

ინტეგრირების როლი ნერვული ქსოვილის ჰიპოქსია/იშემიური
პროცესების განვითარებაში

ელისაბედ კვერელაძე

*სადისერტაციო ნაშრომი წარდგენილია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის
საბუნებისმეტყველო მეცნიერებებისა და მედიცინის ფაკულტეტზე ბიოქიმიის
დოქტორის აკადემიური ხარისხის მინიჭების მოთხოვნების შესაბამისად*

ბიოქიმიის და მოლეკულური ბიოტექნოლოგიის სადოქტორო პროგრამა

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: თამარ ბარბაქაძე, დოქტორი ბიოლოგიაში

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი

თბილისი, 2024

განაცხადი

როგორც წარდგენილი სადისერტაციო ნაშრომის „ინტეგრირების როლი ნერვული ქსოვილის ჰიპოქსია/იშემიური პროცესების განვითარებაში,, ავტორი, 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.

ელისაბედ კვერდელიძე

თარიღი :

აბსტრაქტი

თიროიდული ჰორმონები (TH) წარმოადგენენ ზრდის, განვითარების და მეტაბოლიზმის მნიშვნელოვან რეგულატორებს, აქვთ ნერვულ სისტემაზე მოქმედების ფართო სპექტრი, მონაწილეობენ თავის ტვინის განვითარებაში. ამ მოქმედების მოლეკულური საფუძვლები მოიცავს სპეციფიკური გენების ექსპრესიის ცვლილებას, მიტოქონდრიული ენერგეტიკის რეგულირებას და არაგენომურ მოქმედებას იონურ სატრანსპორტო სისტემებზე, ციტოქრომჩხზე, ცილების შიდაუჯრედულ გადანაწილებაზე, სპეციფიკური კინაზების გააქტივებაზე და ფოსფორილირებაზე, უჯრედების მიგრაციასა და ანგიოგენეზზე. TH-ის, T3/T4 არაგენომური და გენომური მოქმედება ახორციელებს ნეიროპროტექტორულ ეფექტებს თავის ტვინის დაზიანების დროს. ნევროლოგიური დაავადებების განვითარებაში შიდაუჯრედულ ცვლილებებთან ერთად დიდი მნიშვნელობა ენიჭება ექსტრაუჯრედულ მატრიქსის ცვლილებებს, სადაც ინტეგრინულ კავშირებს მნიშვნელოვანი ადგილი აქვს. ინტეგრინული რეცეპტორები ავლენენ სასიგნალო და რეგულატორულ ფუნქციებს ნევროლოგიურ პათოფიზიოლოგიურ პროცესებში და წარმოადგენენ მიმზიდველ ფარმაცოლოგიურ სამიზნეებს. TH-ით მოდულირებადი ინტეგრინი $\alpha\beta 3$ მონაწილეობს TH-ის არაგენომური მოქმედების ეფექტების განხორციელებაში. ჩვენ ვივარაუდეთ, რომ ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონის, T3, $\alpha\beta 3$ -ინტეგრინით გაშუალებულმა ეფექტებმა შეიძლება თავის წვლილი შეიტანოს ნევროლოგიური ფუნქციების აღდგენაში და განსაკუთრებით ინსულტის შემდგომ აღდგენა/რეგენერაციული პროცესების წარმართვაში. ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა დიფერენცირებულ ფეოქრომოციტომას უჯრედებში (PC-12) TH-ების არაგენომური მოქმედების ნეიროპროტექტორული ეფექტების შესწავლა ჰიპოქსიის დროს. TH-ის იმ სავარაუდო სასიგნალო გზების დადგენა, რომელიც ნაკლებად მგრძნობიარეს (ამცირებს ჰიპოქსიის დამაზიანებელ ეფექტს) ხდის ნერვულ უჯრედს ჰიპოქსიის მიმართ. აგრეთვე, იმ მოლეკულური მექანიზმების იდენტიფიცირება, რომლებიც ჩართული არიან ჰიპოქსიით განპირობებული დაზიანების აღდგენაში. დასახული მიზნის შესასრულებლად შევისწავლეთ TH-ის $\alpha\beta 3$ -ინტეგრინით გაშუალებული არაგენომური მოქმედების ეფექტები უჯრედული კულტურის სიცოცხლისუნარიანობაზე, აქტინის ციტოქონჩხის დინამიურობაზე და

განვსაზღვრეთ TH-ის $\alpha\beta 3$ -ინტეგრინით გაშუალებულ არაგენომურ მოქმედებაში ჩართული ზოგიერთი სარეგულაციო სისტემები და განვსაზღვრეთ სხვადასხვა გენთა ექსპრესია, როგორცაა პოსტტრანსლაციურ მოდიფიკაციაში ჩართული პალმიტოილტრანსფერაზების მაკოდირებელი გენების ექსპრესია. დასახული ამოცანების შესასრულებლად განვსაზღვრეთ აქტინის ციტოჩონჩხის პოლიმერიზაციის მთავარი მარეგულირებელი ცილის, კოფილინის შემცველობა და აქტივობა მისი არაფოსფორილირებული და ფოსფორილირებული იზომერების თანაფარდობის მიხედვით. განვსაზღვრეთ Fyn-კინაზის ფოსფორილირებული და არაფოსფორილირებული ფორმების თანაფარდობა, Rac-ის აქტივობა, NADPH ოქსიდაზის (NOX) ზოგადი აქტივობა, NOX2 და NOX4 ექსპრესიის დონე, JAK2/STAT5 პროტეინკინაზული კასკადის ფოსფორილირების დონე და პალმიტოილტრანსფერაზების მაკოდირებელი გენები: ZDHHC2, ZDHHC3, ZDHHC8, ZDHHC9 და ZDHHC16 დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში 1 სთ ჰიპოქსიის შემდეგ.

ჩვენი კვლევებით დადგინდა რომ T3-ის $\alpha\beta 3$ -ინტეგრინით გაშუალებული არაგენომური მოქმედება არეგულირებს აქტინის ციტოჩონჩხის დინამიკას, რაც ზრდის PC-12 უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას ჰიპოქსიის დროს Rac1/NADPH ოქსიდაზა/კოფილინ-1 სასიგნალო გზის მეშვეობით. T3 მნიშვნელოვან როლს თამაშობს Fyn კინაზის ზომიერ გააქტიურებაში ფოსფორილირების გზით, რომელიც კორელაციაშია Fyn კინაზის პალმიტირებასთან. ასევე დადგინდა რომ ჰიპოქსიის დროს $\alpha\beta 3$ -ინტეგრინით გაშუალებული მოქმედებით ადგილი აქვს NADPH ოქსიდაზის აქტივობის ზომიერ მატებას, რომელიც სავარაუდოდ რეგულირდება NOX4/Rac1 კომპლექსის წარმოქმნის დათრგუნვით. ეს რეგულაცია მნიშვნელოვან როლს თამაშობს აქტინის ციტოჩონჩხის დინამიურობის შენარჩუნებაში. T3 არეგულირებს NOX2-ის ზომიერ აქტივაციას $\alpha\beta 3$ ინტეგრინის შუამავლობით Rac1-ს NOX2-თან შეკავშირების გზით, რაც ასტიმულირებს BDNF-ს წარმოებას და ხელს უწყობს მის ნეიროპროტექტორულ სასიგნალო გზის ჩართვას ჰიპოქსიის დროს. ექსპერიმენტების მეორე ნაწილის შედეგად დადგინდა, რომ T3-ის $\alpha\beta 3$ -ინტეგრინით გაშუალებულ ეფექტებში JAK2/STAT5 კასკადის მონაწილეობა ჰიპოქსიის დროს შესაძლოა გავლენას ახდენს უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის შენარჩუნებაზე

ჰიპოქსიის დროს. ეს ცვლილებები შეიძლება მოხდეს STAT5-ზე დამოკიდებული ინდუქციური ეპიგენეტიკური გენთა სლექტიური გაჩუმების გამო, რომელიც პასუხისმგებელია პოსტ-ჰიპოქსიურ დაზიანებებსა და აღდგენაზე ნეირონების გადარჩენის შემდგომი ზრდით. ჩვენი შედეგები ასახავს $\alpha\beta 3$ -ინტეგრინ-დამოკიდებული JAK2/STAT5 პროტეინკინაზული კასკადის ჩართულობას და Fyn პალმიტირების შესაძლო მოდულაციის T3 გაშუალებულ ეფექტებში 1 სთ ჰიპოქსიის დროს. რაც შეეხება თიროიდული ჰორმონის ეფექტებს პოსტტრანსლაციურ მოდიფიკაციაში ჩართული პალმიტოილტრანსფერაზების მაკოდირებელი გენების ექსპრესიაზე დავადგინეთ, რომ T3 გავლენას ახდენს თრგუნავს ZDHHC9 გენის ექსპრესიის დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში ჰიპოქსიის დროს. ასევე მნიშვნელოვნად ზრდის ZDHHC16 გენის ექსპრესიას, მაგრამ ეს ეფექტი არ იხსნება $\alpha\beta 3$ -ინტეგრინის მახლოკირებელი ანტისხეულის მოქმედების შედეგად დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში ჰიპოქსიის დროს. ZDHHC3 და ZDHHC8 გენთა ექსპრესიაზე მოქმედების ეფექტი არ აღინიშნება, ხოლო ZDHHC2 გენის ექსპრესია მცირდება T3-ის მოქმედებით და ეს ეფექტი ნაწილობრივ იხსნება $\alpha\beta 3$ -ინტეგრინის ბლოკირების შედეგად ჰიპოქსიის დროს დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში. მიღებული დასკვნები ხაზს უსვამს კვლევის მნიშვნელობას და გამოყენებას პოტენციური თერაპიული საშუალებების შესასწავლად. $\alpha\beta 3$ -ინტეგრინით გაშუალებულმა ეფექტებმა შეიძლება თავის წვლილი შეიტანონ ნევროლოგიური ფუნქციების ჰიპოქსიის შემდგომი დაზიანებების აღდგენაში და განსაკუთრებით ინსულტის შემდგომ აღდგენა/რეგენერაციული პროცესების წარმართვაში.

ძირითადი საკვანძო სიტყვები : PC-12 ,ჰიპოქსია, ინტეგრინი $\alpha\beta 3$, NADPH ოქსიდაზა, პალმიტირება.

Abstract

Thyroid hormones (TH) are essential in neuronal and glial cell development and differentiation, synaptogenesis, and myelin sheath formation. They are involved in the pathogenesis of various neurological disorders. In addition to nuclear receptors, TH acts through $\alpha\text{v}\beta 3$ -integrin on the plasma membrane, influencing transcriptional regulation of signaling proteins that, in turn, affect adhesion and survival of nerve cells in various neurologic disorders. TH exhibits protective properties during brain hypoxia; however, precise intracellular mechanisms responsible for the preventive effects of TH remain unclear. Ischemia/hypoxia that induces rigidity of the actin filaments, which initiates neurodegeneration and reduces synaptic plasticity. We hypothesized that thyroid hormones via $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin could regulate the actin filament rearrangement during hypoxia and increase neuronal cell viability. In this study, we investigated the impact of TH on integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ -dependent downstream systems in normoxic and hypoxic conditions of pheochromocytoma PC-12 cells. In this experimental study, we analysed the dynamics of actin cytoskeleton according to the G/F actin ratio, cofilin-1/p-cofilin-1 ratio, and p-Fyn/Fyn ratio in differentiated PC-12 cells with/without T3 hormone (3,5,3'-triiodo-L-thyronine) treatment and blocking $\alpha\text{v}\beta 3$ -integrin-antibody under hypoxic conditions using electrophoresis and western blotting methods. We assessed NADPH oxidase activity under the hypoxic condition by the luminometric method and Rac1 activity using the ELISA-based (G-LISA) activation assay kit. We analyzed the T3 effects on Rac1 binding to NOX2 in differentiated PC-12 cells and define the T3 $\alpha\text{v}\beta 3$ -integrin mediated effects on the activation of the JAK2/STAT5 pathway. Analyze the expression of ZDHHC2, ZDHHC3, ZDHHC8, ZDHHC9 and ZDHHC16 the palmitoyltransferases genes. Our findings reveal that the T3 hormone induces the $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin-dependent dephosphorylation of the Fyn kinase, modulates the G/F actin ratio and activates the Rac1/NADPH oxidase/cofilin-1 pathway. T3 increases PC-12 cell viability during hypoxia via $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin-dependent downstream regulation systems. We revealed, that T3 causes increased of the Rac1/NOX2 interaction, and this effect was significantly elevated after blocking of $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin by anti- $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin antibodies in hypoxia. In contrast to NOX2, $\alpha\text{v}\beta 3$ -integrin inhibitory antibody significantly decreased NOX4 expression in differentiated PC-12 cells and abolished the T3-induced

elevation of the BDNF secretion during hypoxia. Overall, T3, acting through $\alpha\text{v}\beta 3$ -integrin, induced activation of the JAK2/STAT5 pathway and suppression of the SHP2 in hypoxic PC-12 cells. This activation correlated with the downregulation of the expression palmitoyltransferase-ZDHHC2 and ZDHHC9 genes, leading to a subsequent decrease in palmitoylation and phosphorylation of Fyn tyrosine kinase. . In summary our study provides the first evidence demonstrating the involvement of integrin-dependent T3 thyroid hormone modulation of the G/F actin ratio via the Rac1 GTPase/NADPH oxidase/cofilin1 signaling pathway and $\alpha\text{v}\beta 3$ -integrin-dependent suppression of Fyn kinase phosphorylation. We suggest, that T3 regulates the moderate activity of NOX2 via $\alpha\text{v}\beta 3$ -integrin-mediated Rac1 binding to NOX2, which stimulates the BDNF production and contributes to its neuroprotective signaling pathway activity during hypoxia. Our study also provides the first evidence demonstrating the involvement of integrin-dependent JAK/STAT pathway, SHP2 suppression, and altered post-translational modification of Fyn in protective effects of T3 during hypoxia.

Keywords: $\alpha\text{v}\beta 3$ -integrin, actin filament Rac1, NOX2, NOX4, hypoxia, Fyn, JAK/STAT, SHP2, T3, hypoxia, palmitoylation, palmitoyltransferase, PC-12.

სარჩევი

ილუსტრაციების ჩამონათვალი	xii
აბრევიატურების ჩამონათვალი	xiv
შესავალი	1
თავი I ლიტერატურის მიმოხილვა	7
1.1 ინტეგრინები, როგორც თიროიდული ჰორმონების არაგენომური მოქმედების საფუძველი	7
1.1.1 ინტეგრინების დახასიათება.....	7
1.1.2 ინტეგრინის სტრუქტურა	8
1.1.3 ინტეგრინის როლი ნეიროპლასტიკურობაში	9
1.2 თიროიდული ჰორმონების მნიშვნელობა და მოქმედების მექანიზმები.....	11
1.2.1 თიროიდული ჰორმონების მნიშვნელობა და როლი თავის ტვინის განვითარებაში.	11
1.2.2 თიროიდული ჰორმონების მნიშვნელობა.....	13
1.2.3 თიროიდული ჰორმონების სინთეზი, დეიოდირება; დეიონიდაზების სტრუქტურა და მოქმედების მექანიზმი.....	14
1.2.4 თიროიდული ჰორმონების მოქმედების მექანიზმები.....	19
1.3. ციტოქრომის სტრუქტურა და მის დინამიკაზე მოქმედი ფაქტორები	25
1.3.1 G აქტინი F აქტინის როლი ციტოქრომის სტაბილურობაში	25
1.3.2 კოფილინი და მისი როლი აქტინის დინამიურობაში.....	27
1.4 ინტეგრინი და თიროზინკინაზები.....	30
1.4.1 Fyn თიროზინკინაზის როლი და ნეიროპროტექტორული ეფექტები.....	31
1.4.2 მცირე GTP-შემაკავშირებელი ცილების როლი ციტოქრომის სტაბილიზებაში	32

1.4.3 JAK2/STAT5 სასიგნალო კასკადი.....	34
1.5. NADPH ოქსიდაზების (NOX-ები)	35
1.5.1 NADPH ოქსიდაზური სისტემის მონაწილეობა ცნს-ის განვითარებაში.....	35
1.5.2 NADPH ოქსიდაზა და ოქსიდაციური სტრესი.....	35
1.5.3 NADPH ოქსიდაზური სისტემა და BDNF ექსპრესია	36
1.5.4 (NADPH) ოქსიდაზას იდენტიფიცირება, როგორც ROS-ის მთავარი გენერატორი.....	39
1.5.5 NADPH ოქსიდაზას დახასიათება	42
1.5.6 NADPH ოქსიდაზას როლი თავის ტვინის დაზიანებასა და ნეიროდეგენერაციულ დარღვევებში	47
1.5.7 NOX-ის ინჰიბირების ნეიროპროტექტორული ეფექტი ტვინის ტრავმული დაზიანებისას (TBI).....	47
1.6 პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაცია (PTM).....	48
1.6.1 PTM მნიშვნელობა უჯრედული პროცესების რეგულირებაში	48
1.6.2 პალმიტირებების როლი ნეიროპლასტიკურობაში და ნეიროდეგენერაციებში	50
1.6.3 S-აცილაცია.....	51
1.6.4 ცილოვანი აცილტრანსფერაზების ZDHHC ოჯახი; ZDHHC ცილების აღმოჩენა.....	53
1.6.5 ZDHHC გენის ოჯახის დახასიათება და მათი გავრცელება.....	54
1.7 ჰიპოქსია და ჰიპოქსიით ინდუცირებული პროცესები.....	54
1.7.1 ჰიპოქსია და მისი როლი სხვადასხვა დაავადების პათოფიზიოლოგიაში	54
1.7.2 HIF - ჰიპოქსიით ინდუცირებული ფაქტორი	56
1.7.3 ჰიპოქსია/იშემია ცნს-ის პათოლოგიებში	58
თავი II. მასალა და მეთოდები	60
2.1 კვლევის ობიექტი	60

2.1.1 PC-12 უჯრედული კულტურის გამრავლება და დიფერენცირება 100ng/ml NGF-ის გამოყენებით	61
2.1.2 უჯრედების ფრაქციონირება.....	62
2.1.3 G აქტინის და F აქტინის ფრაქციების მიღება.....	63
2.2 JAK/STAT გზის ცილების ანალიზი	64
2.3 SDS-PAGE გელ-ელექტროფორეზული და ვესტერნ ბლოტის მეთოდი.....	64
2.3.1 G-აქტინის და F-აქტინის რაოდენობრივი ანალიზი	64
2.3.2 პალმიტირებული Fyn და p-Fyn კინაზების და Fyn და p-Fyn კინაზების მთლიანი რაოდენობის განსაზღვრა.....	65
2.3.3 NOX2, NOX4, კოფილინი1, p-კოფილინი1 -ის შემცველობის განსაზღვრა ელექტროფორეზული და ვესტერნ ბლოტის მეთოდით.....	65
2.4 უჯრედების ციტოტოქსიკურობის ტესტის, ლაქტატდეჰიდროგენაზული აქტივობის განსაზღვრა	66
2.5 პალმიტირებული Fyn და p-Fyn კინაზების განსაზღვრა.....	67
2.6 იმუნოპრეციპიტაცია	68
2.7 NADPHოქსიდაზას აქტივობა..... განისაზღვრება ლუმინისცენტური მეთოდით ფლუორიმეტრის გამოყენებით	69
2.8 რნმ-ის ექსტრაქცია Trizol-ის რეაგენტით	69
2.9 კომპლემენტარული დნმ-ის (კდნმ) სინთეზი.....	70
2.10 გენის ექსპრესიის განსაზღვრა RT-PCR-ით	70
2.11 JAK/STAT გზის ცილების ფოსფორილირების შედარებითი დონის გამოვლენა	72
2.12 BDNF ანალიზი	72
2.13 სტატისტიკური ანალიზი.....	72
თავი III მიღებული შედეგები და მათი განხილვა.....	73
3.1 მიღებული შედეგები	73

3.1.1 თიროიდული ჰორმონების არაგენომური მოქმედების ეფექტების დადგენა უჯრედული კულტურის სიცოცხლისუნარიანობაზე.....	73
3.1.2 თიროიდული ჰორმონების არაგენომური მოქმედების შესწავლა ნეირონული ციტოჩონჩხის შემადგენლობის ცვლილებაზე და თიროიდული ჰორმონების არაგენომურ მოქმედებაში ჩართული ზოგიერთი სარეგულაციო სისტემების აქტივობის განსაზღვრა.....	74
3.1.3 თიროიდული ჰორმონების არაგენომური მოქმედების შესწავლა Rac1 და NADPH ოქსიდაზას აქტივობაზე	76
3.1.4 NOX2 და NOX4 გენის ექსპრესიის დადგენა.....	78
3.1.5 TH-ის გავლენა $\alpha\beta 3$ ინტეგრინ -დამოკიდებულ ქვედა სასიგნალო სისტემებზე ფეოქრომოციტომას PC-12 უჯრედებში, ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში (JAK/STAT სასიგნალო გზა)	80
3.1.6 TH-ის გავლენა $\alpha\beta 3$ ინტეგრინ -დამოკიდებულ ქვედა სასიგნალო სისტემებზე ფეოქრომოციტომას PC-12 უჯრედებში, ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში (პალმ-Fyn/Fyn თანაფარდობა)	82
3.1.7 პალმიტირებაში ჩართული გენების ექსპრესია mRNA რაოდენობრივი ანალიზის გზით.....	84
3.2. შედეგების განხილვა	87
თავი IV. დასკვნები.....	98
თავი V. გამოყენებული ლიტერატურა	100

ილუსტრაციების ჩამონათვალი

სურათი 1. ინტეგრინის სტრუქტურა, უჯრედის ზედაპირზე არსებული ცილოვანი ბუნების რეცეპტორი.

სურათი 2. სქემატური გამოსახულება დეიონიდაზა გამჟღავნებული ძირითადი იოდთირონიინების მეტაბოლიზმის.

სურათი 3. დეიონიდაზების სუბუჯრედული ლოკალიზაცია იმუნოფლუორესცენტული მეთოდი.

სურათი 4. სქემატური გამოსახულება რეაქციების რომელიც რომელიც იწვევს T4 -ის და T3-ის გამომუშავებას და ფარისებრი ჯირკვლიდან განთავისუფლებას.

სურათი 5. თავის ტვინში ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონების მოქმედების გენომური მექანიზმი.

სურათი 6. გზები, რომლითაც ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონები ხელს უწყობენ U-87 MG უჯრედების პროლიფერაციას და ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონის რეცეპტორების: TR α და TR β 1 უჯრედშიდა გადაადგილებას.

სურათი 7. აქტინის ძაფის ფორმირების სქემა.

სურათი 8. კოფილინის კონცენტრაციაზე დამოკიდებული ეფექტები აქტინის დინამიკაზე.

სურათი 9A. ROS-ის უჯრედული წყაროები.

სურათი 9B . სუპეროქსიდის გადაქცევა მეორად ROS-ად.

სურათი 10. NOX იზოფორმები და მარეგულირებელი სუბერთეულები.

სურათი 11. ძირითადი PTM-ების ჩამონათვალი.

სურათი 12. ლაქტატდეჰიდროგენაზული აქტივობის განსაზღვრა დიფერენცირებულ ფეოქრომოციტომას (PC-12) უჯრედებში ნორმოქსიულ და ჰიპოქსიურ პირობებში.

სურათი 13. G აქტინის და F აქტინის თანაფარდობა ფეოქრომოციტომას (PC-12) უჯრედებში ნორმოქსიულ და ჰიპოქსიურ პირობებში.

სურათი 14A. კოფილინი1/p-კოფილინი1 თანაფარდობა ფეოქრომოციტომას (PC-12) უჯრედებში ჰიპოქსიურ პირობებში.

სურათი 14B. P-fyn/ Fyn თანაფარდობა ფეოქრომოციტომას (PC-12) უჯრედებში ნორმოქსიულ და ჰიპოქსიურ პირობებში.

სურათი 15A. Rac1 ექსპრესიის დონის განსაზღვრა დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში.

სურათი 15B. NADPH ოქსიდაზის აქტივობა დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში.

სურათი 16A. Rac1 შეკავშირება NOX2 დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში.

სურათი 16B. თავისუფალი NOX4 ექსპრესიის დონე დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში.

სურათი 17. BDNF-ის გამოთავისუფლება დიფერენცირებული PC-12 უჯრედების უჯრედული კულტურის გარემოში.

სურათი 18. JAK/STAT გზის ცილების ფოსფორილაცია დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში ჰიპოქსიის დროს.

სურათი 19A. პალმ-Fyn/Fyn თანაფარდობა დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში.

სურათი 19B. პალმ-p-Fyn/p-Fyn თანაფარდობა დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში

სურათი 20. ZDHHC2 (A) და ZDHHC9 (B) პალმიტოილტრანსფერაზის გენის ექსპრესიის დონე.

სურათი 21A. თიროიდული ჰორმონის T3 ის ეფექტი აქტინის ციტოჩონჩხის დინამიურობაში დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში ჰიპოქსიის დროს.

სურათი 21B. T3-ის სასარგებლო ეფექტების ჰიპოთეტური სქემა დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში ჰიპოქსიის დროს.

ცხრილი 1. პალმიტოილტრანსფერაზას გენების და ჰიპოქსანტინ ფოსფორიბოზილ-ტრანსფერაზა-1 რევერს-გენის (Hprt1) პრაიმერების თანმიმდევრობა.

ცხრილი 2. ZDHHC2, ZDHHC3, ZDHHC8, ZDHHC9 და ZDHHC16 გენების RT-qPCR ანალიზი.

აბრევიატურების ჩამონათვალი

AD- ალცაიმერის დაავადება

ADF - აქტინის-დეპოლიმერიზაციის ფაქტორის

AHDS - ალან-ჰერდონ-დადლის სინდრომი

APP - ამილოიდის წინამორბედი პროტეინი

BACE1 - ბეტა-სეკრეტაზა 1

BAT - ყავისფერ ცხიმოვან ქსოვილში

BBB -ჰემატოენცეფალურ ბარიერი

BDNF- ტვინისგან მიღებული ნეიროტროფული ფაქტორის

CAMP- ციკლური ადენოზინ მონოფოსფატი

CFL1 - კოფილინი 1

CHF- გულის შეგუბებითი უკმარისობა

CRD- ცისტეინით მდიდარ დომენში

D1 D2- იოდოთირონინ დეიოდინაზები

DIT- დიიოდირებული ამინომჟავები

DUOX1/2-ორმაგი ოქსიდაზა ერთი და ორი

ECM- უჯრედგარე მატრიქსი

ERK1/2- ექსტრაუჯრედული სიგნალის მარეგულირებელი კინაზა

FAK - ფოკალური ადჰეზიური კინაზა

FYN - SRC ოჯახის კინაზა

HIF-1- ჰიპოქსიაინდუქციური ფაქტორი-1

IFN- γ - ინტერფერონ გამა

IL1B-ინტერლეიკინ 1 ბეტა

IP-იმუნოპრეციპიტაცია

JAK- იანუს კინაზას

LDHA- ლაქტატდეჰიდროგენაზა

MAPK- მიტოგენ-გააქტიურებული პროტეინკინაზა

MCT8- მონოკარბოქსილატის ტანსპორტერი 8

MIT- მონოიდირებული ამინომჟავები

MMP - მატრიქსის მეტალოპროტეინაზა

MS - გაფანტული სკლეროზი

NF-κB - ბირთვული ფაქტორი კაპა B

NGF - ნერვული ზრდის ფაქტორი

NO - აზოტის ოქსიდი

NRTK - არარეცეპტორული თიროზინკინაზა

OATP1C1- ორგანული ანიონის ტრანსპორტერი პოლიპეპტიდი 1C1

PAK - p21-ასოცირებული კინაზა

LIMK – LIM კინაზა

PATS - პალმიტოილტრანსფერაზები

PAT- ცილის აცილტრანსფერაზა

PC-12- ფეოქომოციტომას უჯრედები

PD - პარკინსონის დაავადება

PDI პროტეინის დისულფიდ იზომერაზა

PD - პარკინსონის დაავადება

PGK- ფოსფოგლიცერატ კინაზა

PI3K- ფოსფოინოზიტიდი 3 კინაზა

PIP - ფოსფატიდილინოზიტოლს 4,5-P

PKA - პროტეინ კინაზა A

PKC-პროტეინ კინაზა C

PLA - სიახლოვის ლიგაციის ანალიზი

PLC- ფოსფოლიპაზა C

PTM - პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაცია

PVN - პერივენტრიკულურ ბირთვში

ROS - რეაქტიული ჟანგბადი

SHP2-ცილა თიროზინფოსფატაზა

SAM - სიმპათიკური თირკმელზედა ჯირკვლის მედულას ღერძის

T3 - ტრიიოდთირონინი

T4 - თიროქსინი

TBI - ტვინის ტრავმული დაზიანებისას

TG -თირეოგლობულინი

TH- თიროიდული ჰორმონები

THRA ალფა - თიროიდული ჰორმონის რეცეპტორი ალფა

THRB ბეტა - თიროიდული ჰორმონის რეცეპტორი ბეტა

TK- თიროზინ კინაზა

TNFR - სიმსივნური ნეკროზის ფაქტორის რეცეპტორი

TNF-A - ნეკროზის ფაქტორი-ალფა

TPO - ფარისებრი ჯირკვლის პეროქსიდაზა

TR - თიროიდული რეცეპტორები

TRE - თიროიდული ჰორმონის საპასუხო ელემენტი

TRH - თირეოტროპინის გამათავისუფლებელი ჰორმონი

TSH - თირეოტროპული ჰორმონი

VEGF - სისხლძარღვთა ენდოთელური ზრდის ფაქტორის რეცეპტორები

BFGF - ფიბრობლასტების ზრდის ძირითადი ფაქტორი

ატფ - ადენოზინტრიფოსფატი

ცნს - ცენტრალური ნერვული სისტემა

შესავალი

ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციის მონაცემებით, ფარისებრი ჯირკვლის დაავადებებს ენდოკრინულ პათოლოგიებს შორის მეორე ადგილი უჭირავს შაქრიანი დიაბეტის შემდეგ. დაავადების გავრცელების თვალსაზრისით ძირითად ჯგუფს მიეკუთვნებიან ფეხმძიმე და მეძუძური დედები, აგრეთვე 3 წლამდე ბავშვები. ჰიპოთირეოიდიზმის ლიკვიდაცია გაეროს ჯანდაცვის დარგში ერთ-ერთი პრიორიტეტული მიმართულებაა. გაეროს მონაცემებით იოდის ნაკლებობა 43 მილიონი ადამიანის გონებრივი ჩამორჩენილობის მიზეზია. კიდევ 100 ათას ბავშვს ამ მიზეზით აღენიშნება თანდაყოლილი კრეტინიზმი. მწვავე იოდდეფიციტის მქონე რეგიონებში ბავშვების ინტელექტის მაჩვენებელი 20% ჩამორჩება სხვა რეგიონებს (<http://www.ncdc.ge/Handlers/GetFile.ashx?ID=488babef-b809-4985-9c45-06add66ac8e8>).

ფარისებრი ჯირკვლის თიროიდული ჰორმონები (TH), კონკრეტულად თიროქსინი (T4) და ტრიოდთირონინი (T3) სასიცოცხლოდ მნიშვნელოვანია ორგანიზმის ჰომეოსტაზისა და ფუნქციონირების შენარჩუნებისთვის. ისინი მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ ნერვულ და გლიურ უჯრედების განვითარებაში, დიფერენცირებაში, სინაპტოგენეზისა და მიელინის გარსის ფორმირებაში (Uchida and Suzuki, 2021). არსებობს მტკიცებულება, რომელიც ადასტურებს კავშირს ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონების დონის ცვლილებასა და ალცჰეიმერის დაავადების პათოგენეზთან (Tan et al., 2009). ასევე, ფარისებრის დისფუნქცია დაფიქსირდა აუტისტური სპექტრის დაავადებების მქონე ბავშვებში (Frye et al., 2017). დაბალი T3 პლაზმური დონე მწვავე იშემიური ინსულტის შემდეგ ასოცირდება უფრო მძიმე და განმეორებით ინსულტთან გაუარესებული ფუნქციური შედეგებით (Alevizaki et al., 2007). გენომური და არაგენომური მოქმედების მექანიზმების მეშვეობით ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონები გავლენას ახდენენ სხვადასხვა ორგანოთა სისტემებზე, მათ შორის თავის ტვინზე. გენომური მოქმედება მოიცავს ბირთვულ რეცეპტორებთან დაკავშირებას, გენის ექსპრესიის პირდაპირ რეგულირებას (Das et al., 2010). TH-ის არაგენომური მოქმედება არის სწრაფი პროცესი, რომელიც მოიცავს ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონების ურთიერთქმედებას, სხვადასხვა უჯრედულ კომპონენტთან, მათ შორის

ციტოჩონჩხი და მიტოქონდრია (Giammanco et al., 2020). ამ მოქმედებების გარდა, TH უკავშირდება პლაზმური მემბრანის $\alpha\beta 3$ -ინტეგრინს, ცვლის სასიგნალო ცილების ტრანსკრიპციულ რეგულაციას ქვედა დაღმავალ სასიგნალო გზებში (Barbakadze et al., 2014). ეს ურთიერთქმედება იწვევს ადჰეზიის, ზრდისა და პროლიფერაციის ცვლილებებს. უჯრედგარე მატრიქსის ლიგანდები უკავშირდებიან α სუბერთეულს და ააქტიურებენ უჯრედშიდა სასიგნალო მოლეკულებს β სუბერთეულის მეშვეობით რაც აერთიანებს ექსტრაჯრედულ და შიდაუჯრედულ ცვლილებებს, რომლებიც აუცილებელია უჯრედების მიგრაციისა და ინვაზიისთვის (Hynes, 2002).

უჯრედშიდა სტრუქტურები, რომლის წარმოქმნაშიც მონაწილეობენ ინტეგრინები და ციტოჩონჩხის ცილები, არის "კეროვანი კომპლექსები". ინტეგრინის სასიგნალო გზის პირველი საფეხურები მოიცავს ურთიერთქმედებას თიროზინკინაზებთან, როგორცაა ფოკალური ადჰეზიური კინაზა (Fak), Src კინაზა, ინტეგრინთან დაკავშირებული კინაზა, ციტოჩონჩხის ცილები, როგორცაა ტალინი და კინდლინი და ციტოჩონჩხის მოლეკულები, როგორცაა P130CRK-თან ასოცირებული სუბსტრატი (P130Cas) (Yan and Cui, 2023). კლინიკური და პრეკლინიკური კვლევების მიმართულებით, მზარდი ინტერესი ცხადყოფს არარეცეპტორული თიროზინკინაზას (nRTK) სუპეროჯახის მნიშვნელოვან როლს კოგნიტური დარღვევების პათოფიზიოლოგიასა და თერაპიაში (Mao and Wang, 2016). დღესდღეობით, ვარაუდობენ, რომ nRTK -ის სამი ქვეოჯახის: Src კინაზა (SFK), იანუს თიროზინკინაზა (JAK) და ფოკალური ადჰეზიური კინაზა (FAK), შეიძლება ჩართული და დაკავშირებული იყოს უჯრედშიდა, შიდაბირთვულ და სინაფსურ სასიგნალო ქსელთან, რაც თავის მხრივ იწვევს ქრონიკული სტრესის, დეპრესიის და შფოთვის მსგავს ქცევას (Kalia et al., 2004). გაჩენილი მტკიცებულებები აჩვენებს, რომ nRTK წევრები ამ სამი ოჯახიდან მგრძნობიარეა სტრესის მიმართ (Wang et al., 2022). Fyn არის არარეცეპტორული თიროზინკინაზა Src ოჯახიდან, წარმოდგენილია უხვად ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში. Fyn-ის ნაკლებობა თავგებში იწვევს დაქვეითებას ჰიპოკამპის გრძელვადიან პოტენციაციის, სივრცითი სწავლის დეფიციტს, გაზრდილ შიშს და აუდიოგენური კრუნჩხვის მგრძნობელობას ახალ თაობებში (Grant et al., 1992). Fyn აქტივაციას შეუძლია ნეირონები გახადოს უფრო მგრძნობიარე სინაპტოტოქსიურობის მიმართ, ხოლო

შემცირებულ აქტივაციას აქვს ნეიროპროტექტორული ეფექტი. თუმცა, გადაჭარბებულმა დათრგუნვამ შეიძლება დააზიანოს კოგნიტური ფუნქცია ადამიანებში. ამრიგად, მნიშვნელოვანია დელიკატური წონასწორობა Fyn-ის აქტივაციასა და ინჰიბიციას შორის (Matrone et al., 2020). Fyn-ის გადაჭარბებული გააქტიურება დაკავშირებულია თავის ტვინის პათოგენეზთან, რომელიც გამოწვეულია იშემიით და პოტენციურად იწვევს აპოპტოზს (Du et al., 2012). Fyn-ის გარდა, Jak თიროზინკინაზა თამაშობს მნიშვნელოვან როლს თავის ტვინის კოგნიტური ფუნქციების რეგულირებაში. სხვადასხვა კვლევებმა აჩვენეს რომ JAK2/STAT5 სასიგნალო გზა კრიტიკულად მნიშვნელოვანია ნეიროფსიქიკურ დარღვევებში (Jain et al., 2021).

უჯრედშიდა დაღმავალი სასიგნალო გზების გააქტიურება, რეგულირდება ზედა სასიგნალო ცილების პოსტ-ტრანსლაციური ცვლილებებით, მათ შორის პალმიტოილაცია. პალმიტოილაცია არის ცილების ლიპიდური მოდიფიკაცია, რომელიც მოიცავს პალმიტატის ნაშთის დამატებას ცისტეინის ნაშთებზე. ეს მოდიფიკაცია ამაგრებს ცილებს პლაზმური მემბრანაზე, რაც მათ მემბრანულ ლოკალიზაციასა და უჯრედულ პასუხებზე კონტროლის საშუალებას იძლევა (Guan and Fierke, 2011; Goloshvili et al., 2019). პალმიტოილაციის პროცესი გაშუალებულია ცილა პალმიტოილტრანსფერაზით, რომელიც მიეკუთვნება DHHC- (Asp-His-His-Cys) ოჯახს, რომელსაც გადააქვს პალმიტატის ნაწილი პალმიტოილირებად ცილაზე (Tabaczar et al., 2017; Zingler et al., 2019). ამიტომ, ZDHHC გენის დიფერენცირებულმა ექსპრესიამ შეიძლება გავლენა მოახდინოს ცილების ტრანსლოკაციებზე და მნიშვნელოვანი როლი ითამაშოს თავის ტვინის სინაფსურ და მეტაბოლურ აქტივობებში. იდენტიფიცირებულია 23 სხვადასხვა პალმიტოილტრანსფერაზა ძუძუმწოვრებში, რომლებიც ძირითადად განლაგებულია ორგანოების მემბრანაში, როგორცაა ენდოპლაზმური ბადე, გოლჯის აპარატი და უჯრედის მემბრანა (Linder et al., 2007).

ნეირონებში, პალმიტოილაცია არეგულირებს ცილების გადაადგილებას პლაზმურ მემბრანასა და უჯრედული სტრუქტურებს შორის, როგორცაა გოლჯის აპარატი, ენდოპლაზმური ბადე და ენდოსომები (Fukata et al., 2004). პალმიტოილაცია გადამწყვეტ როლს თამაშობს ნეირონების ფიზიოლოგიაში,

როგორცაა ნეიროპლასტიკურობა, ხოლო შეცდომები პალმიტირება/დეპალმიტირების დროს იწვევენ თავის ტვინის პათოლოგიას (Cho et al., 2016).

ჰიპოქსია არის მდგომარეობა რომელიც ხასიათდება ქსოვილებში ჟანგბადის ნაკლებობით, შემცირებით, რაც შეიძლება გამოწვეული იყოს შემცირებული სისხლის მიწოდებით ან სისხლში ჟანგბადის რაოდენობის დაქვეითებით (Bhutta et al., 2022). ეს შეიძლება გამოიხატოს მწვავე ან ქრონიკული ეფექტებით, ქსოვილები კი რეაგირებდნენ განსხვავებულად, ზოგიერთი ქსოვილი ძალიან მდგრადია ჰიპოქსიის მიმართ, ზოგი კი უფრო მეტად მგრძნობიარეა ხანმოკლე ზემოქმედების მიმართ (Dzhalilova and Makarova, 2020). ჰიპოქსიის გავლენა თავის ტვინზე დამოკიდებულია მის ტიპზე, ხანგრძლივობაზე, სიმძიმესა და სიხშირეზე. ჰიპოქსიამ შეიძლება გამოიწვიოს ანთებითი მედიატორების გამონთავისუფლება, როგორცაა $TNF\alpha$ და $IL1\beta$, რაც იწვევს ლოკალურ ანთებას. მას ასევე შეუძლია გამოიწვიოს დეპოლარიზაციის ცვლილებები, ოქსიდაციური სტრესი, აპოპტოზი და ნეიროდეგენერაცია (Burtscher et al., 2021). ზოგიერთ უჯრედულ ტიპებში, ჰიპოქსია აძლიერებს ინტეგრინული რეცეპტორის ექსპრესიას (Ju et al., 2017). ტვინში ინტეგრინის აქტივობა იცვლება ანთების, ჰიპოქსიის და სტრესის დროს (Ikeshima-Kataoka et al., 2022).

TH-ის სასიგანგო გზა, ჩართულია ჰიპოქსიური ქსოვილის რემოდელირებაში ინფარქტის შემდეგ. T3 ხელს უწობს პოსტინფარქტული ქსოვილის რემოდელირებას და ახდენს ქსოვილის განმეორებითი დაზიანების პრევენციას (Lourbopoulos et al., 2021). თუმცა, ზუსტი უჯრედშიდა მექანიზმები, რომლებიც პასუხისმგებელნი არიან TH-ის დამცავ ეფექტებზე და მათ ეფექტებში მონაწილე რეგულატორულ სისტემებზე გაურკვეველი რჩება.

ჩვენ ვივარაუდეთ, რომ არარეცეპტორული თიროზინკინაზები, რომლებიც დაკავშირებულია ინტეგრინის აქტივობასთან და უჯრედებში პალმიტოილტრანსფერაზას დონესთან, განაპირობებენ თიროიდული ჰორმონებით გაშუალებულ დამცველობით ეფექტებს. შესაბამისად, განაპირობებენ უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის მატებას. ეს მოლეკულური ცვლილებები

ზეგავლენას ახდენენ აქტინის ციტოჩონჩხის რეკონფიგურაციაზე და საბოლოოდ აძლიერებენ ნერვული უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას.

ჰიპოქსია/იშემიური პროცესებით განპირობებული უჯრედული პათოლოგიის აღდგენაში TH-ის მნიშვნელობის დადგენისთვის მრავალი კვლევის მიუხედავად, დღემდე დაუდგენელი რჩება ზუსტი მოლეკულური მექანიზმები და დაღმავალი სასიგნალო გზები, რომელიც დაკავშირებულია თიროიდული ჰორმონის არაგენომურ მოქმედებასთან.

ჩვენს მიერ ჩატარებული კვლევით დავადგინეთ, რომ T3-ის არაგენომური მოქმედება არეგულირებს ნეირონული აქტინის ციტოჩონჩხის დინამიკას $\alpha\beta3$ ინტეგრინის მეშვეობით, რაც ზრდის ნეირონების უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას ჰიპოქსიის დროს Rac1/NADPH ოქსიდაზა/კოფილინ1 დაღმავალი გზის მეშვეობით (Barbakadze et al., 2023). T3, ინტეგრინ- $\alpha\beta3$ -ის გაშუალებული გზით, იწვევს JAK2/STAT5 გზის გააქტიურებას PC-12 უჯრედებში. ეს აქტივაცია ასოცირდება პალმიტოილტრანსფერაზა-ZDHHC2 და ZDHHC9 გენის ექსპრესიის ინტეგრინდამოკიდებულ დაღმავლ რეგულაციასთან და შედეგად თიროზინკინაზა Fyn-ის პალმიტოილაციის შემცირებასთან. ჩვენ ვვარაუდობთ, რომ ეს ცვლილებები შეიძლება ხდება STAT5-ზე დამოკიდებული პალმიტოილტრანსფერაზას გენის ეპიგენეტიკური გაჩუმების გამო, რაც თავის მხრივ ამცირებს Fyn-ის პალმიტოილაცია/ფოსფორილირებას. სხვადასხვა კვლევებმა აჩვენეს რომ JAK2/STAT5 სასიგნალო გზა კრიტიკულად მნიშვნელოვანია ნეიროფსიქიკურ დარღვევებში (Jain et al., 2021). ეს მოდიფიკაცია ამაგრებს ცილებს უჯრედულ მემბრანებზე, როგორცაა პლაზმური მემბრანა, რაც მათ მემბრანის ლოკალიზაციასა და უჯრედულ პასუხებზე კონტროლის საშუალებას იძლევა (Guan and Fierke, 2011; Goloshvili et al., 2019).

ჩვენმა ექსპერიმენტებმა გამოავლინა, რომ T3 ამცირებს Fyn-ის პალმიტირებას და ეს ეფექტი იხსნება $\alpha\beta3$ ინტეგრინის ანტისხეულის გამოყენებისას. გარდა ამისა, T3-ის მოქმედებით მცირდება პალმიტილირებული Fyn-ის ფოსფორილირება და მისი ინჰიბირება $\alpha\beta3$ -ინტეგრინის ანტისხეულების მიერ მნიშვნელოვნად ზრდის პალმიტილირებული ფინის ფოსფორილირებას. აღსანიშნავია, $\alpha\beta3$ ინტეგრინის დათრგუნვა T3 გარეშე, ამცირებს პალმიტილირებული Fyn-ის ფოსფორილირებას.

ეს დასკვნები მიუთითებს, რომ T3 ააქტიურებს Fyn ფოსფორილირებას, რაც კორელაციაშია Fyn კინაზის პალმიტირებასთან.

ჩვენი ექსპერიმენტები ცხადყოფს, რომ ტრიოდოთირონინი (T3), რომლის მოქმედებაც გაშუალებულია $\alpha\beta\gamma$ -ით, იწვევს JAK2/STAT5 გზის გააქტიურებას და SHP2-ის დათრგუნვას ჰიპოქსიურ პირობებში, PC-12 უჯრედებში. ეს აქტივაცია დაკავშირებულია პალმიტოილტრანსფერაზა-ZDHHC2 და ZDHHC9 გენების ექსპრესიის დაქვეითებასთან, რაც იწვევს თიროზინკინაზას Fyn-ის პალმიტირების და ფოსფორილირების შემცირებას. ჩვენ ვივარაუდეთ რომ ცვლილებები შეიძლება განპირობებული იყოს STAT5-ზე დამოკიდებული პალმიტოილტრანსფერაზას ეპიგენეტიკური „გათიშვის,, გამო, რომელიც თავის მხრივ ამცირებს Fyn-ის პალმიტირება/ფოსფორილირებას უჯრედების შემდგომი გადარჩენის გზით.

ჩვენი კვლევა გვაწვდის პირველ მტკიცებულებას, რომელიც ადასტურებს ინტეგრინ დამოკიდებული JAK/STAT გზის, ჩართულობას ზემოაღნიშნულ პროცესებში: SHP2 დათრგუნვასა და Fyn-ის პოსტ ტრანსლაციურ მოდიფიკაციებში, რაც თავის მხრივ განაპირობებს T3-ის დამცველობით ეფექტებს ჰიპოქსიის დროს.

ჩვენი კვლევა იქნება წინ გადაგმული ნაბიჯი TH-ის არაგენომური მოქმედების ნეიროპროტექტორული ეფექტების შესწავლაში. კერძოდ, TH-ის იმ სავარაუდო სასიგნალო გზების დადგენა, რომელიც ნაკლებად მგრძნობიარეს ხდის ნერვულ უჯრედს ჰიპოქსიის მიმართ და იმ მოლეკულური მექანიზმის იდენტიფიცირება, რომელიც ჩართულია ჰიპოქსიით განპირობებული დაზიანების აღდგენაში. კვლევის შედეგად მიღებული შედეგები შესაძლოა გახდეს მომავალი კვლევების წინანდარი, რადგან, პროცესში მონაწილე მოლეკულები, სასიგნალო გზები და უჯრედული მექანიზმები შესაძლოა მიმზიდველი იყოს ახალი თერაპიული სამიზნე აგენტების დიზაინის შესაქმნელად, რაც წარმატებული კვლევის წინაპირობაა .

