თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი

ხელნაწერის უფლებით

მ ა ი ა ს ა რ ა ლ ი ძ ე

პლაფერონი ლბ, როგორც ოქსიდაციური სტრესის რეგულატორი რადიაციული დასხივების დროს

14.00.36 – ალერგოლოგია და იმუნოლოგია

მედიცინის მეცნიერებათა კანდიდატის სამეცნიერო ხარისხის მოსაპოვებლად
წარდგენილი დისერტაციის

ა ვ ტ ო რ ე ფ ე რ ა ტ ი

თბილისი
2006

ნაშრომი შესრულებულია საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის

სამედიცინო ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტში

სამეცნიერო ხელმძღვანელი - **თამარ სანიკიძე,** ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი.

ოფიციალური ოპონენტები: - **ნოდარ გოგებაშვილი,** მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი (14.00.36),

- **ლიანა გოგიაშვილი,** მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი (14.00.15).

დისერტაციის დაცვა შედგება 2006 წლის _____ სთ-ზე თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტის სადისერტაციო საბჭოს M14.10 №5 სხდომაზე (0177, თბილისი, ვაჟა-ფშაველას გამზ., ¹33).

დისერტაციის გაცნობა შესაძლებელია თსსუ-ის ბიბლიოთეკაში (0160, თბილისი, ვაჟა-ფშაველას გამზ., №29).

ავტორეფერატი დაიგზავნა 2006 წლის _____

სადისერტაციო საბჭოს სწავლული მდივანი,

მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი - **თ. ჩიქოვანი**

ნაშრომის ზოგადი დახასიათება

პრობლემის აქტუალობა. სხივური თერაპია მიზანმიმართულად იყენებს მაონიზებელ გამოსხივებას სიმსივნური და არასიმსივნური (ოპერაციის შემდგომი ინფილტრაციული პროცესები, კიდურების შემდგომი ამპუტაციური გართულება, სახსრების ანთებითი და დეგენერაციული ცვლილებები და სხვა) დაავადებების სამკურნალოდ, მაგრამ რადიოთერაპიის ეფექტურობა შეზღუდულია მთელი რიგი რადიომგრძნობიარე (სისხლის წარმომქნელი, იმუნური სისტემა, ეპითელიუმის სხვადასხვა ტიპები, რეპროდუქციული სისტემის ორგანოები და სხვ.) და არარადიომგრძნობიარე ორგანოების დაზიანებასთან დაკავშირებული გართულებებით.

მრავალი კვლევებია ჩატარებული რადიაციული დაზიანების მექანიზმების ბუნებისა და პოსტრადიაციული პროცესების განვითარების შესასწავლად ცოცხალი ორგანიზმის ორგანიზაციის ფიზიკო-ქიმიურ, ბიოქიმიურ და მოლეკულურ დონეზე. ცნობილია, რომ რადიაციული დაზიანების ეს ეტაპები მჭიდროდაა დაკავშირებული თავისუფალრადიკალური რეაქციების მიმდინარეობასთან.

რადიაცია-ინდუცირებული დაზიანების პროცესში წამყვანი როლი ენიჭება ბიოლოგიური მემბრანების ოქსიდაციურ დაზიანებას, რომელიც ხორციელდება მაიონიზებელი რადიაციის ზემოქმედებით გენერირებული ჟანგბადის რეაქციული ნაერთების მეშვეობით. მრავალ კვლევებში ნაჩვენები იქნა, რომ დასხივების დროს იზრდება ლიპიდების პეროქსიდაციის ინტენსივობა, მცირდება ანტიოქსიდანტური ფერმენტების (განსაკუთრებით, კატალაზას და გლუტათიონ ოქსიდაზას) აქტივობა. დადგენილია თიოლშემცველი პროტეინების სტატუსის და Mn-SOD მნიშვნელოვანი როლი უჯრედების პოსტრადიაციული ადაპტაციური პასუხის განვითარებაში (Biaglow J.E., et al., 2003, Guo G., et al., 2003).

