporters". Front Biosci. 3:1007–20.
213. Zhang X. and Mosser D.M. 2008. „Macrophage activation by endogenous danger signals". J. Pathol. 214 161–178.
214. Zsuzsanna B., Bence G., Pál G., Edit I. B., Falus A., Nagy G. 2012. „Citrullination under physiological and pathological conditions". Joint Bone Spine, G Model BONSOI-3626.