თავი I ლიტერატურის მიმოხილვა

1.1 ინტეგრინები, როგორც თიროიდული ჰორმონების არაგენომური მოქმედების საფუძველი

1.1.1 ინტეგრინების დახასიათება

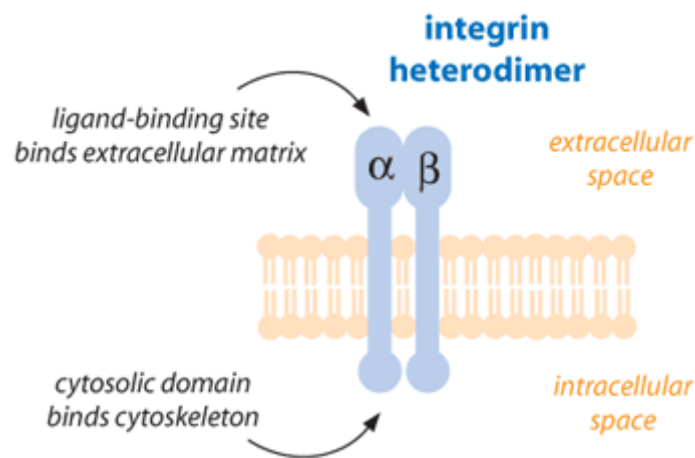
ინტეგრინები არიან ძირითადი რეცეპტორები, რომლებსაც ცხოველური უჯრედები იყენებენ უჯრედგარე მატრიქსთან დასაკავშირებლად. ინტეგრინები ფუნქციონირებენ როგორც ტრანსმემბრანული ცილები, რომლებიც შუამავლობენ ციტოქონჩხსა და უჯრედგარე მატრიქსს შორის ურთიერთქმედებას, რაც საჭიროა უჯრედების ციტოქონჩხის სტაბილიზაციისთვის, უჯრედების ზრდის, უჯრედების გადარჩენისა და პროლიფერაციის ხელშეწყობისთვის. უჯრედს შეუძლია თავისი ინტეგრინის ადჰეზიური აქტივობის შიგნიდან რეგულირება. ინტეგრინები ცნობილია ძირითადად ლიგანდის უჯრედგარე მატრიქსის (ECM) პროტეინებთან შეკავშირების უნარით, როგორიცაა ვიტრონექტინი და ფიბრონექტინი. ის ფაქტი, რომ $\alpha\beta_3$ -ს აქვს დამაკავშირებელი ადგილი TH ანალოგებისთვის და ადგილები სხვა მცირე მოლეკულებისთვის (Lin et al., 2012), გვამღებს ახალ შეხედულებებს ინტეგრინის ფუნქციების შესახებ. მაგრამ მან ასევე ხელი შეუწყო კვლევებს, რომლებიც აღიარებენ ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონის ინტეგრირებულ კონტროლს, რათა შეცვალოს $\alpha\beta_3$ ურთიერთქმედება უჯრედის ზედაპირის არსებულ დიდ მოლეკულებთან: როგორიცაა სისხლძარღვთა ენდოთელური ზრდის ფაქტორის რეცეპტორები (VEGF) და ფიბრობლასტების ზრდის ძირითადი ფაქტორი bFGF. ინტეგრინ-VEGF რეცეპტორის (VEGFR) ან ინტეგრინ-bFGF ურთიერთქმედების ხასიათის ან ხარისხის ცვლილებას შეუძლია ანგიოგენეზის სტიმულირება ან ინჰიბირება იმის და მიხედვით, არის თუ არა T4 ან ტეტრაკი ლიგანდი. $\alpha\beta_3$ -ის მიერ ჰორმონის შეკავშირებას ასევე შეუძლია შეცვალოს ინტეგრინის ურთიერთქმედების წესი ECM პროტეინებთან, როგორიცაა ვიტრონექტინი (Davis et al., 2015) და ბოლოს, $\alpha\beta_3$ -ის αv მონომერის უჯრედშიდა ტრეფიკინგი რეგულირდება T4-ით ინტეგრინის

რეცეპტორზე. უჯრედის ბირთვში $\alpha\gamma$ არის კოაქტივატორი ცილა გარკვეული გენების ექსპრესიისთვის (Lin et al., 2013).

1.1.2 ინტეგრინის სტრუქტურა

ინტეგრინები წარმოადგენენ დიდ პლაზმური მემბრანის გამსჭვალავ ცილებს, რომლებიც აუცილებელია უჯრედ-უჯრედული ურთიერთქმედებისთვის და შესაბამისად, ქსოვილის სტრუქტურისთვის. როგორც ზემოთ აღინიშნა, ეს არის უჯრედის ადჰეზიური მოლეკულები (Humphries, 2000; Hynes, 2002), რომლებიც უკავშირდებიან უჯრედგარე მატრიქსის ლიგანდებს, უჯრედის ზედაპირის ლიგანდებსა და ხსნად ცილებს. ინტეგრინის შეკავშირება მათ ლიგანდებთან დამოკიდებულია უჯრედგარე ორვალენტიან კატიონებზე (Ca^{2+} ან Mg^{2+}), რაც ასახავს α და β სუბერთეულების უჯრედგარე ნაწილში ორვალენტიან-კატიონ-შემაკავშირებელ დომენების არსებობას. ორვალენტიანი კატიონის ტიპს შეუძლია გავლენა მოახდინოს ინტეგრინის ლიგანდებთან შეკავშირების აფინურობაზე და სპეციფიკაზე. ხერხემლიანებში მრავალი მატრიქსის ცილაა აღმოჩენილი სხვადასხვა ტიპის ინტეგრინებით. მინიმუმ 8 ინტეგრინი აკავშირებს ფიბრონექტინს და მინიმუმ 5 აკავშირებს ლამინინს. როგორც ავღნიშნეთ, ინტეგრინები არის ჰეტეროდიმერები, რომლებიც შედგება α ჯაჭვისა და β ჯაჭვისგან, რომლებიც დაკავშირებულია არაკოვალენტურად. თითოეულ მონომერს აქვს დიდი უჯრედგარე დომენი და ჩვეულებრივ მოკლე ციტოპლაზმური დომენი. ძუძუმწოვრების ინტეგრინი არის 18 α -ქვეგანყოფილების გენის და 8 β -ქვეგანყოფილების გენის შედეგი. ინტეგრინები შედგება ორი „ფეხისგან“ და „თავისგან“. თავი მოიცავს ლიგანდის შეკავშირების ადგილებს (Campbell et al., 2011). ინტეგრინის სტრუქტურა ძალიან პლასტიკურია (სურ. 1) და $\alpha\gamma\beta 3$ ამ მხრივ კარგად არის შესწავლილი (Arnaout, 2002) მოლეკულების ლიგანდირებამ და გარკვეულმა ფიზიკურმა ზემოქმედებამ, როგორიცაა რადიაცია, შეიძლება შეცვალოს ჰეტეროდიმერის კონფორმაცია და შეცვალოს მისი ფუნქციური მდგომარეობა („აქტივაცია“). T4 და მისი ანალოგი TETRAC არის $\alpha\gamma\beta 3$ -ის ლიგანდი და აბრუნებს ინტეგრინის რადიაციულ აქტივაციას (Leith et al., 2018).

ლიტერატურის მონაცემებით დადგენილია, რომ ინტეგრინი განიცდის პოსტრანსლაციურ მოდიფიკაციას. მაგალითად, ინტეგრინი $\alpha\beta3$ ფოსფორილირდება თიროქსინის შეკავშირების შემდეგ. აგრეთვე, $\alpha\beta3$ -ზე არსებობს N-გლიკოზილირების ადგილები (Pocheć et al., 2015), ხოლო თიროიდული ჰორმონის ანალოგები ცნობილია, რომ იწვევენ ზოგიერთი ცილების გლიკოზილირებას, როგორცაა ქსოვილის პლაზმინოგენის აქტივატორი (Gawlitzek et al., 2009). თუმცა, ინტეგრინების იოდოთირონინ-სტიმულირებული გლიკოზილირება ჯერ კიდევ არ არის კარგად შესწავლილი.



სურათი 1. ინტეგრინის სტრუქტურა, უჯრედის ზედაპირზე არსებული ცილოვანი ბუნების რეცეპტორი

1.1.3 ინტეგრინის როლი ნეიროპლასტიკურობაში

უჯრედული ბიოლოგიისა და გენეტიკური კვლევების შედეგად გამოვლინდა ინტეგრინის მრავალფეროვანი ფუნქციები. ხელოვნურად შექმნილი ან ბუნებრივი მუტაციების გენეტიკურმა ანალიზმა კიდევ უფრო დაადასტურა ინტეგრინის ცენტრალური როლი ქსოვილის მთლიანობის შენარჩუნებაში, უჯრედების მიგრაციასა და დიფერენციაციაში (Bökel et al., 2002; Bouvard et al., 2002).

ინტეგრინები შუამავლობენ უჯრედ-უჯრედულ, უჯრედ-ECM-სს და უჯრედ-პათოგენურ ურთიერთქმედებებს. მათ შეუძლიათ ლიგანდთან დაკავშირება, რათა

გადასცეს სიგნალები უჯრედგარე დომენიდან ციტოპლაზმამდე კლასიკური გარე მიმართულებით. გარდა ამისა, ინტეგრინის რეცეპტორების უმრავლესობის დამახასიათებელი თვისებაა სხვადასხვა ლიგანდების შეკავშირების უნარი. საპირისპიროდ, რამდენიმე ECM და უჯრედის ზედაპირის ადჰეზიური ცილა ნაჩვენებია, რომ აკავშირებს სხვადასხვა ინტეგრინის რეცეპტორებს. ინტეგრინები ასევე მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ იმუნურ სისტემაში ლეიკოციტების ტრეფიკინგისა და მიგრაციის, იმუნოლოგიური სინაფსების წარმოქმნის, თანასტიმულაციისა და ფაგოციტოზის დროს (Rocha-Perugini et al., 2016),

დინამიურად, ინტეგრინს შეუძლია განახორციელოს უჯრედის ადჰეზია შიგნიდან-გარეთ სასიგნალო პროცესის მეშვეობით. ზეექსპრესირებული ინტეგრინები, რომლებიც წარმოდგენილია კიბოს უჯრედების ან სტრომული უჯრედების ზედაპირზე, შუამავლობს უჯრედის მატრიქსის ადჰეზიას, რამაც შეიძლება ხელი შეუწყოს ამ უჯრედების გადარჩენის შესაძლებლობას კონკრეტულ ადგილას (Alphonso et al., 2009).

კიბოს უჯრედებსა და მათ მიკროგარემოს შორის ურთიერთქმედებამ შეიძლება გამოიწვიოს სიგნალი, რომელიც განსაზღვრავს უჯრედის ბედს და გავლენას ახდენს ავთვისებიანი ფენოტიპის ევოლუციაზე. როგორც პირველადი რეცეპტორები, რომლებიც მონაწილეობენ უჯრედის მატრიქსის ადჰეზიაში, ინტეგრინები, რომლებიც გვხვდება სიმსივნისა და სტრომული უჯრედების ზედაპირზე, ღრმა გავლენას ახდენენ კონკრეტულ ადგილებში გადარჩენის უნარზე. თუმცა, ამ ინტეგრინის რეცეპტორებს ასევე შეუძლიათ ფუნქციონირება ლიგანდის შებოჭვის არარსებობის შემთხვევაში, რათა ხელი შეუწყონ ღეროს გადარჩენას, გარემო და თერაპიული სტრესების არსებობისას (Seguin et al., 2015).

ძუძუმწოვრებში, ზოგიერთი ინტეგრინის რეცეპტორები ჩართულია პერიფერიული ნერვების რეგენერაციაში (Eva et al., 2014; Petrova et al., 2018). განვითარებადი და ზრდასრული ტვინის სინაფსებში ბევრი ინტეგრინი წარმოდგენილია დიდი რაოდენობით (Park et al., 2016).

ინტეგრინს აქვს სხვადასხვა როლი ნეირონულ კავშირსა და თავის ტვინის განვითარებაში (Lilja et al., 2018; De Arcangelis et al., 2000). ზრდასრული ძუძუმწოვრების ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში დაზიანებული აქსონები ვერ

აღდგება; მიუხედავად იმისა, რომ მათ აქვთ განვითარების პროცესში რეგენერაციის უნარი, ეს უნარი იკარგება სიმწიფესთან ერთად. ბევრმა მკვლევარმა ყურადღება გაამახვილა მოლეკულებზე, რომლებიც ხელს უწყობენ ცნს-ის განვითარებას, რათა გამოიწვიონ ცნს-ის რეგენერაცია ტრავმის შემდეგ, თუმცა კარგი შედეგები ჯერ არ არის მიღებული. მაგალითად, აქსონალური ზრდის ხელშემწყობი ინტეგრინები მომწიფებამდე ტრანსპორტირდებიან პერიფერიული ნერვული სისტემის აქსონებში, ხოლო ასეთი ტრანსპორტი მცირდება მომწიფებასთან ერთად ცნს-ის აქსონებში. ფაქტია, ინტეგრინის და გადამუშავებული ენდოსომების რეგულატორი Rab11, შეეყვანა ცნს-ის მომწიფებულ აქსონებში in vitro საშუალებას აძლევდა აქსონების რეგენერაციას ლაზერული დაზიანების შემდეგ, მაგრამ შორ მანძილზე რეგენერაცია in vivo რჩება შესასწავლი (Petrova et al., 2018).

1.2 თიროიდული ჰორმონების მნიშვნელობა და მოქმედების მექანიზმები

1.2.1 თიროიდული ჰორმონების მნიშვნელობა და როლი თავის ტვინის განვითარებაში.

ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონები ძალიან მნიშვნელოვანია ცენტრალური ნერვული სისტემის (ცნს) უჯრედების ნორმალური განვითარებისა და დიფერენციაციისთვის (Koibuchi et al., 2000). ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონების დეფიციტმა პერინატალურ პერიოდში შეიძლება გამოიწვიოს ფსიქიკური და ფიზიკური ჩამორჩენა, რასაც ადამიანებში კრეტინიზმი ეწოდება. ორივე გენომური და არაგენომური მოქმედებები აღწერილია ცნს-ში. ასტროციტებში T4 გარდაიქმნება T3-ად 50 დეიოდინაზას საშუალებით, T3 ტრანსპორტირდება ნეირონებში, სადაც ის უკავშირდება ბირთვულ რეცეპტორებს და ახდენს გენის ექსპრესიის რეგულაციას.

ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონები აუცილებელია თავის ტვინის ნორმალური განვითარებისთვის. ისინი გავლენას ახდენენ ნეიროგენეზზე, ნეირონული და გლიური უჯრედების დიფერენციაციასა და მიგრაციაზე, სინაპტოგენეზსა და მიელინზაციაზე. ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონის დეფიციტმა შეიძლება მძიმედ იმოქმედოს თავის ტვინზე ნაყოფის და პოსტნატალური განვითარების დროს, რაც

იწვევს მომწიფების შეფერხებას, ინტელექტუალურ დეფიციტს და ნევროლოგიურ დაქვეითებას (Bernal et al., 2022).

ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონები გადამწყვეტია თავის ტვინის განვითარებისთვის და გავლენას ახდენენ მის მუშაობაზე მთელი ცხოვრების მანძილზე. მოზრდილებში ჰიპოთირეოზი იწვევს ლეტარგიას, ჰიპორეფლექსიას და მოტორული კოორდინაციის დაქვეითებას (Joffe et al., 1994), სრაც ასოცირდება ბიპოლარულ აფექტურ დარღვევებთან, დეპრესიასთან ან კოგნიტური ფუნქციების დაკარგვასთან (Ganguli et al., 1996; Joffe et al., 2013). სუბკლინიკური ჰიპოთირეოზი ხშირად ასოცირდება მეხსიერების დაქვეითებასთან. პირიქით, ჰიპერთირეოზი იწვევს ჰიპერეფლექსიას, გაღიზიანებას და შფოთვის სხვა სიმპტომებთან ერთად ჰიპო- ან ჰიპერთირეოზმა შეიძლება გამოიწვიოს განწყობის დარღვევები, დემენცია, დაბნეულობა და პიროვნების ცვლილებები. ამ დარღვევების უმეტესობა ჩვეულებრივ შექცევადია სათანადო მკურნალობით, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ ზრდასრული ჯირკვლის ჰორმონის ცვლილებები გავლენას ახდენს ნერვულ ფუნქციაზე, მაგრამ არ ტოვებს მუდმივ სტრუქტურულ დეფექტებს.

ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონების მოქმედება ძუძუმწოვრების თავის ტვინის მომწიფების დროს თვისობრივად განსხვავებულია. ისინი გავლენას ახდენენ განვითარების ბევრ პროცესზე, როგორც წესი, კონკრეტული დროის მონაკვეთში. ისინი საჭიროა დამოუკიდებელი მოვლენების დროული სინქრონიზაციისთვის და ხელს უწყობენ გადასვლას ფეტალურ და პოსტნატალურ სტადიებს შორის (Gil-Ibanez et al., 2017; Morte et al., 2018). ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონის დეფიციტმა კრიტიკულ გარდამავალ პერიოდებში შეიძლება გამოიწვიოს თავის ტვინის შეუქცევადი დაზიანება, რომლის შედეგები დამოკიდებულია დეფიციტის სიმძიმეზე, ხანგრძლივობასა და რაც მთავარია მის დაწყების დროზე (Anderson et al., 2003; Morreale de Escobar et al., 2004). ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონი ცნობილია როგორც მეტაბოლიზმის, ზრდისა და სხეულის მრავალი სხვა ფუნქციის მაკონტროლებელი. ფარისებრი ჯირკვალი, ჰიპოფიზი და ჰიპოთალამუსი ქმნიან წრეს რომელსაც ეწოდება ჰიპოთალამუსო-ჰიპოფიზურ-ფარისებრი ჯირკვალის წრე. ფარისებრი ჯირკვლის მიერ გამომუშავებული ძირითადი ჰორმონებია თიროქსინი ან ტეტრაიოდთირონინი (T4) და ტრიიოდთირონინი (T3). თირეოტროპული ჰორმონის-

გამოთავისუფლების ჰორმონი (TRH) ჰიპოთალამუსიდან, თირეოტროპული ჰორმონი (TSH) წინა ჰიპოფიზის ჯირკვლიდან და T4 მუშაობენ სინქრონულად უკუკავშირის პრინციპით, რათა შეინარჩუნონ ჰომეოსტაზი.

ამ პროცესში მნიშვნელოვანი მიკროელემენტია იოდი რომელიც წვრილ ნაწლავში შეიწოვება. ის არის T3 და T4-ის შემადგენელი ნაწილი. შემცირებულმა მიღებამ შესაძლებელია იოდის დეფიციტი გამოიწვიოს, რაც თავის მხრივ გამოიწვევს თიროიდული ჰორმონების წარმოქმნის დაქვეითებას (Núñez et al., 2017).

1.2.2 თიროიდული ჰორმონების მნიშვნელობა

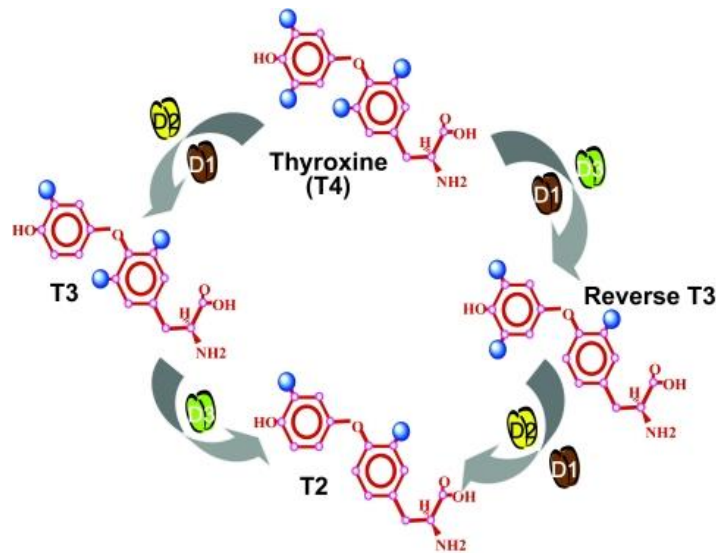
ჰიპოთირეოზი, გამოწვეული ფარისებრი ჯირკვლის დაქვეითებით, ჩვეულებრივ ვლინდება ბრადიკარდიის, სიცივის აუტანლობის, ყაზობის, დაღლილობისა და წონის მომატების სახით. ამის საპირისპიროდ, ფარისებრი ჯირკვლის გაზრდილი ფუნქციით გამოწვეული ჰიპერთირეოზი ვლინდება წონის დაკლებით, სითბოს აუტანლობით, დიარეით, ტრემორითა და კუნთების სისუსტით (Sorisky , 2016).

ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონი გავლენას ახდენს სხეულის თითქმის ყველა ორგანოთა სისტემაზე, მათ შორის გულზე, ცნს-ზე, ავტონომიურ ნერვულ სისტემაზე, ძვალზე, კუჭ-ნაწლავის ტრაქტსა და მეტაბოლიზმზე. ზოგადად, როდესაც ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონი უკავშირდება მის უჯრედშიდა ბირთვულ რეცეპტორს, ის ააქტიურებს გენებს მეტაბოლური სიჩქარის და თერმოგენეზის გასაძლიერებლად. მეტაბოლური სიჩქარის გაზრდა გულისხმობს ჟანგბადის და ენერგიის მოხმარების გაზრდას. ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონებს აქვთ დამამშვიდებელი ეფექტი კატექოლამინებზე. ის ზრდის ბეტა-რეცეპტორების ექსპრესიას, რათა გაზარდოს გულისცემა, ინსულტის მოცულობა, გულის გამომუშავება და კონტრაქტურა. TH ასტიმულირებენ რესპირატორულ ცენტრებს და იწვევენ ჟანგბადის მიღების გაზრდას გაზრდილი პერფუზიის გამო. ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონები იწვევენ II ტიპის კუნთოვანი ბოჭკოების განვითარებას. ეს არის კუნთოვანი ბოჭკოები, რომლებსაც აქვთ სწრაფი და ძლიერი შეკუმშვა. TH ზრდიან ბაზალურ მეტაბოლიზმს. ის ზრდის Na^+/K^+ ატფაზას გენის ექსპრესიას სხვადასხვა ქსოვილებში, რაც იწვევს ჟანგბადის მოხმარების, სუნთქვის სიხშირის და სხეულის ტემპერატურის მატებას.

მეტაბოლური სტატუსიდან გამომდინარე, მას შეუძლია გამოიწვიოს ლიპოლიზი ან ლიპიდების სინთეზი. ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონები ასტიმულირებენ ნახშირწყლების მეტაბოლიზმს და ცილების ანაბოლიზმს, ასევე შეუძლიათ გამოიწვიონ ცილების კატაბოლიზმი. ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონები არ ცვლიან სისხლში გლუკოზის დონეს, მაგრამ მათ შეუძლიათ გამოიწვიონ გლუკოზის რეაბსორბციის გაზრდა, გლუკონეოგენეზი, გლიკოგენის სინთეზი და გლუკოზის დაჟანგვა. ბავშვებში, TH ზრდის ჰორმონთან სინერგიულად მოქმედებენ ძვლის ზრდის სტიმულირებისთვის. TH აინდუცირებენ ქონდროციტებს, ოსტეობლასტებს და ოსტეოკლასტებს. ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონები ასევე ხელს უწყობენ თავის ტვინის მომწიფებას აქსონის ზრდისა და მიელინის გარსის წარმოქმნით (Mughal et al., 2018). მოზრდილებში მას შეუძლია გავლენა მოახდინოს განწყობაზე. ჰიპერთირეოზმა შეიძლება გამოიწვიოს ჰიპერაგზნებადობა და გაღიზიანება. ჰიპოთირეოზმა შეიძლება გამოიწვიოს მეხსიერების დაქვეითება, მეტყველების შენელება და ძილიანობა. ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონი გავლენას ახდენს ნაყოფიერებაზე, ოვულაციასა და მენსტრუაციაზე (Mughal et al., 2018).

1.2.3 თიროიდული ჰორმონების სინთეზი, დეიოდირება; დეიონიდაზების სტრუქტურა და მოქმედების მექანიზმი

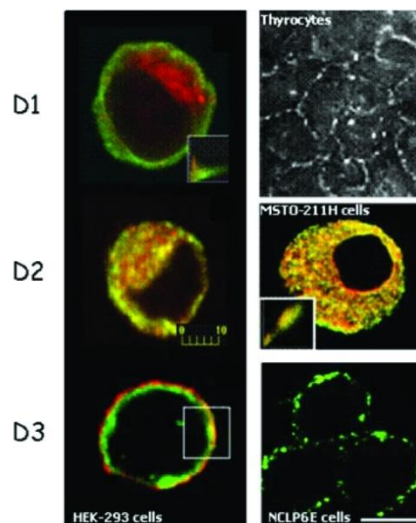
ცნობილია, რომ T4 არის ფარისებრი ჯირკვლის მთავარი სეკრეტორული პროდუქტი ყველა ხერხემლიანში და აღიარებულია, როგორც ხანგრძლივი მინიმალურად აქტიური მოლეკულა. დეიოდირება ახდენს ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონის მოქმედების პირველი საფეხურს კატალიზს, T4-ის მიერ T3-ის აქტივაციას. დეიოდირება ხდება დეიოდინაზური ფერმენტებით რომელიც ხასიათდება ქსოვილ-სპეციფიკური ექსპრესიით (სურ. 2).



სურათი 2. სტრუქტურული გამოსახულება დეიონიდაზა გაშუალებული ძირითადი იოდთირონიინების მეტაბოლიზმის (Gereben et al., 2008)

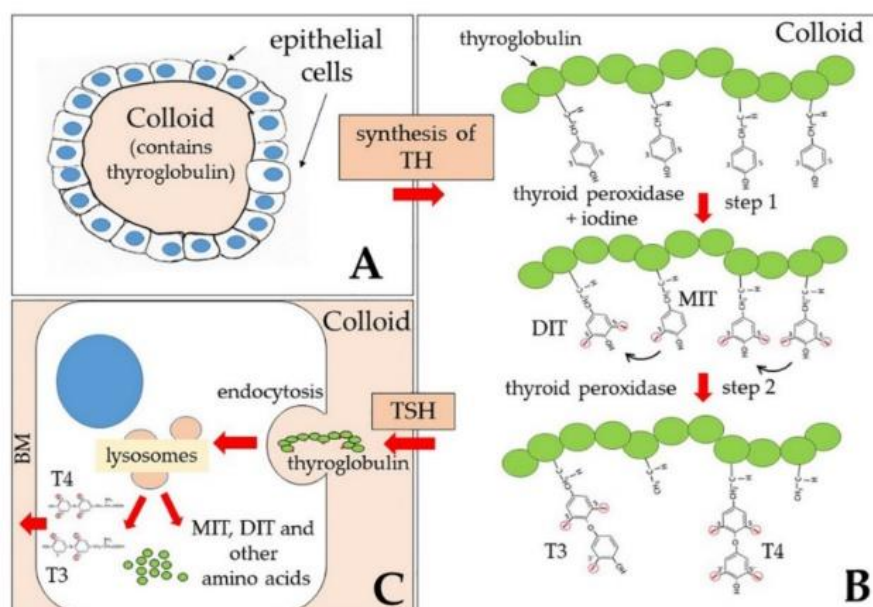
დეიოდინაზების მოლეკულური წონა მერყეობს 29-დან 33 kDa-მდე და მათი თანმიმდევრობის იდენტურობა დაახლოებით 50%-ზე დაბალია; მიუხედავად ამისა, ყველა მათგანს საერთო აქვს დაახლოებით 15 ამინომჟავის სიგრძის კონსერვაცირებული სელენოცისტეინის შემცველი აქტიური ცენტრი და ყველას აქვს ერთი ტრანსმემბრანული დომენი. ცალკეული დეიოდინაზების უჯრედული მდებარეობა ამ ფერმენტების მნიშვნელოვანი მახასიათებელია, იმის გათვალისწინებით, რომ ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონი პლაზმური მემბრანაზე ლოკალიზდება, ხოლო ჰორმონის მოქმედება ხდება უჯრედის ბირთვში. უჯრედულ მოდელზე ჩატარებული კვლევები, სადაც დეიონდაზები იყო დროებით ან ენდოგენურად ექსპრესირებული, მიუთითებს, რომ D1 და D3 განლაგებულია პლაზმურ მემბრანაში, ხოლო D2 არის ენდოპლაზმური რეტიკულუმის (ER) ცილა (Curcio et al., 2001; Baqui et al., 2003). მათ მიერ T4-იდან T3-ის აქტივაციას დიდი მნიშვნელობა ენიჭება და გადამწყვეტია თიროიდული ჰორმონის მოქმედებაში. დეიონიდაზურ ფერმენტებს გააჩნიათ ქსოვილ-სპეციფიკური ექსპრესია. მღრღნელებში T4-დან T3-ის მიიღება პირველი ტიპის დეიოდინაზის მოქმედებით (Dio1), ხოლო ადამიანების შემთხვევაში Dio2-ის მოქმედებით. შესაბამისად ამ ფერმენტების მაკოდირებელი გენების დათრგუნვა ნერვულ და სენსორულ განვითარების დარღვევებს იწვევს. Dio3-ს ასევე გავლენა აქვს ჰიპოთალამუსში,

თიროიდული ჰორმონის აქტივობაზე ასევე ცირკადულ რიტმზე და ლეპტინ-მელანოკორტინულ სისტემაზე. დეიონიდაზების აქტივობა რეგულირდება როგორც ტრანსკრიპციულ, ისე პოსტტრანსკრიპციულ ეტაპებზე (Gereben et al., 2008). ტრიოდთირონინი ახდენს Dio1 და Dio3-ის ტრანსკრიპციის რეგულირებას, ხოლო Dio3-ის ტრანსკრიპცია რეგულირდება THRA-ის მიერ. T4-ის და T3-ის გაზრდილი რაოდენობის შედეგად ხდება Dio2-ის დაუნრეგულაცია (Liu et al., 2018). Dio2 მნიშვნელოვანია თვის ტვინის ნორმალურ განვითარებასა და ფუნქციონირებისთვის. Dio3-მონაწილეობს თავის ტვინის სენსორულ განვითარებაში და იცავს მას დაზიანებისაგან. Dio3-ის დამცველობითი ფუნქცია განსაკუთრებით გამოხატულია თავის ტვინის ქერქში და ნათხეშში. Sonic hedgehog (Shh)-ცილა ახდენს უჯრედების პროლიფერაციას ნერვული განვითარების დროს იგი გავლენას ახდენს Dio2-ის და Dio3-ის მოქმედებაზე, კერძოდ იწვევს Dio3-ის გაძლიერებულ ექსპრესიას (აფრეგულაცია) და Dio2-ის დაუნრეგულაციას (ამას ის ახერხებს Dio2-ის უბიექტივაციით) (სურ. 3).



სურათი 3. დეიონიდაზების სუბუჯრედული ლოკალიზაცია (Gereben et al., 2008).

ფარისებრი ჯირკვლის ძირითადი პროდუქტებია L-თიროქსინი (T4) და ტრიოდო-თირონინი (T3). მათი სინთეზი მოიცავს სხვადასხვა ფერმენტულ საფეხურს, რომელთაგან პირველია იოდირება მე-3 პოზიციაზე ან L-თიროზინის ნაშთების არომატული რგოლის ორივე პოზიციაზე 3 და 5, რომელიც იმყოფება ცილოვან თირეოგლობულინში (TG) (სურ. 4).



სურათი 4. სქემატური გამოსახულება რეაქციების რომელიც რომელიც იწვევს T_4 (თიროქსინი) და T_3 (ტრიიოდთირონინი) გამომუშავებას და ფარისებრი ჯირკვლიდან განთავისუფლებას (Giammanco et al., 2020).

თიროზინის ნაშთების მონოიოდირებული (MIT) ან დიიოდირებული (DIT) რგოლი შემდეგ გადადის სხვა დიიოდირებული თიროზინის რგოლში, რითაც წარმოიქმნება ტრიოდო-თირონინის ან ტეტრაიოდო-თირონინის ნაშთები, ეს ნაშთები არის T_3 და T_4 -ის უშუალო წინამორბედები. სინთეზის ორივე საფეხური კატალიზირებულია ფარისებრი ჯირკვლის პეროქსიდაზას (TPO) მიერ და ხდება ფარისებრი ჯირკვლის ფოლიკულების სანათურში, ეგრეთ წოდებულ კოლოიდში, რომელიც ძირითადად ფორმირდება თირეოგლობულინით. ორივე TG და TPO არის ფარისებრი ჯირკვლის დიფერენციაციის მარკერები და ფუნქციონირებს როგორც აუტოანტიგენები ფარისებრი ჯირკვლის აუტოიმუნურ დაავადებებში, როგორიცაა ჰაშიმოტო, თირეოიდიტი.

ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონის მოქმედება და მეტაბოლიზმი მოითხოვს, იოდოთირონინის ტრანსპორტირებას უჯრედის მემბრანაში სპეციფიური გადამტანების მეშვეობით და არა, როგორც ეს წარსულში ითვლებოდა, პლაზმური მემბრანების პასიურად გადაკვეთით. ბოლო წლებში აღმოჩნდა, რომ სხვადასხვა ტრანსპორტერები მონაწილეობდნენ TH ტრანსპორტში პლაზმურ მემბრანაში. მათ შორის, სამი ოჯახი ასრულებს მთავარ და უფრო სპეციფიკურ როლს, რაზეც

მიუთითებს მათი მუტაციის ეფექტი: (1) მონოკარბოქსილატური გადამტანები (MCT) 8 და 10, (2) L- ტიპის ამინომჟავების გადამტანები (LATs) და (3) ორგანული ანიონის გადამტანები (OATPs, SLC10 და SLC17).

სპეციფიური გადამტანები OATP1C1 და MCT8, როგორც ჩანს, მონაწილეობენ T4-ის ტრანსპორტში ჰემატოენცეფალური ბარიერის გავლით და T3-ის ტრანსპორტში თავის ტვინის ნეირონებში, შესაბამისად. MCT8 გენი განლაგებულია ადამიანის Xq13 (Friesema et al., 2004). ინაქტივირებადი მუტაციები და დელეციები MCT8-ში იწვევს მკაფიო კლინიკურ სურათს, რომელიც ცნობილია როგორც ალან-ჰერდონ-დადლის სინდრომი (AHDS) (Dumitrescu et al., 2004; Friesema et al., 2006) პაციენტი ავლენს ფსიქომოტორული ჩამორჩენის მძიმე ფორმას, რომელიც ხასიათდება ცენტრალური ჰიპოტონიით, სპასტიური ტეტრაპლეგიით, მეტყველების განვითარების ნაკლებობით, მძიმე ინტელექტუალური დეფიციტით და გლობალური განვითარების შეფერხებით. გამოხატული ნევროლოგიური სიმპტომების გარდა, პაციენტებს აღენიშნებოდათ ცვლილებები TH პროფილში, მაღალი T3 და დაქვეითებული T4 კონცენტრაცია. 2004 წლიდან მოყოლებული, ლიტერატურაში მოხსენებულია 45-ზე მეტი ოჯახი 125 დაზარალებული პირით და შემთხვევების 1% X-შეჭიდული გონებრივი ჩამორჩენილობის დიაგნოზით, შეფასებულია, რომ დაკავშირებულია MCT8-ის მუტაციებთან (Visser et al., 2013) თუმცა, რომელი პათოგენური მექანიზმებით იწვევს MCT8 დეფიციტი AHDS-ს, ძირითადად უცნობია.

MCT8 წარმოდგენილია ბევრ ორგანოში, როგორიცაა ღვიძლი, თირკმელები, ჰიპოფიზი და ფარისებრი ჯირკვალი და ასევე ფართოდ არის გამოხატული ცნს-ში. თავისა და ადამიანის ტვინის ქსოვილებში ჩატარებულმა კვლევებმა გამოავლინა MCT8 ექსპრესია განსხვავებულ ნეირონულ პოპულაციებში, mRNA უმაღლესი დონეებით ნეო- და ალოკორტიკალურ სტრუქტურებში (მაგ., თავის ტვინის ქერქში, ჰიპოკამპუსში და ამიგდალაში), ასევე ჰიპოთალამუსის ნეიროენდოკრინულ ბირთვებში (მაგ., პარავენტრიკულური ბირთვი PVN). გარდა ამისა, MCT8 გვხვდება ტანიციტებში, ქოროიდული წნულის სტრუქტურებში და ჰემატოენცეფალურ ბარიერის (BBB) კაპილარულ ენდოთელურ უჯრედებში (Alkemade et al., 2011) მისი ლოკალიზაციის ფონზე, ვარაუდობენ რომ, MCT8 დეფიციტი არღვევს TH-ის შეწოვას ტვინის უჯრედებში, რითაც ხელს უშლის სწორ ნერვულ მიგრაციას და

დიფერენციაციის პროცესებს ტვინის განვითარების კრიტიკულ ეტაპებზე. როგორც აღმოჩნდა, ადამიანის თავის ტვინის ნორმალური ფუნქციონირება დამოკიდებულია Mct8 ტრანსპორტერზე, ხოლო თავგში ამ პროცესში ჩართულია Oatp1c1 ტრანსპორტერიც. ნევროლოგიური დარღვევები თავგში ვლინდება მაშინ, როდესაც ინაქტივირდება ორივე ტრანსპორტერი. MCT8-ის ექსპრესიის მასტიმულირებელს წარმოადგენს ასევე რეტინოის მჟავა (Mayerl et al., 2014).

1.2.4 თიროიდული ჰორმონების მოქმედების მექანიზმები

TH-ების მოქმედების ყველაზე ცნობილი მექანიზმები, სტეროიდების მსგავსად, ეყრდნობა ტრანსკრიპციის რეგულაციაზე პირდაპირ ზემოქმედებას, ბირთვული რეცეპტორების შუამავლობით. ეს ეფექტები ვლინდება გარკვეული პერიოდის შემდეგ, რომლის დროსაც საჭიროა რნმ-ისა და ცილების სინთეზი. თუმცა, TH-ით ინიცირებული ზოგიერთი უჯრედული ეფექტი ძალიან სწრაფად ვითარდება, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ ისინი გენომზე პირდაპირი ზემოქმედების გარდა სხვა, მექანიზმებით მოქმედებენ. ამ აქტივობებს „არაგენომურ“ მოქმედებას უწოდებენ (Davis et al., 2008).

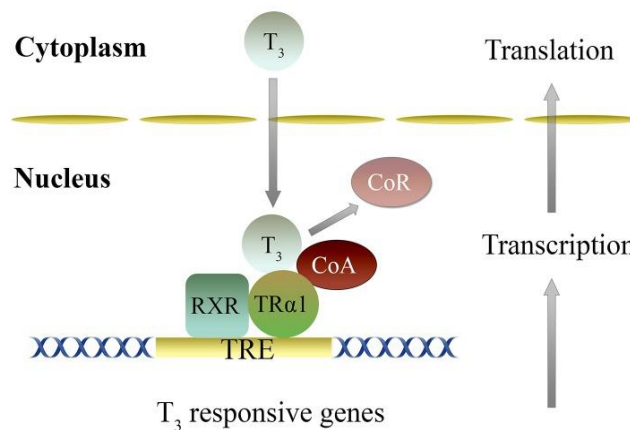
1.2.4.1 თიროიდული ჰორმონების გენომური მოქმედებები

T3 კლასიკური გენომური მოქმედებები განპირობებულია მაღალი აფინობის ბირთვული რეცეპტორებით, რომლებიც უშუალოდ არეგულირებენ გენის ექსპრესიას. ამის საპირისპიროდ, TH არაგენომური ზემოქმედება ხდება სწრაფად და მასზე გავლენას არ ახდენს ტრანსკრიპციის და ცილის სინთეზის ინჰიბიტორები. ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონის გენომური მოქმედების ეფექტებია: სამიზნე ქსოვილების განვითარება, დიფერენციაცია და ჰომეოსტაზის შენარჩუნება. თიროიდული ჰორმონის ბირთვული რეცეპტორების ორი იზოფორმა არსებობს: THRB და THRA. T4 უნდა გარდაიქმნას აქტიურ ფორმად T3, რათა გაააქტიუროს ბირთვული THR-ის რეცეპტორები, THRA და THRB. THRA და THRB განსხვავებულად ექსპრესირდება განვითარებად და ზრდასრულ ქსოვილებში. THR

ურთიერთქმედებს სპეციფიკურ დნმ-ის თანმიმდევრობებთან, TRE-ებთან, რომლებიც დადებითად ან უარყოფითად არეგულირებენ გენის ექსპრესიას. დაუკავშირებელი THRA და THRB უკავშირდებიან TRE-ს და ამცირებენ დადებითად რეგულირებული გენების ექსპრესიას (Cheng et al., 2010). იდენტიფიცირებულია რეცეპტორების კოფაქტორების დიდი ოჯახი, რომლებიც ურთიერთქმედებენ TR-სთან და ცვლიან გენთა ექსპრესიას, კერძოდ კოაქტივატორები რომლებიც ზრდიან და კორეპრესორები რომლებიც ამცირებენ გენთა ექსპრესიას (Hsia et al., 2010). ამ ცილების მთავარი ფუნქციაა ტრანსკრიფციის დათრგუნვა ან გააქტივება.

ძუძუმწოვრებში ნანახია TR- ის ოთხი იზოფორმა, კოდირებული α და β გენით, სადაც ისინი არეგულირებენ გენების ტრანსკრიფციას. იზოფორმები ქსოვილებში არიან გადანაწილებული : TR $\alpha 1$ და TR $\beta 1$ მნიშვნელოვანი როლი აქვს ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში. T3-ის გენომური მოქმედება დაკავშირებულია TR $\alpha 1$ იზოფორმაზე რადგანაც ის მონაწილეობს თავის ტვინში TR ექსპრესიაზე (Brent et al., 2012). TR $\alpha 1$ /TR $\alpha 2$ ექსპრესირდებიან : თავის ტვინში, ჩონჩხის კუნთებში, თირკმელებში, გულში, ღვიძლსა და ფილტვებში. TR $\beta 1$ გავრცელებულია სტრიატუმში, ცერებრალური ქერქში, ჰიპოკამპში ჰიპოთალამუსსა და ნათხეშში. TR $\beta 2$ რეცეპტორები ძირითადად გვხვდება : თავის ტვინში, ფილტვსა და ბადურაში. ხოლო რაც შეეხება TR $\beta 1$: თირკმელებში, ფარისებრი ჯირკვალში, ღვიძლში, თავის ტვინსა და გულშია ექსპრესირებული (Talhada et al., 2019) (სურ. 5).

TH genomic actions



სურათი 5. თავის ტვინში ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონების მოქმედების გენომური მექანიზმი. *National Center for Biotechnology Information, 2019. (Talhada et al., 2019)*

ბოლო დროს ასევე ხაზგასმულია ჰორმონის გენომური და არაგენომური მოქმედებების გადაფარვა (Hammes et al., 2015).

1.2.4.2 თიროიდული ჰორმონების არაგენომური მოქმედებები

თიროიდული ჰორმონების არაგენომური მოქმედება მოიცავს, TH-ის ურთიერთქმედებებს ექსტრაბირთვულ რეცეპტორებთან, რომლებიც მდებარეობენ: ციტოპლაზმაში, უჯრედულ მემბრანაში, მიტოქონდრიაში და ციტოზონში, მათ შორის TR α და TR β ბირთვის გარეთ არსებულ რეცეპტორებთან.

TH-ის არაგენომური მოქმედება შეიძლება გაშუალებული იყოს უჯრედის ზედაპირზე არსებული სპეციფიკური ინტეგრინით, $\alpha\beta 3$ რეცეპტორებით ან ბირთვული რეცეპტორის TR α იზოფორმებით, პლაზმურ მემბრანაზე ან ციტოპლაზმაში. ჰორმონი ასევე არაგენომურად მოქმედებს მიტოქონდრიაზე, სხვა TR იზოფორმის მეშვეობით. $\alpha\beta 3$ -ინტეგრინული რეცეპტორით გაშუალებული სიგნალის გაცემისას TH შეუძლია ადგილობრივად იმოქმედოს პლაზმურ მემბრანაზე (Hammes et al., 2015). ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონების არაგენომური მოქმედებები მოიცავს მრავალ ფიზიოლოგიურ პროცესს სხვადასხვა ტიპის უჯრედებში და ითვლება, რომ შუამავალია Ca^{2+} , ციკლური-AMP ან პროტეინკინაზას სასიგნალო კასკადების ინდუქცია. ამ სფეროში ბოლოდროინდელმა მიღწევებმა გამოავლინა ინტეგრინი $\alpha\beta 3$, როგორც T4-ის მაღალი აფინობის მემბრანული რეცეპტორი, რომელიც ააქტიურებს MAPK (ERK1/2) სასიგნალო გზას და იწვევს ბირთვული რეცეპტორის ფოსფორილაციას, ანგიოგენეზის ინდუქციასა და უჯრედების ზრდის ხელშეწყობას.

TH ასევე არიან მიტოქონდრიული ფუნქციის ძირითადი რეგულატორები და ითვლება რომ, დიოდოთირონინი (T2) და T3 შუამავლობენ სწრაფ თერმოგენურ პასუხებს. T2 აკავშირებს და ააქტიურებს მიტოქონდრიულ ციტოქრომ-c-ოქსიდაზას, ხოლო T3 აკავშირებს ორ შეკვეცილ TR α იზოფორმას (p28 და p43) მიტოქონდრიაში.

P28 თანალოკალიზებულია ადენინის ბირთვულ ტრანსლოკაზასთან და გამოყოფილ პროტეინებთან, ხოლო ლიგანდირებული-p43 აკავშირებს მიტოქონდრიულ-დნმ-ის საპასუხო ელემენტებს და არეგულირებს მიტოქონდრიული ცილის სინთეზს. ამრიგად, ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონები ახორციელებენ მნიშვნელოვან ფიზიოლოგიურ მოქმედებებს როგორც გენომური, ასევე არაგენომური ეფექტებით (Davis et al., 2008; Davis et al., 2021).