სუბუჯრედულ ორგანელათა შორის მიტოქონდრია საკმაოდ მგრძნობიარეა ოქსიდაციური სტრესის მიმართ, რაც განაპირობებს მის მნიშვნელოვან როლს რადიაცია-ინდუცირებული ციტოტოქსიურობის და უჯრედის სიკვდილის განვითარების მექანიზმებში. რადიაცია იწვევს ძლიერი ოქსიდაციური სტრესის განვითარებას როგორც ნორმალური, ასევე სიმსივნური უჯრედების მიტოქონდრიებში. მიტოქონდრიების რედოქს-მდგომარეობის მოდულაციას პოტენციური მნიშვნელობა გააჩნია, როგორც ნორმალურ ქსოვილებში სხივური დაავადების პრევენციის, ასევე სიმსივნის რეგრესიის დროს (Kamat J.P., et al., 1999).

დაგროვებული ექსპერიმენტული მონაცემების ანალიზიდან გამომდინარეობს, რომ γ-დასხივების დროს რადიომგრძნობიარე ორგანოების უჯრედების სრაფი სიკვდილის მიზეზს რადიაცია-ინდუცირებული აპოტოზი წარმოადგენს, რომელიც მიმდინარეობს პროტეინების, p-53 და Bcl-2-ის მონაწილეობით (Mathieu J., et al., 1999). Bcl-2-ის ანტიოქსიდანტური თვისებების გამო მას გააჩნია უჯრედის რედოქს სტატუსის და რედოქს-დამოკიდებული აპოპტოზის რეგულაციის უნარი (Pan Z., et al., 1999). გამოვლენილია Bcl-2-ის ექსპრესიის ინჰიბირება რადიაცია-ინდუცირებული აპოპტოზის აქტივაციის დროს, რაც მიუთითებს ამ პროცესში მიტოქონდრიების მნიშვნელოვანი როლის შესახებ. p-53 იწვევს აპოპტოზის განვითარებას სხვადსხვა გენების ტრანსკრიფციაზე დამოკიდებულ და დამოუკიდებელი გზით, სფინგოლიპიდების, ცერამიდის და ჟანგბადის რეაქციული ნაერთების ჩათვლით. ამ აპოპტოზური გზების რეგულაცია შესაძლებელია მემბრანა შეკავშირებულ

სფინგომიელინაზას ინჰიბირებით და ცერამიდ ინდუცირებული აპოპტოზური კასკადის ინიციაციის გზით (Zavodnik L.B., et al., 2003).L

რადიაციის ზემოქმედების დროს აპოპტოზური სიგნალის აღმოცენება დამოკიდებულია არა მხოლოდ რადიაციის დოზაზე, არამედ პოსტრადიაციული ოქსიდაციური სტრესის ინტენსივობაზე (Lyng F.M., et al., 2001). ამასთან, აპოპტოზის რეგულაციისათვის განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია ქსოვილოვანი ანტიოქსიდანტების და არა ოქსიდანტების აქტივობა. ნაჩვენები იქნა, რომ რადიაციის ზემოქმედების დროს ცერამიდის აკუმულაცია და გლუტათიონის შემცველობის დაქვეითება განპირობებულია p-53-ის გააქტივებით (El-Assaad W., et al., 2003). ამასთან დაკავშირებით ინტერესს წარმოადგენს ორგანიზმში რადიაციული ზემოქმედების საპასუხოდ ანტიოქსიდანტური სისტემის ცვლილებების და პროაპოპტოზური მარკერის p-53-ის ექსპრესიის ინტენსივობის შესწავლა.

რადიაციული დაზიანების პათოგენეზში NO-ს მნიშვნელოვანი როლი ენიჭება. რადიაციული დაზიანების დროს NO ასრულებს დუალურ, რადიოპროტექტორულ და რადიოტოქსიურ როლს. NO-ს რადიოპროტექტორული როლი, განპირობებულია ამ მოლეკულის ანტიოქსიდანტური თვისებებით (Gisone P., et al., 2003), ხოლო რადიაცია-ინდუცირებულ დაზიანებას საფუძვლად უდევს რადიაცია-ინდუცირებული ოქსიდაციური სტრესის პირობებში NO-ს ციტოტოქსიურ პეროქსინიტრიტად ბიოლოგიური დეგრადაცია (Soloviov A. I., 2003). დადგენილია NO-ს ინჰიბიტორების რადიაცია-ინდუცირებული აპოპტოზის პრევენციული მოქმედება, რომლელსაც საფუძვლად უდევს დაღმავალი კასპაზების ინჰიბირება მიტოქონდრიების დაზიანების ხარისხის შემცირების გზით (Chen Y., et al., 2001).

პრეპარატ პლაფერონ ლბ-ს ახასიათებს მკვეთრად გამოხატული მემბრანოპროტექტორული მოქმედება, განპირობებული ამ პრეპარატის არა რეაქციული ჟანგბადის სკავენჯერის (ანტიოქსიდანტური) თვისებებით, არამედ მისი შიგაუჯრედოვანი რედოქს-სტატუსის რეგულაციის უნარით. წინასწარ ექსპერიმემტულ კვლევებზე დაყრდნობით შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ ამ მექანიზმს საფუძვლად უდევს მიტოქონდრიული სატრანსპორტო ჯაჭვის გადამტანების რედოქს მდგომარეობის სტაბილიზაცია. უჯრედის (ქსოვილის) რედოქს სტატუსის შენარჩუნება განაპირობებს მასში როგორც რედოქს მგრძნობიარე ფაქტორების (NF-kappa-B) სტაბილიზაციას და ინდუცირებადი NOS-ის ექსპრესიის შეზღუდვას, ასევე უკვე სინთეზირებული აზოტის ჟანგის პეროქსინიტრიტად ტრანცფორმაციის დაქვეითებას და ამ სასიგნალო მოლეკულის ფიზიოლოგიური ფუნქციის შენარჩუნებას.

მრავალ კვლევებში ნაჩვენები იქნა პლაფერონ ლბ-ს ზემოქმედებით სისხლის ანტიოქსიდანტური სისტემის მაჩვენებლების (ცერულოპლაზმინი-ტრანსფერინი) ნორმალიზაცია, დაქვეითებული Fe^{3+}-ტრანსფერინის და NO-ს შემცველობის აღდგენა, რაც U ხელს უწყობს ორგანიზმში NO-რეგულირებადი რკინის მეტაბოლიზმის ნორმალიზაციას და რკინაშემცველი ცილების სინთეზის და მასზე დამოკიდებული პროლიფერაციული პროცესების ინტენსივობის აღდგენას (Chavchanidze D., et al., 1998, ჯავახიშვილი ნ., და სხვ., 2001, Mamamtavrishvili N., et al., 2002, Shakarashvili R., Sanikidze T., et al., 2003., Мегреладзе, И.И., и др., 2004). ამავე დროს ნაჩვენები იქნა, რომ პლაფერონ ლბ-ს გააჩნია სიმსივნურ უჯრედებში აპოპტოზის გააქტივების უნარი (Bachitashvili a., et al., 2001). აღნიშნული თვისებების გამო ჩვენ გადავწყვიტეთ შევისწავლოთ Pპლაფერონ ლბ-ს ეფექტურობა რადიაციული დაზიანების დროს.

ზემოთთქმულიდან გამომდინარე **შრომის მიზნად** დავისახეთ რადიაციული დაზიანების განვითარების მოლეკულური მექანიზმების და პრეპარატ პლაფერონ ლბ-ს პროტექტორული და სამკურნალო მოქმედების ეფექტურობის დადგენა რადიაციული დაზიანების დროს.

აღნიშნული მიზნის მისაღწევად დაისახა **შემდეგი ამოცანები**:

1. რადიაციული დაზიანების მოლეკულური მექანიზმების დადგენა, რისთვისაც ერთჯერადი დასხივების პირობებში შესწავლილ იქნა:

ა) დასხივებული ვირთაგვების ღვიძლში მიტოქონდრიული სუნთქვის ინტენსივობა და ელექტრონების სატრანსპორტო ჯაჭვის მთლიანობა, ელექტრონულ-პარამაგნიტური (ეპრ) სიგნალები (უბისემიქინონების, NADH დეჰიდროგენაზას FeS ცენტრების, ქსანტინოქსიდაზას), რკინის შემცველი პარამაგნიტური კომპლექსების (Fe^{2+}, Fe^{3+}-ტრანსფერინი), აზოტის ჟანგის მეტაბოლიზმის (თავისუფალი NO, Hb-NO, FeS-NO), თავისუფალრადიკალური ჟანგვის ინტენსივობის (სპინმონიშნული ჟანგბადის და ლიპიდების თავისუფალი რადიკალების, აზოტის ჟანგის) ამსახველი პარამეტრები;