TH-ის არაგენომური ეფექტების აღმოჩენა 1970-იანი წლების ბოლოს 1980-იანი წლების დასაწყისით თარიღდება. ექსპერიმენტის შედეგად ფარისებრი ჯირკვლის ამოკვეთის შემდეგ T3-ის დაბალი დოზების ინექციები შეუყვანეს ცხოველებს, ცხოველებმა რამდენიმე წუთში გაზარდეს მიტოქონდრიული ატფ-ის წარმოება, რასაც თან მოყვა ჟანგბადის მოხმარების ზრდა. ეფექტი არ მოიხსნა ცილის სინთეზის, ინჰიბიტორების მიერ რის გამოც გამოირიცხა ბირთვული გზა (Sterling et al., 1978)

პირველი კონკრეტული ექსტრაბირთვული სამიზნეებს შორის იყო არაგენომური ეფექტები, ერითროციტების პლაზმურ მემბრანაზე $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ აქტივობა, სადაც ტრიოდთირონინის მაღალი აფინურობის დამაკავშირებელი ადგილები აღმოაჩინეს ვირთაგვის ერითროციტის მემბრანებში, შემდეგ აღმოაჩინეს, რომ T3-მა ასევე შეიძლება გავლენა იქონიოს ცილების ფოსფორილირებაზე სხვადასხვა ქსოვილებში, რასაც 1 საათზე ნაკლებ დრო დასჭირდება, რაც აშკარად გულისხმობს არაგენომურ მოქმედებებს. იმავე წლებში შეისწავლიდნენ ასევე „არაბირთვულ“ ეფექტებს, როგორც მათ თავდაპირველად უწოდებდნენ მათ შორის: სხვადასხვა მემბრანული სატრანსპორტო სისტემები და ფერმენტული აქტივობები, როგორიცაა $\text{Ca}^{2+}-\text{ATPase}$, აცეტილქოლინესტერაზა, $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$, და გლუკოზის ტრანსპორტი (de Mendoza et al., 1978; Galo et al., 1981) მოგვიანებით დადგინდა რომ არაგენომური ეფექტი გააჩნდა ასევე T4-ს, კონკრეტულად მის უნარს გარდაქმნას ხსნადი აქტინი ბოჭკოვან ფორმაში, რაც გავლენას ახდენს ციტოჩონჩხის ფორმირებაზე და II ტიპის იოდთირონინის 50-დეიოდინაზას ფუნქციაზე (Siegrist-Kaiser et al., 1990)

TH-ის ერთ-ერთი მთავარი სამიზნე არის გულ-სისხლძარღვთა სისტემა. ამ სისტემაში მემბრანული სატრანსპორტო სისტემების მოდულაციას, როგორიცაა კალციუმის ტუმბო და $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ -აზა, აქვს დიდი ფიზიოლოგიური მნიშვნელობა (Incerpi et al., 2018) კარდიომიოციტებში თიროიდული ჰორმონები განაპირობებენ ზოგიერთი

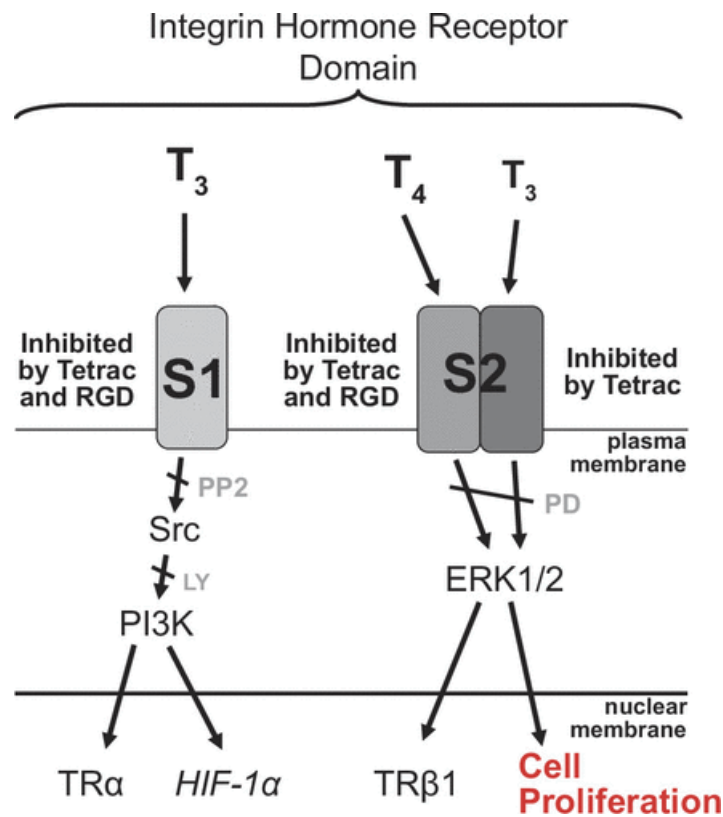
გენის დადებით რეგულაციას/ექსპრესიის გაზრდას, კერძოდ: α -მიოზინის მძიმე ჯაჭვის; სარკოპლაზმური ბადის Ca^{2+} -ATP-ზის; ვოლტაჟ-დამოკიდებული კალციუმის არხების, Na^+/K^+ -ATP-ზის; რიანოდინის რეცეპტორების; L- ტიპის კალციუმის არხების; და β -ადრენერგული რეცეპტორების მაკოდირებელი გენების. ზოგ გენზე ახდენენ საპირისპირო მოქმედებას, თრგუნავენ ამ გენების ექსპრესიას. ეს გენებია: β -მიოზინის მძიმე ჯაჭვის, $\text{Na}^+, \text{Ca}^{2+}$ -მიმომცვლელის და ადენილატციკლაზას გარკვეული იზოფორმების გენები.

T3-ის აქტივობის ფიზიოლოგიური შედეგია გულისცემის გახშირება და სისტოლური შეკუმშვების გაძლიერება, მცირდება დიასტოლური რელაქსაციის ხანგრძლივობა, ძლიერდება სისხლძარღვთა ტონუსი, მცირდება პლაზმური მემბრანის ლიპიდური დონე. გაუმჯობესებული მიოკარდიუმის შეკუმშვა და T3-ით გამოწვეული დიასტოლური რელაქსაციის გაზრდილი სიჩქარე შეიძლება დაკავშირებული იყოს სპეციფიკურ Ca^{2+} -ATP-აზას mRNA-ის დონის ცვლილებებთან, რაც იწვევს ტუმბოს ერთეულების რაოდენობის მატებას. T3-ის ძირითადი ეფექტები განპირობებულია ბირთვული რეცეპტორებით და TR იზოფორმების ექსპრესიის ხარისხმა შეიძლება გავლენა მოახდინოს გულის ფუნქციაზე მაგრამ მიოკარდიუმის სარკოლემის Ca^{2+} -ATPA-ების აქტივობა და სარკოპლაზმური რეტიკულუმი ასევე შეიძლება გააქტიურდეს არაგენომურად. ორივე ეფექტი ხელს უწყობს სარკოპლაზმური (გულის ციტოპლაზმური) კალციუმის შემცველობის შემცირებას და აუმჯობესებს მიოკარდიუმის რელაქსაციას და დიასტოლურ ფუნქციას, რაც იწვევს გულის დამცველობით ეფექტებს (Farias et al. 2006). საინტერესოა ის ფაქტი, რომ სატრანსპორტო სისტემები და სხვა აქტივობები, რომლებიც მოდულირებულია გენომური მექანიზმებით ბირთვული TR რეცეპტორების მეშვეობით ასევე არის არაგენომური მოქმედებების სამიზნე და ეს არის ერთ-ერთი პირველი მტკიცებულება გენომურ და არაგენომურ გზებს შორის ურთიერკავშირების არსებობის. ბირთვული რეცეპტორების არაგენომური აქტივობის კიდევ ერთი მაგალითია T3-დამოკიდებული PI3K-ის გააქტიურება. ადამიანის ენდოთელურ უჯრედებში აქტივაცია მიიღწევა ბირთვული რეცეპტორის პირდაპირი ურთიერთქმედებით PI3K-ის p85 ქვეერთეულთან, რაც იწვევს Akt-ის და ენდოთელური აზოტის ოქსიდის სინთაზას ფოსფორილირებას და გააქტიურებას (Hiroi et al., 2006). ვირთავის

ჰიპოფიზის უჯრედებში, T3-ის შეკავშირება TR β 2-თან იწვევს: PI3K გააქტიურებას, ფოსფატიდილინოზიტოლის 3,4,5-ტრიფოსფატის და Rac-ის შედეგობრივ მატებას, არეგულირებს KCHN2 არხების აქტივობას, რომლებიც პოტენციალ დამოკიდებული კალიუმის არხებია და იწვევს კალიუმის გადატყორცნას (Storey et al., 2006).

TH-ის არაგენომური მოქმედების კიდევ ერთი მაგალითია T3- დამოკიდებული ფოსფატიდილინოზიტოლ-3-კინაზის აქტივობა. T3-ის არაგენომური მოქმედება გამოიხატება ჩონჩხის კუნთებში კინაზას გააქტივებით. ეს კინაზებია: p38 და AMP-აქტივირებადი პროტეინკინაზა (AMPK). p38 MAPK კინაზები არიან პროტეინკინაზების ოჯახის წარმომადგენლები, რომლებიც აქტივირდებიან სხვადასხვა გარემო ფაქტორების ზემოქმედებით როგორიცაა: ციტოკინები, სტრესი, ჟანგბადის რეაქტიული ფორმები.

AMPK წარმოადგენს სერინ/თრეონინ კინაზებს, რომლიც AMP/ATP დონის ცვლილებას პასუხობს. ამ პროცესების შედეგად აქტივირდება ტრანსკრიპციული ფაქტორები როგორიცაა: Nrf1, PPAR- γ , და PGC-1 α , რომლებიც მონაწილეობენ სხვადასხვა ფიზიოლოგიურ პროცესებში: გლუკოზის მეტაბოლიზმში, მიტოქონდრიის ბიოგენეზში და კუნთის უჯრედების დიფერენცირებაში (Irrcher et al., 2008). ასევე დადგენილია, რომ T4 და T3 ურთიერთქმედებენ $\alpha\beta$ 3-ინტეგრინის S2 დომეტან და ააქტივებენ მიტოგენით აქტივირებადი პროტეინ კინაზების MAPK 1 და 2 სასიგნალო გზას. ეს სასიგნალო კასკადი აქტიურდება ფოსფოლიპაზა C (PLC) და PKC-ს საშუალებით. შემდგომში ამ სასიგნალო გზის გააქტივების შედეგად ადგილი აქვს: TR β 1, ესტროგენის რეცეპტორი α , ინტერფერონ გამა (IFN- γ), სიგნალის გადამტანი და ტრანსკრიფციის აქტივატორის (STAT) 1 α და ა.შ. ბირთვში გადასვლას (სურ. 6).



სურათი 6. შემოთავაზებული გზები, რომლითაც ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონები ხელს უწყობენ U-87 MG უჯრედების პროლიფერაციას და ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონის რეცეპტორების TRα და TRβ1 უჯრედშიდა გადაადგილებას (Lin et al., 2009) <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/aipcell.00305.2008>

1.3. ციტოჩონჩხის სტრუქტურა და მის დინამიკაზე მოქმედი ფაქტორები

1.3.1 G აქტინი F აქტინის როლი ციტოჩონჩხის სტაბილურობაში

ციტოჩონჩხი შედგება სამი კომპონენტისგან, 3 სახის ფილამენტისგან: მიკროფილამენტები, შუალედური ფილამენტები და მიკროტუბულები.

ციტოჩონჩხი ერთ-ერთი ყველაზე რთული და ფუნქციურად მრავალმხრივი სტრუქტურაა, რომელიც მონაწილეობს ისეთ პროცესებში, როგორიცაა ენდოციტოზი, უჯრედების გაყოფა, უჯრედშიდა ტრანსპორტი, მოძრაობა, ძალის გადაცემა, რეაქცია გარე ძალებზე, ადჰეზია და უჯრედის ფორმის ადაპტაცია. ამ ფუნქციებს შუამავლობს ციტოჩონჩხის ძაფების სამი კლასიკური ტიპი, როგორიცაა: აქტინი, მიკროტუბულები

და შუალედური ფილამენტები. აღნიშნული ფილამენტები ქმნიან ქსელს, რომელიც არის უაღრესად სტრუქტურირებული და დინამიური. რეაგირებს გარე და შიდა სიგნალებზე სწრაფი რეორგანიზაციით, რომელიც ორკესტრირებულია უმცირეს დროში. სწორედ ამიტომ, მკაცრად უნდა იყოს რეგულირებული.

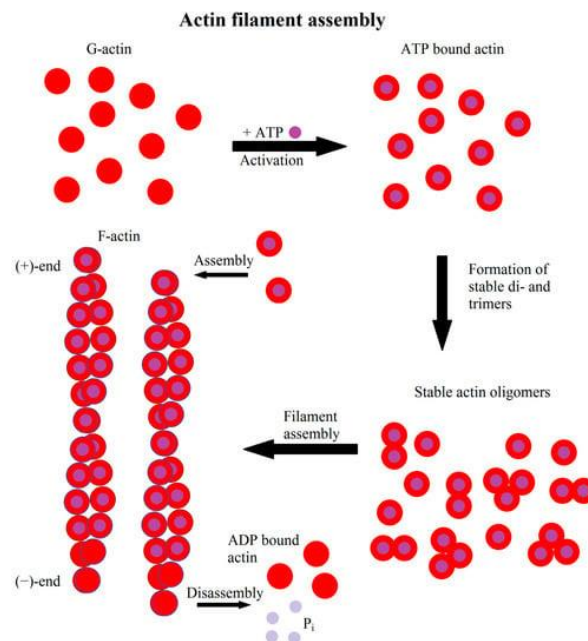
ციტოჩონჩხი მნიშვნელოვან როლს ასრულებს სიმსივნური უჯრედების გავრცელებასა და მიგრაციაში, განსაკუთრებით თავის ტვინის სიმსივნეებში, ვინაიდან ციტოჩონჩხის ორგანიზაცია და რეგულირება რთული და მრავალმხრივია.

უჯრედებში აქტინი გვხვდება ორ განსხვავებულ მდგომარეობაში, შემდეგნაირად: მონომერული G-აქტინი და ძაფისებური F-აქტინი. აქტინის ციტოჩონჩხის მოდულაცია რეგულირდება მონომერული G- და პოლიმერული F-აქტინის ბალანსით და აქტინთან ასოცირებული პროტეინებით (Rotty et al., 2014). აქტინის ციტოჩონჩხი აყალიბებს ქსელს, რომელიც შედგება პოლარიზებული ძაფებისგან, რომლებიც ძირითადად დაკავშირებულია მოძრაობის, ფოკალური ადჰეზიისა და ფორმის ცვლილებებისთვის საჭირო ძალის წარმოქმნასთან.

აქტინის ფილამენტები, შუალედური ფილამენტებისა და მიკროტუბულებისგან განსხვავებით, ნახევრადმოქნილი ფილამენტებია, რომლებიც ქმნიან დენდრიტულ ან ჯვარედინ სტრუქტურებს (Schneider et al., 2023). როგორც ნახევრადმოქნილი პოლიმერი, აქტინის ბოჭკოები აქტიურად იცვლება თერმული ფლუქტუაციების შედეგად, რითაც წარმოქმნის დამატებით წინააღმდეგობას ბოჭკოების გაჭიმვის ძალების მიმართ. თავად აქტინი ითვლება ყველაზე დინამიურად ციტოჩონჩხის სამი ცილიდან, რომელსაც შეუძლია ძლიერი სტრუქტურული ცვლილებების განხორციელება, რითაც განსაზღვრავს უჯრედის ფორმას. ერთი აქტინის ძაფი შედგება აქტინის მონომერებისგან, რომელსაც ეწოდება გლობულარული აქტინი (G-actin). თითქმის ფიზიოლოგიურ პირობებში G-აქტინი პოლიმერიზდება ასიმეტრიულ სპირალურ სტრუქტურებად, ძაფისებრ აქტინად (F-actin).

მიღებულ აქტინის ძაფებს აქვთ მარჯვენა ხელის ხვეული სტრუქტურა. G-აქტინი პოლარიზებულია, შესაბამისად, F-აქტინი ასევე პოლარიზებულია, ნაკლებად დინამიურ მხარეს ეწოდება (-) ბოლო და უფრო დინამიური (+) ბოლო აქვს ათჯერ უფრო მაღალი პოლიმერიზაციის სიჩქარე, ვიდრე (-) ვინაიდან აქტინი არის ATP-აზა, (+) და (-) ბოლოები ასევე შეიძლება გამოირჩეოდეს მათი ATP/ADP სტატუსით,

განსაკუთრებით თუ (-) ბოლოზე ზრდა შემდგომში შეფერხებულია. ამრიგად, (+)ბოლო შეიცავს უფრო მეტ რაოდენობას ATP დაკავშირებულ აქტინს, ხოლო (-) ბოლო შეიცავს უფრო მეტ ADP-თან დაკავშირებულ აქტინს (სურ 7).



სურათი 7. აქტინის ძაფის ფორმირების სქემა. პირველად G-აქტინი უკავშირდება ATP-ს. ამის შემდეგ, იგი აყალიბებს სტაბილურ დი- ან ტრიმერებს და ბოლოს, ძაფები გრძელდება მონომერების დამატებით. ATP-ის ჰიდროლიზი ADP-მდე იწვევს განსხვავებას სწრაფად მზარდ (+) ბოლოსა და ნელა მზარდ ან დისოცირებულ (-) ბოლოს შორის (Hoffmann et al., 2019)

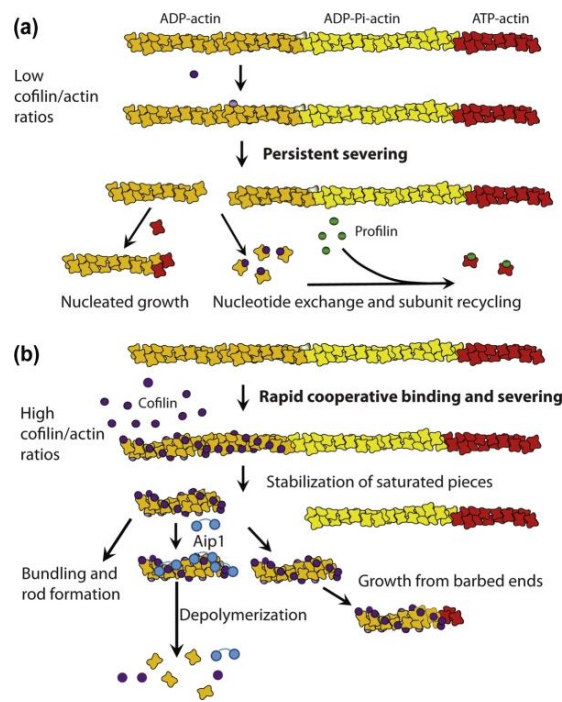
1.3.2 კოფილინი და მისი როლი აქტინის დინამიურობაში

აქტინის დამაკავშირებელ ბევრ სხვა პროტეინთან ერთად აქტინ-დეპოლიმერიზაციის ფაქტორი/კოფილინები აერთიანებს ტრანსმემბრანულ სიგნალებს, რათა კოორდინაცია გაუწიოს აქტინის ძაფის აწყობა/დაშლის (დინამიკას). გარდა ამისა, ამ ცილების ახლად აღმოჩენილი ეფექტები ლიპიდურ მეტაბოლიზმში, გენის რეგულაციასა და აპოპტოზში ვარაუდობს, რომ მათი როლი სცილდება ციტოჩონჩხის რეგულირებას.

ყველა ეუკარიოტში ექსპრესირდება აქტინის-დეპოლიმერიზაციის ფაქტორის(ADF) /კოფილინის ოჯახის მინიმუმ ერთ წევრი მაინც აქტინ-შემაკავშირებელ ცილებიდან (Van Troys et al., 2008). ბუბუმწოვრებში სამი ფორმაა გამოხატული: ADF (ასევე

ცნობილია როგორც დესტრინი); კოფილინი-1, ძირითადი ყველგანმავალი ფორმა არაკუნთოვან ქსოვილში და კოფილინი-2 ძირითადი ფორმა დიფერენცირებულ კუნთებში. იმ ვიტრო, ADF და კოფილინი-1 თვისობრივად მსგავსია, მაგრამ განსხვავდებიან რაოდენობრივად. ADF-ს აქვს უფრო სუსტი ბირთვული უნარი, ვიდრე კოფილინს და შესაბამისად, შეიძლება გახდეს ატფ-აქტინის მონომერის სეკვესტრული პროტეინი იმ კონცენტრაციებში, რომლებშიც კოფილინი აძლიერებს კოფილინი-ატფ-აქტინის კომპლექსის შეერთებას. თუმცა, ფიზიოლოგიური მოლური თანაფარდობით აქტინთან (ზოგადად 1:25-დან 1:4-მდე), ორივე ADF და კოფილინი აკავშირებს ADP სუბერთეულებს აქტინში (F-აქტინი), რაც იწვევს აქტინის გაძლიერებულ დინამიკას (Yeoh et al., 2001; Chen et al., 2004).

კოფილინი ყველაზე ცნობილია, როგორც აქტინის ძაფის არათანაბარი აწყობის/დაშლის რეგულატორი. ხელს უწყობს თუ არა კოფილინი აქტინის აწყობას ან დაშლას, დამოკიდებულია კოფილინის კონცენტრაციაზე აქტინთან მიმართებაში და სხვა აქტინ-შემაკავშირებელ ცილების შედარებით კონცენტრაციაზე. In vitro კვლევებმა აჩვენა, რომ თუ კოფილინი/აქტინის სუბერთეულების თანაფარდობა ძაფში დაბალია (1%-ზე ნაკლები), ეს იწვევს ძაფის მუდმივ გაწყვეტას (სურ. 8) (Andrianantoandro et al., 2006). კოფილინი/აქტინის უფრო მაღალი მოლარული თანაფარდობის დროს (1:10-დან 1:2-მდე), კოფილინი წყდება სწრაფად, მაგრამ დროებით, რადგან ის აკავშირებს F-აქტინს კოოპერატიულად და ასტაბილურებს F-აქტინს გრეხილ ფორმაში, რადგან ის გააჯერებს მოწყვეტილ ნაჭრებს. მართლაც, კოფილინი-ADP-აქტინის კომპლექსის აწყობა არადინამიურ აქტინის ძაფებში, არის ენერგიის დაზოგვის მნიშვნელოვანი მექანიზმი, რომელიც უჯრედების უმეტესობაში ადვილად შექცევადია. თუმცა, სტრესული ნეირონების აქსონებსა და დენდრიტებში, ღეროები ბლოკავს ტრანსპორტირებას და იწვევს სინაფსების დაკარგვას (Bamburg et al., 2010), რაც შესაძლოა ხელს უწყობს დემენციას, მათ შორის ალცჰეიმერის დაავადებას (Bernstein et al., 2010)



სურათი 8. კოფილინის კონცენტრაციაზე დამოკიდებული ეფექტები აქტინის დინამიკაზე (Bamburg et al., 2010)

კოფილინის რეგულირება დამოკიდებულია სამი ძირითადი მექანიზმზე: 1. ფოსფატიდილინოზიტოლ-4,5 ბიფოსფატის გამოყოფა პლაზმურ მემბრანაში. 2. Ser3-ის დეფოსფორილაცია 3. კორტაქტინის გამოყოფა. რაც შეეხება ინჰიბირებას, კოფილინი ინჰიბირდება LIM-კინაზას მეშვეობით, ეს კინაზა არის ციტოქონჩხის დინამიურობაში მონაწილე ფერმენტი (Birkenfeld et al., 2003).

კოფილინის მეორე მნიშვნელოვან ფუნქციაა აპოპტოზურ პროცესებში მონაწილეობა. აპოპტოზური სიგნალების ჩართვა ხდება მიტოქონდრიიდან, აპოპტოზური ცილების გამოყოფით და მათი გააქტივებით. კოფილინი სწორედ ერთ-ერთი ცილაა, რომელიც იწვევს მიტოქონდრიით განპირობებული აპოპტოზის ჩართვას (Kim et al., 2010). კოფილინის აქტივობა შიძლება დარეგულირდეს სხვა გზითაც, PAK-LIM კინაზური გზით. PAK-LIM-კინაზას დაქვეითებულმა მოქმედებამ ან სპეციფიკური შუალედური ფოსფატაზას მომატებულმა აქტივობამ, შესაძლოა კოფილინის ფოსფორილების შემცირება გამოიწვიოს. ფოსფორილების დონის შემცირება ზრდის კოფილინის დაკავშირების შანსს, ფიბრილარულ აქტინთან. მოცემული კავშირი შესაძლოა გახდეს სინაფსური დისფუნქციის და სხვადასხვა ნევროლოგიური დაავადებების ჩამოყალიბების მიზეზი (Ferhat et al., 2012).

1.4 ინტეგრინი და თიროზინკინაზები

nRTK რეცეპტორული თიროზინკინაზების უჯრედშიდა სტრუქტურები, რომლებიც წარმოიქმნება ინტეგრინებით და ციტოჩონჩხის ცილებით არის "კეროვანი კომპლექსები". ინტეგრინის სიგნალინგის პირველი ნაბიჯები მოიცავს ურთიერთქმედებებს თიროზინ კინაზებთან როგორცაა ფოკალური ადჰეზიური კინაზა (Fak), Src კინაზა, ინტეგრინთან დაკავშირებული კინაზა, ციტოჩონჩხის ცილები, როგორცაა ტალინი და კინდლინი, და ხარაჩოების მოლეკულები, როგორცაა P130CRK-თან ასოცირებული სუბსტრატი (P130Cas) (Yan and Cui, 2023). გარდა ამისა, ინტეგრინები არეგულირებს ნეირონული აქტინის დინამიკას ციტოჩონჩხში, რომელიც საბოლოოდ აძლიერებს ნეირონების უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას Rac1/NADPH ოქსიდაზას/კოფილინ-1-ის მეშვეობით გზა (Barbakadze et al., 2023).

კლინიკური და პრეკლინიკური კვლევების მზარდი მტკიცებულება ცხადყოფს nRTK თიროზინკინაზების კრიტიკულ როლს კოგნიტური დარღვევების პათოფიზიოლოგიასა და თერაპიაში (Mao and Wang, 2016). რამდენიმე nRTK წევრს სამი nRTK ქვეოჯახიდან: Src, JAK, FAK შეუძლიათ დაუკავშირდნენ უჯრედშიდა, ინტრაბირთვულ და სინაფსურ სასიგნალო ქსელს (Kalia et al., 2004). გაჩენილი მტკიცებულებები აჩვენებს, რომ nRTK წევრები ამ სამი ოჯახიდან მგრძნობიარეა სტრესის მიმართ (Wang et al., 2022). ბოლო გამოკვლევებმა აჩვენა რომ, T3 ამცირებს ინტეგრინ $\alpha\beta3$ -დამოკიდებულ Fyn-კინაზას ფოსფორილირებას (Barbakadze et al., 2023).

სხვადასხვა ზრდის ფაქტორების მოქმედებით ინტეგრინები ააქტივებენ სხვადასხვა დაღმავალ სასიგნალო სისტემებს, მათ შორის თიროზინკინაზების ოჯახის ცილებს, როგორცაა Src-კინაზები (Johnson et al., 2007). ამ ოჯახის მთავარი წარმომადგენლებია: cSrc, Fyn, Lyn და Yes თიროზინკინაზები (Kefalas et al., 1995).

Jak თიროზინ კინაზა მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ტვინის კოგნიტური ფუნქციების რეგულირებაში. რამდენიმე კვლევა აჩვენებს, რომ JAK2/STAT5

სასიგნალო კასკადი კრიტიკულია ნეიროფსიქიატრიული დარღვევებისთვის (Jain et al., 2021).

1.4.1 Fyn თიროზინკინაზის როლი და ნეიროპროტექტორული ეფექტები

Src ოჯახი (SFKs) შედგება 11 წევრისაგან (Blk, Brk, Fgr, Frk, Hck, Lck, Lyn, c-Src, Srm და c-Yes) ადამიანებში (Rudd et al., 1993) ჩართულია ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში (ცნს) მიმდინარე პროცესებში, მათ შორის სინაფსური გადაცემა, მიელინაცია, აქსონის რეგულირება და ოლიგოდენდროციტების ფორმირება. ძუძუმწოვრებში Src, Fyn და Yes (SYF) ყველგან გვხვდება და ექსპრესირდება ხოლო ოჯახის სხვა წევრები აჩვენებენ ექსპრესიის უფრო შეზღუდულ პროფილს (Reinecke et al., 2014).

Fyn არის Src ოჯახის, წარმოდგენილი არარეცეპტორული თიროზინკინაზა. უხვად ექსპრესირდება ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში. ფინის დეფიციტი თავგებში იწვევს ჰიპოკამპის გახანგრძლივებულ პოტენციაციას, სივრცითი სწავლის დეფიციტს და შიშის გაზრდას და აუდიოგენური კრუნჩხვის მგრძნობელობას ახალ თაობებში (Grant et al., 1992). Fyn აქტივაციას შეუძლია ნეირონების გამომუშავება უფრო მგრძნობიარე სინაპტოტოქსიურობის მიმართ, ხოლო შემცირებულ აქტივაციას აქვს ნეიროპროტექტორული ეფექტი. თუმცა, გადაჭარბებულმა დათრგუნვამ შეიძლება დააზიანოს კოგნიტური ფუნქცია ადამიანებში. ამრიგად, დელიკატური წონასწორობის შენარჩუნება Fyn-ის აქტივაციასა და ინჰიბიციას შორის გადამწყვეტია (Matrone et al., 2020). Fyn-ის გადაჭარბებული გააქტიურება კავშირშია ტვინის პათოგენეზთან, რომელიც გამოწვეულია იშემიით, რომელიც პოტენციურად იწვევს აპოპტოზს (Du et al., 2012).

Fyn-ის თავდაპირველი აღწერიდან თითქმის ასი წლის შემდეგ, ეს ცილა აგრძელებს ექსტრემალურ ინტერესს მოლეკულურ სასიგნალო გზებზე მისი მოქმედებების სიმრავლის გამო, რომლებიც ემყარება ნეიროგანვითარების და ასევე ნეიროპათოლოგიური მოვლენებს.

Fyn-ის მრავალფეროვან სასიგნალო გზებში მონაწილეობის გამო ამ გზების მოშლისას, Fyn-ს შეუძლია წვლილი შეიტანოს ტვინის მძიმე პათოლოგიების

განვითარებაში, როგორცაა ალცჰეიმერის დაავადება (AD) და გაფანტული სკლეროზი (MS) (Matrone et al., 2019; Franklin et al., 2008; Schenone et al., 2011).

პერიფერიულ იმუნურ სისტემაში, Fyn მნიშვნელოვან როლს ასრულებს T-უჯრედების და B-უჯრედების რეცეპტორების სიგნალიზის რეგულირებასა და ბუნებრივი მკვლელი უჯრედების დიფერენციაში (Resh et al., 1998; Saito et al., 2010). მთელი რიგი დამატებითი ბიოლოგიური ფუნქციები, რომლებშიც მონაწილეობს Fyn ფართოდ არის მოხსენებული და მოიცავს ზრდის ფაქტორს და ციტოკინის რეცეპტორების სიგნალიზაციას, იონური არხის ფუნქციას, თრომბოციტების აქტივაციას, განაყოფიერებას, მიტოზის ინიცირებას (Thomas et al., 1997; Sicheri et al., 1997)

მეორეს მხრივ, Fyn-ის აფრეგულაცია და გენეტიკური ცვლილებები დაკავშირებულია ზოგიერთ ავთვისებიან სიმსივნესთან, ასევე რამდენიმე ნეირონულ დისფუნქციასთან. სინამდვილეში, გადაჭარბებული ექსპრესიას, Fyn გავლენას ახდენს უჯრედების ზრდასა და პროლიფერაციაზე და იწვევს მორფოგენურ გარდაქმნებსა და მიტოგენური სიგნალების ცვლილებებს (Chin et al., 2005). გარდა ამისა, Fyn აკონტროლებს ინტეგრინის ადჰეზიას და უჯრედ-უჯრედულ ურთიერთქმედებას, ყველა კლინიკურ მახასიათებელს კიბოს იდენტიფიცირებისთვის (Abram et al., 2000)

Fyn არსებობს ორი კონფორმაციით: აქტიური და არააქტიური. Fyn აქტივაცია (როგორც სხვა Src წევრებისთვის) დამოკიდებულია ლიგანდის შეერთებაზე SH2 და/ან SH3 დომენებთან და ორი კრიტიკული თიროზინის ნაშთების ფოსფორილირება/დეფოსფორილირებაზე (Matrone et al., 2020)

ლიტერატურის მონაცემებით ცნობილია ნერვული უჯრედების დიფერენცირებაში Fyn-თიროზინკინაზის მონაწილეობა, რომელიც რეგულირდება ინტეგრინების გააქტივების გზით, მათ შორის TH avb3-ინტეგრინის მიერ (Osterhout et al., 1999). ამასთანავე, Fyn ააქტივებს Rho-გტფ-აზების ოჯახის ცილა Rac-ს, რომელიც მონაწილეობას იღებს ოლიგოდენდროციტების დიფერენცირების რეგულაციაში.

1.4.2 მცირე GTP-შემაკავშირებელი ცილების როლი ციტოქინების სტაბილიზებაში

კინაზების სინთეზი რეგულირდება ოლიგოდენდროციტების დიფერენცირების დროს. ოლიგოდენდროციტების დამუშავება Src კინაზას ინჰიბიტორებით ბლოკავს ოლიგოდენდროციტების დიფერენცირებას. ოლიგოდენდროციტები ექსპრესირებენ შემდეგ ინტეგრინებს: $\alpha\beta 1$, $\alpha\beta 1$, $\alpha\beta 3$ და $\alpha\beta 5$. ინტეგრინის ჩართულობა იწვევს მრავალ სასიგნალო კასკადის აქტივაციას : თიროზინკინაზების და Rho ოჯახის GTP-აზების (Price et al., 1998).

მცირე GTP-შემაკავშირებელი ცილები (G ცილები) გვხვდება ეუკარიოტებში, შედგება 100-ზე მეტი წევრისაგან. ეს სუპეროჯახი სტრუქტურულად კლასიფიცირებულია მინიმუმ ხუთ ოჯახად: Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf, და Ran ოჯახებად. ისინი არეგულირებენ უჯრედების ფუნქციების მრავალფეროვნებას, განსაზღვრავენ უჯრედის სპეციფიკურ ფუნქციებს, დროის პერიოდებს კონკრეტული უჯრედის ფუნქციების გასაგრძელებლად. გარდა ამისა, ისინი მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ უჯრედის სპეციფიკური ფუნქციების არა მხოლოდ დროებით, არამედ სივრცით განსაზღვრაში. Ras ოჯახი არეგულირებს გენის ექსპრესიას, Rho ოჯახი არეგულირებს ციტოჩონჩხის რეორგანიზაციას და გენის ექსპრესიას, Rab და Sar1/Arf ოჯახები არეგულირებს ვეზიკულების ტრეფიკინგის, ხოლო Ran ოჯახი არეგულირებს ნუკლეოციტოპლაზმურ ტრანსპორტს და მიკროტუბულების ჩამოყალიბებას (Takai et al., 2001). Rho, Cdc42 (Rho ოჯახიდან) და Rac წარმომადგენლები არეგულირებს უჯრედში მიმდინარე მორფოლოგიურ ცვლილებებს, რომლებიც ოლიგოდენდროციტების დიფერენცირებასთან არის კავშირში. Cdc42 და Rac1 პირველადი ოლიგოდენდროციტების დიფერენცირებაში მონაწილეობენ. ინტეგრინის ან Fyn აქტივაციის დათრგუნვა იწვევს Rac1 და cdc42 აქტივობის დათრგუნვას, ასევე მიეღინის ფუძე ცილის ექსპრესიის დაქვეითებას , შედეგად ვასკნით რომ ინტეგრინ-Fyn-Rho ოჯახის GTP-აზას გზა ჩართულია ოლიგოდენდროციტების მორფოლოგიურ დიფერენცირებაში. ცნობილია, რომ Rac ცილა არეგულირებს NADPH-ოქსიდაზას (NOX) აქტივობას უჯრედის შიგნით, რომელიც წარმოადგენს ტრანსკრიფციული ფაქტორების მნიშვნელოვან რეგულატორს ცნს-ში. ამ ფაქტორებიდან აღსანიშნავია HIF1 α , Nrf2 და სხვა (Nayernia et al., 2014).

1.4.3 JAK2/STAT5 სასიგნალო კასკადი

JAK/STAT შედგება ლიგანდ-რეცეპტორული კომპლექსებისგან, JAK-ები და STAT-ები. JAK ოჯახში 4 წევრია: JAK1, JAK2, JAK3 და TYK2. STAT თავის მხრივ მოიცავს შვიდ წევრს: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b და STAT6.

იანუს კინაზას (JAK), გააქტიურების (STAT) სასიგნალო გზას იყენებს სხვადასხვა ციტოკინები, ინტერფერონები, ზრდის ფაქტორები და სხვა სასიგნალო მოლეკულები მოქმედებისთვის. ამ გზის საშუალებით უჯრედგარე ფაქტორები აკონტროლებენ გენის ექსპრესიას (O'Shea et al., 2017). JAK-ები არაკოვალენტურად უკავშირდებიან ციტოკინის რეცეპტორებს, შუამავლობენ რეცეპტორების თიროზინის ფოსფორილირებას და იწახვევენ ერთ ან მეტ STAT პროტეინს (Hu et al., 2021). ინტეგრინები არეგულირებენ უჯრედების პროლიფერაციას, დიფერენციაციას და მიგრაციას.

β1-ინტეგრინი უნარჩუნებს სარძევე ჯირკვალს ფუნქციას, ინტეგრინის შემცველი ადჰეზიური კომპლექსის პროტეინის ILK (ინტეგრინთან დაკავშირებული კინაზა) მეშვეობით. ILK არეგულირებს STAT5 სასიგნალო გზას Rac1-ის მეშვეობით, რომელიც არის ინტეგრინის კრიტიკული დადმავალი სასიგნალო გზის ფაქტორი. მექანიკურად, Rac1 იღებს STAT5-ს კინაზას კომპლექსებში და აძლიერებს მის ფოსფორილირებას

JAK2-ის მომატებული აქტივობა ზრდის BDNF-ის ექსპრესიას და თრგუნავს ნეირონების აპოპტოზს მსუბუქი სტრესის დროს (Tian et al., 2021). უფრო მეტიც, ჰიპოქსიით გამოწვეულმა JAK2/STAT5-ის აქტივაციამ შეიძლება თავიდან აირიდოს ნეირონების აპოპტოზი იშემიური დაზიანების შემდეგ (Liu et al., 2021). შესაბამისად STAT5 შეიძლება იყოს ჩართული გენის ექსპრესიის ეპიგენეტიკურ რეგულირებაში ტვინში მიმდინარე ფიზიოლოგიური და პათოლოგიური პროცესების დროს (Kagohara et al., 2018).

1.5. NADPH ოქსიდაზების (NOX-ები)

1.5.1 NADPH ოქსიდაზური სისტემის მონაწილეობა ცნს-ის განვითარებაში

T4-ისგან განსხვავებით, T3-ის არაგენომიური მოქმედება არეგულირებს ნეირონული აქტინის ციტოჩონჩხის დინამიკას $\alpha\text{v}\beta 3$ ინტეგრინის მეშვეობით, რაც ზრდის ნეირონების უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას ჰიპოქსიის დროს Rac1/NADPH ოქსიდაზა/კოფილინ-1 გზის მეშვეობით (Barbakadze et al., 2023).

ყველასთვის ცნობილი NADPH ოქსიდაზები (NOXs) არიან ტრანსმემბრანული ცილები, რომლებიც ახდენენ სუპეროქსიდის და რადიკალური და არარადიკალური მოლეკულური სახეობების მასპინძლობის კატალიზებას, რომლებსაც ერთობლივად უწოდებენ რეაქტიულ ჟანგბადის სახეობებს (ROS). NOX ფერმენტები მონაწილეობენ ცენტრალური ნერვული სისტემის განვითარებაში და მომწიფებული ნეირონების ფუნქციონირებაში. ძუძუმწოვრების უმეტესობაში არის შვიდი NOX იზოფორმა, მაგრამ მხოლოდ NOX2 და NOX4 იყო დემონსტრირებული, როგორც ძირითადი ტიპები, რომლებიც მონაწილეობენ ტვინის ქსოვილში ROS წარმოქმნაში (Lou et al., 2018).

1.5.2 NADPH ოქსიდაზა და ოქსიდაციური სტრესი

ფიზიოლოგიურ პირობებში, NOX ფერმენტები, სავარაუდოდ, წარმოქმნიან ROS-ის მხოლოდ დაბალ დონეს ცნს-ში. ასეთი დაბალი დონის ROS-ის სავარაუდო ფუნქციაა უჯრედული სიგნალები (Chen et al., 2011). ხაზგასმით უნდა აღინიშნოს, რომ უჯრედის ბედის გადაწყვეტილება ROS-ზე ზემოქმედების საპასუხოდ განისაზღვრება ცნს-ის უჯრედების მგრძნობელობით ROS-ის მიმართ, რაც საკვანძო ფაქტორია სიგნალინგის და უჯრედის სიკვდილის გადაწყვეტილების მისაღებად (Nayernia et al., 2014).

NADPH ოქსიდაზა – წარმოებული ROS მნიშვნელოვანია ცნს-ის პათოფიზიოლოგიურ და ნორმალურ პროცესებში. Rac1-ით გააქტიურებული NADPH ოქსიდაზური სისტემა ასტიმულირებს ROS-ის წარმოქმნას, რაც იწვევს BDNF-ის

ექსპრესიას და თავის მხრივ, არეგულირებს ნეიროგენეზს. ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონები (TH; T3/T4), მონაწილეობენ იმემიური ინსულტის შემდეგ, ნეირონების პლასტიკურობისა და გლიური უჯრედების ფუნქციონირებაში. წინა კვლევები მოწმობს, რომ T3 არეგულირებს ნეირონული აქტინის ციტოჩონჩხის დინამიურობას $\alpha\beta3$ ინტეგრინის საშუალებით, რაც ზრდის ნერვული უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას Rac1/NADPH ოქსიდაზას გზის მეშვეობით ჰიპოქსიის დროს. ვარაუდობენ რომ TH-მა $\alpha\beta3$ ინტეგრინის საშუალებით შეიძლება დაარეგულიროს NADPH ოქსიდაზას აქტივობა NOX2-თან Rac1-ის დაკავშირების გზით, ან NOX4-ის ექსპრესიის ცვლილებით და შესაბამისად, ასტიმულიროს BDNF ექსპრესია. კვლევით დგინდება, რომ T3 იწვევს Rac1-ის NOX2-თან შეკავშირების ზომიერ მატებას და ეს ეფექტი მნიშვნელოვნად იზრდება $\alpha\beta3$ -ინტეგრინის ინჰიბირებით ჰიპოქსიის დროს. NOX2-სგან განსხვავებით, $\alpha\beta3$ -ინტეგრინის ინჰიბიტორული ანტისხეული მნიშვნელოვნად ამცირებს NOX4-ის ექსპრესიას დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში და ხსნის T3-ით გამოწვეულ BDNF სეკრეციის მომატებას ჰიპოქსიის დროს (Kvergelidze et al., 2022).

1.5.3 NADPH ოქსიდაზური სისტემა და BDNF ექსპრესია

ლიტერატურიდან მიღებული მონაცემები მიუთითებს, რომ ROS დონის მოდულაცია მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ტვინისგან მიღებული ნეიროტროფიული ფაქტორის (BDNF) ექსპრესიაში. ოქსიდაციურ სტრესს შეუძლია ურთიერთქმედება BDNF სისტემასთან სინაფსური პლასტიკურობის და კოგნიტური ფუნქციის მოდულირებისთვის. BDNF-ის როლი ტვინის განვითარებასა და ფუნქციაში ძალიან კარგად არის დადასტურებული (Binder and Scharfman, 2004) და მისი ფუნქციონირება დაკავშირებულია ტვინში TH დონესთან (Gilbert et al., 2013). BDNF გენს (ადამიანებში, რომლებიც მდებარეობს 11pქრომოსომაზე) აქვს ოთხი 5' ეგზონი (ეგზონები I-IV), რომლებიც დაკავშირებულია განსხვავებულ პრომოტორებთან და ერთი 3' ეგზონი (ეგზონი V), რომელიც კოდირებს BDNF ცილას.

ნერვული ზრდის ფაქტორი (NGF) აღმოაჩინეს 1950-იანი წლების დასაწყისში მისი ტროფიკული (გადარჩენისა და ზრდის ხელშემწყობი) ეფექტის გამო სენსორულ და

სიმპათიკურ ნეირონებზე, 1982 წელს, კი აღმოაჩინეს ტვინისგან მიღებული ნეიროტროფიული ფაქტორი (BDNF). ნეიროტროფული ფაქტორების ოჯახის მეორე წევრი, ნაჩვენები იყო, რომ ხელს უწყობს დორსალური ფესვის განგლიების , ნეირონების სუბპოპულაციის გადარჩენას. მას შემდეგ ნეიროტროფინების ოჯახის სხვა წევრები, როგორიცაა ნეიროტროფინი-3 (NT-3) და ნეიროტროფინ-4/5 (NT-4/5) აღწერილია, თითოეულს აქვს ტროფიკული ეფექტების მკაფიო პროფილი პერიფერიულ და ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში ნეირონების ქვეპოპულაციებზე.

1.5.3.1 BDNF სიგნალის გადაცემა

თითოეული ნეიროტროფინი აკავშირებს ერთ ან მეტ ტროპომიოზინთან დაკავშირებულ კინაზას (Trk) რეცეპტორებს, თიროზინკინაზების ოჯახის წევრებთან. ლიგანდით გამოწვეული რეცეპტორების დიმერიზაცია იწვევს კინაზას გააქტიურებას. რეცეპტორების დაკავშირების შემდგომ ხდება ავტოფოსფორილირება თიროზინის ნაშთებზე, სადაც არის სპეციფიკური შეკავშირების ადგილები უჯრედშიდა სამიზნე ცილებისთვის, რომლებიც უკავშირდებიან გააქტიურებულ რეცეპტორს SH2 დომენების მეშვეობით, მათ შორისაა PLC- γ 1 (ფოსფოლიპაზა C), p85 (PI-3 კინაზას არაკატალიზური ქვედანაყოფი) და Shc (SH2-შემცველი თანმიმდევრობა). ამ სამიზნე ცილების გააქტიურებამ შეიძლება გამოიწვიოს სხვადასხვა უჯრედშიდა სასიგნალო კასკადები, როგორიცაა Ras-MAP (მიტოგენით გააქტიურებული ცილა) კინაზას კასკადი და ციკლური AMP პასუხის ელემენტის დამაკავშირებელი პროტეინის (CREB) გააქტივება.

გარდა ამისა, ყველა ნეიროტროფინი უკავშირდება p75 რეცეპტორს, რომელსაც ეწოდება p75NTR. p75NTR, რომელიც დაკავშირებულია სიმსივნური ნეკროზის ფაქტორის (TNFR) სუპეროჯახის პროტეინებთან, აქვს გლიკოზირებული უჯრედგარე რეგიონი, რომელიც ჩართულია ლიგანდის შეკავშირებაში, ტრანსმემბრანული რეგიონი და მოკლე ციტოპლაზმური თანმიმდევრობა, რომელსაც აკლია შინაგანი კატალიზური აქტივობა. ნეიროტროფინის დაკავშირება p75NTR-თან დაკავშირებულია უჯრედშიდა სიგნალის გადაცემის რამდენიმე გზასთან, მათ შორის ბირთვული ფაქტორი- κ B (NF- κ B), JNK კინაზა და სფინგო-მიელინის ჰიდროლიზი. P75NTR სიგნალინგი შუამავლობს ბიოლოგიურ მოქმედებებს, რომლებიც

განსხვავდებიან trk რეცეპტორებისგან, განსაკუთრებით დაპროგრამებული უჯრედის სიკვდილის (აპოპტოზის) დაწყებას. ასევე ვარაუდობენ, რომ p75 შეიძლება ემსახუროდეს ნეიროტროფინის დამაკავშირებელი სპეციფიკის განსაზღვრას (Binder and Scharfman, 2004).

1.5.3.2 BDNF როლი დეგენერაციულ დარღვევებში

1982 წელს BDNF-ის გაწმენდის შემდეგ, მრავალი მტკიცებულება გაჩნდა მისი მნიშვნელოვანი როლის შესახებ ტვინის განვითარებაში, ფიზიოლოგიასა და პათოლოგიაში. გარდა მისი მნიშვნელობისა ნერვულ განვითარებასა და უჯრედების გადარჩენაში. BDNF როგორც ჩანს, აუცილებელია სინაფსური პლასტიურობის მოლეკულური მექანიზმებისთვის. ითვლება, რომ ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში ძირითად აქტივობასთან დაკავშირებული ცვლილებები დამოკიდებულია სინაფსური გადაცემის BDNF მოდიფიკაციაზე, განსაკუთრებით ჰიპოკამპსა და ნეოკორტექსში. BDNF-დამოკიდებული სინაფსური პლასტიურობის პათოლოგიურმა დონეებმა შეიძლება ხელი შეუწყოს ისეთ მდგომარეობებს, როგორიცაა ეპილეფსია და ქრონიკული ტკივილის სენსიბილიზაცია, ხოლო BDNF-ის ტროფიკული თვისებების გამოყენებამ შეიძლება გამოიწვიოს ახალი თერაპიული ვარიანტები ნეიროდეგენერაციულ დაავადებებში და შესაძლოა ნეიროფსიქიატრიულ დარღვევებშიც კი.

იდეამ, რომ ნერვული სისტემის დეგენერაციული დაავადებები შეიძლება გამოწვეული იყოს ნეიროტროფული ფაქტორების არასაკმარისი მიწოდებით, დიდი ინტერესი გამოიწვია BDNF-ის, როგორც პოტენციური თერაპიული აგენტის მიმართ. ბევრ მოხსენებას აქვს დოკუმენტირებული მტკიცებულება BDNF-ის შემცირებული ექსპრესიის შესახებ ნევროლოგიურ დაავადებაში. ჰიპოკამპში BDNF mRNA-ს შერჩევითი შემცირება დაფიქსირდა ალცჰეიმერის დაავადების ნიმუშებში, თუმცა ცხოველურ მოდელში აფრეგულაცია, როგორც ჩანს, ხდება გლიურ უჯრედებში. BDNF ცილის დაქვეითება ნაჩვენებია პარკინსონის დაავადების შავი სუბსტანციაში. საინტერესოა, რომ ბოლოდროინდელმა კვლევებმა BDNF ჩართო ჰანტინგტონის დაავადებაშიც. ჰანტინგტონის დაავადებაში მუტაციური ცილა, არეგულირებს BDNF ტრანსკრიფციას, ხოლო ჰანტინგტონის შუამავლობით BDNF ტრანსკრიფციის

დაკარგვა იწვევს სტრიატალური ნეირონების ტროფიკული მხარდაჭერის დაკარგვას, რომლებიც შემდგომში გადაგვარდებიან დაავადების დამახასიათებელ პათოლოგიაში (Zuccato et al., 2001). ბოლოდროინდელმა კვლევამ აჩვენა, რომ ჰანთინგტინი ჩვეულებრივ აფერხებს ნეირონების შემზღუდველ მაყუჩებელ ელემენტს (NRSE), რომელიც მონაწილეობს ტრანსკრიპციის მატონიზირებელ რეპრესიაში BDNF პრომოტორ II-დან. ყველა დარღვევებისას, BDNF-ის მიწოდება ან ენდოგენური BDNF წარმოების გაზრდა შეიძლება იყოს თერაპიული, თუ გამოყენებული იქნება შესაბამის სივრცითი-დროის კონტექსტში.

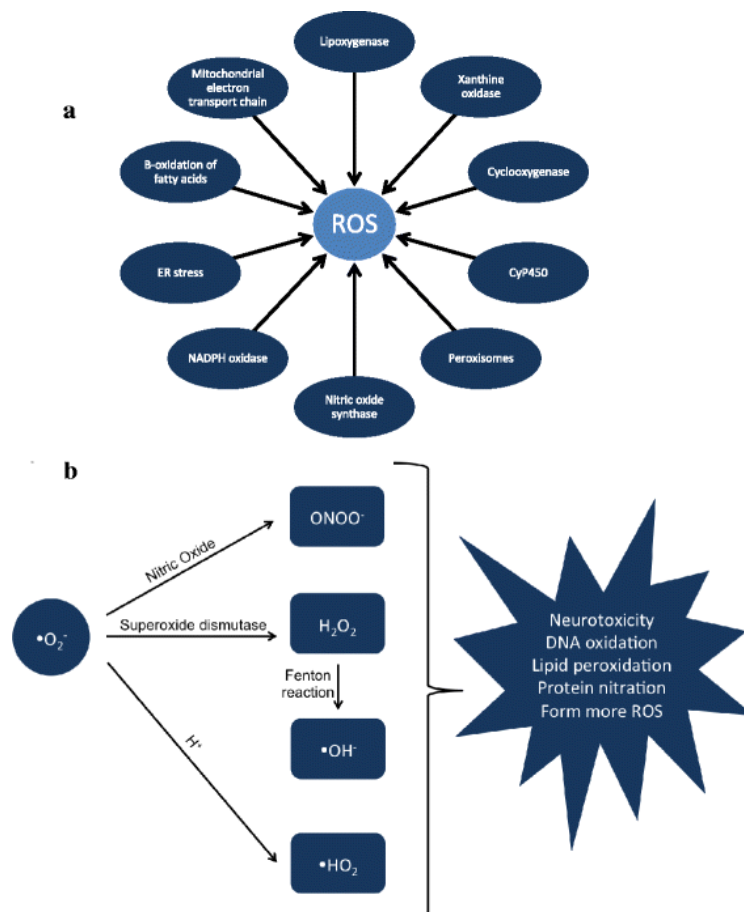
BDNF ასევე აძლიერებს ნეიროგენეზს. მაგალითად, BDNF-ის ინტრავენტრიკულური ინფუზია ან ადენოვირუსით გამოწვეული BDNF აქტივობა ზრდის ნეირონების რაოდენობას ზრდასრულთა ყნოსვის ბოლქვში, ზოლიან ძარღვში, ძგიდეში და თალამუსში. გამოავლინდა ზოგიერთი სასიგნალო მექანიზმი, რომელიც, როგორც ჩანს, მოიცავს *trkB* აქტივაციას, რასაც მოჰყვება MAP კინაზას და PI3-კინაზას სასიგნალო გზების გააქტიურება (Binder and Scharfman, 2004).

1.5.4 (NADPH) ოქსიდაზას იდენტიფიცირება, როგორც ROS-ის მთავარი გენერატორი

კლინიკური კვლევების წარუმატებლობამ განაპირობა ისეთი ჰიპოთეზის გაჩენა, რომ ROS-ის წარმოქმნის დათრგუნვა და არა მისი უკვე წარმოქმნილი რაოდენობის შემცირება, შეიძლება იყოს თერაპიის უფრო წარმატებული გზა. ამ ჰიპოთეზის შესაბამისად, მრავალი ლაბორატორია ფოკუსირებულია ROS-ის გენერირების გზების როლის გაღრმავებაზე სხვადასხვა პათოლოგიურ სიტუაციებში. ამ კვლევებმა გამოიწვია ფერმენტის, ნიკოტინამიდ ადენინ დინუკლეოტიდ ფოსფატის (NADPH) ოქსიდაზას იდენტიფიცირება, როგორც ROS-ის მთავარი გენერატორი, რომელიც ხელს უწყობს როგორც ტვინის მწვავე დაზიანების, ასევე ქრონიკული ნეიროდეგენერაციული დარღვევების პათოლოგიას (Ma et al., 2017).

ROS წარმოიქმნება ენდოგენურად მოლეკულური ჟანგბადისგან უჯრედული ოქსიდაზების, მიტოქონდრიული ელექტრონული ჯაჭვის სატრანსპორტო სისტემის მონო- და დი-ოქსიგენაზების ან პეროქსიდაზების მიერ. ოქსიდაციურ სტრესში ჩართული ROS მოიცავს: სუპეროქსიდის ანიონს, წყალბადის ზეჟანგს და

ჰიდროქსილის რადიკალებს. ასევე არსებობს აზოტის რეაქტიული სახეობები (RNS), როგორიცაა აზოტის ოქსიდი და პეროქსინიტრიტი, რომლებიც მონაწილეობენ ოქსიდაციურ სტრესში ცნს-ში და მთელ სხეულში. არსებობს მრავალი წყარო და პროცესი, რომელიც იწვევს უჯრედებში სუპეროქსიდის და ROS-ის წარმოქმნას (სურ. 9A). სუპეროქსიდის, წარმოქმნის შემდეგ, შეუძლია უშუალოდ გამოიწვიოს ოქსიდაციური დაზიანება, ან მას შეუძლია ურთიერთქმედება სხვა მოლეკულებთან და წარმოქმნას "მეორადი" რადიკალები ფერმენტული ან მეტალის კატალიზებული რეაქციების გზით. ამ ხაზების გასწვრივ, სუპეროქსიდს შეუძლია რეაგირება მოახდინოს აზოტის ოქსიდთან და წარმოქმნას RNS პეროქსინიტრიტი, რომელიც ძალზე რეაქტიულია და როდესაც ზედმეტად წარმოიქმნება, შეუძლია საზიანო ნიტრირება მოახდინოს უმეტეს ბიოლოგიურ მოლეკულებზე სხეულის ყველა ნაწილში, მათ შორის ტვინში (სურ. 9B).



სურათი 9. A. ROS-ის უჯრედული წყაროები ROS შეიძლება წარმოიქმნას უჯრედშიდა სხვადასხვა ორგანელების, ფერმენტების და პროცესების მოქმედებით. 9.B სუპეროქსიდის გადაქცევა მეორად ROS-ად. წარმოქმნის შემდეგ, სუპეროქსიდს შეუძლია ურთიერთქმედება

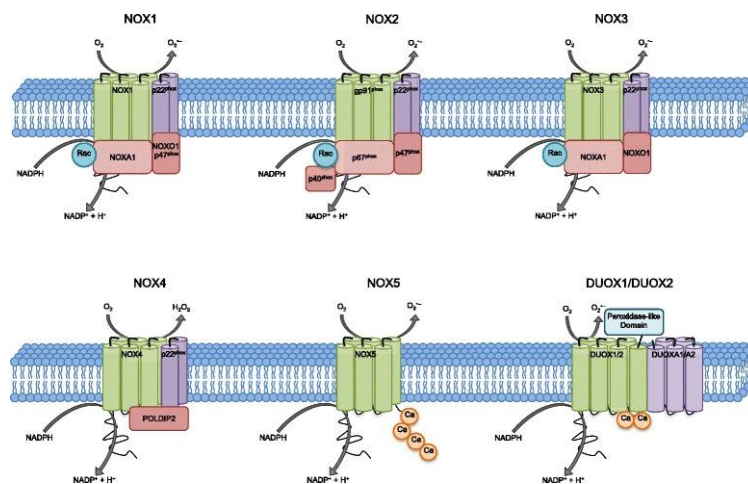
სხვადასხვა მოლეკულებთან მეორადი რადიკალების წარმოქმნით. სუპეროქსიდს შეუძლია რეაგირება მოახდინოს აზოტის ოქსიდთან პეროქსინიტრიტის წარმოქმნით. სუპეროქსიდ დისმუტაზას ასევე შეუძლია სუპეროქსიდის გარდაქმნა წყალბადის ზეჟანგად, რომელი შემდეგ გაივლის ფენტონის რეაქციის ჰიდროქსილის რადიკალების და იონების წარმოქმნით. სუპეროქსიდის პროტონებთან ურთიერთქმედებამ შეიძლება წარმოქმნას ჰიდროპეროქსილის რადიკალები. ეს მეორადი რადიკალები ძალიან რეაქტიულია და შეიძლება იყოს ნეიროტოქსიკური, მაკრომოლეკულების ცვლილებებისა და ოქსიდაციური სტრესის გაძლიერების გამო (Ma et al., 2017).

სუპეროქსიდს ასევე შეუძლია განიცადოს დისმუტაცია სუპეროქსიდდისმუტაზას მეშვეობით ჟანგბადისა და წყალბადის ზეჟანგის წარმოქმნით. წყალბადის ზეჟანგი ძალიან გამტარია უჯრედის მემბრანების მეშვეობით და შეუძლია პირდაპირ დააზიანოს უჯრედები დეზოქსირიბონუკლეინის მჟავას (დნმ), ცილების და ლიპიდების დაჟანგვის გზით. გარდამავალი ლითონების თანდასწრებით, წყალბადის ზეჟანგს შეუძლია წარმოქმნას უაღრესად რეაქტიული ჰიდროქსილის რადიკალები, რამაც შეიძლება დააზიანოს დნმ და სხვა მოლეკულები უჯრედში მაკრომოლეკულების მოდიფიკაციისა და დაზიანების გარდა, დაუწყვილებელ ელექტრონს ROS-ში ასევე შეუძლია გააძლიეროს ჟანგვითი დაზიანება მეტი თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნით (Benov, 2001). ROS-ით გამოწვეულმა მოდიფიკაციამ შეიძლება გამოიწვიოს სხვადასხვა სახის დაღმავალი სასიგნალო ეფექტები, რომლებიც მოიცავს გენის ექსპრესიას და აპოპტოზს. კავშირი ოქსიდაციური სტრესსა, ტვინის დაზიანების პროგრესირებასა და ნეიროდეგენერაციულ დარღვევებს შორის მუდმივი კვლევის საგანია. ვრცელმა კვლევამ აჩვენა, რომ მიტოქონდრიიდან მიღებული ROS არის კლინიკურად მნიშვნელოვანი, როგორც ხელშემწყობი ფაქტორი ტვინის დაზიანებისა და ქრონიკული ნეიროდეგენერაციული დარღვევების დროს. ბოლო დროს გაიზარდა ინტერესი ROS-ის სხვა წყაროების მიმართ, როგორიცაა NADPH ოქსიდაზა, აზოტის ოქსიდის სინთაზა, ციტოქრომ 450 (cyp450), ციკლოოქსიგენაზა, ლიპოოქსიგენაზა და ქსანტინოქსიდაზა (Maraldi, 2013). ზემოაღნიშნული სიიდან მხოლოდ NADPH ოქსიდაზას აქვს, ძირითადი ფუნქციაა ROS-ის წარმოქმნა, რადგან სხვები ქმნიან ROS-ს, როგორც ქვეპროდუქტს. არსებობს კავშირი მიტოქონდრიასა და NADPH

ოქსიდაზას შორის რაც გულისხმობს რომ ისინი არიან ძირითადი მოთამაშე და გამომწვევი ოქსიდაციური სტრესის (Ma et al., 2017).

1.5.5 NADPH ოქსიდაზას დახასიათება

NADPH ოქსიდაზას (NOX) ფერმენტების ოჯახი არის ტრანსმემბრანული გადამტანები რომლებსაც გადააქვთ ელექტრონი ციტოზოლური NADPH-დან, რათა შეამცირონ ჟანგბადი და წარმოქმნან სუპეროქსიდ ანიონი. დღეისათვის ცნობილია შვიდი წევრი, რომლებიც შედგებიან სხვადასხვა სუბერთეულებისგან და წარმოქმნიან აქტიურ ფერმენტულ კომპლექსებს: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, ორმაგი ოქსიდაზა 1 (DUOX1) და DUOX2) (სურ. 10). NOX და DUOX იზოფორმები სტრუქტურულად მსგავსია, რადგან თითოეულ იზოფორმს აქვს ჰემის, ფლავინ ადენინ დინუკლეოტიდის (FAD) NADPH და 6 ტრანსმემბრანული α -სპირალის დამაკავშირებელი საიტები (Ma et al., 2017).



სურათი 10. NOX იზოფორმები და მარეგულირებელი სუბერთეულები. NADPH ოქსიდაზებს აქვთ მთავარი როლი ROS-ის წარმოქმნაში. რამდენიმე კომპონენტი და დომენი ქმნის NADPH ოქსიდაზას იზოფორმების ტრანსმემბრანულ აქტიურ ფერმენტულ კომპლექსებს. აქ ნაჩვენებია NOX1-5 და DUOX1/DUOX2. გააქტიურებისას ელექტრონი გადაეცემა NADPH-დან O₂-ს სუპეროქსიდის წარმოქმნით. NOX4 წარმოქმნილი სუპეროქსიდი განიცდის სწრაფ გარდაქმნას წყალბადის ზეჟანგად, რაც შუამავლობს მის ბევრ

დადმავალ სასიგნალო ეფექტს. NOX5 და DUOX ფერმენტები მგრძნობიარეა Ca^{2+} უჯრედული კონცენტრაციის მიმართ (Ma et al., 2017).

1.5.5.1 NOX1

NOX1 წარმოქმნის სუპეროქსიდს და აქვს ყველაზე მეტი მსგავსება NOX2 და NOX3 იზოფორმებთან, რაც დასტურდება ჰომოლოგიური მარეგულირებელი სუბერთეულებით და Rac GTPase-ით. NOX1-3 სუბერთეულები ქმნიან ფუნქციურ დიმერებს p22phox-ით. გარდა ამისა, NADPH ოქსიდაზას აქტივატორი 1(NOXA1) მოქმედებს, როგორც "აქტივატორი" NOX 1 და 3-ისთვის და სტრუქტურულად ჰომოლოგიურია p67 ფაგოციტური ოქსიდაზის(p67phox), რომელიც არის NOX2-ის აქტივატორი. NOXO1 არის „ორგანიზატორი“ NOX1-ისა და 3-ისთვის და სტრუქტურულად ჰომოლოგიურია p47phox-ისა და p40phox-ის, რომლებიც არიან NOX2-ის გენერატორები. ნაჩვენებია, რომ NOX1-ის მიერ სუპეროქსიდის ანიონის წარმოება მოითხოვს NOXO1-ის ფოსფორილირებას, რაც განპირობებულია ცილა კინაზა A (PKA) (Ser154-ზე) ან PKC -ით (Thr341-ზე), რომელიც შემდეგ ურთიერთქმედებს NOXA1-თან NOX1 აქტივობის რეგულირებისთვის. თუმცა, მნიშვნელოვანია აღინიშნოს, რომ NOXO1 ლოკალიზებულია მემბრანაზე, უჯრედული აქტივაციისგან დამოუკიდებლად, რამაც მის ავტონიზიტიტორულ ფუნქციის ნაკლებობასთან ერთად, შეიძლება ხელი შეუწყოს კონსტიტუციურად გააქტიურებულ NOX1-ს.

დამატებითმა კვლევებმა აჩვენა, რომ NOXA1-ის ფოსფორილაცია სერინ 282-ზე MAP კინაზებით და სერინ 172-ზე PKC-ით ამცირებს NOX1-ის კონსტიტუციურ აქტივობას. მოხსენებული იყო, რომ NOX1-ის ფოსფორილაცია (Thr429-ზე) PKC-β-ით კრიტიკულია NOX1 კომპლექსის წარმოქმნისთვის და შესაბამისად, NOX1 აქტივაციისთვის. გარდა ამისა, Rac1 ასევე არის NOX1-ის ცნობილი აქტივატორი და ბოლოს, მთელი რიგი ფერმენტები, ციტოკინები, ზრდის ფაქტორები, ჰორმონები და უჯრედული სტრესორები, ასევე მონაწილეობენ NOX1-ის ფუნქციურ რეგულაციაში (სურ 10).

NOX1 ჩართულია ტკივილში, რომელიც თან ახლავს ანთებას, მასპინძლის დაცვაში მიკროგლიაში ექსპრესიით და ნეირონების ზრდაში, ასევე მნიშვნელოვანია NOX1-ის როლი ნეიროპათოლოგიასა და ნეიროდეგენერაციულ დარღვევებში (Ma et al., 2017).

1.5.5.2 NOX2

NOX2 (ზოგჯერ მოიხსენიება მისი ძირითადი სუბერთეულის სახელით - gp91phox) წარმოქმნის სუპეროქსიდს, როგორც მის პროდუქტს. NOX2 ექსპრესირებულია სხეულის სხვადასხვა ქსოვილებში, ისევე როგორც ტვინის რამდენიმე რეგიონში. უჯრედულ დონეზე NOX2 გვხვდება სხვადასხვა ტიპის უჯრედებში, მათ შორის ნეირონებსა და ენდოთელურ უჯრედებში და ძლიერად არის ექსპრესირებული მიკროგლიაში, სადაც ის მონაწილეობს იმუნურ/ანთებით რეაქციებში, განსაკუთრებით ტრამვის შემდგომი ალდგენის პროცესში, NOX2-ს აქვს როგორც მემბრანული სუბერთეული (gp91phox და p22phox), ასევე ციტოზოლური კომპონენტები (p47phox და p67phox) (სურ. 10). აქტივაციის დროს, ფოსფორილირებული p47phox ურთიერთქმედებს p22phox-თან, რაც აადვილებს მემბრანაში ტრანსპორტს, სადაც p67phox შეიძლება დაუკავშირდეს p47phox-ს და წარმოქმნას აქტიური NOX2. Rac2 კოორდინაციულად გროვდება მემბრანაში, სადაც ის პირდაპირ უკავშირდება p67phox-ს და აუცილებელია NOX2 აქტივაციისთვის. Rac2-ის დამაკავშირებელი ადგილები ასევე იდენტიფიცირებულია პირდაპირ NOX2-ში. NOX2 არაფაგოციტურ უჯრედებში სტრუქტურულად ჰგავს ფაგოციტების NOX2-ს, მაგრამ მისი რეგულაცია შეიძლება განსხვავდებოდეს. მოსვენებულ ენდოთელურ უჯრედს აქვს ნაწილობრივ წინასწარ აწყობილი NOX2, რომელიც წარმოქმნის სუპეროქსიდის დაბალ დონეს უჯრედშიდა ფიზიოლოგიური ფუნქციებისთვის. NOX2-ის გააქტიურება მოითხოვს p47phox ქვედანაყოფის სერინის ფოსფორილირებას TNF სტიმულაციის და ანგიოტენზინ II სტიმულაციის გამოყენებით, გარდა ამისა, მთელი რიგი ფერმენტები, ციტოკინები, მეტაბოლური ფაქტორები და უჯრედის სტრესორები (ჰიპოქსია და Aβ) ჩართულია NOX2-ის რეგულირებაში. NOX2-დან მიღებული ROS-ის იდენტიფიცირებული ქვედა სასიგნალო გზების სამიზნეები მოიცავს, სხვადასხვა კინაზას სასიგნალო გზას, ასევე ციტოკინებს და ტრანსკრიფციის ფაქტორებს (Ma et al., 2017).

1.5.5.3 NOX3

ტვინში, NOX3 გვხვდება შიდა ყურის ნეირონებში, სადაც ის მნიშვნელოვან როლს ასრულებს კოხლეასა და ვესტიბულურ სისტემაში ამ არგუმენტის მხარდასაჭერად, NOX3 ნოკაუტირებულ თაგვებში გამოავლინეს დისბალანსის ნიშნები გარდა ამისა, NOX3-ის შემცირება გულისხმობს დამცავ ეფექტს კოხლეარული დაზიანების დროს წარმოქმნილი ოქსიდაციური სტრესის რაოდენობის შემცირებით, NOX3 წარმოქმნის სუპეროქსიდს, როგორც მის პროდუქტს და NOX3-ის მარეგულირებელი მექანიზმი შეიძლება მოიცავდეს Rac1, NOXO1 და p67phox, გარდა ამისა, ვარაუდობენ, რომ p22phox სუბერთეული გადამწყვეტია NOX3-ის სათანადო აწყობისა და ფუნქციონირებისთვის, და ბოლოს, NOX3 ასევე ცნობილია, რომ აქტიურია მისი ცნობილი რეგულატორების არარსებობის შემთხვევაში (სურ. 10) (Ma et al., 2017).

1.5.5.4 NOX4

NOX4 არის კონსტიტუციურად აქტიური იზოფორმა, სხვა NOX იზოფორმებისგან განსხვავებით, NOX4-ის დადმავალი სასიგნალო გზების ეფექტები წყალბადის პეროქსიდის შუამავლობით მიმდინარეობს, NOX4-ის წარმოქმნილი სუპეროქსიდის, წყალბადის ზეჟანგად სწრაფი გარდაქმნის გამო. NOX4 ფართოდ გვხვდება სხეულში და ექსპრესირებულია ტვინის სხვადასხვა რეგიონში და უჯრედებში. ცნობილია, რომ ის არის სუპეროქსიდის ძირითადი წყარო ადამიანში NOX4 საჭიროებს p22phox სუბერთეულს ფუნქციონირებისთვის და ვარაუდობენ, რომ ის ინდუცირებადია NOX4 mRNA-სა და ROS-ის წარმოქმნას შორის მჭიდრო კავშირის გამო. გარდა ამისა, იდენტიფიცირებულია სხვა NOX4 მარეგულირებელი ცილები: როგორიცაა პოლიმერაზა (დნმ-ზე მიმართული) დელტა ურთიერთქმედების პროტეინი 2 (Poldip2). პროტეინის დისულფიდ იზომერაზა (PDI) და თიოროზინკინაზას სუბსტრატი 4/5 SH3 დომენი (Tsk4/5), რამაც შესაძლოა კიდევ უფრო დაარეგულიროს NOX4-ის აქტივობა. გარდა ამისა, ბოლოდროინდელი მტკიცებულებები ვარაუდობენ, რომ წყალბადის ზეჟანგით ინდუცირებული კლონი 5 (Hic-5), ფოკალური ადჰეზიური ადაპტერი ცილა, ფუნქციონირებს როგორც NOX4-ის უარყოფითი

რეგულატორი, NOX4-ის უბიკვინ-პროტეოსომური სისტემით გაშუალებული დეგრადაციის ხელშეწყობით (Ma et al., 2017).

1.5.5.5 NOX5

NOX5 არის გენეტიკურად ყველაზე განსხვავებული NOX იზოფორმებს შორის. NOX5 ექსპრესირებულია ელენთასა და სათესლე ჯირკვალში და უფრო ნაკლებად სხეულის სხვა ქსოვილებში. თავის ტვინში NOX5-ის ექსპრესია დადასტურებულია მხოლოდ ტვინის კიბოს, კონკრეტულად მულტიფორმული გლიობლასტომის დროს. NOX5 განსხვავდება NOX-ის სხვა იზოფორმებისგან იმით, რომ იგი ქმნის სრულად ფუნქციურ ოლიგომერებს (სურ. 10). დადგინდა რომ NOX5-ის ფოსფორილირება Thr494 და Ser498 ნარჩენებზე ზრდის მის მგრძნობელობას კალციუმის მიმართ (Ma et al., 2017).

1.5.5.6 DUOX1/2

ორმაგი ოქსიდაზა ერთი და ორი (DUOX1/2) წარმოქმნის წყალბადის ზეჟანგს და დასახელებულია მათი gp91phox დომენისა და უჯრედგარე პეროქსიდაზას დომენის გამო. DUOX1 და DUOX2 ყველაზე მეტად იყო შესწავლილი ფარისებრ ჯირკვალში, მაგრამ ასევე აღმოჩენილი იქნა სხეულის სხვა ნაწილებში. DUOX ფერმენტები ურთიერთქმედებენ DUOX აქტივატორ პროტეინებთან: DUOXA1 და DUOXA2, რომლებიც გადამწყვეტია DUOX ფერმენტების ფუნქციონირებისთვის. ცნობილია, რომ DUOX2 მონაწილეობს ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონების სინთეზში და DUOX2-ის არასწორი მუტაცია იწვევს თანდაყოლილ ჰიპოთირეოზის განვითარებას (სურ. 10). DUOX1 ასევე ექსპრესირებულია ფარისებრ ჯირკვალში, მაგრამ მისი ფუნქცია ფარისებრ ჯირკვალში უცნობია. ცნობილია, რომ DUOX1 შუამავლობს ალერგიულ ასთმას, ახანგრძლივებს ROS წარმოქმნას დასხივების შემდეგ, თამაშობს როლს სიმსივნის განვითარებაში. DUOX2 ასევე შუამავლობს კერატინოციტების ანთებას, კოხლერული დაზიანებას და ფილტვის დაზიანებას. გარდა ამისა, ორივე DUOX ფერმენტი ჩართულია ROS-დამოკიდებულ იმუნიტეტში (Ma et al., 2017).

1.5.6 NADPH ოქსიდაზას როლი თავის ტვინის დაზიანებასა და ნეიროდეგენერაციულ დარღვევებში

არსებობს მზარდი მტკიცებულება NOX იზოფორმების როლის შესახებ ტვინის დაზიანებასა და ნეიროდეგენერაციულ დარღვევებში, განსაკუთრებით NOX1, 2 და 4-ისთვის. NOX აქტივაცია შეიძლება გაიზარდოს სხვადასხვა ანთებითი და ნეიროდეგენერაციული ფაქტორებით, როგორიცაა ამილოიდის წინამორბედი პროტეინი (APP), ამილოიდი β , სიმსივნური ნეკროზის ფაქტორი-ალფა (TNF- α), მატრიქსის მეტალოპროტეინაზა (MMP), ინტერლეიკინები და α -სინუკლეინები. მნიშვნელოვანია NOX-ის აქტივაციის როლს ტვინის იშემიური და ტრავმული დაზიანების პათოლოგიებში (Ma et al., 2017).

1.5.7 NOX-ის ინჰიბირების ნეიროპროტექტორული ეფექტი ტვინის ტრავმული დაზიანებისას (TBI)

NADPH ოქსიდაზას პოტენციური როლის შესასწავლად TBI პათოლოგიაში და მის აღდგენაში, მკვლევარებმა გამოიყენეს NADPH ოქსიდაზას ინჰიბიტორები და NOX2 ნოკაუტირებული ცხოველები. NADPH ოქსიდაზას ინჰიბიტორის, აპოცინინის გამოყენება მკვეთრად აფერხებს მიკროგლიური აქტივაციით და ოქსიდაციური სტრესით გამოწვეულ დაზიანებას. ასევე AD-თან (ალცჰეიმერის დაავადება) დაკავშირებული ცილების და აქსონალური დაზიანების მარკერების შესუსტებულ TBI-ის ინდუქციას, როგორიცაა β -ამილოიდი და ამილოიდის წინამორბედი ცილა. გარდა ამისა, აპოცინინის ან უფრო სპეციფიური NOX2 ინჰიბიტორის, gp91ds-tat-ის შეყვანამ გამოიწვია მნიშვნელოვანი ნეიროპროტექცია TBI-ისგან და შეამცირა ნეირონული დეფიციტი, gp91ds-tat-ის მოქმედებამ ასევე შეცვალა მიკროგლიის პოლარიზაცია TBI-ის შემდეგ, რითიც დაეხმარა M2-ის მსგავსი ანთების საწინააღმდეგო ფენოტიპს, რაც მიუთითებს NADPH ოქსიდაზას მნიშვნელოვან როლზე TBI-ის შემდეგ M1-ის მსგავსი მიკროგლიის "პროანთებითი" ფენოტიპის ხელშეწყობაში. ანალოგიურად, NOX2 ნოკაუტირებულ თაგვებს აქვთ შემცირებული

კონტუზიის ზომა, ასევე შემცირებული სუპეროქსიდისა და პეროქსინიტრიტის მეტაბოლიზმი და ქერქში აპოპტოზური უჯრედების შემცირებული რაოდენობა TBI-ის შემდეგ, რაც ადასტურებს NOX2-ის შესაძლო როლს TBI პათოლოგიაში (Ma et al., 2017)

1.6 პოსტრანსლაციური მოდიფიკაცია (PTM)

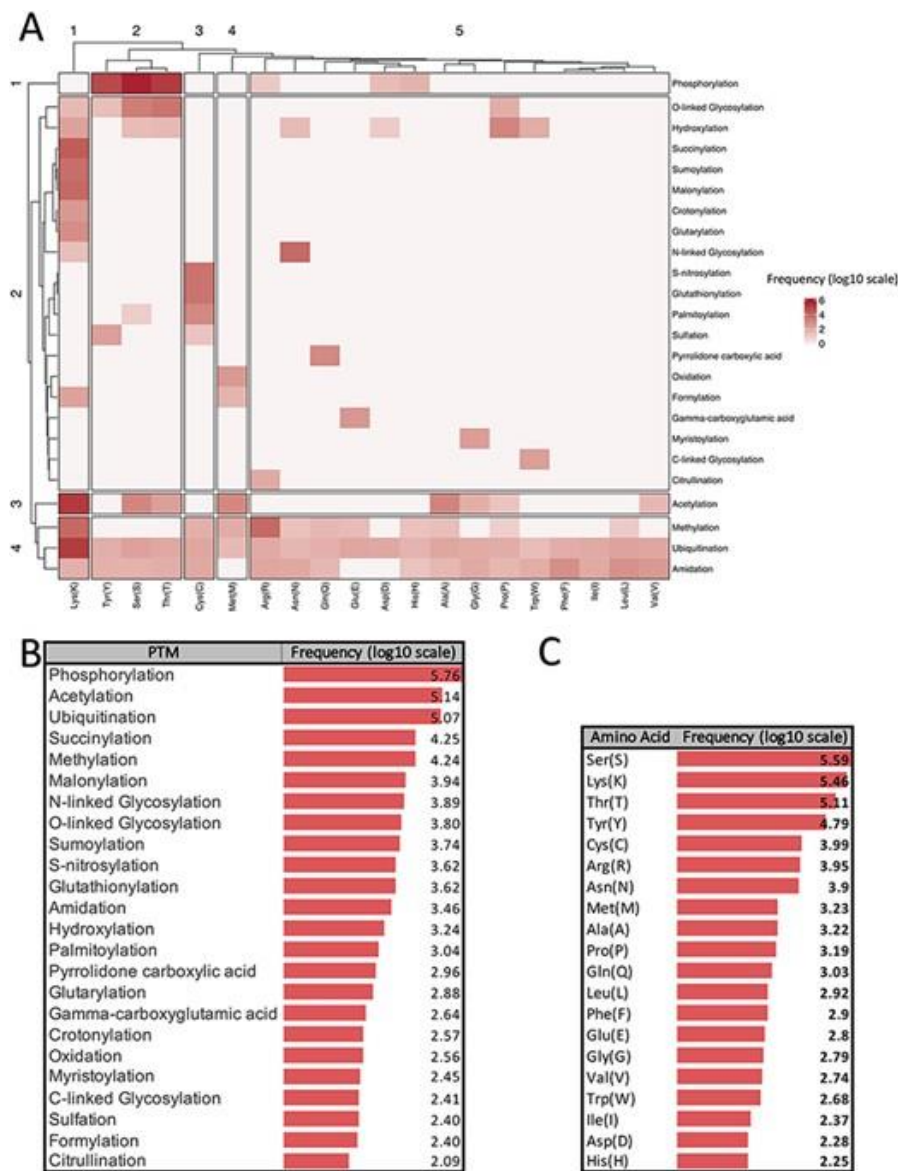
1.6.1 PTM მნიშვნელობა უჯრედული პროცესების რეგულირებაში

პოსტრანსლაციური მოდიფიკაცია (PTM) არის ბიოქიმიური მექანიზმი, როდესაც ხდება ამინომჟაური ნაშთების კოვალენტური მოდიფიკაცია. ეს არის ბუნების გაქცევა გენეტიკური პატიმრობიდან. გენების თანმიმდევრობა იცვლება ევოლუციური დროის მასშტაბით, მაგრამ არა იმით, რომელიც შეესაბამება ორგანიზმის განვითარებას, ზრდასრულთა ფიზიოლოგიას, დაავადებისა და დარღვევების წინააღმდეგ მუდმივ ბრძოლას. ეგზონების არჩევისა და სპლაისინგის შემდეგ, ცილის მესამეული სტრუქტურა იცვლება მხოლოდ კონფორმაციული ფლუქტუაციებით. PTM საშუალებას იძლევა შეიცვალოს ამინომჟავის თვისებები პროცესის დროს, განვითარების ან ფიზიოლოგიური მოთხოვნების შესაბამისად. ასეთმა სირთულემ შეიძლება შექმნას უჯრედული ინფორმაციის დამუშავების დახვეწილი პროცესი, რომლებიც აუცილებელია ორგანიზმის კომპლექსურობის წარმოქმნისთვის.

PTM ეხება ამინომჟავების გვერდითი ჯაჭვის მოდიფიკაციას ზოგიერთ ცილაში მათი ბიოსინთეზის შემდეგ. არსებობს 400-ზე მეტი სხვადასხვა ტიპის PTM, რომლებიც გავლენას ახდენენ ცილის ფუნქციების მრავალ ასპექტზე. ასეთი ცვლილებები ხდება, როგორც გადამწყვეტი მოლეკულური მარეგულირებელი მექანიზმები სხვადასხვა უჯრედული პროცესების რეგულირებისთვის. ეს პროცესები მნიშვნელოვან გავლენას ახდენს ცილების სტრუქტურასა და ფუნქციაზე. PTM-ების დარღვევამ შეიძლება გამოიწვიოს სასიცოცხლო ბიოლოგიური პროცესების დისფუნქცია და შესაბამისად სხვადასხვა დაავადებები (Ramazi and Zahiri, 2021).

PTM-ები არის კოვალენტური დამუშავების პროცესები რომელიც ცვლის ცილის თვისებებს პროტეოლიზური გაყოფით და მოდიფიცირებული ჯგუფის, როგორიცაა

აცეტილი, ფოსფორილის, გლიკოზილი და მეთილის, ერთი ან მეტი ამინომჟავას დამატებით. PTM-ები მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ მრავალრიცხოვან ბიოლოგიურ პროცესებში, რომლებიც მნიშვნელოვან ზეგავლენას ახდენენ ცილების სტრუქტურასა და დინამიკაზე. ზოგადად, PTM შეიძლება იყოს შექცევადი ან შეუქცევადი. შექცევადი რეაქციები შეიცავს კოვალენტურ მოდიფიკაციას, ხოლო შეუქცევადი რომელიც ერთი მიმართულებით მიმდინარეობს, მოიცავს პროტეოლიზურ მოდიფიკაციას. PTM-ები წარმოიქმნება ერთი ტიპის ამინომჟავაში ან მრავალ ამინომჟავაში და იწვევს ცვლილებებს მოდიფიცირებული ადგილების ქიმიურ თვისებებში. PTM-ები ჩვეულებრივ გვხვდება მნიშვნელოვანი სტრუქტურების/ფუნქციების მქონე ცილებში როგორიცაა სეკრეტორული ცილები, მემბრანის ცილები და ჰისტონები. ეს ცვლილებები გავლენას ახდენს ცილის ქცევისა და მახასიათებლების ფართო სპექტრზე, მათ შორის ფერმენტის ფუნქციასა და კავშირებზე, ცილის სიცოცხლის ხანგრძლივობაზე, ცილა-ცილოვან ურთიერთქმედებაზე, უჯრედ-უჯრედულ და უჯრედ-მატრიქსის ურთიერთქმედებაზე, მოლეკულურ ტრეფიკინგზე, რეცეპტორების გააქტიურებაზე, ცილის ხსნადობაზე, ცილის დაკეცვასა და ცილის ლოკალიზაციაზე. ამრიგად, ეს ცვლილებები ჩართულია სხვადასხვა ბიოლოგიურ პროცესებში, როგორიცაა სიგნალის გადაცემა, გენის ექსპრესიის რეგულირება, გენის გააქტიურება, დნმ-ის შეკეთება და უჯრედული ციკლის კონტროლი. PTMs გვხვდება სხვადასხვა უჯრედულ ორგანოებში, მათ შორის ბირთვში, ციტოპლაზმაში, ენდოპლაზმურ რეტikulumსა და გოლჯის აპარატში (სურ.11) (Ramazi and Zahiri, 2021).



სურათი 11. ძირითადი PTM-ების ჩამონათვალი (24 PTM 80-ზე მეტი ექსპერიმენტის შედეგად) dbPTM მონაცემთა ბანკის მიხედვით (2020 წლის ოქტომბერი). კლასტერგრამა, რომელიც მიუთითებს თითოეული PTM-ის სიხშირეს სხვადასხვა ამინომჟავებზე. (B) ძირითადი PTM-ების სიხშირე. (C) თითოეული მოდიფიცირებული ამინომჟავის სიხშირე (Ramazi and Zahiri, 2021).

1.6.2 პალმიტირების როლი ნეიროპლასტიკურობაში და ნეიროდეგენერაციებში

უჯრედის შიგნით დაღმავალი სასიგნალო გზების გააქტიურება რთულად რეგულირდება ზედა დინების სასიგნალო ცილების პოსტრანსლაციური მოდიფიკაციებით, მათ შორის პალმიტოილაცია. პალმიტოილაცია არის ცილების

ლიპიდური მოდიფიკაცია, რომელიც მოიცავს პალმიტატის ნარჩენების დამატებით ცისტეინის ნარჩენებს. ეს მოდიფიკაცია ამაგრებს ცილებს უჯრედულ მემბრანებზე, როგორცაა პლაზმური მემბრანა, რაც მათ მემბრანის ლოკალიზაციასა და უჯრედულ პასუხებზე კონტროლის საშუალებას იძლევა (Guan and Fierke, 2014; Goloshvili et al., 2019). პალმიტირებას შუამავლობს ცილა პალმიტოილტრანსფერაზას, რომელიც ეკუთვნის DHHC (Asp-His-His-Cys) ოჯახს, რომელსაც გადააქვს პალმიტატის ნაწილი პალმიტირებულ ცილაზე (Tabaczar et al., 2017; Zingler et al., 2019). ამიტომ, დიფერენციალურმა ZDHHC გენის ექსპრესიამ შეიძლება გავლენა მოახდინოს ცილების ტრანსლოკაციებზე და მნიშვნელოვანი როლი ითამაშოს ტვინის სინაფსურ და მეტაბოლურ აქტივობებში. ძუძუმწოვრებში იდენტიფიცირებულია 23 განსხვავებული პალმიტოილტრანსფერაზა, რომლებიც ძირითადად განლაგებულია ორგანოების მემბრანაში, როგორცაა ენდოპლაზმური ბადე, გოლჯის აპარატი და უჯრედის მემბრანა (Linder et al., 2007). ნეირონებში პალმიტირება დინამიურად არეგულირებს ცილების მიმოქცევას პლაზმურ მემბრანასა და უჯრედულ სტრუქტურებს შორის, როგორცაა გოლჯის აპარატი, ენდოპლაზმური ბადე და ენდოსომები (Fukata et al., 2004). პალმიტირება გადამწყვეტ როლს თამაშობს ნერვულ ფიზიოლოგიაში, როგორცაა ნეიროპლასტიურობა. პალმიტირება/ დეპალმიტირების შეცდომებმა შეიძლება გამოიწვიოს ტვინის პათოლოგია (Cho et al., 2016).

1.6.3 S-აცილაცია

S-აცილაცია არის ცილების პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაცია გრძელი ჯაჭვის ცხიმოვანი მჟავებით, ნახშირბადის სხვადასხვა შემცველობით, როგორცაა: მირისტინის მჟავა (C14:0), პალმიტატის მჟავა (C16:0), პალმიტოლენის მჟავა (C16:1), სტეარინის მჟავა (C18:0), ოლენის მჟავა (C18:1), არაქიდონის მჟავა (C20:4) და ეიკოსაპენტაენონის მჟავა (C20:5). მათ შორის, პალმიტოლენის მჟავას (C16:1) მოდიფიკაციები ძალიან ხშირია, ამიტომ ცილის S-აცილაცია ასევე ხშირად მოიხსენიება, როგორც ცილის პალმიტირება. პალმიტირება პირველად დაფიქსირდა 1979 წელს და ცნობილია, რომ სულ მცირე 3,500 ცილა პალმიტირებულია 9000-ზე

მეტ პალმიტირების საიტებზე. პალმიტირების სამი ძირითადი ფუნქციაა: პირველი-ზრდის ცილის ჰიდროფობიურობას, რაც იწვევს კონფორმაციის, სტაბილურობის, ლოკალიზაციისა და კოფაქტორებთან შეკავშირების ცვლილებებს. მეორე-უზრუნველყოფს სტრუქტურულ მთლიანობას და ცილების სათანადო დაკეცვას და ზღუდავს ცილის ცდომილ სინთეზს და უბიკვინაციის შუამავლობით პროტეინის დეგრადაციას. დაბოლოს-გავლენას ახდენს მემბრანასთან ასოცირებული ცილების ტრანსპორტირებაზე ადრეული სეკრეტორული ადგილებიდან შესაბამის უჯრედულ დანიშნულებამდე, ცილოვანი ურთიერთქმედების რეგულირებით (Stix et al., 2020).

ტრადიციულად, პალმიტირება შეიძლება კლასიფიცირდეს N-პალმიტირებად O-პალმიტირებად და S-პალმიტირებად, მოდიფიკაციის ადგილის მიხედვით. თუმცა, აღსანიშნავია, რომ სამი მოდიფიკაციიდან მხოლოდ S-პალმიტირება არის შექცევადი, დინამიურად რეგულირებული პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაცია, რომელიც შეიძლება დასრულდეს წამებიდან საათებში, ხოლო N- და O-პალმიტირება შეუქცევადია. ვინაიდან S-პალმიტირება უფრო ხშირად ხდება მისი შექცევადი ბუნების გამო, ცილის პალმიტირება ჩვეულებრივ მოიხსენიება S-პალმიტირებად. S-პალმიტირების რეაქცია ეუკარიოტულ უჯრედებში ხდება PAT-ებით (ცილის აცილტრანსფერაზა). ეს PAT ჩვეულებრივ შეიცავს კონსერვარებულ DHHC (ასპარტატ-ჰისტიდინ-ჰისტიდინ-ცისტეინს) ტეტრაპეპტიდებს და თუთიის თითების სტრუქტურულ დომენებს და, შესაბამისად, განისაზღვრება, როგორც ZDHHC ოჯახს მიკუთვნებული პროტეინები. ბოლო რამდენიმე წლის განმავლობაში, კავშირი ZDHHC ოჯახის პროტეინებსა და ნევროლოგიურ დარღვევებს შორის, მათ შორის ინტელექტუალური შეზღუდული შესაძლებლობის, ჰანტინგტონის დაავადებასა და შიზოფრენიას შორის, შესწავლილი იქნა უჯრედული კულტურის, ცხოველური მოდელების და ZDHHC-დეფიციტური თაგვების გამოყენებით (Stix et al., 2020).

ცილის S-აცილაციის სამიზნეები ეხება უჯრედული ფიზიოლოგიის თითქმის ყველა ასპექტს, მათ შორის რეცეპტორებს, იონურ არხებს, გადამტანებს, უჯრედის ადჰეზიურ ცილებს, ფერმენტებს, ხარაჩოების ცილებს და მცირე GTP-აზებს. გასაკვირი არ არის, რომ S-აცილირება მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ბიოლოგიურ პროცესებში, მათ შორის: მეიოზის, მასიური ენდოციტოზის და მეტაბოლიზმის ჩათვლით. ასევე დადგინდა, რომ S-აცილაცია წარმოადგენს მასპინძელ-პათოგენის

ურთიერთქმედების მნიშვნელოვან კომპონენტს. ნაჩვენებია, რომ პათოგენური ბაქტერიები აგროვებენ მასპინძელი უჯრედის DHHC ფერმენტებს, რომლებსაც ბაქტერიები იყენებენ ეფექტური ცილების შესაცვლელად, რომლებიც შემდეგ შეჰყავთ მასპინძელ უჯრედში გადარჩენისა და პროლიფერაციისთვის (Stix et al., 2020).

1.6.4 ცილოვანი აცილტრანსფერაზების ZDHHC ოჯახი; ZDHHC ცილების აღმოჩენა

თავდაპირველად, პალმიტატი აღმოჩნდა უჯრედებში CoA-ს სახით (პალმიტოილ-კოენზიმი A). თუმცა, თავისუფალი შეუკავშირებელი აცილ-CoA-ს კონცენტრაცია არ იყო საკმარისი სპონტანური S-პალმიტილირებისთვის. აქედან გამომდინარე, მკვლევარები ვარაუდობენ, რომ ცილების პალმიტირება ძირითადად ფერმენტების მოქმედებას ეყრდნობა. ამ მოსაზრების მხარდასაჭერად Erf2p, ფერმენტი, რომელიც აცილებს ცისტეინის აცილის ტრანსფერს Ras2-ში, აღმოაჩინეს 2002 წელს და განისაზღვრა, როგორც პირველი PAT. შემდგომში, PAT-ების სერია, მათ შორის HIP14 (Huntington-interacting proteins 14), SERZ-beta (Sertoli უჯრედის გენი თუთიის თითის დომენით-ბეტა) და HIP14L (Huntingtin-ინტერაქციული პროტეინი 14-ის მსგავსი) მოხსენებული იყო, რომ თამაშობს კატალიზურ როლს პალმიტირებაში. საბოლოოდ დაასკვნეს, რომ პალმიტირება კატალიზებულია დაბალი სიმრავლის, პოლიტოპური ეუკარიოტული ინტეგრალური მემბრანის PAT-ებით (Liao et al., 2024).

სტრუქტურულად დადგინდა, რომ PAT-ებს შორის საერთო მახასიათებელია DHHC-ის შემცველი მაღალკონსერვირებული სტრუქტურული დომენი. ამიტომ ზოგიერთი სტატია მოიხსენიებს PAT-ებს, როგორც DHHC ცილებს. თუმცა, ეს DHHC დომენი ასევე კოორდინაციას უწევს ორი Zn^{2+} ატომის დაკეცვას თუთიის თითების სტრუქტურულ დომენში, რაც აუცილებელია PAT-ების სტრუქტურული სტაბილურობისთვის. ამიტომ, უფრო მეტმა ავტორმა მოიხსენია DHHC სტრუქტურული დომენების შემცველი PAT-ების ოჯახი ZDHHC-ად. ამჟამად, თავისა და ადამიანის პროტეომის მონაცემთა ბაზაში არის 23 განსხვავებული ZDHHC იზოფორმა, სახელად ZDHHC1-დან ZDHHC24-მდე, ZDHHC10-ის გამოტოვებით. ყველა ZDHHC ცილა ავლენს განსხვავებულ თვითაცილირების უნარს და კატალიზური ეფექტურობის განსხვავებულ დონეს (Liao et al., 2024).