ბ) დასხივებული ვირთაგვების ღვიძლში პროაპოპტოზური ცილა p-53-ის შემცველობა;

ვ) დასხივებული ვირთაგვების სისხლში ანტიოქსიდანტური ფერმენტების (ცერულოპლაზმინის, Fe^{3+}-ტრანფერინის, კატალაზას, გლუტათიონ-რედუქტაზას, სუპეროქსიდდისმუტაზას) და პროოქსიდანტური სისტემის (Mn^{2+}, Fe^{2+} იონების, ლიპიდების და ჟანგბადის თავისუფალი რადიკალების, აზოტის ჟანგის) და აგრეთვე Met-Hb, დეზოქსიჰემოგლობინის NO-სთან კომპლექსების (Hb-NO) შემცველობის ამსახველი პარამეტრები;

გ) დასხივებული ვირთაგვების სისხლში საერთო ქოლესტეროლის, ტრიგლიცერიდების და დაბალი სიმკვრივის ლიპოპროტეიდების (LDL) შემცველობის ამსახველი პარამეტრები;

დ) დასხივებული ვირთაგვების სისხლში ერითროციტების დეფორმაბელობის ამსახველი პარამეტრები.

2. დასხივებულ ვირთაგვებზე ყველა შესწავლილ (ზემოთ ჩამოთვლილ) პარამეტრზე ანტიოქსიდანტური ბუნების ტრადიციული რადიოპროტექტორის, C ვიტამინის და პლაფერონ ლბ-ს მაკორეგირებელი პრევენციული და სამკურნალო მოქმედების ეფექტურობის და მექანიზმების შესწავლა.

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე:

- პირველადაა შესწავლილი პლაფერონ ლბ-ს რადიოპროტექროტორული მოქმედების მექანიზმები ერთჯერადი ძლიერი რადიციული დასხივების დროს;

- დადგენილია, რომ ჰეპატოციტების პირველადი (1 საათის შემდეგ) γ-რადიაციული დაზიანება პოსტრადიაციული ოქსიდაციური სტრესის განვითარების შედეგს წარმოადგენს, რომელიც ლიპოპეროქსიდაციის ჯაჭვური რეაქციების ინიციაციას განაპირობებს. ჰეპატოციტების γ-რადიაციული დაზიანების მე-2 ეტაპზე (დასხივებიდან 24 საათის შემდეგ) ადგილი აქვსLლიპოპეროქსიდაციის ჟაჭვური რეაქციების ინტენსიფიკაციას, ჰეპატოციტების დაზიანების ხარისხის გაღრმავებას, მიტოქონდრიული ელექტრონების სატრანსპორტო ჯაჭვის მუშაობის დარღვევას NADH:უბიქინონ-ოქსიდორედუქტაზულ უბანზე, რკინის იონების განთავისუფლებას,

NO-ს გაძლიერებულ წარმოქმნას და ოქსიგენ- ნიტროგენული სტრესით ინდუცირებული p53-დამოკიდებული აპოპტიზის განვითარებას;

- დადგენილია, რომ პლაფრონ ლბ- პრე- და პოსტრადიაციული ზემოქმედების დროს უზრუნველყოფს ორგანიზმის რედოქს–ჰომეოსტაზის აღდგენას და NO-ს მეტაბოლიზმის ნორმალიზაციას;

- გამოვლენილია პლაფერონ ლბ-ს NO-ინდუცირებული ცილა p53-ის აქტივაციის და NO-დამოკიდებული p53-ინდუცირებული აპოპტოზის პრევენციის უნარი.

დაცვაზე გამოტანილი ძირითადი დებულებები.

1. ორგანიზმის რადიაციაინდუცირებული დაზიანების მექანიზმს საფუძვლად უდევს ჟანგბადის თავისუფალი რადიკალების ჭარბი წარმოქმნა და ანტიოქსიდაციური დაცვის სისტემის აქტივობის ცვლილებები. რადიოინდუცირებული თავისუფალრადიკალური ჯაჭვურ პროცესები მემბრანული სტრუქტურების დაზიანებას, უჯრედული მეტაბოლიზმის დარღვევას, აზოტის ჟანგის გაძლიერებულ წარმოქმნას, ჟანგვითი ჰომეოსტაზის მოშლას, აპოპტოზის და ნეკროზის განვითარებას და γ-ინდუცირებული დაზიანების პროგრესირებას განაპირობებენ.