მრავალი წლის განმავლობაში ითვლებოდა, რომ პალმიტირება ძირითადად ხდებოდა ავტოკატალიზური მექანიზმებით. თუმცა, პალმიტოილ აცილტრანსფერაზას (PAT) ფერმენტების ოჯახის ბოლოდროინდელმა აღმოჩენამ, რომელიც ახორციელებს ცილის პალმიტირებას, შეცვალა ეს ცნება და გააფართოვა იმ მექანიზმების სირთულე, რომლითაც რეგულირდება პალმიტირება

1.6.5 ZDHHC გენის ოჯახის დახასიათება და მათი გავრცელება

PAT კოდირებულია ZDHHC გენის ოჯახით და ხასიათდება (DHHC)Asp-His-His-Cys თანმიმდევრობით, ცისტეინით მდიდარ დომენში (CRD). DHHC და CRD დომენები აუცილებელია პალმიტოილ აცილტრანსფერაზას აქტივობისთვის. 23 გენი, რომლებიც აკოდირებენ ცილებს DHHC-CRD დომენებით, იდენტიფიცირებულია თაგვებისა და ადამიანების მონაცემთა ბაზაში. ნერვულ ქსოვილში იდენტიფიცირებულია პალმიტოილტრანსფერაზის შემდეგი გენები: Zdhhc2, Zdhhc3, Zdhhc8, Zdhhc9, Zdhhc16 და სხვა. აქედან დადასტურებულია, რომ ისინი დაკავშირებულია ადამიანში დაავადებების პათოგენეზთან: DHHC8 შიზოფრენიასთან, DHHC17/HIP14 ჰანტინგტონის დაავადებასთან, DHHC15 და DHHC9 X-დაკავშირებულია გონებრივი ჩამორჩენასთან და DHHC2, DHHC9, DHHC17 და DHHC11 სიმსივნის გენეზთან (Planey et al., 2009).

1.7 ჰიპოქსია და ჰიპოქსიით ინდუცირებული პროცესები

1.7.1 ჰიპოქსია და მისი როლი სხვადასხვა დაავადების პათოფიზიოლოგიაში

ჰიპოქსია არის მდგომარეობა, რომელიც ხასიათდება ქსოვილის დონის არასაკმარისი ჟანგბადით, შეიძლება გამოწვეული იყოს სისხლის მიწოდების შემცირებით ან სისხლში ჟანგბადის დონის შემცირებით. ის შეიძლება გამოვლინდეს მწვავედ ან ქრონიკულად, სხვადასხვა ქსოვილის პასუხებით. ზოგიერთი ქსოვილი ძალიან მდგრადია ჰიპოქსიის მიმართ, ზოგი კი უფრო დაუცველია ხანმოკლე ექსპოზიციის მიმართ (Dzhalilova et al., 2020). ჰიპოქსიის გავლენა თავის ტვინზე დამოკიდებულია

მის ტიპზე, ხანგრძლივობაზე, სიმძიმესა და სიხშირეზე. ჰიპოქსიამ შეიძლება გამოიწვიოს ანთებითი შუამავლების გათავისუფლება, როგორცაა $TNF\alpha$ და $IL1\beta$, რაც იწვევს ადგილობრივ ანთებას. მას ასევე შეუძლია გამოიწვიოს დეპოლარიზაციის ცვლილებები, ოქსიდაციური სტრესი, აპოპტოზი და ნეიროდეგენერაცია (Hou et al., 2019; Burtcher et al., 2021). რამდენიმე ტიპის უჯრედში, ჰიპოქსია შერჩევით აძლიერებს ინტეგრინის რეცეპტორების ექსპრესიას (Ju et al., 2017).

ჰიპოქსია შეიძლება გამოვლინდეს ინტენსივობის სპექტრის მასშტაბით, დაწყებული რბილიდან მძიმემდე და წარმოდგენილი იყოს მწვავე, ქრონიკული ან შერეული, მწვავე და ქრონიკული ფორმებით. ჰიპოქსიაზე პასუხი ქსოვილებში განსხვავებულია, მაშინ როცა ზოგიერთ ქსოვილს შეუძლია მოითმინოს ჰიპოქსიის ან იშემიის გარკვეული ფორმები ხანგრძლივი პერიოდის განმავლობაში, სხვებში მნიშვნელოვნად ზიანდება მცირე ხნის შემდეგადაც. თავის ტვინში ჟანგბადის მიწოდების ნებისმიერმა დაბრკოლებამ შეიძლება გამოიწვიოს ტვინის უჯრედებზე კატასტროფული შედეგები. ჰიპოქსიის როლი სხვადასხვა დაავადებების პათოფიზიოლოგიაში დიდია რადგან აქვს მოქმედების ფართო სპექტრი ორგანიზმზე. ჰიპოქსია შეიძლება განვითარდეს იშემიის დროს, ქსოვილებში სისხლის ნაკადის შემცირებისას ან იშემიისგან დამოუკიდებელი ფილტვების მწვავე დაზიანებისას, ანემიის და ნახშიროჟანგით მოწამვლის დროს. ჰიპოქსია შეიძლება დაფიქსირდეს ისეთი დაავადების მქონდე პაციენტებში როგორცაა: ძილის ობსტრუქციული აპნოე, ცერებროვასკულური დაავადებები, სისტემური ჰიპერტენზია, გულსისხლძარღვთა დაავადებები, ფილტვების ქრონიკული ობსტრუქციული დაავადება, ფილტვის ჰიპერტენზია და გულის შეგუბებითი უკმარისობა, თირკმლის ანთებითი, მწვავე და ქრონიკული დაავადებები.

ბოლო დროს მიმდინარე კვლევებმა აჩვენა, რომ ჰიპოქსიური სასიგნალო გზა მონაწილეობს, როგორც სხეულის ადაპტაციაში ჟანგბადის შემცირების მიმართ აგრეთვე, დაავადებების პათოგენეზში სხვადასხვა საპასუხო სასიგნალო სისტემაში. ჰიპოქსიური სასიგნალო შუამავლები ახორციელებენ პასუხს ანგიოგენეზის, გლიკოლიზის და ერითროპოეზის, ანთების მოდულაციით (Lee et al., 2020). ჰიპოქსიაზე საპასუხოდ, უჯრედი იწვევს უამრავ რეაქციას, რომელიც მოიცავს

იონური არხის ჰომეოსტაზის დარღვევას, ენერგიის უკმარისობას, თავისუფალი რადიკალების გამომუშავებას და სხვა.

1.7.2 HIF - ჰიპოქსიით ინდუციბელური ფაქტორი

ჟანგბადი უჯრედების გადარჩენისთვის აუცილებელი ელემენტია, ის მოქმედებს როგორც საბოლოო ელექტრონის მიმღები ოქსიდაციური ფოსფორილირების დროს, რაც საბოლოოდ იწვევს ენერგიის გამომუშავებას ატფ-ის სახით. თუმცა, ჰიპოქსიის პირობებში, უჯრედი განიცდის ენერგიის ხანგრძლივ დეპრივაციას, რაც იწვევს შეუქცევად უჯრედულ დისფუნქციას და საბოლოოდ იწვევს უჯრედულ დაღუპვას (Gutierrez, 1991; Hardie, 2003).

ნორმალურ პირობებში 60% ATP-ისმოიხმარება და ATPase-ების მიერ Na^+/K^+ ATPase. ჰიპოქსიის დროს ხდება უჯრედშიდა ATP/ADP თანაფარდობის შემცირება, რაც არღვევს იონების კონცენტრაციულ გრადიენტებს K^+ იონების გადინების და Na^+ და Ca^{2+} იონების შემოდინების გამო. საბოლოოდ, ხდება მემბრანის დეპოლარიზაცია და დაგროვილი Ca^{2+} იონები ააქტიურებენ პროტეაზებს, რაც იწვევს მემბრანის დაზიანებას, მიტოქონდრიულ მეტაბოლიზმის დარღვევას და რეაქტიული ჟანგბადის სახეობების (ROS) წარმოქმნას (Boutillier, 2001). ჰიპოქსიის გახანგრძლივებული ზემოქმედების პირობებში, ჰიპოქსია ინდუციბელური ფაქტორი (HIF) აქტივირდება, რომელიც კარგად შესწავლილი ტრანსკრიფციის ფაქტორია და წარმოადგენს ჰიპოქსიის პოტენციურ ენდოგენურ მარკერს. HIF-1 ტრანსკრიპციული კომპლექსი შედგება ორი სუბერთეულისგან, კერძოდ HIF-1 α და HIF-1 β , რომელიც უერთდება დნმ-ს სამიზნე გენების ჰიპოქსიის საპასუხო ელემენტებს (HRE) (Semenza, 1999; Peers et al., 2007). ცნობილია, რომ 200-ზე მეტი სამიზნე გენი რეგულირდება HIF კომპლექსით, რომელიც შემდგომში „ჩართავს“ ფაქტორებს, რომლებიც მონაწილეობენ ერითროპოეზში, ანთებითი პროცესის გენის ექსპრესიაში, ენერგიის მეტაბოლიზმში ან აპოპტოზში, ანგიოგენეზისა და უჯრედების გადარჩენასა და პროლიფერაციაში (Kaur et al., 2005).

ასაკი არის ჰიპოქსიის და მასთან დაკავშირებული კლინიკური დარღვევების მთავარი რისკფაქტორი. ჰიპოქსიით გამოწვეული დაავადებებისადმი დაუცველობა ასაკთან ერთად იზრდება. უფრო აშკარა გახდა, რომ ასაკთან ერთად ჟანგბადის წნევა ეცემა, რაც ცერებრალური პერფუზიის დაბალ წნევასთან ერთად იწვევს მიკროგლიების აქტივაციას და ნეიროანთებას (Buga et al., 2013; Sandu et al., 2015). ასევე დადგინდა HIF-ში ასაკთან დაკავშირებული ცვლილებები, რომლებიც დაკავშირებულია ინსულტის მიმართ მომატებულ მგრძნობელობასთან (Katschinski, 2006). დაფიქსირდა განსხვავება HIF-ის დნმ-ის შეკავშირების ეფექტურობაში, როდესაც შევადარეთ ახალგაზრდა და მოხუც თავგებს შორის, რომლებიც ექვემდებარებოდნენ ჰიპოქსიას (Frenkel-Denkberg et al., 1999). სხვადასხვა კვლევებმა აჩვენა, რომ ტელომერების შემცირებისა და თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნის დაბერების თეორიები, ორივე დამოკიდებულია ჟანგბადის ხელმისაწვდომობაზე (Nishi et al., 2004). დადგინდა, რომ აერობული ვარჯიშის პროცესების ჩატარებისას იოგას ჩათვლით, სხეულში იზრდება ტვინისგან მიღებული ნეიროტროფული ფაქტორის (BDNF) ექსპრესია. BDNF არის ნეიროგენეზის, ისევე როგორც ნეირონების პლასტიურობის მნიშვნელოვანი შუამავალი. ის ხელს უწყობს ტვინის სხვადასხვა უბნების ზრდას, როგორიცაა ჰიპოკამპი, ზურგის ფესვის განგლიონები, ასევე კორტიკალური ნეირონები. ეს დონეები ასაკთან ერთად მცირდება, თუმცა ყველა ასაკობრივ ჯგუფში, რომლებიც ასრულებდნენ აერობულ ვარჯიშებს, ამ შემთხვევაში იოგას ეს რიცხვი გაუმჯობესებულია. აერობული ვარჯიშები, რომლებიც ზრდის სისხლში ჟანგბადის დონეს და, შესაბამისად, ხელს უწყობს ცერებრალური პერფუზიას, პირდაპირ გავლენას ახდენს სიმპათიკური თირკმელზედა ჯირკვლის მედულას ღერძის (SAM) შემცირებაზე. SAM-ის გააქტიურება იწვევს თირკმელზედა ჯირკვლის ტვინიდან კატექოლამინების გათავისუფლებას. მწვავე რთულ შეთხვევებში ამ კატექოლამინებს დიდი მნიშვნელობა აქვს. თუმცა, თუ მუდმივად გაიზარდება, შეიძლება გამოიწვიოს სისხლძარღვთა რეზისტენტობა, რაც თავის მხრივ ორგანოების პერფუზიის დაქვეითებას მათ შორის ცერებრალური პერფუზიის დაცემას გამოიწვევს (Arora and Bhattacharjee, 2008).

1.7.3 ჰიპოქსია/იშემია ცნს-ის პათოლოგიებში

შემცირებული სისხლის მიწოდება ასევე ართმევს ქსოვილს ჟანგბადს და საკვებ ნივთიერებებს, რაც იწვევს ქსოვილის დაზიანებას და უჯრედების სიკვდილს გახანგრძლივებული ჰიპოქსიური მდგომარეობის დროს. ნორმალურ პირობებში სხეულს აქვს საკუთარი მექანიზმები ჟანგბადის ნაკლებობის შესაგრძნობად და ამის დასაძლევად. თუმცა, მუდმივი დაზიანება და პათოლოგიური შედეგი შეიძლება წარმოიშვას იმ პირობებში, როდესაც ჰიპოქსიის ქვეშ მყოფი ქსოვილი ვერ შეძლებს დეფიციტის აღმოფხვრას. ტვინს როგორც ცნობილია, აქვს ძალიან მაღალი მეტაბოლური მოთხოვნილება და გლუკოზის მეტაბოლიზმისთვის მთლიანად დამოკიდებულია ჟანგბადის მიწოდებაზე. ჟანგბადის მიწოდების ნებისმიერმა მცირე დარღვევამ, თუნდაც რამდენიმე წამით, შეიძლება გამოიწვიოს ტვინის ფუნქციონირების უცარი და შეუქცევადი დაზიანება. ცნს-ის ქსოვილებში ჰიპოქსიამ შეიძლება გამოიწვიოს პათოფიზიოლოგიური მოვლენების სერია.

ჰიპოქსიური დაზიანება დაკავშირებულია ცნს-ის მრავალ კლინიკურ ანომალიასთან, მათ შორის ინსულტთან, ენცეფალოპათიასთან, იშემიურ რეტინოპათიებთან და ალცჰეიმერის დაავადებასთან (Peers et al., 2007). ბოლო გამოკვლევებით გამოიკვეთა, რომ AD-ის პათოლოგიას საერთო კავშირები აქვს ჰიპოქსია/იშემიასთან. კვლევებმა აჩვენა, რომ ჰიპოქსია იწვევს ბეტა-სეკრეტაზა 1 (BACE1) გენის ექსპრესიის რეგულაციას, როგორც in vitro, ასევე in vivo, რითაც ხელს უწყობს ალცჰეიმერის დაავადების (AD) პათოლოგიას. ბოლო აღმოჩენამ ასევე აჩვენა, რომ ჰიპოქსია იწვევს AD-ში ეპიგენეტიკურ ცვლილებას და სავარაუდოდ მას შეუძლია გააძლიეროს AD პროგრესირება γ -სეკრეტაზას ფერმენტის მაკოდირებელი გენების დემეთილირების გზით. ამ კვლევამ აჩვენა, რომ ჰიპოქსია იწვევდა ნევროლოგიურ დარღვევებს და მეხსიერების დისფუნქციას AD თავგებში. ნაჩვენებია, რომ პაციენტები, რომლებსაც გადატანილი აქვთ ინსულტი ან აწუხებთ გულ-სისხლძარღვთა დაავადებები, უფრო მგრძნობიარენი არიან ალცჰეიმერის მიმართ, კოგნიტური უკმარისობისა და დემენციის განვითარების მიმართ. ცერებრალური იშემიის შემთხვევაში, AD-ის მიმართ მგრძნობელობა იზრდება. ჰიპოქსიამ ასევე შეიძლება გამოიწვიოს β -ამილოიდური ჩანართების წარმოქმნა ხანგრძლივი მოქმედების დროს. AD-ის

პათოგენეზის მექანიზმი, რომელიც დაკავშირებულია ჰიპოქსია/იშემიასთან, ჯერ კიდევ უცნობია. მიუხედავად ამისა, გამოვლინდა რომ კალციუმის ჰომეოსტაზისა და კალციუმის არხის სასიგნალო გზები არის დამაკავშირებელი რგოლი AD განვითარებასა და ჰიპოქსიას შორის. ამილოიდური β ფირფიტების წარმოების გაზრდის გარდა, ნაჩვენებია რომ ჰიპოქსია ასევე იწვევს სხვა პათოლოგიურ ნიშნებს, რომლებიც დაკავშირებულია AD-თან, როგორიცაა ტაუფოსფორილირება, დეგრადაციის შემცირება და დაფების კლირენსი (Minhas et al., 2017).

ლიტერატურაში არსებული მონაცემების გაანალიზებისა და შესწავლის შედეგად ნათელია ჰიპოქსიით გამოწვეული ცვლილებების დეტალური შესწავლის აუცილებლობა და აღნიშნული ცვლილებებით გამოწვეული დაზიანებების აღდგენაში ჩართული მოლეკულების და მოლეკულური მექანიზმების აღმოჩენა დაზიანებების შემდგომში უკეთ მართვის მიზნით. ლიტერატურის მონაცემებით არსებული ცოდნა ჰიპოქსიური ქსოვილის რემოდელირებაში ინფარქტის შემდეგ და პოსტინფარქტული ქსოვილის რემოდელირებაში თიროიდული ჰორმონების ჩართულობის შესახებ, რაც გავლენას ახდენს ქსოვილის განმეორებითი დაზიანების პრევენციას მიუთითებს თიროიდული ჰორმონების მნიშვნელობაზე ჰიპოქსიის შემდგომი აღდგენის პროცესში. თუმცა, ზუსტი უჯრედშიდა მექანიზმები, რომლებიც პასუხისმგებელნი არიან თიროიდული ჰორმონების დამცავ ეფექტებზე და მათ ეფექტებში მონაწილე რეგულატორულ სისტემებზე რჩება გაურკვეველი, რომელთა შესწავლა დავისახეთ მიზნად.

თავი II. მასალა და მეთოდები

დასახული ამოცანების შესასრულებლად, კვლევის ობიექტად გამოვიყენეთ: ფეოქრომოციტომას თირკმელზედა ჯირკვლის ტვინოვანი შრის სიმსივნის, ფეოქრომოციტომას უჯრედული ხაზი, PC-12 უჯრედული ხაზი.

ამოცანა 1. თიროიდული ჰორმონების არაგენომური მოქმედების ეფექტების დადგენა უჯრედული კულტურის სიცოცხლისუნარიანობაზე

ამოცანა 2. თიროიდული ჰორმონების არაგენომური მოქმედების შესწავლა ნეირონული ციტოჩონჩხის შემადგენლობის ცვლილებაზე

ამოცანა 3. თიროიდული ჰორმონების არაგენომურ მოქმედებაში ჩართული ზოგიერთი სარეგულაციო სისტემების დადგენა

2.1 კვლევის ობიექტი

ვირთაგვის ფეოქრომოციტომისაგან მიღებული PC-12 უჯრედული კულტურა ერთ-ერთ საუკეთესო მოდელს წარმოადგენს ნეიროპლასტიკურობის და ნეიროდეგენერაციის პროცესების შესწავლის მიზნით. ეს მოდელი აქტიურად გამოიყენება მზგავსი კვლევებისთვის, ასევე ამ მოდელზე მუშაობენ ნეირონული უჯრედების სასიგნალო გზების შესასწავლად (Vaudry et al., 2002). PC-12 უჯრედული კულტურას ნერვული ზრდის ფაქტორის (NGF) მოქმედებით უნარი აქვს გარდაიქმნას ნერვული უჯრედის მზგავს უჯრედად (Greene and Tischler, 1976), რაც მოსახერხებელს ხდის მის გამოყენებას დიფერენცირებაში ჩართული სასიგნალო გზების და მექანიზმების შესწავლაში. კვლევის დროს ჩვენ შევისწავლით თიროიდული ჰორმონების არაგენომურ მოქმედებას 3 მოდელის მიხედვით: ჟანგბადით დეპრივაციამდე, დეპრივაციის დროს და დეპრივაციის შემდეგ მოხდება PC-12 უჯრედულ კულტურასთან თიროიდულ ჰორმონებით დამუშავება, ხოლო ამ ჰორმონების არაგენომური მოქმედების დასადასტურებლად პარალელურად

ჩატარდება ექსპრიმენტი თიროიდული ჰორმონების ინტეგრინის ინჰიბიტორებთან თანაობისას.

2.1.1 PC-12 უჯრედული კულტურის გამრავლება და დიფერენცირება 100ng/ml NGF-ის გამოყენებით

PC-12 უჯრედული კულტურის გამრავლება ხდება (PC-12 - ATCC® CRL1721) ტენიან 5% CO₂-ის შემცველ ატმოსფეროში 37 °C ტემპერატურაზე მაღალი გლუკოზის, 10% გაცხელებით-ინაქტივირებული ცხენის შრატის და 5% ჩანასახოვანი ხარის შრატის შემცველ DMEM საკვებ არეში. ფეოქრომოციტომას უჯრედების დიფერენცირებისთვის 5x10⁶ უჯრედი (თითოეული სინჯისთვის) ინკუბირებული იყო შრატის დაბალი შემცველობის DMEM, რომელშიც სამი დღის განმავლობაში ემატებოდა ნერვული ზრდის ფაქტორი NGF 100 ნგ/მლ-ს. უჯრედები შეფასდა როგორც დიფერენცირებული, თუ ერთი ან მეტი ნეირიტი უჯრედის სხეულის დიამეტრზე გრძელი იქნება. დიფერენცირებული უჯრედები ინკუბირდებოდა (+) ან (-) ინტეგრინის ინჰიბიტორულ αvβ3-ანტისხეულთან (sc-7312, Santa cruz) (Scarlett et al., 2008) ან/და T3-თან ჰიპოქსიურ პირობებში. ჰიპოქსიური პირობები შენარჩუნებული იყო (0-1% ჟანგბადი) აზოტის აირით ჰიპოქსიის კამერაში (BioSpherix, USA), რომელიც მოთავსდა CO₂-ინკუბატორში, ხოლო ჟანგბადის დონე კონტროლირდებოდა მაკონტროლებელი ხელსაწყოთი ProOx Model 110 და ჟანგბადის სენსორით.

დიფერენციაციის ხარისხის შეფასება ხდება მიკროსკოპით, ხოლო უჯრედების რაოდენობის დათვლა Bio-Rad უჯრედების მთვლელით. საინკუბაციო არეში არდებული გამოთავისუფლებული ლაქტატდეჰიდროგენაზას განსაზღვრით ლაქტატდეჰიდროგენაზული ციტოტოქსიკური შეფასდა უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა შესაბამისი კიტის გამოყენებით (ab102526) და MTT ტესტით ცოცხალ ინტაქტურ უჯრედებში წარმოქმნილი ფორმაზანის რაოდენობის განსაზღვრით 570ნმ-ზე მიკროპლანშეტური სპექტრიფოტომეტრის გამოყენებით “Biotek ELx808” (აშშ).

2.1.2 უჯრედების ფრაქციონირება

თიროიდულ ჰორმონებთან და შესაბამის ინტეგრინის ანტისხეულთან ინკუბირების შემდეგ, პოლი-D-ლიზინით დაფარული მატრასებიდან ამოვიღეთ არეები, მატრასებზე ადჰეზირებული უჯრედების PBS-ით 3-ჯერ გარეცხვის შემდეგ უჯრედები მოიხსნა 0,025% Trypsin/PBS-ით, 1 წთ-იანი შენჯღრევითი ინკუბაციის შემდეგ დაემატა ტრაზილოლის შემცველი PBS ბუფერი (ტრიფსინის ინჰიბირებისთვის, 20 მლ PBS-ზე 10 მკლ ტრაზილოლი), დაცენტრიფუგირდა 5 წთ 300 x გ-ზე. უჯრედების დათვლის შემდეგ გაირეცხა PBS ბუფერით 5 წთ 300 x გ-ზე დაცენტრიფუგირებით. უჯრედების ნალექს დაემატა ლიზის ბუფერი (1×10^6 უჯრედზე 100 მკლ ლიზის ბუფერი) მუდმივი რესუსპენდირებით 37°C -ზე 10 წუთიანი ინკუბაციის შემდეგ დაცენტრიფუგირდა 1000 x გ-ზე 10 წთ. მიღებული ნალექი შევინახეთ, როგორც ბირთვული და დაუშლელი უჯრედების ფრაქცია, ხოლო 200 მკლ სუპერნატანტი დავაცენტრიფუგით მაღალი სიჩქარის ულტრაცენტრიფუგაზე 134000 x გ-ზე 1 სთ.

ციტოპლაზმური ფრაქციის მისაღებად უჯრედების ლიზისი მოხდა ლიზისის ბუფერში (LB: 1% IGEPAL CA-630, 50-mM Tris-HCl, 150-mM NaCl, and 10% გლიცეროლი, რომელშიც დამატებული იყო 50 mM N-ეთილმალეიმიდი, PMSF და პროტეაზების ინჰიბიტორების კოქტეილი PI Cocktail III; pH7.5) (ყველა გამოყენებული რეაგენტი იყო მოწოდებული Sigma-Aldrich, USA-დან). უჯრედების ლიზისისთვის ნიმუშები გავაჩერეთ 30 წუთი მაცივარში ყინულზე, გავატარეთ 26 $\frac{1}{2}$ GA შპრიცში 5-6 ჯერ და გავუკეთეთ სონიკაცია ყინულზე 15 წამის განმავლობაში. უჯრედების ლიზისის შემდგომ, ბირთვები მოვაცილეთ 720xგ-ზე 5 წუთიანი ცენტრიფუგირებით. შემდეგ ნიმუშები დაცენტრიფუგირდა 16,000 x გ 30 წუთის განმავლობაში, რის შემდგომაც მივიღეთ ციტოპლაზმური ფრაქცია, რომელიც გამოვიყენეთ შემდგომი ექსპერიმენტებისთვის.

2.1.3 G აქტინის და F აქტინის ფრაქციების მიღება

ფრაქციების მიღება მოხდა ბამბჰვანის ჯგუფის (Bhambhani et al., 2017) პროტოკოლის მიხედვით. უჯრედების ინკუბაციიდან მოხსნის შემდეგ დაემატება ლიზის ბუფერი “F აქტინის სტაბილიზაციის ბუფერი“ (1×10^6 უჯრედზე 100 მკლ ლიზის ბუფერი) და დაინკუბირდა 37°C-ზე 10 წუთი მუდმივი რესუსპენდირებით. დაცენტრიფუგირების შემდეგ, 1000 x g-ზე 10 წთ, მიღებული ნალექი დახასიათდა როგორც ბირთვული და დაუშლელი უჯრედების ფრაქცია, ხოლო სუპერნატანტის 200 მკლ დაცენტრიფუგირდა მაღალი სიჩქარის ულტრაცენტრიფუგაზე 134000 x g-ზე 1 სთ. მიღებული ნალექი ჩაითვადა როგორც F აქტინის ფრაქცია, ხოლო მიღებული სუპერნატანტი გამოყენებული იყო G აქტინის რაოდენობრივი ანალიზისთვის. მიღებული ნალექი გაიხსნა 50 მკლ F-აქტინის დეპოლიმერიზაციის ბუფერში თავისუფალი G აქტინის მიღების მიზნით ყინულზე 1 საათიანი ინკუბაციით და ყოველ 15 წუთში შენჯღრევით (ვორტექსზე)

F-აქტინის სტაბილიზაციის ბუფერის შემადგენლობა: PIPES-0.1M, pH6.8; 30% glycerol, 5% DMSO, 1mM $MgSO_4$, 1 mM EGTA, 1%Triton x-100, 1 mM ATP, პროტეაზების ინჰიბიტორების კოქტეილი PI (1:1000);

F-აქტინის დეპოლიმერიზაციის ბუფერის შემადგენლობა: 5mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.2 mM $CaCl_2$, 0.2mM ATP, 1 mM DTT.

მიღებული F-აქტინის და G-აქტინის ფრაქციები გამოყენებული იყო SDS-PAGE ელექტროფორეზის და ვესტერ ბლოტინგის ანალიზისთვის. თითოეულ ნიმუშში განისაზღვრა საერთო ცილის რაოდენობა და საერთო ცილის თანაბარი რაოდენობის მიხედვით სუპერნატანტებს დაემატა 1:1 ნატრიუმის დოდეცილსულფატის და მერკაპტოეთანოლის შემცველი ნიმუშის ბუფერი (Sample Buffer) და ნიმუშები moduRda 95°C-ზე 5 წუთის განმავლობაში. მიღებული ნიმუშები დატანილი იყო პოლიაკრილამიდის ელექტროფორეზის გელზე.

2.2 JAK/STAT გზის ცილების ანალიზი

ჰიპოქსიურ პირობებში $\alpha\beta 3$ ინტეგრინის ინჰიბიტორულ $\alpha\beta 3$ -ანტისხეულთან ან/და T3-თან ინკუბირებული უჯრედების ლიზისი მოხდა შესაბამისი ლიზის ბუფერით, რომელიც მოწოდებული იყო RayBiothec-ის მიერ. უჯრედების ლიზისის შემდეგ, ბირთვები და დაუნგრეველი უჯრედები მოშორებული იყო დაცენტრიფუგირებით 5 წუთის განმავლობაში $720 \times g$ -ზე და სუპერნატანტი შემდგომი გაანალიზების მიზნით დაექვემდებარა შემდგომ საფეხურებს.

2.3 SDS-PAGE გელ-ელექტროფორეზული და ვესტერნ ბლოტის მეთოდი

2.3.1 G-აქტინის და F-აქტინის რაოდენობრივი ანალიზი

ჩატარდა SDS-PAGE გელ-ელექტროფორეზული და ვესტერნ ბლოტის მეთოდით abcam-ის პროტოკოლის მიხედვით. 7,5 -12% პოლიაკრილამიდის გელზე მოხდა უჯრედული ლიზატების დაყოფა, 110 mV-ზე. ნიტროცელულოზის მემბრანაზე ცილების ტრანსფერი განხორციელდა 350 watt და 100 mV-ზე 1 საათის განმავლობაში. ტრანსფერის დადასტურებისთვის ნიტროცელულოზის მემბრანა შევლბეთ პონსო-S საღებავით. შემდეგ ნიტროცელულოზის მემბრანა ვაინკუბირეთ 5% ალბუმინის ბლოკინგის ბუფერში (PBS 0.1% Tween-40, PBST) 4°C -ზე მთელი ღამე. მეორე დღეს მემბრანა ვაინკუბირეთ აქტინის პირველად ანტისხეულთან (anti-mouse, anti-actin; sc-) 1 საათი, რომელიც გახსნილი იყო 3% ალბუმინის PBST ბუფერში 1:500 შეფარდებით. ინკუბაციის შემდეგ გავრეცხეთ 3-ჯერ PBST ბუფერით 5-5 წუთი. შემდეგ 1 საათი ვაინკუბირეთ შესაბამის მეორედ ანტისხეულთან (Chicken Anti-Mouse IgG H&L (HRP) (ab112458), რომელიც გახსნილი იყო 3% ალბუმინის PBST ბუფერში 1:10000 შეფარდებით. ინკუბაციის დასრულების შემდეგ გავრეცხეთ 3-ჯერ PBST ბუფერით 5-5 წუთი და მოვახდინეთ მემბრანის ვიზუალიზაცია ქემილუმინისცენტური ხსნარების (Amersham, California, USA) და ქემილუმინისცენციის x-ray ფირების გამოყენებით

2.3.2 პალმიტირებული Fyn და p-Fyn კინაზების და Fyn და p-Fyn კინაზების მთლიანი რაოდენობის განსაზღვრა

პალმიტირებული Fyn და p-Fyn კინაზების (პალმიტირებული Fyn და p-Fyn კინაზების მონიშვნა აღწერილის 2.5 ქვეთავში) და Fyn და p-Fyn კინაზების მთლიანი რაოდენობის განსაზღვრის მიზნით, ექსპერიმენტული ნიმუშების თანაბარი რაოდენობა ვადუღეთ 90°C-ზე 5 წუთის განმავლობაში 2 x ნიმუშის ბუფერთან (Sample buffer), გავაციეთ და ვაცენტრიფუგირეთ 16,000xg-ზე 3 წუთის განმავლობაში, მოვახდინეთ ელექტროფორეზული დაყოფა SDS-PAGE-ის მეშვეობით 8% SDSPAGE გელზე და დაყოფილი ცილები შემდგომი ანალიზისთვის გადავიტანეთ ნიტროცელულოზის მემბრანაზე. 5% ალბუმინის მეხუთე ფრაქციის და 0.05% Tween-20-ის შემცველ Tris-HCl-ბუფერში ბლოკინგის შემდგომ, ნიტროცელულოზური მემბრანები ვაინკუბირეთ პირველად ანტისხეულთან, რომელიც გახსნილი იყო 3% ალბუმინის მეხუთე ფრაქციის და 0.05%-იანი Tween-20-ის შემცველ Tris-HCl-ბუფერში. Fyn და p-Fyn კინაზების დეტექციისათვის გამოყენებული იყო ანტი-Fyn (sc-434, Santa Cruz Biotechnology, USA) და ანტი-p-Fyn (sc-377555, Santa Cruz Biotechnology, USA) 1:500. თანაფარდობით. ინკუბაციის შემდეგ გაირეცხა სამჯერ 5-5 წუთის განმავლობაში და მოხდა შემდგომი 1 საათიანი ინკუბაცია შესაბამის მეორად ანტისხეულთან (1:2000 თანაფარდობით) ან სტრეპტავიდინის-HRP-თან (1:2000 თანაფარდობით). იმუნომონიშნული ცილების ვიზუალიზაცია მოხდა გაძლიერებული ქემილუმინესენციის კიტით (sc-2048, Santa Cruz Biotechnology, USA) და გაანალიზდა დენსიტომეტრის გამოყენებით. პალმიტირებული Fyn და p-Fyn კინაზების რაოდენობის ნორმალიზება მოხდა მთლიანი Fyn და p-Fyn კინაზების რაოდენობასთან. მემბრანები სტრიპინგის ბუფერით გარეცხვის შემდეგ ხელახალი გაანალიზების შედეგად. (Abcam-ის სტრიპინგის პროტოკოლი).

2.3.3 NOX2, NOX4, კოფილინი1, p-კოფილინი1 -ის შემცველობის განსაზღვრა ელექტროფორეზული და ვესტერნ ბლოტის მეთოდით

კოფილინის არაფოსფორილირებული და ფოსფორილირებული იზომერის რაოდენობრივი ანალიზი/თანაფარდობის განსაზღვრის მიზნით ჩავატარეთ SDS-PAGE გელ-ელექტროფორეზული და ვესტერნ ბლოტით ანალიზი abcam-ის პროტოკოლის მიხედვით. 7,5-12% პოლიაკრილამიდის გელზე მოვახდინეთ უჯრედული ლიზატების დაყოფა, 110 mV-ზე. ნიტროცელულოზის მემბრანაზე ცილების ტრანსფერი განხორციელდა 350 watt და 100 mV-ზე 1 საათის განმავლობაში. წარმატებული ტრანსფერის დადასტურებისთვის ნიტროცელულოზის მემბრანა შევღებეთ პონსო-S საღებავით. შემდეგ მემბრანა ვაინკუბირეთ 5% ალბუმინის ბლოკინგის ბუფერში (TBS 0.1% Tween-40, TBST) 4°C-ზე მთელი ღამე. მეორე დღეს ვაინკუბირეთ შესაბამისს პირველად ანტისხეულთან (anti-p-cofilin1 - sc-271921; anti-cofilin1 - sc-53934; anti-NOX4- sc-518092; Santa Cruz Biotechnology, USA; anti-NOX-2 ab80897; Abcam USA) 1 საათი, რომელიც გახსნილი იყო 3% ალბუმინის TBST ბუფერში 1:500 შეფარდებით. ინკუბაციის შემდეგ გავრეცხეთ 3-ჯერ TBST ბუფერით 5-5 წუთი. შემდეგ 1 საათი ვაინკუბირეთ შესაბამისს მეორედ ანტისხეულთან (ab112458, Abcam, USA), რომელიც გახსნილი იყო 3% ალბუმინის TBST ბუფერში 1:2000 შეფარდებით. ინკუბაციის დასრულების შემდეგ გავრეცხეთ 3-ჯერ TBST ბუფერით 5-5 წუთი და მოვახდინეთ მემბრანის ვიზუალიზაცია ქემილუმინისცენტური ხსნარების (sc-2048, Santa Cruz Biotechnology, USA) და ქემილუმინისცენციის x-ray ფირების გამოყენებით. გაანალიზება მოხდა ImageJ პროგრამის გამოყენებით (1.53 k, National Institute of Health, USA).

2.4 უჯრედების ციტოტოქსიკურობის ტესტის, ლაქტატდეჰიდროგენაზული

აქტივობის განსაზღვრა

ლაქტატდეჰიდროგენაზული ციტოტოქსიკური ტესტი ჩატარდა საინკუბაციო საკვებ არეში შესაბამისი კიტის გამოყენებით (ab102526). ლაქტატდეჰიდროგენაზული აქტივობა განისაზღვრა სპექტროფოტომეტრული რიდერის გამოყენებით 630 და 490 ნმ ტალღის სიგრძეზე.

2.5 პალმიტირებული Fyn და p-Fyn კინაზების განსაზღვრა

პალმიტირებული Fyn და p-Fyn კინაზების დეტექცია მოხდა (Brigidi et al., 2013; Goloshvili et al., 2019)-ის მიხედვით. ციტოპლაზმური ფრაქციიდან იმუნოპრეციპიტაციის გზით მიღებულ პირველად ანტისხეულთან (anti-Fyn sc-434, Santa Cruz Biotechnology, USA; anti-p-Fyn sc-377555, Santa Cruz Biotechnology, USA) და A/G-აგაროზასთან ბმული Fyn და p-Fyn კინაზების გამოყენებით (იხ. იმუნოპრეციპიტაცია). A/G-აგაროზასთან დაკავშირებულ კინაზებს დავუმატეთ ლიზისის ბუფერი (LB) +10mM N-ეთილმალეიმიდი (NEM) ბუფერი და ვაინკუბირეთ 10 წუთი ყინულზე. LB შემადგენლობა: 1% IGEPAL CA-630, 50mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 10% Glycerol. შემდეგ ვაცენტრიფუგირეთ 500xg-ზე 4°C-ზე და დავუმატეთ Stringent Buffer-ს და ვაცენტრიფუგირეთ ძალიან სწრაფად და გავაშორეთ. გავრეცხეთ 3-ჯერ LB pH7.2 (LB_{7.2}) ბუფერით (რეცხვა მოიცავს 1 წუთიან დაცენტრიფუგირებას 500xg-ზე 4°C-ზე). შემდეგ ნალექს დავუმატეთ LB_{7.2}+10mM NEM ბუფერში მომზადებული ჰიდროქსილამინი (1M HAM ბუფერი), როგორც ძლიერი აღმდგენი აგენტი, ცისტეინის ნაშთებიდან პალმიტატის ჯგუფების მოცილების მიზნით Fyn და p-Fyn კინაზების მოლეკულებში პალმიტირებული ცისტეინების შემდგომი ანალიზისათვის. საკვლევი ნიმუშები დაყოვნებული იქნა 1 საათის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე ნელი შენჯღრევით. ინკუბაციის შემდგომ მოვაშორეთ სუპერნატანტი და თითოეული ნიმუში ერთჯერადად გაირეცხა ყინულზე ლიზის ბუფერით (LB, pH6.2 PMSF/PI (LB_{6.2}) ძალიან მნიშვნელოვანია ზუსტი pH-ის შენარჩუნება), უშუალოდ გამოყენების წინ მომზადდა ბიოტინ-BMCC-ის საწყისი ხსნარი LB_{6.2} PMSF/PI ბუფერში (2,1მგ ბიოტინი-BMCC გახსნილი 0,5მლ დიმეთილსულფოქსიდი) იგივე ნაშთების თიოლ-რეაქტიული რეაგენტით, ბიოტინი-BMCC (Sigma Aldrich, cat no. B9181), საბოლოო კონცენტრაციით 5μM შემდგომი ბიოტინილირების მიზნით. თითოეულ ნიმუშის Fyn და p-Fyn კინაზების /A/G-აგაროზას კომპლექსს დავუმატეთ ბიოტინი-BMCC ბუფერი (სამუშაო კონცენტრაცია 0.5 - 5 μM) თავისუფალ ცისტეინის ნაშთებზე თიოლის ჯგუფთან შეკავშირების მიზნით და დავაყოვნეთ 1 საათის განმავლობაში 4°C ტემპერატურაზე ნელი შენჯღრევით. ინკუბაციის შემდეგ, თითოეული ნიმუში ერთჯერადად გაირეცხა

ყინულზე LB_{6.2} PMSF/PI -ით. შემდგომ, ნიმუშები გარეცხილ იქნა სამჯერადად LB_{7.2}-ით+PMSF/PI. ზემოაღნიშნული გარეცხვის პროცესის მიმდინარეობისას, ყველა ნიმუში მოთავსებული იყო ყინულზე. შემდგომ, 2×ნატრიუმის დოდეცილსულფატის (SDS)-ის საანალიზო ბუფერი მერკაპტოეთანოლის გარეშე (5% SDS, 5% გლიცეროლი, 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, და 0.01% ბრომოფენოლის ლურჯი) ახალმომზადებულ დითიოტრეიტოლთან ერთად დაემატა ნიმუშებს. ბიოტინი-BMCC დაკავშირებული პალმ-Fyn-ის და პალმ-p-Fyn-ის შემცველობა განისაზღვრა ელექტროფორეზით და ვესტერნ-ბლოტინგის მეთოდებით იმუნომონიშნული სტრეპტავიდინის-HPR გამოყენებით, ხოლო ვიზუალიზაცია მოხდა გაძლიერებული ქემილუმინესენციის კიტით (sc-2048; ECL, Santa Cruz Biotechnology,) და გაანალიზდა ImageJ პროგრამის გამოყენებით (1.53 k, National Institute of Health, USA).

2.6 იმუნოპრეციპიტაცია

ნიმუშების ციტოპლაზმურ ფრაქციას (თითოეულ ნიმუშში ცილის საერთო რაოდენობა შეადგენდა 300 მკგ, რომელიც განისაზღვრა BCA ცილის განსაზღვრის კიტის გამოყენებით) დავუმატეთ 10 მკლ შესაბამისი პირველადი ანტისხეული (anti-p-Fyn ან anti-Fyn ან anti-Rac1) და ვაინკუბირეთ მთელი ღამე 4°C-ტემპერატურაზე ნელი შენჯღრევით. მეორე დღეს წარმოქმნილ ანტისხეულების/ანტიგენური კომპლექსს დავუმატეთ A/G აგაროზა (80 მკლ თითოეულ ნიმუშში) და ვაინკუბირეთ 4 სთ 4°C ტემპერატურაზე მსუბუქი შენჯღრევით. ინკუბაციის შემდეგ გავრეცხეთ PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, and 1.8 mM KH₂PO₄)ბუფერით სამჯერ 2 წუთიანი დაცენტრიფუგირებით 300g-ზე 4° C-ზე. ცილა/პირველადი ანტისხეული/A/G-აგაროზის ნალექი შემდგომში გამოვიყენეთ სამიზნე ცილების პალმიტირების დონის დასადგენად.

2.7 NADPH ოქსიდაზას აქტივობა განისაზღვრება ლუმინისცენტური მეთოდით ფლუორიმეტრის გამოყენებით

NADPH ოქსიდაზური აქტივობა გაანალიზდა ლუციგენინის გამოყენებით, ჟანგის (Zhang et al., 2006) მიერ აღწერილი მეთოდის შესაბამისად, ვანგის (Wang and Lou, 2009) მოდიფიკაციებით. დიფერენცირებული PC-12 უჯრედები (1×10^6) გაირეცხა PBS-ით და დაიშალა სონიკაციით ყინულოვან კრებსის ბუფერში (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2mM MgCl₂, 1.5mM CaCl₂, 5mM გლუკოზა, 35 mM H₃PO₄ და 20 mM HEPES, pH 7,4). $1000 \times$ -ზე ცენტრიფუგირების შემდეგ, ნალექის რესუსპენდირება მოხდა 0,5mM ლუციგენინის შემცველ კრებსის ბუფერში. ლუმინისცენტრის განსაზღვრა მოხდა ბრტყელძირიან პლანშეტზე, მიკროპლანშეტური ფლუორისცენტულ რიდერზე (Twinkle LB979, Berthold, USA), სუბსტრატის სახით დავამატეთ 0.1 mM NADPH.

2.8 რნმ-ის ექსტრაქცია Trizol-ის რეაგენტით

Trizol-ის რეაგენტი არის სრული, გამოსაყენებლად მზა რეაგენტი, მაღალი ხარისხის საერთო რნმ-ის, დნმ-ის და ცილის ერთდროული იზოლირებისთვის სხვადასხვა ბიოლოგიური ნიმუშებიდან. ამიტომ ექსტრაქციისთვის გამოვიყენეთ ეს რეაგენტი და ვიმოქმედეთ პროტოკოლის შესაბამისად. პირველ რიგში დავამატეთ 1ml Trizol-ითითოეულ ნიმუშს და დავაყოვნეთ ოთახის ტემპერატურაზე 5 წუთის განმავლობაში, ამის შემდეგ დავამატეთ 200 მკლ ქლოროფორმი და ისევ შევანჯღრიეთ კარგად ვორტექსის აპარატით 10-15 წმ. დავაინკუბირეთ ყინულზე 15 წთ და შემდეგ დავაცენტრიფუგირეთ ($12000 \times g$ 15 წთ $4^{\circ}C$ -ზე). შედეგად მივიღეთ სამი ფაზა: ზედა ფაზა - რნმ, შუა ფაზა - დნმ და მესამე ფაზა - ცილა. ზედა შრიდან ანუ რნმ-ის ფაზიდან ამოვიღეთ დახლოებით 80% და გადავიტანეთ ახალ ეპენდორფში. შემდგომ დავუმატეთ იზოპროპანოლი (0.5 ml) დავავორტექსეთ 10 წამი, დავაყოვნეთ ყინულზე 10 წუთის განმავლობაში, შემდეგ ისევ დავაცენტრიფუგირეთ ($12000 \times g$ 15 წთ, $4^{\circ}C$). მიღებულ ნიმუშს, რომელიც არის ნალექი მოვამორეთ სუპერნატანტი და დავამატეთ 1 ml 70%-იანი ეთანოლი და დავაცენტრიფუგირეთ ($7500 \times g$ 10წთ, $4^{\circ}C$). კვლავ

მოვაშორეთ სუპერნატანტი, ამოვიღეთ ეთანოლი და გავაჩერეთ ოთახის ტემპერატურაზე ეთანოლის ასაორთქლებლად 5-10 წუთი. ძალიან არ უნდა გამოშრეს, რადგან ხელს უშლის რნმ შემდგომ გახსნას წყალში. შედეგად ვიღებთ რნმ-ს, რომელიც თავისუფალია დნმ-ისა და ცილებისგან, თუმცა მაინც ვამოწმებთ და ვითვლით რნმ-ს ნანოდროპზე. ნალექს ვხსნით DEPC წყალში (30 μ l) 55 °C-ზე 10 წთ. ვითვლით ნანოდროპზე A_{260}/A_{280} , თანაფარდობა უნდა იყოს >1,8. მიღებული შედეგებით დავადგინეთ რნმ-ის სისუფთავე.

2.9 კომპლემენტარული დნმ-ის (კდნმ) სინთეზი

Trizol-ის რეაგენტით ექსტრაქციით მიღებული სუფთა რნმ-იდან ა კომპლემენტარული დნმ-ის (კდნმ) სინთეზისთვის გამოვიყენე Revert Aid RT ნაკრები (კატ. K1691; Thermo Scientific™) და შესაბამისად ვიხელმძღვანელებთ მწარმოებლის მიერ მოწოდებული პროტოკოლით. თითოეული ნიმუშის 2 მკგ რნმ-ს დავუმატეთ 1 მკლ პრაიმერი (Random Hexamer primer) და წყლით შევავსეთ 12 μ l-მდე. შემდეგ დავაბატე 4 მკლ 5x სარეაქციო ბუფერი, 1 მკლ RiboLock რნმ-აზას ინჰიბიტორი, 2 მკლ 10mM DNTP, 2 μ l, RevertAid). ნიმუშები მოვათავსეთ თერმოციკლერში (5 წუთი 25°C, შემდგომ 60 წუთი 42 °C და 5 წუთი 70 °C) კდნმ-ის სინთეზისთვის. მიღებული კდნმ შევინახეთ -70 °C-ზე შემდგომი ანალიზისთვის RT-PCR-ზე.

2.10 გენის ექსპრესიის განსაზღვრა RT-PCR-ით

პალმიტოილტრანსფერზას Zdh2, Zdh3, Zdh8 Zdh9, Zdh16 და რევერს-გენის, ჰიპოქსანტინ ფოსფორიბოზილ-ტრანსფერაზა-1 (“housekeeping” გენი: Hprt1-Hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1) ექსპრესიის დასადგენად გამოყენებული იყო რეალური დროის პჯრ მეთოდი (RT-PCR). ეს რევერს-გენი შევარჩიეთ საკონტროლო გენად, რადგან დადგენილია, რომ იშემიის დროს მისი ექსპრესია არ იცვლება (Gubern et al. 2009). გავითვალისწინეთ PC-12 უჯრედული ხაზის

სახეობრივი წარმოშობა - *Rattus norvegicus* - და შევადგინეთ PCR-ისთვის შესაბამისი პრაიმერები Integrate DNA Technology (<https://eu.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/Default.aspx>) და Primer-BLAST-ის (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) გამოყენებით.

Ref seq gene	Accession number	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Ampl. size
Hprt1	NM_012583.2	GTTCTGTCATGTCGACCCTC	AACACCTTTTCCAAATCTTCA GC	115
Zdhhc2	NM_145096	TGTATGCGGCTGGAAGATG	AGCTGATGAACACCACAGG	95
Zdhhc3	NM_001039014	ATGCCAGTATGGACAGAATAGC	GGCTGGAGGTATTCTGGTTTC	86
Zdhhc8	NM_001039021	TCAAACCCGCCAAGTACATC	ACAGCTCTTGTCAACCACG	103
Zdhhc9	NM_001039016	GATTTTCAAGCTCAGCCTCTG	TTTCTCCCACTTCCTTGTAC	120
Zdhhc16	NM_001039346	TGAAACTTCTATGCGCCAGG	GAGCAGAGGTGGGCATC	120

ცხრილი 1. პალმიტოილტრანსფერაზას გენების და ჰიპოქსანტინ ფოსფორიბოზილ-ტრანსფერაზა-1 რეფერს-გენის (*Hprt1*) პრაიმერების თანმიმდევრობა.

პჯრ-ის პარამეტრები:

საფეხური	პოლიმერაზას აქტივაცია	პჯრ	
	HOLD	ციკლი (40 ციკლი)	
		დენატურაცია	ანელინგი/დაგრძელება
დრო	95.0°C	95.0°C	60°C
დრო	10 წუთი	15 წამი	1 წუთი

RT-PCR რეაქციისთვის გამოყენებული იყო Sybr Green PCR Master mix (#4309155, Applied biosystems), რომელიც მოიცავს ნუკლეოტიდებს, დნმ პოლიმერაზას Sybr Green. პირველ ეტაპზე განვაზავეთ პრაიმერები სამუშაო კონცენტრაციამდე მომწოდებლის მიერ მითითებული განზავებების მიხედვით (Eurofins Genomics). ლიოფილიზირებული პრაიმერების დაცენტრიფუგირების შემდეგ ფხვნილი

გავხსენით ნუკლეაზებისგან გასუფთავებულ წყალში (პრაიმერის საბოლოო კონცენტრაცია 10 pmol/μl. პრაიმერების საწყისი კონცენტრაცია გვერდითა pmol/μl, განვაზავეთ 10 ჯერ). სარეაქციო არის მთლიანი მოცულობა 50 მკლ შეიცავდა: კდნმ მკლ + Forward primer (5'-3') 1 მკლ + 1 Reverse primer (5'-3') მკლ + წყალი 21 მკლ + 2X Sybr green Master Mix 25 მკლ

2.11 JAK/STAT გზის ცილების ფოსფორილირების შედარებითი დონის გამოვლენა

JAK/STAT სასიგნალო გზის ცილების ფოსფორილირების ფარდობითი დონეები გამოვლინდა RayBio® JAK/STAT Pathway Phosphorylation Array ნაკრების (#AAH-JAKSTAT-1-8; RayBiotech) გამოყენებით. 100 მკგ ცილა გადავიტანეთ RayBio Human Signaling Pathway Antibody Array მემბრანაზე და მივეყვით პროტოკოლში მითითებულ საფეხურებს. საბოლოოდ მემბრანაზე იმუნურად მარკირებული ზოლები ვიზუალიზაცია გაძლიერებული ქიმილუმინესცენციის მეთოდის გამოყენებით (sc-2048, Santa Cruz Biotechnology, აშშ) და გააანალიზა ImageJ პროგრამის გამოყენებით (1.53 k, National Institute of Health, USA). სტანდარტისთვის გამოყენებული იყო თითოეული ცილის შიდა კონტროლები.

2.12 BDNF ანალიზი

BDNF შემცველობა გაზომილი იყო უჯრედების საინკუბაციო საკვებ არეში, Human BDNF ELISA kit -ის (ab212166; Abcam, USA) გამოყენებით, მწარმოებლის პროტოკოლის მიხედვით.

2.13 სტატისტიკური ანალიზი

სტატისტიკური ანალიზი ჩატარდა one-way ANOVA-ს მეთოდის გამოყენებით post-hoc Tukey ერთად. მნიშვნელობა $p < 0.05$ ჩათვლილი იყო სტატისტიკურად მნიშვნელოვანი

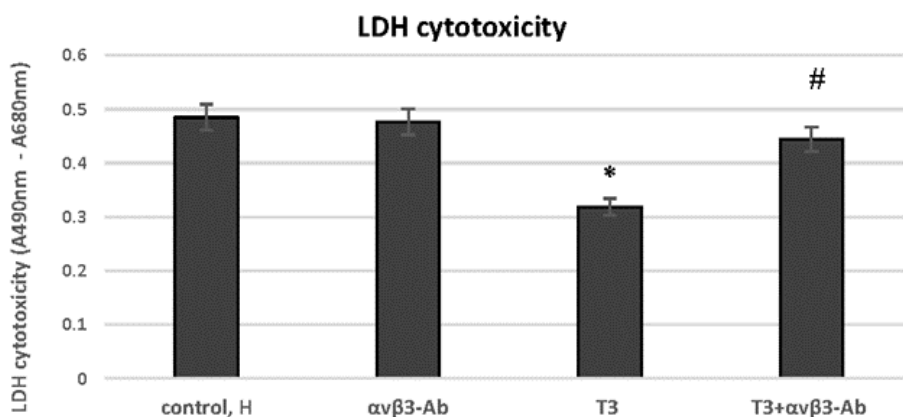
თავი III. მიღებული შედეგები და მათი განხილვა

3.1 მიღებული შედეგები

3.1.1 თიროიდული ჰორმონების არაგენომური მოქმედების ეფექტების დადგენა უჯრედული კულტურის სიცოცხლისუნარიანობაზე

ჩვენ ვივარაუდეთ, რომ ფარისებრი ჯირკვალის ჰორმონებმა $\alpha\beta 3$ ინტეგრინზე დმოკიდებული სასიგნალო გზით და აქტინის დინამიურობის მეშვეობით შეიძლება გავლენა მოახდინონ ჰიპოქსიით გამოწვეული უჯრედების დაზიანებაზე და გაზარდონ უჯრედების გამძლეობა ჰიპოქსიის დროს.

იმისთვის რომ შეგვესწავლა T3-ის არაგენომური $\alpha\beta 3$ ინტეგრინით გაშუალებული ეფექტი ჰიპოქსიის დროს, ჩვენ ვაინკუბირეთ უჯრედები (იხილეთ თავი უჯრედების ზრდა/დიფერენცირება) დიფერენცირებული PC-12 უჯრედები T3 თან და $\alpha\beta 3$ -ინტეგრინის ინჰიბიტორთან ($\alpha\beta 3$ მაინჰიბირებელი ანტისხეული) ერთ საათიან ჰიპოქსიურ პირობებში.



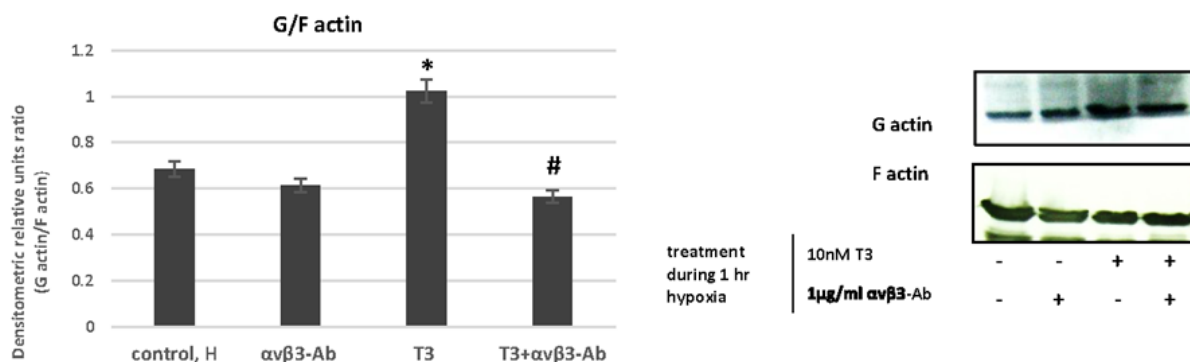
სურათი 12. ლაქტატდეჰიდროგენაზული აქტივობის განსაზღვრა დიფერენცირებულ ფეოქრომოციტომას (PC-12) უჯრედებში ჰიპოქსიურ პირობებში T3 და $\alpha\beta 3$ ინტეგრინის

*მაინჰიბირებელ ანტისხეულთან ინკუბაციის შემდეგ. მნიშვნელოვანი დონე აღნიშნულია * $P<0.05$ და შედარებულია საკონტროლო ჯგუფთან.*

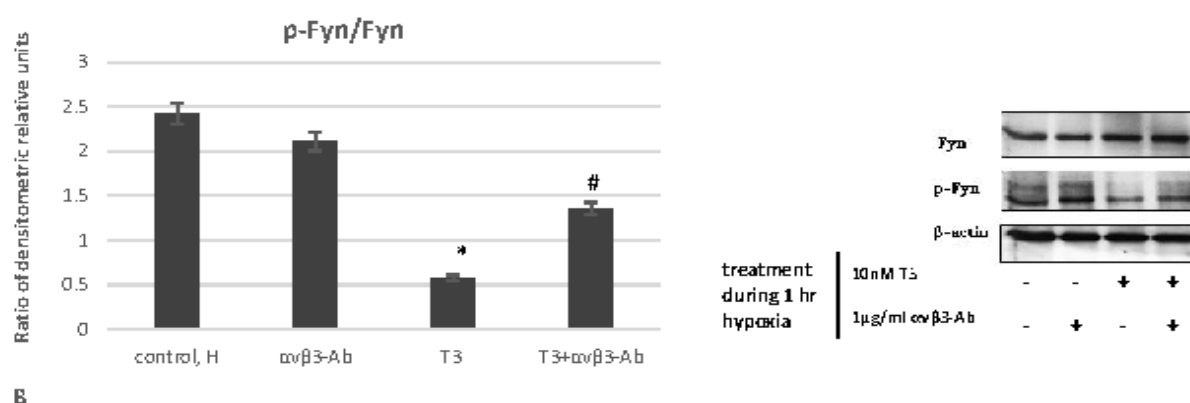
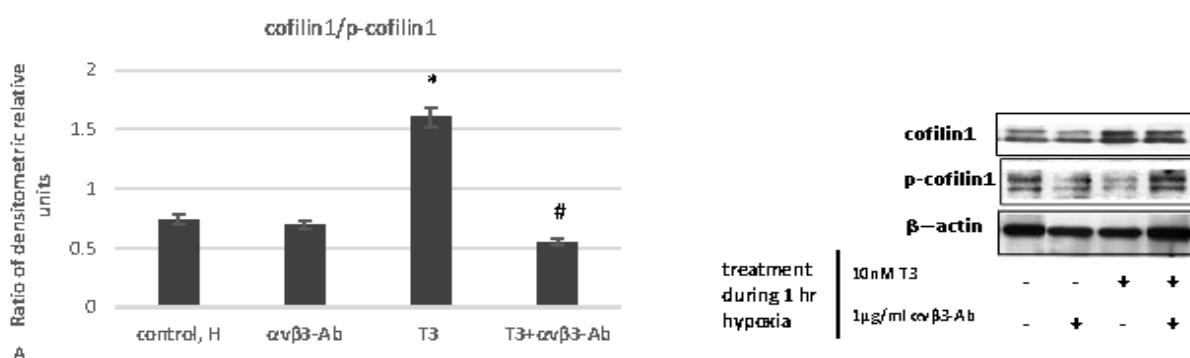
ჩვენ დავადგინეთ, რომ T3-მა გაზარდა PC-12 უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა ($P=0.0050$) ჰიპოქსიის დროს. T3-ის ეს პრო-გადარჩენის ეფექტი მოიხსნა $\alpha\beta$ 3 ანტისხეულის ზემოქმედებით ($P=0.0153$), რაც ხაზს უსვამს უჯრედის ინტეგრინით გაშუალებულ მოქმედებას უჯრედის სიცოცხლისუნარიანობაზე ჰიპოქსიის დროს (სურ.12).

3.1.2 თიროიდული ჰორმონების არაგენომური მოქმედების შესწავლა ნეირონული ციტოჩონჩხის შემადგენლობის ცვლილებაზე და თიროიდული ჰორმონების არაგენომურ მოქმედებაში ჩართული ზოგიერთი სარეგულაციო სისტემების აქტივობის განსაზღვრა

შემდეგ ეტაპზე გავაგრძელებთ კვლევა და შევისწავლეთ: თიროიდული ჰორმონების ინტეგრინით გაშუალებული მოქმედება ნეირონული ციტოჩონჩხის შემადგენლობის ცვლილებაზე, შესაბამისად ციტოჩონჩხის სტაბილურობაზე. შევისწავლეთ ციტოჩონჩხის შემადგენელი ნაწილები: მონომერული -G აქტინი და ფილამენტური პოლიმერი -F აქტინი და განვსაზღვრეთ G/F აქტინის თანაფარდობა. ჩვენმა შედეგებმა აჩვენა რომ T3 ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონით უჯრედების დამუშავებამ გაზარდა G/F აქტინის თანაფარდობა ($P=0.0010$) ჰიპოქსიის დროს. T3 ჰორმონის ზემოქმედება მოიხსნა ინტეგრინულ ინჰიბიტორთან თანაობისას ($P=0.0020$) (სურ. 13).



სურათი 13. *G* აქტინის და *F* აქტინის თანაფარდობა ფეოქრომოციტომას (PC-12) უჯრედებში ჰიპოქსიურ პირობებში T3 და αβ3 ინტეგრინის მაინჰიბირებელ ანტისხეულთან ინკუბაციის შემდეგ აქტინის მიმართ ანტისხეულის ვესტერნ ბლოტინგის შედეგად. იმუნობლოტისთვის 8% SDS-პოლიაკრილამიდის გელზე დატანილი იყო თითოეული ფრაქციის მთლიანი ცილის 50 μg (SDS-PAGE), გადატანილი იყო ნიტროცელულოზის მემბრანაზე და გაანალიზებული ანტი-აქტინის ანტისხეულის გამოყენებით გამოყენებით.



სურათი 14. A. კოფილინი1/p-კოფილინი1 თანაფარდობა ფეოქრომოციტომას (PC-12) უჯრედებში ჰიპოქსიურ პირობებში T3 და αβ3 ინტეგრინის მაინჰიბირებელ ანტისხეულთან ინკუბაციის შემდეგ კოფილინი1 ან p-კოფილინი1 ანტისხეულის მიმართ ვესტერნ ბლოტინგის შედეგად. იმუნობლოტისთვის 8% SDS-პოლიაკრილამიდის გელზე დატანილი იყო

თითოეული ფრაქციის მთლიანი ცილის 50 μg (SDS-PAGE), გადატანილი იყო ნიტროცელულოზის მემბრანაზე და გაანალიზებული ანტი-აქტინის ანტისხეულის გამოყენებით გამოყენებით. **B.** *P-fyn/ Fyn* თანაფარდობა ფეოქრომოციტომას (PC-12) უჯრედებში ჰიპოქსიურ პირობებში TH და $\alpha\beta 3$ ინტეგრინის მაინჰიბირებელ ანტისხეულთან ინკუბაციის შემდეგ *Fyn* ან *p-Fyn* პირველადი ანტისხეულის მიმართ ვესტერნ ბლოტინგის შედეგად. იმუნობლოტისთვის 8% SDS-პოლიაკრილამიდის გელზე დატანილი იყო თითოეული ფრაქციის მთლიანი ცილის 50 μg (SDS-PAGE), გადატანილი იყო ნიტროცელულოზის მემბრანაზე და გაანალიზებული ანტი-აქტინის ანტისხეულის გამოყენებით.

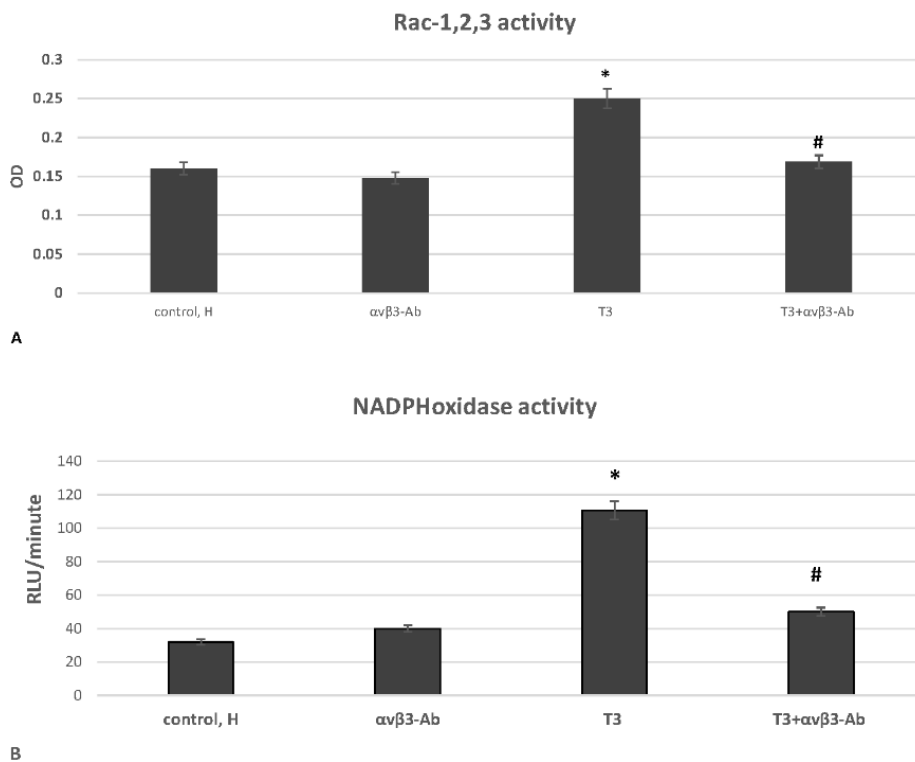
გარდა ამისა, ჩვენ დავადგინეთ, რომ T3 ჰორმონით დამუშავებისას გაიზარდა კოფილინი1/p-კოფილინი1 თანაფარდობა ($P=0.0045$) ჰიპოქსიის დროს, კოფილინი1-ის ფოსფორილირების შემცირებით, ეს ეფექტი მოიხსნა $\alpha\beta 3$ -ინტეგრინის მაინჰიბირებელ ანტისხეულთან თანაობისას ($P=0.0058$) (სურ.14A). ინტეგრინის დაღმავალი სასიგნალო გზების შესაფასებლად შევისწავლეთ კოფილინი1/p-კოფილინი1 თანაფარდობა (სურ. 14A).

ჩვენ შემდგომ გავაანალიზეთ T3 ჰორმონის ეფექტი *Fyn* კინაზას ფოსფორილირებაზე, (*Src*-კინაზების ოჯახი) დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში ჰიპოქსიის დროს. დავადგინეთ, რომ ჰიპოქსიურ უჯრედებში T3 ამცირებს *Fyn* კინაზის ფოსფორილირებას და შესაბამისად მცირდება *p-Fyn/Fyn* თანაფარდობა ($P=0.0010$) (სურ. 14B). ეს თანაფარდობა აღდგება ინტეგრინის მაინჰიბირებელ ანტისხეულთან თანაობისას ($P=0.0138$), რაც მიუთითებს ინტეგრინით გაშუალებულ ეფექტზე (სურ. 14B).

3.1.3 თიროიდული ჰორმონების არაგენომური მოქმედების შესწავლა *Rac1* და *NADPH* ოქსიდაზას აქტივობაზე

ცნობილია, რომ *Rac1* გტფ-აზა უზრუნველყოფს უამრავი პათოლოგიური მოვლენის და სასიგნალო გზების ინიცირებას, რომელიც ერთიანად იწვევს ცერებრალური იშემიის შემდგომ ნეირონულ დაზიანებას და კოგნიტურ დისფუნქციას (Raz et al.,

2010). ჩვენ გავაანალიზეთ Rac1 აქტივობა და დავადგინეთ, რომ ჰიპოქსიურ უჯრედებში T3 ჰორმონის დამატებით გაიზარდა Rac1 აქტივობა ($P=0.0069$) და ეს ეფექტი მოიხსნა ინტეგრინის მაინჰიბირებელი ანტისხეულის გამოყენებით ($P=0.0078$) (სურ.16A). შესაბამისად, ჩვენ განვსაზღვრეთ Rac1-ის ერთერთი სამიზნის NADPH ოქსიდაზას აქტივობა და დავადგინეთ, რომ დიფერენცირებული PC-12 უჯრედების T3-ით 24 საათიანი წინასწარი დამუშავებისას იზრდება NADPH ოქსიდაზის აქტივობა. ორივე ეფექტი იხსნება ინტეგრინის anti- $\alpha\beta3$ ანტისხეულით უჯრედების დამუშავების შედეგად. ეს მონაცემები მიუთითებენ Rac1-ის კორელაციაზე NADPH ოქსიდაზის აქტივობასთან და $\alpha\beta3$ ინტეგრინით გაშუალებულ ეფექტებზე (სურ.15A).



სურათი 15. A Rac1 ექსპრესიის დონის განსაზღვრა დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში T3 და $\alpha\beta3$ ანტისხეულის თანაობისას/ან მათ გარეშე 1 სთ ჰიპოქსიის დროს და 24 სთ წინასწარი დამუშავება T3 და $\alpha\beta3$ ინტეგრინის მაინჰიბირებელი ანტისხეულით. მნიშვნელოვანი რაოდენობა აღნიშნულია * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, და n.s. (not significant) უშრატო საკონტროლო ჰიპოქსიურ ჯგუფთან შედარებით (control, H) და # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ T3 ჯგუფთან შედარებით ANOVA მეთოდის გამოყენებით. მონაცემები მოიცავს სამი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის

$\pm$ SEM. **B.** NADPH ოქსიდაზის აქტივობა დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში T3 და $\alpha\beta3$ ანტისხეულის თანაობისას/ან მათ გარეშე 1 სთ ჰიპოქსიის დროს და 24 სთ წინასწარი დამუშავება T3 და $\alpha\beta3$ ინტეგრინის მაინჰიბირებელი ანტისხეულით. მნიშვნელოვანი რაოდენობა აღნიშნულია * $p<0.05$, ** $p<0.01$, და n.s. (not significant) უშრატო საკონტროლო ჰიპოქსიურ ჯგუფთან შედარებით(control, H) და # $p<0.05$, ## $p<0.01$ T3 ჯგუფთან შედარებით ANOVA მეთოდის გამოყენებით. მონაცემები მოიცავს სამი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის $\pm$ SEM.

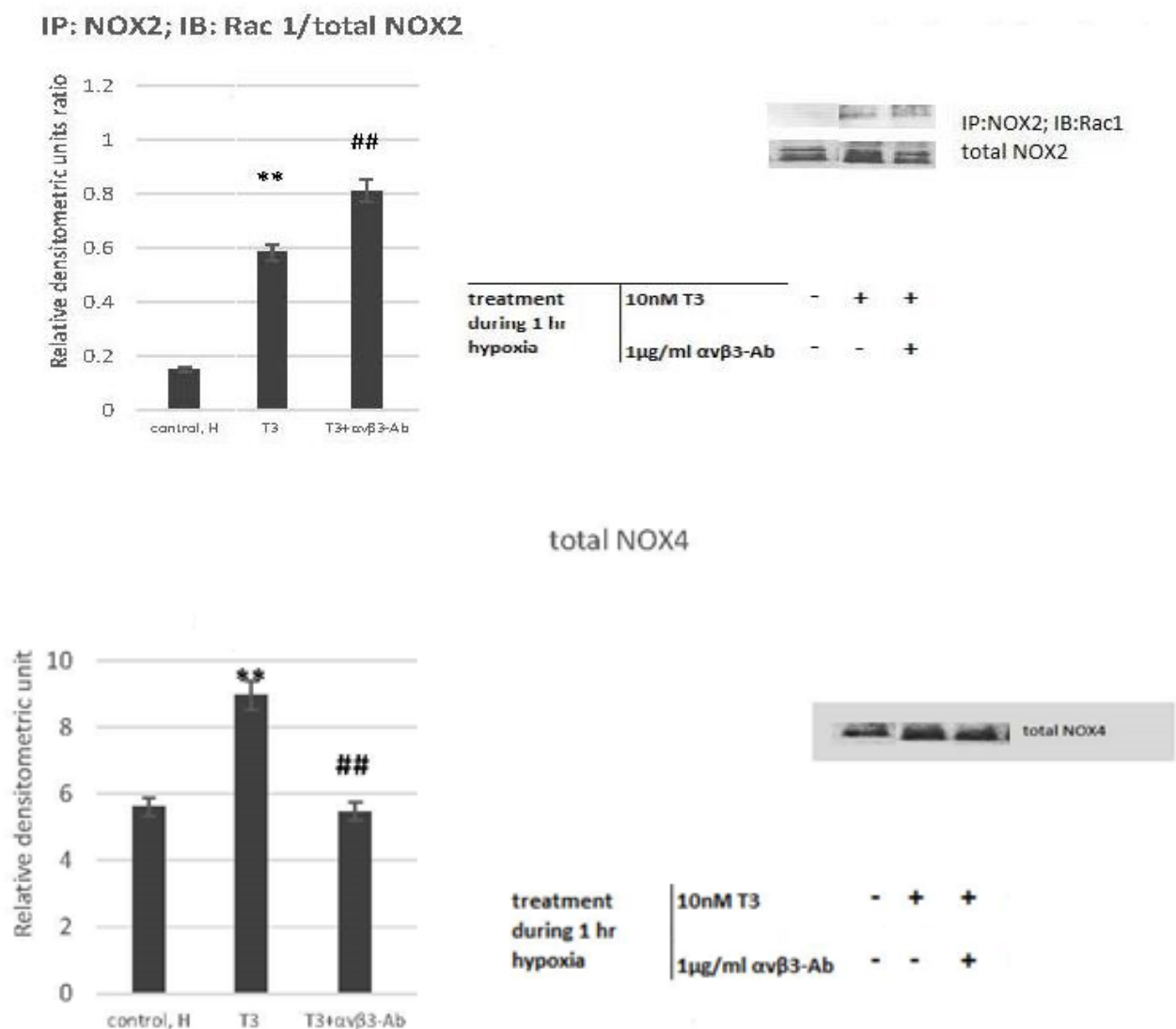
3.1.4 NOX2 და NOX4 გენის ექსპრესიის დადგენა

კვლევის შემდგომ ეტაპზე განვსაზღვრეთ თიროიდული ჰორმონების ინტეგრინით გაშუალებული ეფექტი NADPH ოქსიდაზების ფერმენტების ორი ძირითად იზომერის, NOX2 და NOX4, ექსპრესიის დონეზე (სურ. 16).

ჩვენმა ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ T3 ზრდის Rac1-ის შეკავშირებას NOX2 ფერმენტთან ზუსტად ჰიპოქსიის დროს და ეს ურთიერთქმედება იზრდება $\alpha\beta3$ ინტეგრინის ინჰიბიტორული ანტისხეულის თანაობისას (სურ.16A). რაც ხაზს უსვამს T3-ის უპირატეს როლს ჰიპოქსიაში. იმის გამო, რომ NOX2 გააქტიურებულია NOX4-დან მიღებული ROS-ით, გადავწყვიტეთ განგვესაზღვრა NOX4 ექსპრესიის დონე უჯრედებში. ჩვენ დავადგინეთ, რომ T3 ზრდის NOX4-ის ექსპრესიას და ეს ეფექტი იხსნება $\alpha\beta3$ ინტეგრინის ინჰიბიტორთან თანაობისას. უნდა აღინიშნოს, რომ თავისუფალი NOX2 და Rac1-თან დაკავშირებული NOX2-ის რაოდენობა უკუპროპორციულია უჯრედში (სურ. 16B). ჩვენ ვერ ვიპოვეთ კორელაცია NOX2-სა და NOX4-ის ექსპრესიის დონეებს შორის. როგორც ცნობილია, NOX2 და NOX4 მონაწილეობენ აგონისტების მიერ სტიმულირებულ სიგნალის გადაცემის სხვადასხვა გზაზე, მაგრამ მათი სპეციფიკური როლი ასეთი გზების მოდულაციაში გაურკვეველი რჩება.

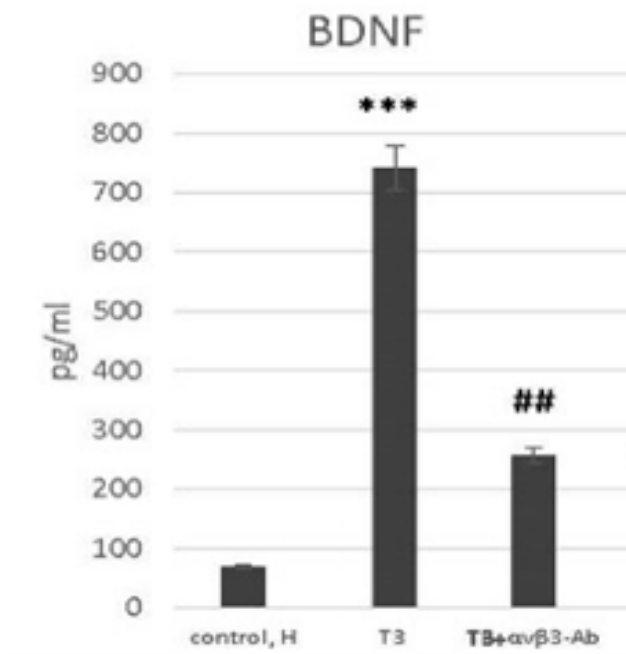
ლიტერატურიდან მიღებული მონაცემები მიუთითებს, რომ ROS-ის დონის მოდულაცია მნიშვნელოვან როლს თამაშობს თავის ტვინში ნეიროტროფიული ფაქტორის (BDNF) ექსპრესიაში. ოქსიდაციურ სტრესს შეუძლია ურთიერთქმედება BDNF სისტემასთან სინაფსური პლასტიურობის და კოგნიტური ფუნქციის

მოდულირებისთვის. BDNF-ის როლი თავის ტვინის განვითარებასა და ფუნქციონირებაში ძალიან კარგად არის დადასტურებული. მისი ფუნქცია დაკავშირებულია თავის ტვინში TH-ის დონესთან. ბოლო წლებში ნაჩვენებია BDNF-ით გაზულებული მოქმედება სტრუქტურულ პლასტიურობასა, და ციტოჩონჩხის მემბრანის დინამიურობის რეგულირებაში. ჩვენ შევისწავლეთ ასევე BDNF-ის დონე უჯრედულ კულტურაში. ჩვენმა შედეგებმა აჩვენა, რომ ჰიპოქსიის დროს უჯრედების T3-ით დამუშავებამ გაზარდა BDNF-ის დონე. T3-ის გავლენა გაუქმდა $\alpha\beta 3$ ინტეგრინის ანტისხეულის დამატებით (სურ. 17).



სურათი 16. NOX2 და NOX4 ექსპრესიის დონე ელექტროფეროზული და ვესტერნ ბლოტის მეთოდის გამოყენებით. **A.** Rac1 ანტისხეულით იმუნოპრეციპიტაციის შედეგად NOX2 ექსპრესიის დონე დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში T3 და $\alpha\beta 3$ ანტისხეულის თანაობისას/ან მათ გარეშე 1 სთ ჰიპოქსიის დროს. **B** თავისუფალი NOX4 ექსპრესიის დონე

დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში T3 და $\alpha\beta 3$ ანტისხეულის თანაობისას/ან მათ გარეშე 1 სთ ჰიპოქსიის დროს. მნიშვნელოვანი რაოდენობა აღნიშნულია * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, და n.s. (not significant) უშრატო საკონტროლო ჰიპოქსიურ ჯგუფთან შედარებით (control, H) და # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ T3 ჯგუფთან შედარებით ANOVA მეთოდის გამოყენებით. მონაცემები მოიცავს სამი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის $\pm$ SEM.

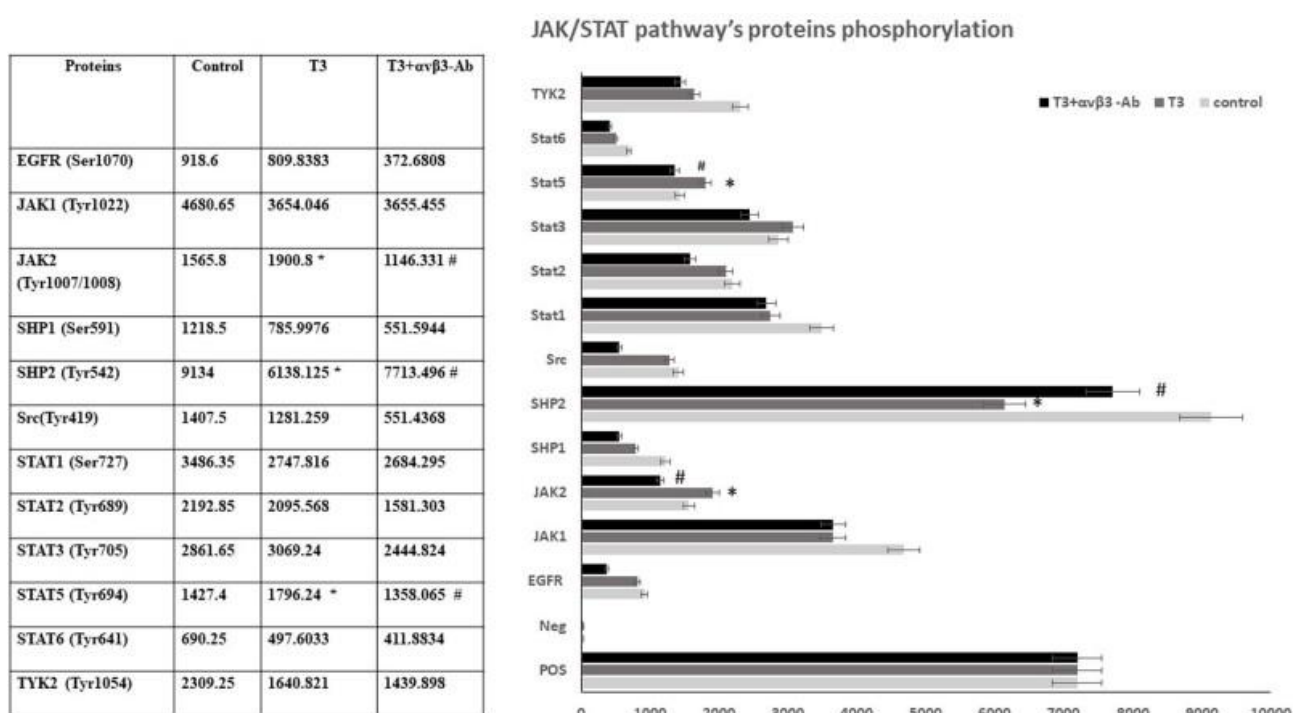


სურათი 17. BDNF-ის გამოთავისუფლება დიფერენცირებული PC-12 უჯრედების უჯრედული კულტურის გარემოში. მნიშვნელოვანი რაოდენობა აღნიშნულია * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, და n.s. (not significant) უშრატო საკონტროლო ჰიპოქსიურ ჯგუფთან შედარებით (control, H) და # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ T3 ჯგუფთან შედარებით ANOVA მეთოდის გამოყენებით. მონაცემები მოიცავს სამი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის $\pm$ SEM.

3.1.5 TH-ის გავლენა $\alpha\beta 3$ ინტეგრინ -დამოკიდებულ ქვედა სასიგნალო სისტემებზე ფეოქრომოციტომას PC-12 უჯრედებში, ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში (JAK/STAT სასიგნალო გზა)

T3-დამოკიდებული ინტეგრინის აქტივაციის ეფექტებში ჩართული მარეგულირებელი სისტემის გასარკვევად, ჩვენ გავაანალიზეთ JAK/STAT სასიგნალო გზის კომპონენტების ფოსფორილების ხარისხი. JAK/STAT სასიგნალო გზის 12

კომპონენტებიდან ყველაზე მნიშვნელოვანი ცვლილებები დაფიქსირდა: JAK1 და JAK2, SHP1 და SHP2, STAT1, STAT3 და STAT5 და არარეგულარულ თიროზინკინაზა – TYK2-ში. ჩვენმა შედეგებმა აჩვენა რომ JAK1, SHP1, SHP2 და STAT1 ფოსფორილაცია შემცირდა. ამის საპირისპიროდ, JAK2-ის ფოსფორილირება, STAT3 და STAT5 გაიზარდა და მხოლოდ ცვლილება JAK2-ში, STAT5 და SHP2 ფოსფორილაცია დაუბრუნდა საკონტროლო დონეებს $\alpha\beta 3$ -ინტეგრინის მაინჰიბირებელი ანტისხეულების არსებობისას (სურ. 18). ფოსფორილაცია სხვა ცილების ფოსფორილაცია არ შეცვლილა ინჰიბიტორის გამოყენებისას რაც მიუთითებს, რომ ამ შემთხვევაში, ფოსფორილირების ცვლილება ინტეგრინისგან დამოუკიდებლად ხდება. ამიტომ, T3-ის მოქმედებით ჰიპოქსიის დროს აქტიურდება მხოლოდ ინტეგრინ დამოკიდებული JAK2/STAT5 სასიგნალო გზა .



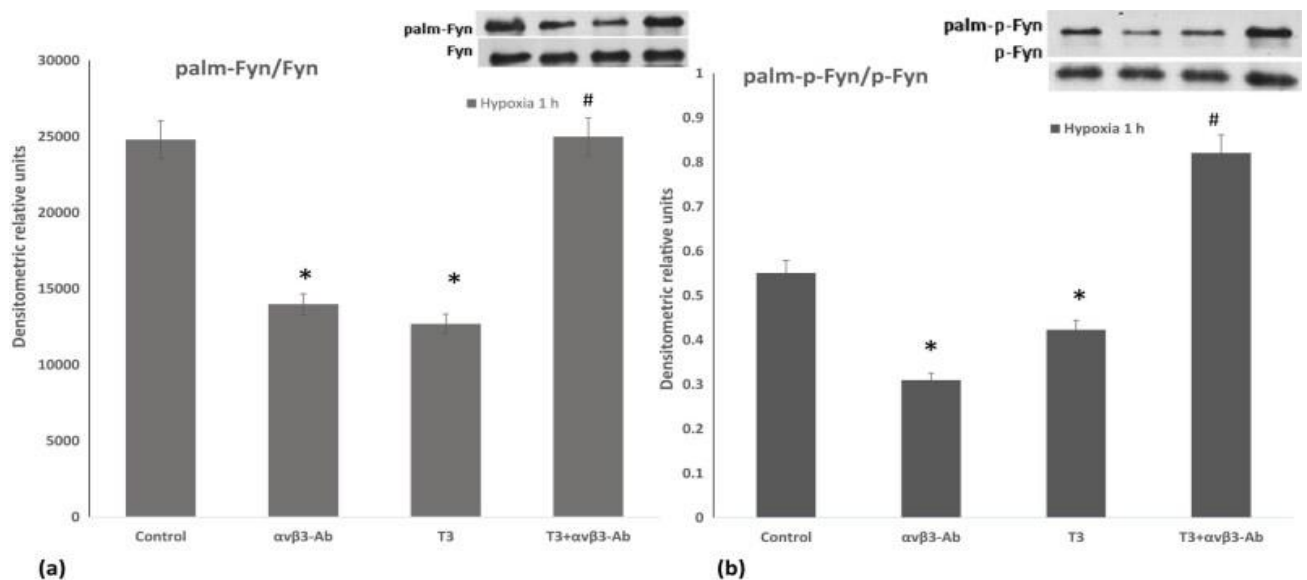
სურათი 18. JAK/STAT გზის ცილების ფოსფორილაცია დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში ჰიპოქსიის დროს, რაც აჩვენებს 10 nM T3 და $\mu\text{g/ml}$ $\alpha\beta 3$ ინტეგრინის მაინჰიბირებელი ანტისხეულის ეფექტს. შედეგები წარმოადგენს ორი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის დუბლიკატი ნიმუშების საშუალო $\pm$ SEM-ს. მნიშვნელოვანი დონე განისაზღვრა როგორც $*p<0.05$. კონტროლის წინააღმდეგ და $\#p<0.05$. T3-მდე.

3.1.6 TH-ის გავლენა $\alpha\beta$ ინტეგრინ -დამოკიდებულ ქვედა სასიგნალო სისტემებზე ფეოქრომოციტომას PC-12 უჯრედებში, ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში (პალმ-Fyn/Fyn თანაფარდობა)

დადგენილია, რომ Fyn აძლიერებს JAK2 შუამავლობით ფოსფორილირებას (Tse et al., 2013) და ორივე Fyn და JAK2 საჭიროა ROS-ზე დამოკიდებული რედოქს-მგრძნობიარე დაღმავალი სასიგნალო გზის აქტივაციისთვის (Abe and Berk, 1999). ამრიგად, Fyn კინაზას აქტივობა მჭიდროდ არის დაკავშირებული JAK2 გზასთან.

იმის გათვალისწინებით რომ Fyn-ის ლოკალიზაცია და აქტივობა ფოსფორილირების გარდა რეგულირდება პალმიტირებით, შემდეგ ჩვენ გამოიკვლიეთ T3-ის $\alpha\beta$ ინტეგრინის შუამავლობით გამოწვეული ეფექტები Fyn-ის პალმიტირებასა და პალმიტირებული Fyn-ის ფოსფორილირებაზე (Thr12-ნაშთზე) 1-სთ ჰიპოქსიის დროს.

ჩვენმა ექსპერიმენტებმა გამოავლინა, რომ T3 ამცირებს Fyn-ის პალმიტირებას და ეს ეფექტი იხსნება $\alpha\beta$ ინტეგრინის ანტისხეულის გამოყენებისას (სურ. 19). გარდა ამისა, T3-ის მოქმედებით მცირდება პალმიტილირებული Fyn-ის ფოსფორილაცია და მისი ინჰიბირება $\alpha\beta$ -ინტეგრინის ანტისხეულების მიერ მნიშვნელოვნად ზრდის პალმიტილირებული ფინის ფოსფორილირებას. აღსანიშნავია, $\alpha\beta$ ინტეგრინის დათრგუნვა T3 გარეშე, ამცირებს პალმიტილირებული Fyn-ის ფოსფორილირებას. ეს დასკვნები მიუთითებს, რომ T3 ააქტიურებს Fyn-ის ფოსფორილირებას, რაც კორელაციაშია Fyn კინაზის პალმიტირებასთან.



სურათი 19. პალმ-Fyn/Fyn თანაფარდობა დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში 10 nM T3 და $\mu\text{g/ml}$ $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -ინტეგრინის მაინჰიბირებელი ანტისხეულის მოქმედებისას 1 საათიანი ჰიპოქსიის დროს. A. პალმიტირებული Fyn და Fyn-ის მთლიანი რაოდენობის იმუნობლოტინგის სურათი; B. პალმიტირებული პალმ-p-Fyn/p-Fyn მთლიანი რაოდენობის თანაფარდობის დიაგრამა. შედეგები წარმოადგენს ორი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის დუბლირებული ნიმუშის საშუალოს $\pm$ SEM. მნიშვნელოვანი დონე განისაზღვრა * $p < 0.05$. კონტროლის მიმართებაში და # $p < 0.05$. T3 მიმართ.

PC-12 უჯრედებში პალმიტირებული Fyn კინაზას ფოსფორილირებული და არაფოსფორილირებული ფორმების თანაფარდობის გაანალიზებისას გამოვლინდა T3-ის და $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ ინტეგრინით გაშუალებული მნიშვნელოვანი ეფექტი. ჰიპოქსიურ უჯრედებში თიროიდული ჰორმონის დამატება ზრდის პალმიტირებული Fyn კინაზის ფოსფორილირებული/არაფოსფორილირებული ფორმების თანაფარდობას ნორმალურ პირობებთან შედარებით და $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ ინტეგრინის ინჰიბირება კიდევ უფრო ზრდის ამ თანაფარდობას. მაგრამ T3-ის გარეშე $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ ინტეგრინის დათრგუნვა არ ცვლის ჰიპოქსიურ უჯრედთან შედარებით აღნიშნულ თანაფარდობას (სურ. 19).

ამ შედეგების საფუძველზე შეიძლება ვივარაუდოდ, რომ ჰიპოქსიის დროს დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში ადგილი აქვს T3-ით განპირობებულ $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ ინტეგრინით გაშუალებული გზის FAK/STAT3 - ის და სხვა nRTK დამოკიდებული

გზების გააქტივებას, რაც იწვევს კომპლექსური უჯრედული პროცესების ჩართვას, რომლებიც იწვევენ ერთმანეთის მოდულაციას.

3.1.7 პალმიტირებაში ჩართული გენების ექსპრესია mRNA რაოდენობრივი ანალიზის გზით

პალმიტოილტრანსფერაზები, როგორც წესი, განლაგებულია უჯრედშიდა სტრუქტურებში. ამ ფერმენტების დონე უჯრედებში დამოკიდებულია ამ ფერმენტების მაკოდირებელი გენების აქტივობაზე. ამრიგად, შემდეგ ჩვენ განვსაზღვრეთ იმ გენების ექსპრესია რომელიც ჩართულია პალმიტოილაციაში mRNA რაოდენობრივი ანალიზის გზით. კონკრეტულად, ჩვენ შევისწავლეთ პალმიტოილტრანსფერაზას გენების 2, 3, 8, 9 და 16 ექსპრესია მათი კრიტიკული მნიშვნელობის გამო ნერვულ სისტემაში ZDHC2, 3, 8, 9 და 16 გენების ექსპრესიის დონეები 1-სთ ჰიპოქსიის დროს მოცემულია ცხრილში (ცხრილი 2). ჩვენ დავადგინეთ, რომ T3 არ ცვლის ექსპრესიას ZDHC3 და ZDHC8 გენების ჰიპოქსიის დროს თუმცა, როდესაც αvβ3 ინტეგრინის ინჰიბიტორს ვიყენებთ ფიქსირდება ექსპრესიის მნიშვნელოვანი ზრდა. შემდგომში ჩვენ განვიხილეთ ZDHC2-ის ექსპრესია რადგან არსებობს გარკვეული მტკიცებულება იმისა, რომ ZDHC2-ის აქტივობა დაკავშირებულია ციტოქონჩხთან ასოცირებული პროტეინ-4 (CKAP4) პალმიტირებასთან რითაც თრგუნავს უჯრედების პროლიფერაციულ აქტივობას სიმსივნურ გენებში. T3 მნიშვნელოვნად ამცირებს ZDHC2-ის ექსპრესიას, რომელიც გაშუალებულია αvβ3 ინტეგრინებით (სურ. 20).