2. პლაფრონ ლბ პრე- და პოსტრადიაციული ზემოქმედების დროს ორგანიზმის რედოქს–ჰომეოსტაზის აღდგენას და NO-ს მეტაბოლიზმის ნორმალიზაციას, NO-ინდუცირებული ცილა p53-ის აქტივაციის და NO-დამოკიდებული p53-ინდუცირებული აპოპტოზის პრევენციას უზრუნველყოფს.

ნაშრომის პრაქტიკული ღირებულება.

ექსპერიმენტში ვირთაგვებზე გამოვლენილი პლაფერონ ლბ-ს რადიოპროტექტორული მოქმედების ეფექტურობა და მოქმედების მექანიზმები საშუალებას გვაძლევენ რეკომენდაცია გავუწიოთ ამ პრეპარატის გამოყენებას რადიოთერაპიის დროს რადიოპროტექტორის სახით.

ნაშრომის აპრობაცია.

დისერტაციის ძირითადი დებულებები მოხსენებულია საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის სამედიცინო ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტის ბიოტექნოლოგიისა და იმუნოლოგიის განყოფილების გაერთიანებულ სხდომაზე. ოქმი ¹2 (3 თებერვალი, 2006 წ.)

პუბლიკაციები.

სადისერტაციო თემის ირგვლივ გამოქვეყნებულია …3 სამეცნიერო ნაშრომი, მათ შორის 3 საერთაშორისო მიმოქცევის ჟურნალებში.

დისერტაციის მოცულობა და სტრუქტურა.

სადისერტაციო ნაშრომი შეიცავს 120 ნაბეჭდ გვერდს. შედგება თავებისაგან: შესავალი, ლიტერატურის მიმოხილვა, კვლევის მასალა და მეთოდები, საკუთარი გამოკვლევები, მიღებული შედეგების განხილვა, დასკვნები და პრაქტიკული რეკომენდაციები. დისერტაცია ილუსტრირებულია 8 დიაგრამით, 9 ფოტოსურათით, 8 ცხრილით. გამოყენებული ლიტერატურის ნუსხა მოიცავს 187 წყაროს.

კვლევის მასალა და მეთოდები

1. **რადიაციული დასხივება.**

ექსპერიმენტი ტარდებოდა ზრდასრულ მდედრობითი სქესის თეთრ ვირთაგვებზე, წონით 180-200 გ. (90 ვირთაგვა). ექსპერიმენტული ცხოველები დაყოფილი იყო 6 ჯგუფად:

I ჯგუფი - საკონტროლო ცხოველები (15 ვირთაგვა);

II ჯგუფი – რადიაციული დასხივება (15 ვირთაგვა);

III ჯგუფი – რადიაციული დასხივება + C ვიტამინი (15 ვირთაგვა);

IV ჯგუფი – რადიაციული დასხივება + პლაფერონი ლბ (15 ვირთაგვა);

V ჯგუფი – C ვიტამინი + რადიაციული დასხივება (15 ვირთაგვა);

VI ჯგუფი – პლაფერონი ლბ + რადიაციული დასხივება (15 ვირთაგვა).

ექსპერიმენტულ ცხოველებს უტარდებოდა ერთჯერადი γ-რადიოთერაპია დოზით 6 Gr აპარატი АГАТ РС მეშვეობით. რადიოპროტექტორები (C ვიტამინი და პლაფერონი ლბ) ცხოველებში შეგვყავდა კუნთებში დასხივებისთანავე და დასხივებიდან 18 საათის შემდეგ (3 და 4 ჯგუფები) და დასხივებამდე 5 დღის განმავლობაში (5 და 6 ჯგუფი) დოზებით 0, 40 მგ/კგ და 0,25 მგ/კგ, შესაბამისად. ცხოველებს ვკლავდით ეთერის ნარკოზის ქვეშ დასხივებიდან 1 და 24 საათის შემდეგ.

2. **ბიოქიმიური კვლევები.**

Kსისხლის შრატში კატალაზას აქტივობის განსაზღვრა

ანტიოქსიდანტურ ფერმენტ კატალაზას აქტივობას ვსაზღვრავდით Aebi-ის მეთოდით (1984), რომელიც მოდიფიცირებული იქნა М. А. Королюк, Л. И. Иванова-ს და სხვების მიერ (1988) სპექტროფოტომეტრი СФ-46 ЛОМО-ს გამოყენებით.