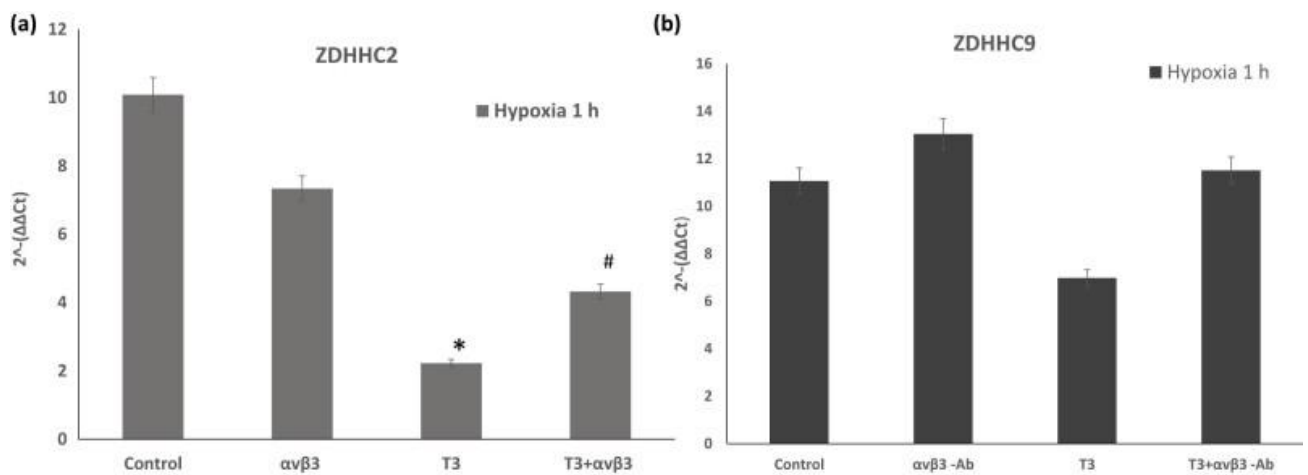
	ZDHHC2 ($2^{-(\Delta\Delta Ct)}$)	ZDHHC3 ($2^{-(\Delta\Delta Ct)}$)	ZDHHC8 ($2^{-(\Delta\Delta Ct)}$)	ZDHHC9 ($2^{-(\Delta\Delta Ct)}$)	ZDHHC16 ($2^{-(\Delta\Delta Ct)}$)
კონტროლი	3.73	4.90	1.00	11.06	3.55
$\alpha\beta 3$ -Ab	4.13	7.26	5.01	13.04	1.10
T3	1.92	5.02	0.75	6.97	4.82
T3+ $\alpha\beta 3$ -Ab	2.91	4.63	1.32	11.51	6.39

ცხრილი 2. ZDHHC2, ZDHHC3, ZDHHC8, ZDHHC9 და ZDHHC16 გენების RT-qPCR ანალიზი, რომელიც აჩვენებს 10 nM T3 და $\alpha\beta 3$ -ინტეგრინის მაინჰიბირებელი ანტისხეულის ეფექტს (მკგ/მ) დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში, 1 სთ ჰიპოქსიის დროს. შედეგები გამოიხატება როგორც $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ Hprt1 (ჰიპოქსანთინფოსფორიბოზილ ტრანსფერაზა) რეფერენს გენთან ნორმალიზების შემდეგ. შედეგები წარმოადგენს სამი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის დაშლირებული ნიმუშის საშუალოს $\pm$ SEM.

ჩვენი შედეგებიდან გამომდინარე, შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ T3 არ მოქმედებს ZDHHC3 და ZDHHC8 ექსპრესიაზე ჰიპოქსიურ პირობებში თუმცა ამცირებს ZDHHC2 გენის ექსპრესიას და ეს ეფექტი ნაწილობრივ წყდება $\alpha\beta 3$ ინტეგრინის იმჰიბირებით. ეს მონაცემები მიუთითებს, რომ T3, ჰიპოქსიის დროს, გავლენას არ ახდენს ZDHHC3 და ZDHHC8 ექსპრესიაზე; თუმცა, ის მნიშვნელოვნად ამცირებს ZDHHC2 გენის ექსპრესიას. რადგან ZDHHC9 პალმიტოილტრანსფერაზას მუტაციას იწვევს სხვადასხვა შემეცნებითი ფუნქციების დაქვეითებას და ეპილეფსიის განვითარებას (Baker et al., 2015). ZDHHC16 პალმიტოილტრანსფერაზა კი მნიშვნელოვან როლს ასრულებს დნმ-ის დაზიანებაზე ადრეული პასუხის ჩართვაში (Cao et al., 2016). ჩვენ გავანალიზეთ ამ ორი გენის ექსპრესია და დავადგინეთ, რომ T3 მნიშვნელოვნად ამცირებს ZDHHC9 ექსპრესიას ჰიპოქსიურ უჯრედებში და ეს ეფექტი იხსნება $\alpha\beta 3$ ინტეგრინის მაბლოკირებელი ანტისხეულის თანაობისას, რაც მიუთითებს $\alpha\beta 3$ ინტეგრინით გაშუალებულ T3-ის ეფექტზე ჰიპოქსიის დროს დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში (სურ. 20; ცხრილი 2).

შემდეგ ეტაპზე განისაზღვრა ZDHHC16-ის პალმიტოილტრანსფერაზის ექსპრესიის დონე. არსებობს გარკვეული მტკიცებულება, რომ ის მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ნერვული სისტემის ემბრიოგენეზში. გარდა ამისა, ZDHHC16-ის მნიშვნელობა დადგენილია დნმ-ის დაზიანებაზე ადრეული პასუხის ჩართვაში. ჩვენ აღმოვაჩინეთ, რომ T3 არასპეციფიკურად ზრდის ZDHHC16-ის ექსპრესიას, მაგრამ ეს ეფექტი გაძლიერებულია $\alpha\beta 3$ ინტეგრინის ინჰიბიტორ ანტისხეულთან თანაობისას, ე.ი არ არის გაშუალებული ინტეგრინული ურთიერთქმედებით, ZDHHC9-ისგან განსხვავებით (ცხრილი 2).

მიღებულ მონაცემებზე დაყრდნობით, შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ ZDHHC9 გენის ექსპრესია რეგულირდება T3 ჰორმონის მიერ $\alpha\beta 3$ ინტეგრინით გაშუალებული გზით. ZDHHC16 გენის ექსპრესია აგრეთვე იცვლება, თუმცა ZDHHC9-გან განსხვავებით ეს მოქმედება არ არის ინტეგრინ სპეციფიური და სხვა T3 დაკავშირებული მექანიზმები არიან ჩართული ამ გენის ექსპრესიაში (სურ. 20; ცხრილი 2)



სურათი 20. ZDHHC2 (A) და ZDHHC9 (B) პალმიტოილტრანსფერაზის გენის ექსპრესიის დონე, რომელიც აჩვენებს 10 nM T3 და $\alpha\beta 3$ -ინტეგრინის მაინჰიბიტორული ანტისხეულის ეფექტს (მკგ/მ) დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში, 1 სთ ჰიპოქსიის დროს. განისაზღვრა RT-PCR მეთოდით. შედეგები გამოიხატება როგორც $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ *Hprt1* (ჰიპოქსანთინფოსფორიბოზილ ტრანსფერაზა) რეფერენს გენთან ნორმალიზების შემდეგ. შედეგები წარმოადგენს სამი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის დუბლირებული ნიმუშის საშუალოს $\pm$ SEM.

3.2. შედეგების განხილვა

თიროიდული ჰორმონები T3 და T4 არიან მნიშვნელოვანი აგენტები თავის ტვინის ნორმალური განვითარების დროს, რაც ხელს უწყობს თავის ტვინის დაზიანების შემდეგ სწრაფ რეგენერაციას. ეს ჰორმონები მოქმედებენ ძირითადად ბირთვული რეცეპტორების მეშვეობით. ამასთანავე, დადგენილია თავის ტვინში მათი არაგენომური მოქმედება (Liu et al., 2018).

ჩვენი კვლევებით დავადგინეთ, რომ T3-თან უჯრედების ინკუბაციამ ერთ საათიანი ჰიპოქსიის პირობებში გაზარდა უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა, და ეს ეფექტი მოიხსნა $\alpha\beta 3$ ინტეგრინული რეცეპტორის ინჰიბიტორის გამოყენებისას. ეს მონაცემები ამტკიცებს, რომ სიცოცხლისუნარიანობის გაზრდა დამოკიდებულია უჯრედგარე არეში T3-ის არსებობაზე და გაშუალებულია $\alpha\beta 3$ მოქმედებით.

ჰიპოქსია იწვევს F-აქტინის აკუმულირებას, აქტინ-შემაკავშირებელი და დამშლელი ცილის ინაქტივაციის გამო (კოფილინი) LIM კინაზა გაშუალებული ფოსფორილირებით (Ziesenis, 2014). ამიტომ, G/F აქტინის თანაფარდობის შენარჩუნება გადამწყვეტია ნეირონში აქტინის ფიბრილების დინამიურობის რეგულირებისთვის და უჯრედის სიცოცხლისუნარიანობისთვის. ნეირონებში კოფილინი-1-მა შეიძლება მნიშვნელოვანი წვლილი შეიტანოს დეგენერაციული პროცესების კოფილინი-აქტინის ღეროების წარმოქმნით (Bamburg et al., 2016; Hoffmann et al., 2019). ამ დაკვირვებებზე დაყრდნობით ჩვენ შევისწავლეთ აქტინის ციტოჩონჩხის შემადგენელი კომპონენტები: აქტინის მონომერი-G აქტინი და პოლიმერი-F აქტინი და განისაზღვრა G/F აქტინის თანაფარდობა, როგორც ციტოჩონჩხის დინამიურობის მარკერი (Menon et al., 2016). მიღებული შედეგების მიხედვით, გაზრდილი G/F აქტინის თანაფარდობა ძირითადად რეგულირდება $\alpha\beta 3$ ინტეგრინული რეცეპტორის მეშვეობით (სურ. 13) და ეს ეფექტი კორელაციაშია p-კოფილინი-1-ის დონის შემცირებასთან (სურ. 14A). ამრიგად, აქტინის დინამიურობის ცვლილებები, როგორც ჩანს, კოფილინი-1-ის დეფოსფორილირების შედეგია. ჰიპოქსია იწვევს აქტინის რეორგანიზაციას სხვადასხვა უჯრედებსა და ქსოვილებში. სავარაუდოდ Rho GTPase-ს მეშვეობით. Rho ოჯახის GTPase-ები თამაშობენ

მნიშვნელოვან როლს უჯრედების მორფოლოგიის კონტროლში. არსებობს რამდენიმე კვლევა Fyn კინაზის როლზე, (Src კინაზების ოჯახის წევრი) Rho-ს ინაქტივაციაში და Rac-ის გააქტიურებაში, რაც იწვევს მორფოლოგიურ ცვლილებებს (Arthur et al., 2002; Liang et al., 2004).

მეორეს მხრივ, Fyn-ის აქტივაციას აქვს არასასურველი ეფექტი ნეირონებზე, რაც მათ უფრო მეტად დაუცველს ხდის სინაპტოტოქსიურობის მიმართ. საპირისპირო ეფექტი მიიღწევა Fyn-ის აქტივაციის შემცირებით თუმცა გადაჭარბებულმა ინჰიბირებამ შეიძლება გამოიწვიოს ცუდი გრძელვადიანი ეფექტები ადამიანებში კოგნიტურ ფუნქციებზე. ამრიგად, თერაპიული მიზანი შეინარჩუნდეს ბალანსი Fyn-ის გააქტიურება და დათრგუნვას შორის, სავარაუდოდ, ოპტიმიზდება ნერვული ქსელების ფუნქციონირებით (Nygaard et al., 2014; Matrone et al., 2020).

გადაჭარბებული გააქტიურება Src ოჯახის თიროზინკინაზების, მათ შორის Fyn-ის, ჩართულია იშემიით გამოწვეულ ცერებრალურ პათოგენეზში და შეუძლია აპოპტოზის დაწყება (Du et al., 2012). მონაცემებზე დაყრდნობით, ჩვენ გავაანალიზეთ თიროიდული ჰორმონების მოქმედება Fyn-ის ფოსფორილირებაზე დიფერენცირებულ PC-12-უჯრედებში ჰიპოქსიის დროს ჩვენ აღმოვაჩინეთ, რომ T3-ის ჰორმონთან თანობისას შემცირდა და შენარჩუნდა ზომიერი p-Fyn/Fyn-ის თანაფარდობა (სურ. 14B), შესაბამისად, T3 ჰორმონი არეგულირებს აქტინის ციტოჩონჩხის დინამიკას $\alpha\beta3$ ინტეგრინით გაშუალებული Fyn-ის დეფოსფორილირებით. ამრიგად, ჩვენი შედეგები თანხვედრაშია მონაცემებთან, რომ Fyn კინაზის ფოსფორილირების დათრგუნვა რთავს ანტი-აპოპტოზურ სიგნალს, განსაკუთრებით დოფამინერგულ უჯრედებში. Fyn-ის აქტივაცია შეიძლება აღმოჩნდეს თერაპიული სამიზნე დოფამინერგული დეგენერაციის დროს სხვადასხვა ნევროლოგიური დარღვევების დროს, მათ შორის პარკინსონის დაავადების დროს (Saminathan et al., 2021).

რამდენიმე კვლევამ აჩვენა, რომ Rac-ის აქტივაცია ხელს უწყობს ლამელიპოდისა და ფილოპოდის წარმოქმნას. ამავდროულად, Rho აქტივობა ხელს უშლის ნეირიტის განვითარების ინიციაციას (Govek et al., 2005). ნანახია, რომ Rac-ით გაშუალებული ROS წარმოება ამცირებს Rho-ს აქტივობას (Nimnual et al., 2003). არსებობს მტკიცებულება, რომ Rac1 GTPase-ს ასევე შეუძლია ხელი შეუწყოს მრავალ

პათოლოგიურ მოვლენას და სასიგნალო გზებს, რომლებიც ერთობლივად უწყობს ხელს ნეირონის დაზიანებას და კოგნიტური დისფუნქციებს იშემიის შემდეგ. Rac1 მონაწილეობს ROS ფორმირებაში NADPH ოქსიდაზას გააქტიურების გზით სხვადასხვა უჯრედულ ტიპებში. ჩვენი დასკვნებით, T3 ჰორმონმა გამოიწვია ზომიერი NADPH ოქსიდაზას გააქტიურება Rac1-დან NADPH ოქსიდაზა 2 (NOX2) თან დაკავშირების გზით დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში ჰიპოქსიის დროს. ეს ეფექტი მოიხსნა ინტეგრინული რეცეპტორის ინჰიბიტორთან თანაობისას (Kvergelidze et al., 2022) (სურ. 15A და B).

T3-ის არაგენომური მოქმედება არეგულირებს ნეირონული აქტინის ციტოჩონჩხის დინამიკას $\alpha\text{v}\beta 3$ ინტეგრინის მეშვეობით, რაც ზრდის ნეირონების უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას ჰიპოქსიის დროს Rac1/NADPH ოქსიდაზა/კოფილინ1 დაღმავალი გზის მეშვეობით (Barbakadze et al., 2023). ყველასთვის ცნობილი NADPH ოქსიდაზები (NOXs) არიან ტრანსმემბრანული ცილები, რომლებიც აკატალიზებენ რეაქტიულ ჟანგბადის სახეობებს (ROS). NOX ფერმენტები მონაწილეობენ ცენტრალური ნერვული სისტემის განვითარებაში, ნერვული ღეროვანი უჯრედების ბიოლოგიაში და მომწიფებული ნეირონების ფუნქციონირებაში. ძუძუმწოვრების უმეტესობაში არის შვიდი NOX იზოფორმა, მაგრამ მხოლოდ NOX2 და NOX4 იყო დემონსტრირებული, როგორც ძირითადი წარმომადგენლები, რომლებიც მონაწილეობენ თავის ტვინის ქსოვილში ROS წარმოქმნაში (Lou et al., 2018). ფიზიოლოგიურ პირობებში, NOX ფერმენტები, სავარაუდოდ, წარმოქმნიან ROS-ის მხოლოდ მცირე რაოდენობას ცნს-ში. ასეთი მცირე რაოდენობა ROS -ის ყველაზე სავარაუდო ფუნქციაა უჯრედული სასიგნალო მოქმედება (Chen et al., 2011). ხაზგასმით უნდა აღინიშნოს, რომ უჯრედის ბედის გადაწყვეტილება ROS-ზე ზემოქმედების საპასუხოდ განისაზღვრება ცნს-ის უჯრედების მგრძნობელობით ROS-ის მიმართ, რაც საკვანძო ფაქტორია უჯრედული სიგნალიზის და უჯრედის სიკვდილის გადაწყვეტილების მისაღებად (Nayernia et al., 2014). ლიტერატურაში არსებული მონაცემები მიუთითებს, რომ ROS-ის რაოდენობის მოდულაცია მნიშვნელოვან როლს თამაშობს თავის ტვინში ნეიროტროფიული ფაქტორის (BDNF) ექსპრესიაში. ოქსიდაციურ სტრესს შეუძლია ურთიერთქმედება BDNF სისტემასთან სინაფსური პლასტიურობის და კოგნიტური ფუნქციის მოდულირებისთვის. BDNF-

ის როლი თავის ტვინის განვითარებასა და ფუნქციაში ძალიან კარგად არის დადასტურებული (Binder et al., 2004) და მისი ფუნქცია დაკავშირებულია თავის ტვინში TH-ის დონესთან (Gilbert et al., 2013). შესაბამისად შევისწავლეთ ასევე BDNF-ის დონე უჯრედულ კულტურაში T3 და ინტეგრინის ინჰიბიტორის მოქმედებისას ჰიპოქსიურ პირობებში. ჩვენმა შედეგებმა აჩვენა, რომ ჰიპოქსიის დროს უჯრედების T3-ით დამუშავებამ გაზარდა BDNF დონე. T3-ის გავლენა გაუქმდა $\alpha\beta 3$ ინტეგრინის ანტისხეულის დამატებით (სურ. 17).

ამ დაკვირვებებზე დაყრდნობით, ჩვენ ჩამოვაცალიბეთ ჰიპოთეზა, რომ $\alpha\beta 3$ -ინტეგრინის შუამავლობით T3-ის მიერ BDNF-ის დონის მომატება არის NADPH ოქსიდაზას სპეციფიკური აქტივაციის შედეგი ჰიპოქსიურ პირობებში. ამრიგად, სპეციფიკური NADPH ოქსიდაზას ჩართულობის იდენტიფიცირებას $\alpha\beta 3$ ინტეგრინით გაშუალებულ T3 ეფექტებში BDNF-ის წარმოებაზე ჰიპოქსიის დროს დიდი მნიშვნელობა აქვს იშემიით გამოწვეული პათოლოგიური მდგომარეობის შემდგომი თერაპიული მიზნებისთვის.

ჩვენ შევისწავლეთ T3-ის ეფექტები Rac1-ის NOX2-თან დაკავშირების დონეზე და NOX4-ის მთლიანი ექსპრესიის დონეზე დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში ჰიპოქსიის დროს. ჩვენმა ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ TH ზრდის Rac1 შეკავშირებას NOX2 ფერმენტთან ზუსტად ჰიპოქსიის დროს და ეს ურთიერთქმედება იზრდება $\alpha\beta 3$ ინტეგრინის ინჰიბიტორული ანტისხეულის თანაობისას (სურ. 16).

ჩვენს მიერ დადგინდა, რომ T3 არეგულირებს ნეირონული აქტინის ციტოჩონჩხის დინამიურობას $\alpha\beta 3$ ინტეგრინის მეშვეობით, რაც ზრდის ნეირონების უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას ჰიპოქსიის დროს Rac1/NADPH ოქსიდაზას გააქტიურების გზით. ამრიგად, შესაძლებელია, რომ NOX2 მონაწილეობს როგორც სასიგნალო მოლეკულა ჰიპოქსიის დროს. ცნობილია, რომ NOX2 კომპლექსის ციტოზოლური სუბერთეული p40 (phox) ნაწილობრივ ასოცირდება F-აქტინთან ნეირონების ზრდის კონუსებში, ხოლო ამ კომპლექსის მიერ წარმოებული ROS არეგულირებს F-აქტინის დინამიკას და ნეირიტების ზრდას (Munnamalai et al., 2014).

იმის გამო, რომ NOX2 გააქტიურებულია NOX4-დან მიღებული ROS-ით, შემდეგში გადავწყვიტეთ შეგვესწავლა NOX4 ექსპრესიის დონე უჯრედებში. ჩვენ დავადგინეთ,

რომ T3 ზრდის NOX4-ის ექსპრესიას და ეს ეფექტი იხსნება $\alpha\beta3$ ინტეგრინის ინჰიბიტორთან თანაობისას (სურ. 16). ჩვენ ვერ ვიპოვეთ კორელაცია NOX2 და NOX4 ექსპრესიის დონეებს შორის. როგორც ცნობილია, NOX2 და NOX4 მონაწილეობენ აგონისტების მიერ სტიმულირებულ სიგნალის გადაცემის სხვადასხვა გზაზე, მაგრამ მათი სპეციფიკური როლი ასეთი გზების მოდულაციაში გაურკვეველი რჩება (Anilkumar et al., 2008).

ჩვენ შევისწავლეთ ასევე BDNF-ის დონე უჯრედულ კულტურაში. ჩვენმა შედეგებმა აჩვენა, რომ ჰიპოქსიის დროს უჯრედების T3-ით დამუშავებამ გაზარდა BDNF დონე. T3-ის გავლენა გაუქმდა $\alpha\beta3$ ინტეგრინის ანტისხეულის დამატებით (სურ. 17). NOX-ის მიერ წარმოქმნილი ROS მიჩნეულია, როგორც აქტინის ციტოჩონჩხის და ციტოჩონჩხთან დაკავშირებული უჯრედების ფუნქციების მნიშვნელოვანი რეგულატორები. NOX-დან მიღებული ROS-ის ზემოქმედება ციტოჩონჩხის რემოდელირებაზე შეიძლება დიდწილად მიეკუთვნებოდეს ROS-ის უნარს, უშუალოდ შეცვალოს ცილები, რომლებიც ქმნიან ან ასოცირდება ციტოჩონჩხთან. გარდა ამისა, NOX-გან მიღებული ROS შეიძლება მონაწილეობდეს ციტოჩონჩხის რემოდელირების მარეგულირებელ სასიგნალო გზებში (Valdivia et al., 2015).

ბოლო წლებში ნაჩვენებია BDNF-ით გაშუალებული მოქმედება სტრუქტურულ პლასტიურობასა, და ციტოჩონჩხის მემბრანის დინამიურობის რეგულირებაში (Gonzalez et al., 2016). BDNF-ის ცილის შემცველობა რეგულირდება ოქსიდაციური სტრესით. ROS-ის დაბალმა დონემ შესაძლოა გამოიწვიოს გენის არასაკმარისი ექსპრესია რედოქს ჰომეოსტაზისთვის და, შესაბამისად, დაქვეითებული პასუხი ოქსიდაციურ გამოწვევაზე. მეორეს მხრივ, ROS-ის მაღალი დონე აღემატება უჯრედების ადაპტირებულ ტოლერანტობას, რაც იწვევს მნიშვნელოვან ჟანგით დაზიანებას, აპოპტოზს და ნეკროზს. ასე რომ, ROS-ის ზომიერი დონე გადამწყვეტია ROS სასიგნალო გზასა და უჯრედების გადარჩენაში. ჩვენი დასკვნებით, T3 არეგულირებს NOX2-ის ზომიერ აქტივაციას $\alpha\beta3$ ინტეგრინის შუამავლობით Rac1-ის NOX2-თან შეკავშირების გზით, რაც ასტიმულირებს BDNF-ის წარმოებას და ხელს უწყობს მის ნეიროპროტექტორული სასიგნალო გზის ჩართვას ჰიპოქსიის დროს.

დაგროვილი მონაცემები ცხადყოფს რომ TH თამაშობს კრიტიკულ როლს იშემია/ჰიპოქსიურ პროცესების დროს სხვადასხვა ქსოვილების საპასუხო

მექანიზმების ჩართვაში. TH-ის სასიგნალო გზა ჩართულია ROS-დამოკიდებულ დაზიანება ინფარქტის შემდეგ ჰიპოქსიურ ქსოვილში, და ინფარქტის შემდგომი პრევენციასა და რემოდელირებაში (Lourbopoulos et al., 2021; Forini et al., 2014). TH-ების ეს ეფექტები შეიძლება გამოწვეული იყოს გენომური და არაგენომური მოქმედებით. კლასიკურ T3-ის გენომურ მოქმედებას განაპირობებს მაღალი აფინურობის ბირთვული რეცეპტორები, რომლებიც უშუალოდ არეგულირებენ გენის ექსპრესიას. ამის საპირისპიროდ, TH-ის არაგენომური ზემოქმედება ხდება სწრაფად და ტრანსკრიფციისა და ცილის სინთეზის ინჰიბიტორები გავლენას არ ახდენენ. TH-ის არაბირთვული მოქმედებები მოიცავენ მრავალჯერად ფიზიოლოგიურ პროცესებს სხვადასხვა ტიპის უჯრედებში და ითვლება, რომ შუამავლობენ სხვადასხვა უჯრედშიდა მარეგულირებელი სისტემები. არაგენომური მოქმედების ადგილები ლოკალიზებულია პლაზმური მემბრანაში ციტოპლაზმაში, ციტოქონჩხსა და უჯრედქვეშა ორგანოებში. ბოლოდროინდელმა მიღწევებმა გამოავლინა პლაზმური მემბრანის რეცეპტორის, $\alpha\beta 3$ ინტეგრინი, როგორც მაღალი აფინურობის რეცეპტორი T3-სთვის (Davis et al., 2021). ეს კვლევა ახალ მიმართულებას მატებს TH-ის ეფექტებს, რადგან ისინი ხელს უწყობენ ახალი მექანიზმების აღმოჩენას უჯრედების ზრდასა და პროლიფერაციას.

$\alpha\beta 3$ ინტეგრინი არის ჰეტეროდიმერი, რომელიც გვხვდება უჯრედების ზედაპირებზე, რომლებსაც არსებითი როლი აქვთ უჯრედის სტრუქტურის შენარჩუნებაში და სიგნალის გადაცემაში. რამდენიმე მცირე მოლეკულას, მაგ რესვერატროლი, არაპეპტიდური ჰორმონები, როგორიცაა სტეროიდული ჰორმონები (Chin et al., 2018) და TH-ებს (Lin et al., 2011) აქვთ სპეციფიკური შეკავშირების ადგილები ინტეგრინ $\alpha\beta 3$ -ზე. ეს ლიგანდები იწვევენ სიგნალის გადაცემას და თანმიმდევრულად ასტიმულირებენ უჯრედების ბიოლოგიურ აქტივობას. ფოკალური ადჰეზიური კინაზა (Fak), არარეცეპტორული თიროზინკინაზა, აკონტროლებს $\alpha\beta 3$ ინტეგრინის აქტივობას და ხელს უწყობს უჯრედების მიგრაციას და შემოსვლას (Sulzmaier et al., 2014).

პროლიფერაციული გენების გააქტიურება $\alpha\beta 3$ ინტეგრინის/Fak გზის მეშვეობით არის TH-ის ერთ-ერთი სასიგნალო მოქმედება (Cheng et al., 2021). რამდენიმე კვლევამ აჩვენა, რომ სხვადასხვა არარეცეპტორულ თიროზინკინაზებს, მათ შორის Fak-ს,

შეუძლიათ გამოიწვიონ JAK/STAT კასკადის გააქტიურება; თუმცა, ზუსტი მექანიზმები JAK-ის ფოსფორილირებასა და აქტივაციაში უცნობია (Behera et al., 2022; Gao et al., 2021).

ჩვენს მიერ ჩატარებულმა კვლევამ აჩვენა სხვადასხვა არარეცეპტორული თიროზინკინაზების JAK2/STAT5-ის T3 დამოკიდებული ფოსფორილაცია რაც მიუთითებს ამ კასკადური გზის გააქტიურებაზე. JAK2/STAT5 სასიგნალო გზის გამართული ფუნქციონირება ეყრდნობა სხვა სასიგნალო გზებთან ურთიერთდაკავშირებას, რაც იწვევს ნორმალურ ბიოლოგიურ მუშაობას (Tian et al., 2020). იმის გათვალისწინებით რომ ჰიპოქსიამ შესაძლოა კომპენსატორულად გაააქტიუროს ეს სასიგნალო კასკადი (Joung et al 2005; Wang et al., 2016), შეიძლება დავასკვნათ, რომ დამატებით T3-ის მოქმედებამ შეიძლება მნიშვნელოვნად გაზარდოს ოქსიდაციური სტრესით გამოწვეული რეაქციები. ამავდროულად, T3 ამცირებს SHP-2 ცილის ფოსფორილირებას ჰიპოქსიის დროს (სურ. 18), რომელიც გავლენას ახდენს Fak კინაზას აქტივაციაზე (Choi et al., 2016).

T3-ით ინდუცირებული ეფექტი უქმდება $\alpha\beta 3$ ინტეგრინის ინჰიბიტორული ანტისხეულის მოქმედებით. ბოლო კვლევებმა აჩვენა, რომ SHP2-ს გადამწყვეტი როლი აქვს ნეიროდეგენერაციულ დაავადებებში და მის დათრგუნვას შეიძლება ქონდეს ნეიროპროტექტორული ეფექტები (Pan et al., 2022) (სურ. 18). JAK2-STAT5 გზა აუცილებელია უჯრედების განვითარებისა და გადარჩენისთვის (O'Shea et al., 2002). გაზრდილი JAK2 აქტივობა ზრდის BDNF-ის ექსპრესიას და თრგუნავს ნეირონების აპოპტოზს ქრონიკული მსუბუქი სტრესის დროს (Kvergelidze et al., 2022; Tian et al., 2019). უფრო მეტიც, ჰიპოქსიით გამოწვეული JAK2/STAT5-ის აქტივაციამ შეიძლება თავიდან აიცილოს ნეირონების აპოპტოზი იშემიური დაზიანების შემდეგ (Liu et al., 2021). არაერთმა კვლევამ აჩვენა, რომ STAT5-ს ასევე შეუძლია ფუნქციონირდეს როგორც ტრანსკრიპციული რეპრესორი ეპიგენეტიკური მოდიფიკატორების დემეთილირების ან დეაცეტილირების რეკრუტირების გზით სპეციფიკურ გენის ლოკუსებში (Yang et al., 2011; Mandal et al., 2011). ლიზინ-სპეციფიკური ჰისტონ დემეთილაზა 1A (LSD1) და HDAC3 ასევე ახდენენ STAT-ის სამიზნეების ტრანსკრიფციულ რეგულირებას და ხელს უწყობენ სპეციფიკური გენის რეპრესიას დეაცეტილაციით ან ჰისტონის დემეთილაციით (Wingelhofer et al., 2018).

მიღებული შედეგები მიუთითებს, რომ STAT5 შეიძლება იყოს ჩართული გენთა ექსპრესიის ეპიგენეტიკურ რეგულირებაში და თავის ტვინის ფიზიოლოგიურ და პათოლოგიურ პროცესებში (Kagohara et al., 2018).

ჩვენ დავადგინეთ, რომ Fyn კინაზას, Src ოჯახის წევრ თიროზინკინაზას, ასევე შეუძლია მონაწილეობა მიიღოს T3-დამოკიდებულ მოქმედებაში ჰიპოქსიურ უჯრედებში. Fyn-ის პალმიტირება აუცილებელია მისი ლოკალიზაციისთვის მემბრანაზე, ამ ფერმენტის აბერანტული მოდიფიკაცია ხელს უწყობს ნეიროდეგენერაციული დაავადებების პათოფიზიოლოგიას (Li et al., 2023).

უჯრედშიდა დაღმავალი სასიგნალო გზების გააქტიურება, რეგულირდება ზედა სასიგნალო ცილების ტრანსლაციური ცვლილებებით, მათ შორის პალმიტირებით. თიროზინკინაზა Fyn ჩართულია ფოსფორილირებაში და პოსტსინაფსური კომპლექსების აწყობა/რემოდელირებაში, თავის ტვინში ჰიპოქსია/იშემიური პროცესების საპასუხოდ. Fyn კოორდინაციას უწევს სხვა არარეცეპტორულ თიროზინკინაზებს (Knox and Jiang, 2015). დადგენილია, რომ Fyn აძლიერებს JAK2 გაშუალებულ ფოსფორილირებას (Tse et al., 2013) და ორივე Fyn და JAK2 საჭიროა ROS-ზე დამოკიდებული რედოქს-მგრძნობიარე დაღმავალი სასიგნალო გზის აქტივაციისთვის (Abe and Berk, 1999). ამრიგად, Fyn კინაზას აქტივობა მჭიდროდ არის დაკავშირებული JAK2 გზასთან. იმის გათვალისწინებით, რომ Fyn ის ლოკალიზაცია და აქტივობა ფოსფორილირების გარდა რეგულირდება პალმიტირებით, შემდეგ ჩვენ გამოვიკვლიეთ T3-ის $\alpha\beta 3$ ინტეგრინის შუამავლობით გამოწვეული ეფექტები Fyn ის პალმიტირებასა და პალმიტირებული Fyn ფოსფორილირებაზე (Thr12-ნაშთზე) 1-სთ ჰიპოქსიის დროს.

ჩვენმა ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ T3 ამცირებს Fyn-ის პალმიტოილაციას და ამცირებს მის ფოსფორილირებას (Thr12-ზე). ჩვენი ბოლოდროინდელი კვლევები მიუთითებს, რომ p-Fyn/Fyn-ის თანაფარდობის შემცირება არეგულირებს აქტინის ციტოჩონჩხის დინამიკას, $\alpha\beta 3$ -ინტეგრინით გაშუალებული Fyn-ის დეფოსფორილირების გზით (Barbakadze et al., 2023) (სურ.19).

მიღებული შედეგები ემთხვევა კვლევებს, რომლის მიხედვით ფოსფორილაცია მე-12 თრეონინის ნაშთზე ამოღებული Fyn კინაზას აქტივობას (Anzovino et al., 2017;

Tang et al., 2007) და Fyn კინაზას ფოსფორილირების შემცირებით რთავს ანტი-აპოპტოზურ სიგნალს ნეირონებში (Saminathan et al., 2021).

პალმიტირებაში მონაწილე ფერმენტების (Wild et al., 2022) და ინტეგრინების (Izumi et al., 2017) მომატებული ექსპრესია აღმოაჩინეს ნეირონებში. ამაზე დაყრდნობით, ჩვენ გავანალიზეთ ხუთი გენის ექსპრესიის ცვლილება, რომლებიც ყველაზე მეტად არის გავრცელებული ნერვულ ქსოვილში. ჩვენი შედეგები აჩვენებს, რომ T3 ამცირებს ZDHHC2 და ZDHHC9 გენების ექსპრესიას ინტეგრინ-გაშუალებული სპეციფიური მოქმედებით (სურ. 20). ამის საპირისპიროდ, სხვა პალმიტოილტრანსფერაზას გენების ექსპრესია, როგორცაა ZDHHC3, ZDHHC8, და ZDHHC16, იცვლება უმნიშვნელოდ, ან ეს ცვლილებები არ არის ინტეგრინით გაშუალებული (ცხრილი 2). ამრიგად, შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ თიროიდული ჰორმონი T3, $\alpha\beta 3$ ინტეგრინ/JAK2/STAT5 გზის მეშვეობით, თრგუნავს პალმიტოილტრანსფერაზას გენების ZDHHC2 და ZDHHC9 ექსპრესიას, რაც სავარაუდოდ განპირობებულია ეპიგენეტიკური გაჩუმების ჩართვით. აღსანიშნავია, DHHC პროტეინის ოჯახი პალმიტოილტრანსფერაზები ეპიგენეტიკურად რეგულირდება დნმ-ის მეთილირებით, რომელიც შეიძლება მოდულირებული იყოს STAT5-ით. როგორც ჩანს, ამ ცვლილებებს აქვთ პრევენციული ეფექტი დაიცვან თავის ტვინი მაღალი სიხშირის სტიმულაციისა რეაქციებისგან (Wang et al., 2016).

დასასრულს, ჩვენი ექსპერიმენტები გვიჩვენებს ინტეგრინზე დამოკიდებული JAK2/STAT5 კასკადის ჩართულობას და Fyn-ის პალმიტოილაციის შესაძლო მოდულაციას T3 გაშუალებულ ეფექტებში 1-სთ ჰიპოქსიის დროს. ეს გზა და nRTK-ები აქტიურდება $\alpha\beta 3$ -ინტეგრინის მეშვეობით და სავარაუდოდ აკომპენსირებს ROS-ით გამოწვეულ დაზიანებას. ამ შემთხვევაში, ZDHHC2 და ZDHHC9 გენის ექსპრესიის დაქვეითებას აქვს ადგილი. ეს არის გენები, რომლებიც მონაწილეობენ პალმიტოილაციის ცვლილებებში და სხვადასხვა ცილის გადანაწილებაში, მათ შორის Fyn, რომლებიც სასარგებლოა უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის შენარჩუნებაში ჰიპოქსიის დროს.

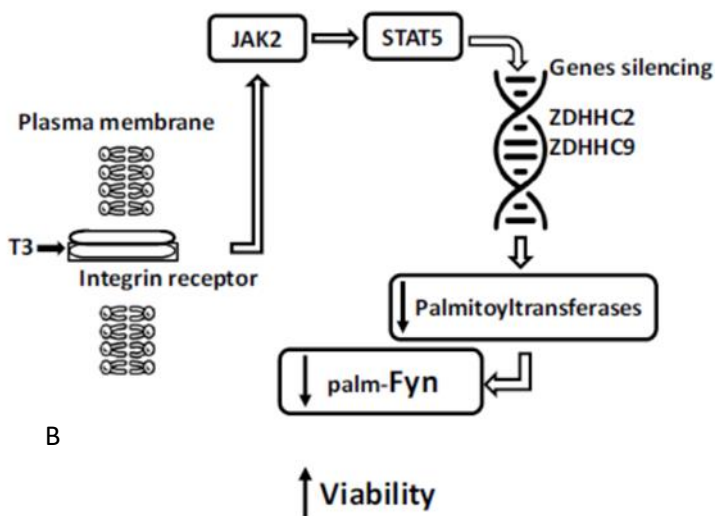
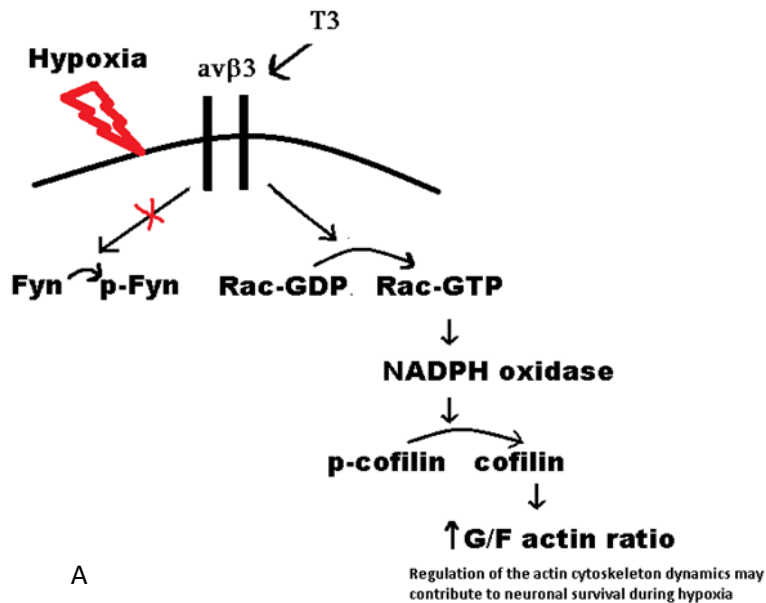
ჩვენი ექსპერიმენტები ცხადყოფს, რომ ტრიოდოთირონინი (T3), რომლის მოქმედებაც გაშუალებულია $\alpha\beta 3$ -ინტეგრინული რეცეპტორით, იწვევს JAK2/STAT5 გზის გააქტიურებას და SHP2-ის დათრგუნვას ჰიპოქსიურ პირობებში, PC-12

უჯრედებში. ეს აქტივაცია დაკავშირებულია პალმიტოილტრანსფერაზა-ZDHHC2 და ZDHHC9 გენების ექსპრესიის დაქვეითებასთან, რაც იწვევს თიროზინკინაზას Fyn-ის პალმიტირების და ფოსფორილირების შემცირებას. ჩვენ ვივარაუდეთ რომ ცვლილებები შეიძლება განპირობებული იყოს STAT5-ზე დამოკიდებული პალმიტოილტრანსფერაზას ეპიგენეტიკური „გათიშვის,, გამო, რომელიც თავის მხრივ ამცირებს Fyn-ის პალმიტირებას/ფოსფორილირებას უჯრედების შემდგომი გადარჩენის გზით.

ჩვენი კვლევა გვაწვდის პირველ მტკიცებულებას, რომელიც ადასტურებს ინტეგრინ დამოკიდებული JAK/STAT გზის, ჩართულობას ზემოაღნიშნულ პროცესებში: SHP2 დათრგუნვასა და Fyn-ის პოსტტრანსლაციურ მოდიფიკაციებში, რაც თავის მხრივ განაპირობებს T3-ის დამცველობით ეფექტებს ჰიპოქსიის დროს (Kvergelidze et al., 2024). ეს ცვლილებები შეიძლება მოხდეს STAT5-ზე დამოკიდებული პალმიტოილტრანსფერაზას გენის, შესაძლო ინდუქციური ეპიგენეტიკური გაჩუმების გამო, რომელიც თავის მხრივ ამცირებს Fyn-ის პალმიტოილაციას/ფოსფორილაციას შემდგომში ნეირონების გადარჩენის ზრდით (სურ. 21).

არაგენომურ მექანიზმებს, რომელიც ინიცირებულია T3 თიროიდული ჰორმონით $\alpha\beta3$ ინტეგრინის მეშვეობით მნიშვნელოვანი წვლილის შეტანა შეუძლიათ ნევროლოგიური ფუნქციების აღდგენაში და ინსულტის შემდგომი აღდგენა რეგენერაციაში. თიროიდული ჰორმონების ერთ-ერთი ყველაზე კრიტიკული სამიზნე არის $\alpha\beta3$ ინტეგრინი, რომელსაც შეუძლია მონაწილეობა თავის ტვინის აღდგენის პროცესებში და მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ ნეირონული უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის შენარჩუნებაში ჰიპოქსიის დროს. ეს რეცეპტორი კომპლექსურ როლს ასრულებს უჯრედ-მატრიქსის ურთიერთქმედებაში, რომელიც შუამავლობს უჯრედის ადჰეზიას, მიგრაციას და განვითარებას. გარდა ამისა, $\alpha\beta3$ ინტეგრინი ახდენს უჯრედშიდა ზემოქმედებას აქტინის ციტოჩონჩხზე სხვადასხვა სასიგნალო პროცესის რეგულირებით. როგორც უჯრედის ზედაპირის რეცეპტორს, ამ ინტეგრინს აქვს ცენტრალური როლი თავის ტვინის მრავალი დაავადების პათოფიზიოლოგიაში და არის ახალი სამკურნალო საშუალებების პოტენციური სამიზნე (Barbakadze et al., 2023). ჩვენს მიერ მიღებული შედეგები ხაზს უსვამს

ჩატარებული კვლევის მნიშვნელობას და მიღებული მონაცემების შესაძლო გამოყენებას პოტენციური თერაპიული საშუალებების შემუშავება/შესწავლაში.



სურათი 21. სქემატური გამოსახულება A. თიროიდული ჰორმონის T3-ის ეფექტი აქტინის ციტოქონჩის დინამიურობაში დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში ჰიპოქიის დროს. B. T3-ის სასარგებლო ეფექტების ჰიპოთეტური სქემა დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში ჰიპოქსიის დროს.

თავი IV. დასკვნები

1. ფეოქრომოციტომას უჯრედებში T3-ის თანაობისას ადგილი აქვს G/F აქტინის თანაფარდობის მოდულირებას Rac1/NADPHოქსიდაზა/კოფილინ1 სასიგნალო გზის მეშვეობით და $\alpha\beta 3$ -ინტეგრინით გაშუალებული Fyn კინაზას ფოსფორილირების დათრგუნვის საშუალებით. T3 არეგულირებს აქტინის ციტოჭონჩხის დინამიურობას $\alpha\beta 3$ ინტეგრინის მეშვეობით, რაც ზრდის უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას ჰიპოქსიის დროს.
2. T3 არეგულირებს NOX2-ის ზომიერ აქტივაციას $\alpha\beta 3$ ინტეგრინის შუამავლობით Rac1-თან NOX2-თან შეკავშირების გზით, რაც ზრდის BDNF-ს წარმოქმნას და შესაბამისად, ხელს უწყობს თიროიდული ჰორმონის ნეიროპროტექტორულ მოქმედებას ჰიპოქსიის დროს.
3. დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში T3 ჰორმონი $\alpha\beta 3$ ინტეგრინზე მოქმედებით განაპირობებს Fyn კინაზას პალმიტირებას. ამ დროს ადგილი აქვს Fyn კინაზას ფოსფორილირების დონის შემცირებას, რაც ჩვენი ვარაუდით მნიშვნელოვან როლს თამაშობს Fyn კინაზას ზომიერ გააქტიურებაში ფოსფორილირების გზით, ჰიპოქსიურ პირობებში.
4. დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში ჰიპოქსიის დროს T3 იწვევს, $\alpha\beta 3$ -ინტეგრინით გაშუალებულ JAK2 და STAT5 ფოსფორილირების ზრდას და SHP2 ფოსფატაზის ფოსფორილირების შემცირებას.
5. $\alpha\beta 3$ -ინტეგრინით გაშუალებული JAK2/STAT5 კასკადის გზით, T3 შესაძლებელია გავლენას ახდენდეს უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის გაზრდაზე ჰიპოქსიის დროს, რაც სავარაუდოდ მიმდინარეობს STAT5-ით განპირობებული გენთა ექსპრესიის ეპიგენეტიკური გაჩუმების შედეგად.
6. ფეოქრომოციტომას უჯრედებში T3-ის ზემოქმედება თრგუნავს ინტეგრინით გაშუალებულ ZDHHC2 და ZDHHC9 გენთა ექსპრესიას, ხოლო პალმიტოილტრანსფერაზას ZDHHC3, ZDHHC8, და ZDHHC16, გენთა ექსპრესია თიროიდული ჰორმონის ზეგავლენით მხოლოდ მცირედით იცვლება. ZDHHC3, ZDHHC8, და ZDHHC16, გენთა ექსპრესია არ არის ინტეგრინით გაშუალებული, რაც საფუძველს გვაძლევს დავასკვნათ, რომ თიროიდული ჰორმონი T3 $\alpha\beta 3$ /JAK2/STAT5

გზის გავლით სპეციფიკურად მოქმედებს მხოლოდ ZDHHHC2 და ZDHHHC9 გენების ექსპრესიაზე, რაც სავარაუდოდ მათი ეპიგენეტიკური სუპრესიის ფონზე მიმდინარეობს.

7. აღსანიშნავია, რომ ჩვენი კვლევების საშუალებით პირველად იქნა ნანახი JAK2/STAT5 კასკადის და Fyn-ის პალმიტირების მონაწილეობა თიროიდული ჰორმონის მოქმედების ინტეგრირით გაშუალებულ ეფექტებში ჰიპოქსიის პირობებში.

თავი V. გამოყენებული ლიტერატურა

- Abe, J. I., Berk, B. C. (1999). Fyn and JAK2 mediate Ras activation by reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*, 274(30), 21003-21010. doi: 10.1074/jbc.274.30.21003.
- Abram, C. L., Courtneidge, S. A. (2000). Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Experimental cell research*, 254(1), 1-13. doi: 10.1006/excr.1999.4732.
- Alevizaki, M., Synetou, M., Xynos, K., Pappa, T., & Vemmos, K. N. (2007). Low triiodothyronine: a strong predictor of outcome in acute stroke patients. *European journal of clinical investigation*, 37(8), 651-657.
- Alkemade, A., Friesema, E. C., Kalsbeek, A., Swaab, D. F., Visser, T. J., & Fliers, E. (2011). Expression of thyroid hormone transporters in the human hypothalamus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(6), E967-E971. doi: 10.1210/jc.2010-2750.
- Alphonso, A., & Alahari, S. K. (2009). Stromal cells and integrins: conforming to the needs of the tumor microenvironment. *Neoplasia*, 11(12), 1264-1271. doi: 10.1593/neo.91302.
- Anderson, G. W., Schoonover, C. M., & Jones, S. A. (2003). Control of thyroid hormone action in the developing rat brain. *Thyroid*, 13(11), 1039-1056. doi: 10.1089/105072503770867219
- Andrianantoandro, E., & Pollard, T. D. (2006). Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Molecular cell*, 24(1), 13-23. doi: 10.1016/j.molcel.2006.08.006.
- Anilkumar, N., Weber, R., Zhang, M., Brewer, A., & Shah, A. M. (2008). Nox4 and nox2 NADPH oxidases mediate distinct cellular redox signaling responses to agonist stimulation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28(7), 1347-1354. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.164277.
- Anzovino, A., Chiang, S., Brown, B. E., Hawkins, C. L., Richardson, D. R., & Huang, M. L. H. (2017). Molecular alterations in a mouse cardiac model of Friedreich ataxia: an impaired Nrf2 response mediated via upregulation of Keap1 and activation of the Gsk3 β

- axis. *The American journal of pathology*, 187(12), 2858-2875. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.08.021.
- Arnaout, M.A. (2002). Integrin structure: new twists and turns in dynamic cell adhesion. *Immunological Reviews*, 186: 125-140. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2002.18612.x>
- Arora, S., Bhattacharjee, J. (2008). Modulation of immune responses in stress by Yoga. *International journal of yoga*, 1(2), 45-55. doi: 10.4103/0973-6131.43541.
- Arthur, W. T., Noren, N. K., Burridge, K. (2002). Regulation of Rho family GTPases by cell-cell and cell-matrix adhesion. *Biological research*, 35(2), 239-246. doi: 10.4067/s0716-97602002000200016.
- Baker K, Astle DE, Scerif G, Barnes J, Smith J, Moffat G, Gillard J, Baldeweg T, Raymond FL. (2015). Epilepsy, cognitive deficits and neuroanatomy in males with ZDHHC9 mutations. *Annals of clinical and translational neurology*, 2(5), 559-569. doi: 10.1002/acn3.196.
- Bamburg, J. R., & Bernstein, B. W. (2016). Actin dynamics and cofilin-actin rods in Alzheimer disease. *Cytoskeleton*, 73(9), 477-497. doi: 10.1002/cm.21282.
- Bamburg JR, Bernstein BW, Davis RC, Flynn KC, Goldsberry C, Jensen JR, Maloney MT, Marsden IT, Minamide LS, Pak CW, Shaw AE, Whiteman I, Wiggan O. (2010). ADF/Cofilin-actin rods in neurodegenerative diseases. *Current Alzheimer Research*, 7(3), 241-250. doi: 10.2174/156720510791050902.
- Baqui M, Botero D, Gereben B, Curcio C, Harney JW, Salvatore D, Sorimachi K, Larsen PR, Bianco AC. (2003). Human type 3 iodothyronine selenodeiodinase is located in the plasma membrane and undergoes rapid internalization to endosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(2), 1206-1211. doi: 10.1074/jbc.M210266200.
- Barbakadze, T., Kvergeliidze, E., Bátor, J., Szeberényi, J., & Mikeladze, D. (2023). 3, 5, 3'-Triiodo-L-thyronine regulates actin cytoskeleton dynamic in the differentiated PC-12 cells during hypoxia through an $\alpha v \beta 3$ integrin. *Cell Journal (Yakhteh)*, 25(4), 247. doi: 10.22074/cellj.2022.557501.1059.

- Barbakadze, T., Natsvlishvili, N., & Mikeladze, D. (2014). Thyroid hormones differentially regulate phosphorylation of ERK and Akt via integrin $\alpha\beta 3$ receptor in undifferentiated and differentiated PC-12 cells. *Cell biochemistry and function*, 32(3), 282-286.
- Behera, R., Kumar, V., Lohite, K., Karnik, S., & Kundu, G. C. (2010). Activation of JAK2/STAT3 signaling by osteopontin promotes tumor growth in human breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 31(2), 192-200. doi: 10.1093/carcin/bgp289.
- Benov, L. (2001) How superoxide radical damages the cell. *Protoplasma* 217, 33–36. <https://doi.org/10.1007/BF01289410>
- Bernal J. Thyroid Hormones in Brain Development and Function. 2022 Jan 14. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, de Herder WW, Dhatariya K, Dungan K, Hofland J, Kalra S, Kaltsas G, Kapoor N, Koch C, Kopp P, Korbonits M, Kovacs CS, Kuohung W, Laferrère B, Levy M, McGee EA, McLachlan R, New M, Purnell J, Sahay R, Shah AS, Singer F, Sperling MA, Stratakis CA, Trencé DL, Wilson DP, editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.;
- Bernstein, B. W., & Bamburg, J. R. (2010). ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends in cell biology*, 20(4), 187-195. doi: 10.1016/j.tcb.2010.01.001.
- Bhutta, B. S., Alghoula, F., & Berim, I. (2022). Hypoxia. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing.
- Binder, D. K., Scharfman, H. E. (2004). Brain-derived neurotrophic factor. *Growth factors* 22(3), 123. doi: 10.1080/08977190410001723308.
- Birkenfeld, J., Betz, H., & Roth, D. (2003). Identification of cofilin and LIM-domain-containing protein kinase 1 as novel interaction partners of 14-3-3 ζ . *Biochemical Journal*, 369(1), 45-54. doi: 10.1042/BJ20021152.
- Bökel, C., & Brown, N. H. (2002). Integrins in development: moving on, responding to, and sticking to the extracellular matrix. *Developmental cell*, 3(3), 311-321. doi: 10.1016/s1534-5807(02)00265-4.
- Boutillier, R. G. (2001). Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *Journal of*

- Experimental Biology, 204(18), 3171-3181. doi: 10.1242/jeb.204.18.3171.
- Bouvard, D., Brakebusch, C., Gustafsson, E., Aszódi, A., Bengtsson, T., Berna, A., & Fässler, R. (2001). Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circulation research*, 89(3), 211-223. doi: 10.1161/hh1501.094874.
- Bhambhvani HP, Mueller TM, Simmons MS, Meador-Woodruff JH. (2017). Actin polymerization is reduced in the anterior cingulate cortex of elderly patients with schizophrenia. *Transl Psychiatry*. 7(12):1278–1278. doi: 10.1038/s41398-017-0045-y.
- Brent, G. A. (2012). Mechanisms of thyroid hormone action. *The Journal of clinical investigation*, 122(9), 3035-3043. doi: 10.1172/JCI60047.
- Brigidi GS, Bamji SX. (2013). Detection of protein palmitoylation in cultured hippocampal neurons by immunoprecipitation and acyl-biotin exchange (ABE). *J Vis Exp*. 72:50031. 10.3791/50031.
- Buga, A. M., Di Napoli, M., & Popa-Wagner, A. (2013). Preclinical models of stroke in aged animals with or without comorbidities: role of neuroinflammation. *Biogerontology*, 14, 651-662. doi: 10.1215/S1152851704001115.
- Burtscher, J., Mallet, R. T., Burtscher, M., Millet, G. P. (2021). Hypoxia and brain aging: Neurodegeneration or neuroprotection? *Ageing research reviews*, 68, 101343. doi: 10.1016/j.arr.2021.101343
- Campbell, I. D., Humphries, M. J. (2011). Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(3), a004994. doi: 10.1101/cshperspect.a004994.
- Cao N, Li JK, Rao YQ, Liu H, Wu J, Li B, Zhao P, Zeng L, Li J. (2016). A potential role for protein palmitoylation and zDHHC16 in DNA damage response. *BMC molecular biology*, 17, 1-11. doi: 10.1186/s12867-016-0065-9.
- Chen H., Yoshioka H., Kim GS., Jung JE., Okami N., Sakata H., Maier CM., Narasimhan P., Goeders CE., Chan PH. (2011) Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid Redox*

- Signal, 14:1505-1517. doi: 10.1159/000489450.
- Chen, H., Bernstein, B. W., Sneider, J. M., Boyle, J. A., Minamide, L. S., & Bamburg, J. R. (2004). In vitro activity differences between proteins of the ADF/cofilin family define two distinct subgroups. *Biochemistry*, 43(22), 7127-7142. doi: 10.1021/bi049797n.
- Cheng, S. Y., Leonard, J. L., Davis, P. J. (2010). Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocrine reviews*, 31(2), 139-170. doi: 10.1210/er.2009-0007.
- Cheng TM, Chang WJ, Chu HY, De Luca R, Pedersen JZ, Incerpi S, Li ZL, Shih YJ, Lin HY, Wang K, Whang-Peng J. (2021). Nano-Strategies Targeting the Integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ Network for Cancer Therapy. *Cells* 2021, 10, 1684. doi: 10.3390/cells10071684.
- Chin J, Palop JJ, Puoliväli J, Massaro C, Bien-Ly N, Gerstein H, Searce-Levie K, Masliah E, Mucke L. Fyn (2005). Fyn kinase induces synaptic and cognitive impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 25(42), 9694-9703. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2980-05.2005.
- Chin YT, Wei PL, Ho Y, Nana AW, Changou CA, Chen YR, Yang YS, Hsieh MT, Hercbergs A, Davis PJ, Shih YJ, Lin HY. (2018). Thyroxine inhibits resveratrol-caused apoptosis by PD-L1 in ovarian cancer cells. *Endocrine-Related Cancer*, 25(5), 533-545. doi: 10.1530/ERC-17-0376.
- Cho, E., & Park, M. (2016). Palmitoylation in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Pharmacological Research*, 111, 133-151. doi: 10.1016/j.phrs.2016.06.008
- Choi, I., Byun, J. W., Park, S. M., Jou, I., & Joe, E. H. (2016). LRRK2 inhibits FAK activity by promoting FERM-mediated autoinhibition of FAK and recruiting the tyrosine phosphatase, SHP-2. *Experimental Neurobiology*, 25(5), 269. doi: 10.5607/en.2016.25.5.269.
- Curcio C, Baqui MM, Salvatore D, Rihn BH, Mohr S, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC. (2001). The human type 2 iodothyronine deiodinase is a selenoprotein highly expressed in a mesothelioma cell line. *Journal of Biological Chemistry*, 276(32), 30183-30187. doi: 10.1074/jbc.C100325200.

- Das, B., Matsuda, H., Fujimoto, K., Sun, G., Matsuura, K., & Shi, Y. B. (2010). Molecular and genetic studies suggest that thyroid hormone receptor is both necessary and sufficient to mediate the developmental effects of thyroid hormone. *General and comparative endocrinology*, 168(2), 174-180.
- Davis, P. J., Leonard, J. L., & Davis, F. B. (2008). Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Frontiers in neuroendocrinology*, 29(2), 211-218. doi: 10.1016/j.yfrne.2007.09.003.
- Davis, P. J., Mousa, S. A., & Lin, H. Y. (2021). Nongenomic actions of thyroid hormone: the integrin component. *Physiological Reviews*, 101(1), 319-352.
- Davis, P. J., Sudha, T., Lin, H. Y., & Mousa, S. A. (2015). Thyroid hormone, hormone analogs, and angiogenesis. *Comprehensive Physiology*, 6(1), 353-362. doi: 10.1002/cphy.c150011
- De Arcangelis, A.; Georges-Labouesse, E. (2000). Integrin and ECM Functions in Vertebrate Development. *Trends Genet.*, 16, 389–395. doi: 10.1016/s0168-9525(00)02074-6
- De Mendoza, D., Moreno, H., & Farias, R. N. (1978). Membrane cooperative enzymes. High molecular specificity for blocking action of thyroxine on triiodothyronine effect in rat erythrocyte and *Escherichia coli* systems. *Journal of Biological Chemistry*, 253(17), 6255-6259.
- Du, C. P., Tan, R., & Hou, X. Y. (2012). Fyn kinases play a critical role in neuronal apoptosis induced by oxygen and glucose deprivation or amyloid- β peptide treatment. *CNS neuroscience & therapeutics*, 18(9), 754-761. doi: 10.1111/j.1755-5949.2012.00357.x.
- Dumitrescu, A. M., Liao, X. H., Best, T. B., Brockmann, K., & Refetoff, S. (2004). A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. *The American Journal of Human Genetics*, 74(1), 168-175. doi: 10.1086/380999.
- Dzhalilova, D., Makarova, O. (2020). Differences in tolerance to hypoxia: physiological, biochemical, and molecular-biological characteristics. *Biomedicines*, 8(10), 428. doi: 10.3390/biomedicines8100428
- Eva, R.; Fawcett, J. (2014). Integrin Signalling and Traffic during Axon Growth and

- Regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 27, 179–185. doi: 10.1016/j.conb.2014.03.018 ;
- Farias, R. N., Fiore, A. M., Pedersen, J. Z., Incerpi, S. (2006). Nongenomic actions of thyroid hormones: focus on membrane transport systems. *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine and Metabolic Agents)*, 6(3), 241-254. doi: 10.2174/187152206777435609
- Ferhat, L. (2012). Potential role of Drebrin A, an F-actin binding protein, in reactive synaptic plasticity after pilocarpine-induced seizures: functional implications in epilepsy. *International Journal of Cell Biology*, 2012(1), 474351. doi: 10.1155/2012/474351.
- Forini F, Kusmic C, Nicolini G, Mariani L, Zucchi R, Matteucci M, Iervasi G, Pitto L. (2014). Triiodothyronine prevents cardiac ischemia/reperfusion mitochondrial impairment and cell loss by regulating miR30a/p53 axis. *Endocrinology*, 155(11), 4581-4590. doi: 10.1210/en.2014-1106.
- Franklin, R. J., & Ffrench-Constant, C. (2008). Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(11), 839-855. doi: 10.1038/nrn2480.
- Frenkel-Denkberg, G., Gershon, D., & Levy, A. P. (1999). The function of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) is impaired in senescent mice. *FEBS letters*, 462(3), 341-344. doi: 10.1016/s0014-5793(99)01552-5.
- Friesema, E. C., Grueters, A., Biebermann, H., Krude, H., Von Moers, A., Reeser, M., ... & Visser, T. J. (2004). Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *The Lancet*, 364(9443), 1435-1437. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17226-7.
- Friesema, E. C., Jansen, J., Heuer, H., Trajkovic, M., Bauer, K., & Visser, T. J. (2006). Mechanisms of disease: psychomotor retardation and high T3 levels caused by mutations in monocarboxylate transporter 8. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*, 2(9), 512-523.
- Frye RE, Wynne R, Rose S, Slattery J, Delhey L, Tippet M, et al. (2017). Thyroid dysfunction in children with autism spectrum disorder is associated with folate

- receptor α autoimmune disorder. *J Neuroendocrinol* 29(3). doi: 10.1111/jne.12461
- Fukata, M., Fukata, Y., Adesnik, H., Nicoll, R. A., & Brecht, D. S. (2004). Identification of PSD-95 palmitoylating enzymes. *Neuron*, 44(6), 987-996. doi: 10.1016/j.neuron.2004.12.005
- Galo, M. G., Unates, L. E., & Farias, R. N. (1981). Effect of membrane fatty acid composition on the action of thyroid hormones on $(Ca^{2++} Mg^{2+})$ -adenosine triphosphatase from rat erythrocyte. *Journal of Biological Chemistry*, 256(14), 7113-7114.
- Ganguli, M., Burmeister, L. A., Seaberg, E. C., Belle, S., & DeKosky, S. T. (1996). Association between dementia and elevated TSH: a community-based study. *Biological psychiatry*, 40(8), 714-725. doi: 10.1016/0006-3223(95)00489-0.
- Gao, J., Zhao, B. R., Zhang, H., You, Y. L., Li, F., Wang, X. W. (2021). Interferon functional analog activates antiviral Jak/Stat signaling through integrin in an arthropod. *Cell reports*, 36(13). doi: 10.1016/j.celrep.2021.109761.
- Gawlitsek, M., Estacio, M., Fürch, T., & Kiss, R. (2009). Identification of cell culture conditions to control N-glycosylation site-occupancy of recombinant glycoproteins expressed in CHO cells. *Biotechnology and bioengineering*, 103(6), 1164-1175. doi: 10.1002/bit.22348
- Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang SA, Simonides WS, Zeöld A, Bianco AC. (2008). Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocrine reviews*, 29(7), 898-938. doi: 10.1210/er.2008-0019.
- Giammanco, M., Di Liegro, C. M., Schiera, G., & Di Liegro, I. (2020). Genomic and non-genomic mechanisms of action of thyroid hormones and their catabolite 3, 5-diiodo-L-thyronine in mammals. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 4140. doi: 10.3390/ijms21114140.
- Gilbert, M. E., Lasley, S. M. (2013). Developmental thyroid hormone insufficiency and brain development: a role for brain-derived neurotrophic factor (BDNF)? *Neuroscience*, 239, 253-270. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.11.022.
- Gil-Ibañez, P., García-García, F., Dopazo, J., Bernal, J., & Morte, B. (2017). Global

- transcriptome analysis of primary cerebrocortical cells: identification of genes regulated by triiodothyronine in specific cell types. *Cerebral cortex*, 27(1), 706-717. doi: 10.1093/cercor/bhv273.
- Goloshvili, G., Barbakadze, T., Mikeladze, D. (2019). Sodium nitroprusside induces H-Ras depalmitoylation and alters the cellular response to hypoxia in differentiated and undifferentiated PC-12 cells. *Cell Biochemistry and Function*, 37(7), 545-552. doi: 10.1002/cbf.3431.
- Gonzalez, A., Moya-Alvarado, G., Gonzalez-Billaut, C., & Bronfman, F. C. (2016). Cellular and molecular mechanisms regulating neuronal growth by brain-derived neurotrophic factor. *Cytoskeleton*, 73(10), 612-628. doi: 10.1002/cm.21312.
- Govek, E. E., Newey, S. E., Van Aelst, L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes & development*, 19(1), 1-49. doi: 10.1101/gad.1256405.
- Grant SGN, O'Dell TJ, Karl KA, Stein PL, Soriano P, Kandel ER (1992) Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice. *Science* 258: 1903-1910. doi: 10.1126/science.1361685.
- Greene, L. A., & Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(7), 2424-2428. doi: 10.1073/pnas.73.7.2424.
- Guan, X., Fierke, C. A. (2011). Understanding protein palmitoylation: Biological significance and enzymology. *Science China Chemistry*, 54, 1888-1897. doi: 10.1007/s11426-011-4428-2.
- Gubern C, Hurtado O, Rodríguez R, Morales JR, Romera VG, Moro MA, Lizasoain I, Serena J, Mallolas J. (2009) Validation of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in in-vivo and in-vitro models of cerebral ischaemia. *BMC Mol Biol*. 10:57. doi: 10.1186/1471-2199-10-57.
- Gutierrez, G. (1991). Cellular energy metabolism during hypoxia. *Critical care medicine*, 19(5), 619-626. doi: 10.1097/00003246-199105000-00008.
- Hammes, S. R., & Davis, P. J. (2015). Overlapping nongenomic and genomic actions of

- thyroid hormone and steroids. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 29(4), 581-593. doi: 10.1016/j.beem.2015.04.001.
- Hardie, D. G. (2003). Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology*, 144(12), 5179-5183. doi: 10.1210/en.2003-0982.
- Hiroi Y, Kim HH, Ying H, Furuya F, Huang Z, Simoncini T, Noma K, Ueki K, Nguyen NH, Scanlan TS, Moskowitz MA, Cheng SY, Liao JK. (2006). Rapid nongenomic actions of thyroid hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(38), 14104-14109. doi: 10.1073/pnas.0601600103.
- Hoffmann, L., Rust, M. B., & Culmsee, C. (2019). Actin (g) on mitochondria—a role for cofilin1 in neuronal cell death pathways. *Biological chemistry*, 400(9), 1089-1097. doi: 10.1515/hsz-2019-0120.
- Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S. G., Croteau, D. L., & Bohr, V. A. (2019). Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology*, 15(10), 565-581. doi: 10.1038/s41582-019-0244-7.
- Hsia, S. C. V., Chen, L. H., & Tseng, H. F. (2017). Receipt of thyroid hormone deficiency treatment and risk of herpes zoster. *International Journal of Infectious Diseases*, 59, 90-95. doi: 10.1016/j.ijid.2017.04.016.
- Hu, X., Li, J., Fu, M., Zhao, X., & Wang, W. (2021). The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 402. doi: 10.1038/s41392-021-00791-1.
- Humphries, M. J. (2000). Integrin structure. *Biochemical Society Transactions*, 28(4), 311-340.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *cell*, 110(6), 673-687. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00971-6.
- Ikeshima-Kataoka, H., Sugimoto, C., & Tsubokawa, T. (2022). Integrin signaling in the central nervous system in animals and human brain diseases. *International journal of*

- molecular sciences, 23(3), 1435. doi: 10.3390/ijms23031435
- Incerpi, S., Davis, P. J., Pedersen, J. Z., Lanni, A. (2018). Nongenomic Actions of Thyroid Hormones. 10.1007/978-3-319-44675-2_32. In: Belfiore, A., LeRoith, D. (eds) Principles of Endocrinology and Hormone Action. Endocrinology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44675-2_32
- Irrcher, I., Walkinshaw, D. R., Sheehan, T. E., & Hood, D. A. (2008). Thyroid hormone (T3) rapidly activates p38 and AMPK in skeletal muscle in vivo. *Journal of applied physiology*, 104(1), 178-185. doi: 10.1152/japplphysiol.00643.
- Izumi, Y., Wakita, S., Kanbara, C., Nakai, T., Akaike, A., & Kume, T. (2017). Integrin $\alpha 5\beta 1$ expression on dopaminergic neurons is involved in dopaminergic neurite outgrowth on striatal neurons. *Scientific reports*, 7(1), 42111. doi: 10.1038/srep42111.
- Jain, M., Singh, M. K., Shyam, H., Mishra, A., Kumar, S., Kumar, A., & Kushwaha, J. (2021). Role of JAK/STAT in the neuroinflammation and its association with neurological disorders. *Annals of neurosciences*, 28(3-4), 191-200. doi: 10.1177/09727531211070532.
- Joffe, R. T., & Sokolov, S. T. (1994). Thyroid hormones, the brain, and affective disorders. *Critical reviews in neurobiology*, 8(1-2), 45-63.
- Joffe, R. T., Pearce, E. N., Hennessey, J. V., Ryan, J. J., & Stern, R. A. (2013). Subclinical hypothyroidism, mood, and cognition in older adults: a review. *International journal of geriatric psychiatry*, 28(2), 111-118. doi: 10.1002/gps.3796
- Johnson, F. M., & Gallick, G. E. (2007). SRC family nonreceptor tyrosine kinases as molecular targets for cancer therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 7(6), 651-659. doi: 10.2174/187152007784111278.
- Joung YH, Lim EJ, Lee MY, Park JH, Ye SK, Park EU, Kim SY, Zhang Z, Lee KJ, Park DK, Park T, Moon WK, Yang YM. (2005). Hypoxia activates the cyclin D1 promoter via the Jak2/STAT5b pathway in breast cancer cells. *Experimental & molecular medicine*, 37(4), 353-364. doi: 10.1038/emm.2005.45.
- Ju, J. A., Godet, I., Ye, I. C., Byun, J., Jayatilaka, H., Lee, S. J., Gilkes, D. M. (2017). Hypoxia

- selectively enhances integrin $\alpha 5 \beta 1$ receptor expression in breast cancer to promote metastasis. *Molecular Cancer Research*, 15(6), 723-734. doi: 10.1158/1541-7786
- Kagohara, L. T., Stein-O'Brien, G. L., Kelley, D., Flam, E., Wick, H. C., Danilova, L. V., ... & Fertig, E. J. (2018). Epigenetic regulation of gene expression in cancer: techniques, resources and analysis. *Briefings in functional genomics*, 17(1), 49-63. doi: 10.1093/bfpg/elx018.
- Kalia, L. V., Gingrich, J. R., & Salter, M. W. (2004). Src in synaptic transmission and plasticity. *Oncogene*, 23(48), 8007-8016. doi: 10.1038/sj.onc.1208158.
- Katschinski, D. M. (2006). Is there a molecular connection between hypoxia and aging?. *Experimental gerontology*, 41(5), 482-484. doi: 10.1016/j.exger.2005.12.003.
- Kaur, B., Khwaja, F. W., Severson, E. A., Matheny, S. L., Brat, D. J., & Van Meir, E. G. (2005). Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro-oncology*, 7(2), 134-153. doi: 10.1042/BSE0430153.
- Kefalas, P., Brown, T. R. P., & Brickell, P. M. (1995). Signalling by the p60c-src family of protein—tyrosine kinases. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 27(6), 551-563. doi: 10.1016/1357-2725(95)00024-J.
- Kim, J. E., Ryu, H. J., Kim, M. J., Kim, D. W., Kwon, O. S., Choi, S. Y., & Kang, T. C. (2010). Pyridoxal-5'-phosphate phosphatase/chronophin induces astroglial apoptosis via actin-depolymerizing factor/cofilin system in the rat brain following status epilepticus. *Glia*, 58(16), 1937-1948. doi: 10.1002/glia.21063
- Knox, R., Jiang, X. (2015). Fyn in neurodevelopment and ischemic brain injury. *Developmental neuroscience*, 37(4-5), 311-320. doi: 10.1159/000369995
- Koibuchi, N., & Chin, W. W. (2000). Thyroid hormone action and brain development. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 11(4), 123-128. doi: 10.1016/s1043-2760(00)00238-1
- Kvergelidze, E., Barbakadze, T., Mikeladze, D. (2022). Thyroid Hormone T3 Regulates NOX2 activity and BDNF secretion in differentiated PC-12 cells during hypoxia via $\alpha v \beta 3$

- integrin. *Bull Georg Natl Acad Sci*, 16(2), 115-121.
- Kvergelidze, E., Barbakadze, T., Bátor, J., Kalandadze, I., & Mikeladze, D. (2024). Thyroid hormone T3 induces Fyn modification and modulates palmitoyltransferase gene expression through $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin receptor in PC-12 cells during hypoxia. *Translational Neuroscience*, 15(1), 20220347.
- Lee, P., Chandel, N. S., & Simon, M. C. (2020). Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*, 21(5), 268-283. doi: 10.1038/s41580-020-0227-y.
- Leith, J. T., Hercbergs, A., Kenney, S., Mousa, S. A., & Davis, P. J. (2018). Activation of tumor cell integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ by radiation and reversal of activation by chemically modified tetraiodothyroacetic acid (tetrac). *Endocrine Research*, 43(4), 215-219. doi: 10.1080/07435800.2018.1456550
- Li W, Pang Y, Wang Y, Mei F, Guo M, Wei Y, Li X, Qin W, Wang W, Jia L, Jia J. (2023). Aberrant palmitoylation caused by a ZDHHC21 mutation contributes to pathophysiology of Alzheimer's disease. *BMC medicine*, 21(1), 223. doi: 10.1186/s12916-023-02930-7.
- Liang, X., Draghi, N. A., & Resh, M. D. (2004). Signaling from integrins to Fyn to Rho family GTPases regulates morphologic differentiation of oligodendrocytes. *Journal of Neuroscience*, 24(32), 7140-7149. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5319-03.2004.
- Liao, D., Huang, Y., Liu, D., Zhang, H., Shi, X., Li, X., & Luo, P. (2024). The role of s-palmitoylation in neurological diseases: implication for ZDHHC family. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1342830. doi: 10.3389/fphar.2023.1342830.
- Lilja, J.; Ivaska, J. (2018) Integrin Activity in Neuronal Connectivity. *J. Cell Sci.* 131, jcs212803. doi: 10.1242/jcs.212803.
- Lin, H. Y., Cody, V., Davis, F. B., Hercbergs, A. A., Luidens, M. K., Mousa, S. A., Davis, P. J. (2011). Identification and functions of the plasma membrane receptor for thyroid hormone analogues. *Discovery medicine*, 11(59), 337-347.
- Lin, H. Y., Su, Y. F., Hsieh, M. T., Lin, S., Meng, R., London, D., Lin C, Tang HY, Hwang J,

- Davis FB, Mousa SA, Davis, P. J. (2013). Nuclear monomeric integrin α_v in cancer cells is a coactivator regulated by thyroid hormone. *The FASEB Journal*, 27(8), 3209-3216. doi: 10.1096/fj.12-227132
- Lin HY, Sun M, Tang HY, Lin C, Luidens MK, Mousa SA, Incerpi S, Drusano GL, Davis FB, Davis PJ. (2009). L-Thyroxine vs. 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 296(5), C980-C991. doi: 10.1152/ajpcell.00305.2008.
- Lin, H. Y., Tang, H. Y., Davis, F. B., Mousa, S. A., Incerpi, S., Luidens, M. K., Davis, P. J. (2012). Nongenomic regulation by thyroid hormone of plasma membrane ion and small molecule pumps. *Discovery medicine*, 14(76), 199-206.
- Linder, M. E., & Deschenes, R. J. (2007). Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(1), 74-84. doi: 10.1038/nrm2084.
- Liu, F., Lu, Z., Li, Z., Wang, S., Zhuang, L., Hong, M., Huang, K. (2021). Electroacupuncture improves cerebral ischemic injury by enhancing the EPO-JAK2-STAT5 pathway in rats. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2489-2498. doi: 10.2147/NDT.S316136.
- Liu, W., Wang, M., Shen, L., Zhu, Y., Ma, H., Liu, B., Sun, Y. (2021). SHP2-mediated mitophagy boosted by lovastatin in neuronal cells alleviates parkinsonism in mice. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 34. doi: 10.1038/s41392-024-02103-9.
- Liu, Y. Y., & Brent, G. A. (2018). Thyroid hormone and the brain: mechanisms of action in development and role in protection and promotion of recovery after brain injury. *Pharmacology & therapeutics*, 186, 176-185. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.01.007.
- Lou, Z., Wang, A. P., Duan, X. M., Hu, G. H., Song, G. L., Zuo, M. L., Yang, Z. B. (2018). Upregulation of NOX2 and NOX4 mediated by TGF- β signaling pathway exacerbates cerebral ischemia/reperfusion oxidative stress injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 46(5), 2103-2113. doi: 10.1159/000489450.
- Lourbopoulos, A. I., Mourouzis, I. S., Trikas, A. G., Tseti, I. K., & Pantos, C. I. (2021). Effects

- of thyroid hormone on tissue hypoxia: relevance to sepsis therapy. *Journal of Clinical Medicine*, 10(24), 5855. doi: 10.3390/jcm10245855
- Ma MW, Wang J, Zhang Q, Wang R, Dhandapani KM, Vadlamudi RK, Brann DW. (2017) NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders. *Mol Neurodegeneration* 12, 7. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0150-7>.
- Mandal M, Powers SE, Maienschein-Cline M, Bartom ET, Hamel KM, Kee BL, Dinner AR, Clark MR. (2011). Epigenetic repression of the Igk locus by STAT5-mediated recruitment of the histone methyltransferase Ezh2. *Nature immunology*, 12(12), 1212-1220. doi: 10.1038/ni.2136.
- Mao, L. M., & Wang, J. Q. (2016). Tyrosine phosphorylation of glutamate receptors by non-receptor tyrosine kinases: roles in depression-like behavior. *Neurotransmitter* (Houston, Tex.), 3.
- Maraldi Tullia. (2013). Natural Compounds as Modulators of NADPH Oxidases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 271602-271612. <https://doi.org/10.1155/2013/271602>
- Matrone, C., Iannuzzi, F., & Annunziato, L. (2019). The Y682ENPTY687 motif of APP: Progress and insights toward a targeted therapy for Alzheimer's disease patients. *Ageing Research Reviews*, 52, 120-128. doi: 10.1016/j.arr.2019.04.003
- Matrone, C., Petrillo, F., Nasso, R., & Ferretti, G. (2020). Fyn tyrosine kinase as harmonizing factor in neuronal functions and dysfunctions. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4444. doi: 10.3390/ijms21124444.
- Mayerl S, Müller J, Bauer R, Richert S, Kassmann CM, Darras VM, Buder K, Boelen A, Visser TJ, Heuer H. (2014). Transporters MCT8 and OATP1C1 maintain murine brain thyroid hormone homeostasis. *The Journal of clinical investigation*, 124(5), 1987-1999. doi: 10.1172/JCI70324.
- Menon, S., Gupton, S. L. (2016). Building blocks of functioning brain: cytoskeletal dynamics in neuronal development. *International review of cell and molecular biology*, 322, 183-245. doi: 10.1016/bs.ircmb.2015.10.002.
- Minhas, G., Mathur, D., Ragavendrasamy, B., Sharma, N. K., Paanu, V., & Anand, A. (2017).

- Hypoxia in CNS pathologies: emerging role of miRNA-based neurotherapeutics and yoga based alternative therapies. *Frontiers in neuroscience*, 11, 386. doi: 10.3389/fnins.2017.00386.
- Morreale de Escobar, G., Obregón, M. J., & Escobar del Rey, F. (2004). Role of thyroid hormone during early brain development. *European journal of endocrinology*, 151(Supplement_3), U25-U37. doi: 10.1530/eje.0.151u025.
- Morte, B., Gil-Ibáñez, P., & Bernal, J. (2018). Regulation of gene expression by thyroid hormone in primary astrocytes: factors influencing the genomic response. *Endocrinology*, 159(5), 2083-2092. doi: 10.1210/en.2017-03084.
- Mughal, B. B., Fini, J. B., & Demeneix, B. A. (2018). Thyroid-disrupting chemicals and brain development: an update. *Endocrine connections*, 7(4), R160-R186. doi: 10.1530/EC-18-0029.
- Munnamalai, V., Weaver, C. J., Weisheit, C. E., Venkatraman, P., Agim, Z. S., Quinn, M. T., Suter, D. M. (2014). Bidirectional interactions between NOX 2-type NADPH oxidase and the F-actin cytoskeleton in neuronal growth cones. *Journal of neurochemistry*, 130(4), 526-540. doi: 10.1111/jnc.12734.
- Nayernia Z., Jaquet V., Krause K. H. (2014) New insights on NOX enzymes in the central nervous system. *Antioxidants & redox signaling*, 20(17): 2815–2837. doi: 10.1089/ars.2013.5703.
- Nimnual AS, Taylor LJ, Bar-Sagi D. (2003) Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat Cell Biol.* 5(3):236–241. doi: 10.1038/ncb938.
- Nishi, H., Nakada, T., Kyo, S., Inoue, M., Shay, J. W., Isaka, K. (2004). Hypoxia-inducible factor 1 mediates upregulation of telomerase (hTERT). *Mol. Cell. Biol.* 24, 6076–6083. doi: 10.1128/MCB.24.13.6076-6083.2004.
- Núñez, A., Bedregal, P., Becerra, C., & Grob, L. F. (2017). Neurodevelopmental assessment of patients with congenital hypothyroidism. *Revista Medica De Chile*, 145(12), 1579-1587. doi: 10.4067/s0034-98872017001201579.
- Nygaard, H. B., van Dyck, C. H., Strittmatter, S. M. (2014). Fyn kinase inhibition as a novel

- therapy for Alzheimer's disease. *Alzheimer's research & therapy*, 6, 1-8. doi: 10.1186/alzrt238.
- O'Shea, J. J., Gadina, M., Schreiber, R. D. (2002). Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell*, 109(2), S121-S131. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00701-8.
- Osterhout, D. J., Wolven, A., Wolf, R. M., Resh, M. D., & Chao, M. V. (1999). Morphological differentiation of oligodendrocytes requires activation of Fyn tyrosine kinase. *The Journal of cell biology*, 145(6), 1209-1218. doi: 10.1083/jcb.145.6.1209.
- Pan, J., Zhou, L., Zhang, C., Xu, Q., Sun, Y. (2022). Targeting protein phosphatases for the treatment of inflammation-related diseases: From signaling to therapy. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1), 177. doi: 10.1038/s41392-022-01038-3.
- Park YK, Goda Y. (2016). Integrins in synapse regulation. *Nat Rev Neurosci*. 17(12):745-756. doi: 10.1038/nrn.2016.138
- Peers, C., Pearson, H. A., & Boyle, J. P. (2007). Hypoxia and Alzheimer's disease. *Essays in biochemistry*, 43, 153-164. doi: 10.1042/BSE0430153.
- Petrova, V.; Eva, R. (2018). The Virtuous Cycle of Axon Growth: Axonal Transport of Growth-Promoting Machinery as an Intrinsic Determinant of Axon Regeneration. *Dev. Neurobiol.* 78, 898–925. doi: 10.1002/dneu.22608.
- Planey, S. L., Keay, S. K., Zhang, C. O., Zacharias, D. A. (2009). Palmitoylation of cytoskeleton associated protein 4 by DHHC2 regulates antiproliferative factor-mediated signaling. *Molecular Biology of the Cell*, 20(5), 1454-1463. doi: 10.1091/mbc.e08-08-0849.
- Pocheć E, Bubka M, Rydlewska M, Janik M, Pokrywka M, Lityńska A. (2015). Aberrant glycosylation of $\alpha v \beta 3$ integrin is associated with melanoma progression. *Anticancer Res.* 35(4):2093-103.
- Price, L. S., Leng, J., Schwartz, M. A., & Bokoch, G. M. (1998). Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Molecular biology of the cell*, 9(7), 1863-1871. doi: 10.1091/mbc.9.7.1863.

- Ramazi, S., Zahiri, J. (2021). Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. Database, 2021, baab012. doi: 10.1093/database/baab012.
- Raz L, Zhang QG, Zhou CF, Han D, Gulati P, Yang LC, Yang F, Wang RM, Brann DW. (2010) Role of Rac1 GTPase in NADPH oxidase activation and cognitive impairment following cerebral ischemia in the rat. PLoS One. 5(9):e12606. doi: 10.1371/journal.pone.0012606.
- Reinecke, J., & Caplan, S. (2014). Endocytosis and the Src family of non-receptor tyrosine kinases. Biomolecular concepts, 5(2), 143-155. doi: 10.1515/bmc-2014-0003.
- Resh, M. D. (1998). Fyn, a Src family tyrosine kinase. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 30(11), 1159-1162. doi: 10.1016/s1357-2725(98)00089-2.
- Rocha-Perugini, V., Sánchez-Madrid, F., & Martinez del Hoyo, G. (2016). Function and dynamics of tetraspanins during antigen recognition and immunological synapse formation. *Frontiers in immunology*, 6, 653. doi: 10.3389/fimmu.2015.00653.
- Rotty, J. D., Bear, J. E. (2015). Competition and collaboration between different actin assembly pathways allows for homeostatic control of the actin cytoskeleton. *Bioarchitecture*, 5(1-2), 27-34. doi: 10.1080/19490992.2015.1090670.
- Rudd, C. E., Janssen, O., Prasad, K. V. S., Raab, M., da Silva, A., Telfer, J. C., & Yamamoto, M. (1993). Src-related protein tyrosine kinases and their surface receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1155(2), 239-266. doi: 10.1016/0304-419x(93)90007-y.
- Saito, Y. D., Jensen, A. R., Salgia, R., & Posadas, E. M. (2010). Fyn: a novel molecular target in cancer. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 116(7), 1629-1637. doi: 10.1002/cncr.24879.
- Saminathan H, Ghosh A, Zhang D, Song C, Jin H, Anantharam V, Kanthasamy A, Kanthasamy AG. (2021). Fyn kinase-mediated PKC δ Y311 phosphorylation induces dopaminergic degeneration in cell culture and animal models: implications for the identification of a new pharmacological target for parkinson's disease. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 631375. doi: 10.3389/fphar.2021.631375.

- Sandu, R. E., Buga, A. M., Uzioni, A., Petcu, E. B., and Popa-Wagner, A. (2015). Neuroinflammation and comorbidities are frequently ignored factors in CNS pathology. *Neural Regen. Res.* 10, 1349–1355. doi: 10.4103/1673-5374.165208.
- Scarlett A, Parsons MP, Hanson PL, Sidhu KK, Milligan TP, Burrin JM. Thyroid hormone stimulation of extracellular signal-regulated kinase and cell proliferation in human osteoblast-like cells is initiated at integrin α V β 3. *J Endocrinol.* 2008; 196(3): 509-517. doi: 10.1677/JOE-07-0344.
- Schenone, S., Brullo, C., Musumeci, F., Biava, M., Falchi, F., Botta, M. (2011). Fyn kinase in brain diseases and cancer: the search for inhibitors. *Current medicinal chemistry*, 18(19), 2921-2942. doi: 10.2174/092986711796150531.
- Schneider, F., Metz, I., & Rust, M. B. (2023). Regulation of actin filament assembly and disassembly in growth cone motility and axon guidance. *Brain Research Bulletin*, 192, 21-35. doi: 10.1016/j.brainresbull.2022.10.019.
- Seguin, L., Desgrosellier, J. S., Weis, S. M., & Cheresch, D. A. (2015). Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends in cell biology*, 25(4), 234-240. doi: 10.1016/j.tcb.2014.12.006.
- Semenza, G. L. (1999). Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annual review of cell and developmental biology*, 15(1), 551-578. doi: 10.1146/annurev.cellbio.15.1.551.
- Sicheri, F., & Kuriyan, J. (1997). Structures of Src-family tyrosine kinases. *Current opinion in structural biology*, 7(6), 777-785. doi: 10.1016/s0959-440x(97)80146-7.
- Siegrist-Kaiser, C. A., Juge-Aubry, C., Tranter, M. P., Ekenbarger, D. M., & Leonard, J. L. (1990). Thyroxine-dependent modulation of actin polymerization in cultured astrocytes. A novel, extranuclear action of thyroid hormone. *Journal of Biological Chemistry*, 265(9), 5296-5302.
- Sorisky, Alexander. (2016) "Subclinical Hypothyroidism—What is Responsible for its Association with Cardiovascular Disease?" *European Endocrinology* 12, no. 2: 96. doi:

- Sterling, K., Lazarus, J. H., Milch, P. O., Sakurada, T., & Brenner, M. A. (1978). Mitochondrial thyroid hormone receptor: localization and physiological significance. *Science*, 201(4361), 1126-1129. doi: 10.1126/science.210507.
- Stix, R., Lee, C. J., Faraldo-Gómez, J. D., Banerjee, A. (2020). Structure and mechanism of DHHC protein acyltransferases. *Journal of molecular biology*, 432(18), 4983-4998. doi: 10.1016/j.jmb.2020.05.023.
- Storey, N. M., Gentile, S., Ullah, H., Russo, A., Muessel, M., Erxleben, C., & Armstrong, D. L. (2006). Rapid signaling at the plasma membrane by a nuclear receptor for thyroid hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(13), 5197-5201. doi: 10.1073/pnas.0600089103.
- Sulzmaier, F. J., Jean, C., & Schlaepfer, D. D. (2014). FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nature reviews cancer*, 14(9), 598-610. doi: 10.1038/nrc3792.
- Tabaczar, S., Czogalla, A., Podkalicka, J., Biernatowska, A., Sikorski, A. F. (2017). Protein palmitoylation: Palmitoyltransferases and their specificity. *Experimental Biology and Medicine*, 242(11), 1150-1157. doi: 10.1177/1535370217707732.
- Takai, Y., Sasaki, T., Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiological reviews*, 81(1), 153-208. doi: 10.1152/physrev.2001.81.1.153.
- Talhada, D., Santos, C. R. A., Gonçalves, I., Ruscher, K. (2019). Thyroid hormones in the brain and their impact in recovery mechanisms after stroke. *Frontiers in neurology*, 10, 1103. doi: 10.3389/fneur.2019.01103.
- Tan, Z. S., & Vasan, R. S. (2009). Thyroid function and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 16(3), 503-507.
- Tang, X., Feng, Y., & Ye, K. (2007). Src-family tyrosine kinase fyn phosphorylates phosphatidylinositol 3-kinase enhancer-activating Akt, preventing its apoptotic cleavage and promoting cell survival. *Cell Death & Differentiation*, 14(2), 368-377. doi: 10.1038/sj.cdd.4402011.

- Thomas, S. M., & Brugge, J. S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annual review of cell and developmental biology*, 13(1), 513-609. doi: 10.1146/annurev.cellbio.13.1.513.
- Tian, R. H., Bai, Y., Li, J. Y., & Guo, K. M. (2019). Reducing PRLR expression and JAK2 activity results in an increase in BDNF expression and inhibits the apoptosis of CA3 hippocampal neurons in a chronic mild stress model of depression. *Brain research*, 1725, 146472. doi: 10.1016/j.brainres.2019.146472.
- Tian WJ, Jeon SH, Zhu GQ, Kwon EB, Kim GE, Bae WJ, Cho HJ, Ha US, Hong SH, Lee JY, Kim KS, Kim SW. (2021). Effect of high-BDNF microenvironment stem cells therapy on neurogenic bladder model in rats. *Translational Andrology and Urology*, 10(1), 345. doi: 10.21037/tau-20-1072.
- Tse, M. C. L., Liu, X., Yang, S., Ye, K., Chan, C. B. (2013). Fyn regulates adipogenesis by promoting PIKE-A/STAT5a interaction. *Molecular and Cellular Biology*, 33(9), 1797-1808. doi: 10.1128/MCB.01410-12
- Uchida, K., & Suzuki, M. (2021). Congenital hypothyroidism and brain development: association with other psychiatric disorders. *Frontiers in neuroscience*, 15, 772382.
- Valdivia, A., Duran, C., & San Martin, A. (2015). The role of Nox-mediated oxidation in the regulation of cytoskeletal dynamics. *Current pharmaceutical design*, 21(41), 6009-6022. doi: 10.2174/1381612821666151029112624.
- Van Troys, M., Huyck, L., Leyman, S., Dhaese, S., Vandekerkhove, J., & Ampe, C. (2008). Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *European journal of cell biology*, 87(8-9), 649-667. doi: 10.1016/j.ejcb.2008.04.001.
- Vaudry, D., Stork, P. J. S., Lazarovici, P., & Eiden, L. E. (2002). Signaling pathways for PC-12 cell differentiation: making the right connections. *Science*, 296(5573), 1648-1649. doi: 10.1126/science.1071552.
- Visser, W. E., Vrijmoeth, P., Visser, F. E., Arts, W. F. M., van Toor, H., & Visser, T. J. (2013). Identification, functional analysis, prevalence and treatment of monocarboxylate transporter 8 (MCT 8) mutations in a cohort of adult patients with mental

- retardation. *Clinical endocrinology*, 78(2), 310-315. doi: 10.1111/cen.12023. PMID: 22924588.
- Wang, J. Q., Derges, J. D., Bodepudi, A., Pokala, N., & Mao, L. M. (2022). Roles of non-receptor tyrosine kinases in pathogenesis and treatment of depression. *Journal of integrative neuroscience*, 21(1), 25.
- Wang, Y., Wang, D., Zhang, L., Ye, F., Li, M., Wen, K. (2016). Role of JAK-STAT pathway in reducing cardiomyocytes hypoxia/reoxygenation injury induced by S1P postconditioning. *European journal of pharmacology*, 784, 129-136. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.05.024.
- Wang Y, Lou MF. (2009) The regulation of NADPH oxidase and its association with cell proliferation in human lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.50(5):2291–2300. doi: 10.1167/iovs.08-2568.
- Wild, A. R., Hogg, P. W., Flibotte, S., Nasser, G. G., Hollman, R. B., Abazari, D., ... & Bamji, S. X. (2022). Exploring the expression patterns of palmitoylating and de-palmitoylating enzymes in the mouse brain using the curated RNA-seq database BrainPalmSeq. *Elife*, 11, e75804. doi: 10.7554/eLife.75804.
- Wingelhofer B, Neubauer HA, Valent P, Han X, Constantinescu SN, Gunning PT, Müller M, Moriggl R. (2018). Implications of STAT3 and STAT5 signaling on gene regulation and chromatin remodeling in hematopoietic cancer. *Leukemia*, 32(8), 1713-1726. doi: 10.1038/s41375-018-0117-x.
- Yan, L., Cui, Z. (2023). Integrin $\beta 1$ and the repair after nervous system injury. *European Neurology*, 86(1), 2-12. doi: 10.1159/000526690.
- Yang XP, Ghoreschi K, Steward-Tharp SM, Rodriguez-Canales J, Zhu J, Grainger JR, Hirahara K, Sun HW, Wei L, Vahedi G, Kanno Y, O'Shea JJ, Laurence A. (2011). Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. *Nature immunology*, 12(3), 247-254. doi: 10.1038/ni.1995.
- Yeoh, S., Pope, B., Mannherz, H. G., & Weeds, A. (2002). Determining the differences in actin binding by human ADF and cofilin. *Journal of molecular biology*, 315(4), 911-

925. doi: 10.1006/jmbi.2001.5280.

Zhang W, Wang Y, Chen CW, Xing K, Vivekanandan S, Lou MF. (2006) The positive feedback role of arachidonic acid in the platelet-derived growth factor-induced signaling in lens epithelial cells. *Mol Vis* 12; 821–831.

Zieseniss, A. (2014). Hypoxia and the modulation of the actin cytoskeleton–emerging interrelations. *Hypoxia* 2, 11-21. doi: 10.2147/HP.S53575.

Zingler P, Särchen V, Glatter T, Caning L, Saggau C, Kathayat RS, Dickinson BC, Adam D, Schneider-Brachert W, Schütze S, Fritsch J. Palmitoylation is required for TNF-R1 signaling. *Cell Commun Signal*. 2019 Aug 5;17(1):90. doi: 10.1186/s12964-019-0405-8.