სისხლის შრატში სუპეროქსიდდისმუტაზას (სოდ) აქტივობის განსაზღვრა

სუპეროქსიდდისმუტაზის (სოდ) აქტივობას ვსაზღვრავდით Fრიედ-ის (1970) მეთოდით, რომელიც მოდიფიცირებული იყო Е. В. Макаренко-ს მიერ (1988).

სისხლის შრატში ქოლესტეროლის და ტრიგლიცერიდების და დაბალი სიმკრივის ლიპოპროტეიდების (LDL) განსაზღვრა. სიხხლის პლაზმაში ქოლესტეროლის და ტრიგლიცერიდების შემცველობას ვსაზღრავდით Acctrend-GCT ტიპის (Roche-ს ფირმა) რეფლექტოფოტომეტრის გამოყენებით.

ელექტრონული პარამაგნიტური რეზონანსის (ეპრ) სპექტროსკოპული კვლევები.

ეპრ კვლევები ტარდებოდა რადიოსპექტრომეტრზე РЭ-1307 (რუსეთი), რომელიც ოპერირებს ზემაღალი სიხშირის არეში 9.77 GHz მოდულაციის სიხშირით 50 kHz , თხევადი აზოტის (-196^{0}C) ტემპერატურაზე..

ვსაზღრავდით სისხლის და ღვიძლის ეპრ სპექტრებს. სისხლში ისაზღვრებოდა პროოქსიდანტური (ცვალებადი ვალენტობის მქონე იონების (Mn^{2+} (g_1=2,14), Fe^{2+} (g=2,37, ΔH=350Гс), მეთჰემოგლობინის (MetHb) g=6,0) და ანტიოქსიდანტური (ცერულოპლაზმინის (g=2,05), Fe^{3+}-ტრანსფერინის (g=4,3)) სისტემების ეპრ სიგნალები (Пулатова М.К., и др., 1999). სპექტრების რეგისტრაცია ტარდებოდა მოდულაციის ამპლიტუდაზე 0,6 мТ მიკროტალღოვანი გამოსხივების სიმძლავრეზე 100 мВт.

ღვიძლში ვსაზღრავდით მიტოქონდრიული სუნთქვის (ფლავინების და უბიქინონების სემიქინონური ფორმების (g=2,00) და რკინაგოგირდოვანი (FeS) ცენტრების (g=1,94) ეპრ სიგნალები) მაჩვენებლებს, მიკროსომული ციტოქრომ P-450-ის (g=2,25), Mn^{2+} შემცველი ცენტრების (g-2,14) ეპრ სიგნალებს.

სისხლში და ღვიძლში თავისუფალი აზოტის ჟანგის განსაზღვრის მიზნით ვიყებენდით სპინ-ხაფანგს ნატრიუმის დიეთილდითიოკარბამატს (DETC) (SIGMA). DETC (დოზით 500 მგ/კგ) და Fe^{2+}-ციტრატი (50 მგ$FeSO_{4+}$· $6H_2O$+ 250 მგ ნატრიუმის ციტრატი კგ-1) შეგვყავდა ინტრაპერიტონიალურად (Beltran B., et al., 2000). ცხოველებს ვკლავდით სპინხაფანგის შეყვანიდან …10 წუთის შემდეგ; NO-Fe^{2+}-$(DETC)_2$ კომპლექსების ეპრ სპექტრები ისაზღვრებოდა თხევადი აზოტის ტემპერატურაზე მიკროტალღოვან სიმძლავრეზე 20 мВт (Галаган М.Е., Киладзе А.Ф., 1997, Meng F., Lowell C.A., 1997).

სისხლში და ღვიძლში პეროქსიდრადიკალების (LOO·) განსაზღვრის მიზნით ვიყენებდით სპინხაფანგს α-ფენილ-*tert*ბუტილნიტრონ (PBN) (SIGMA), რომელიც შეგვყავდა ინტრაპერიტონიალურად დოზით 10 მგ/კგ (Sweet M.J., Hume D.A., 1996). ცხოველებს ვკლავდით სპინხაფანგის შეყვანიდან 10 წუთის შემდეგ. LOO·-ს ეპრ სპექტრებს ვსაზღრავდით ოთახის ტემპერატურაზე მიკროტალღოვან სიმძლავრეზე 20 мВт.

სისხლში ჟანგბადის თავისუფალი რადიკალების (სუპეროქსიდ-რადიკალების) განსაზღვრის მიზნით ვიყენებდით სპინ-ხაფანგს 5,5 დიმეთილ-I-პიროლინ-IV-ოქსიდი (DMPO) (SIGMA). ვაწარმოებდით სისხლის ინკუბაციას DMPO-თან (დოზით 50 mM на 1 მლ სისხლზე) 3 წუთის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე (Sweet M.J., Hume D.A.. J. Leukocite Biol., 1996, v. 60, p. 8-26.). სუპეროქსიდრადიკალების ეპრ სპექტრებს ვსაზღრავდით ოთახის ტემპერატურაზე მიკროტალღოვან სიმძლავრეზე 20 мВт.

ერითროციტების მემბრანის დეფორმაბელობის უნარის განსაზღვრა. ერითროციტების მემბრანის დეფორმაბელობის უნარის გამოკვლევას კომპიუტერული ფილტრაციულ-ფოტომეტრული მეთოდის გამოყენებით ვაწარმოებდით (ხულუზაური ო., ტყეშელაშვილი ბ., 1990).

ჰისტოლოგიური კვლევები.

უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის შეფასებისათვის ვიყენებდით იმუნოჰისტოქიმიურ მეთოდს – უჯრედის ბირთვში პროაპოპტოზური მარკერის ცილა p53-ის გამოვლინებას თაგვის IgG-2b კლასის მონონუკლეალური ანტისხეულების A(Novo-Castra, კატალოგის RTU-p53-D07) გამოყენებით. რეაქციის პროდუქტების ფიქსაცია ხდებოდა ფირმა Novo-Castra უნივერსალურ შრატებში და სტრეპტოვიდინ-პეროქსიდაზას კომპლექსში (Novostain Universal Quick Kit, ფირმა Novo-Castra, კოდი NCL-RTU-QU); ვიზუალიზაციას ვაწარმოებდით 3,3-დიაბენზიდინტეტრაქლორიდში (DAB; 0,5 mg/ml; pH 7,6; 0,001% H_2O_2, BD Biosciences Pharmingen).

მიღებული შედეგები და მათი განხილვა

როგორც ცნობილია, რადიო- და ქიმიოთერაპიის შესაძლებლობები შეზღუდულია იმ მძიმე გართულებებით, რომლებიც დაკავშირებულია რადიომგრძნობიარე ქსოვილების დაზიანებასთან. დაგროვებული ექსპერიმენტული მონაცემების ანალიზიდან გამომდინარეობს, რომ γ-დასხივების დროს რადიომგრძნობიარე ორგანოების უჯრედების სრაფი სიკვდილის მიზეზს ცილა p-53-ზე დამოკიდებული აპოპტოზის განვითარება წარმოადგენს (Assaad W, 2003). არსებობს მოსაზრება, რომ რადიაციაინდუცირებული სტრესის განვითარების პირველი საათების განმავლობაში ცილა p-53-ის ფუნქციონირების დათრგუნვა, შესაძლოა შეამცირებს ნორმალური

ქსოვილების დაზიანებას რადიოთერაპიის დროს. სწორედ ასეთი ანტიაპოპტოზური მოქმედების მქონე პრეპარატების გამოვლინებას ეძღვნება ჩვენი ნაშრომი. როგორც უკვე აღვნიშნეთ, ჩვენს მიზანს შეადგენდა პლაფერონ ლბ-ს რადიოპროტექროტორული ეფექტის დადგენა ერთჯერადი ძლიერი რადიციული დასხივების დროს.

უჯრედებზე რადიაციული ზემოქმედების დროს მნიშვნელოვანი როლი ენიჭება ბიოლოგიური მემბრანების ჟანგვით დაზიანებას, რომელიც ხორციელდება მაიონიზირებელი რადიაციის მიერ გენერირებული ჟანგბადის თავისუფალი რადიკალების მეშვეობით.

ჩვენი კვლევების შედეგებიდან გამომდინარეობს, რომ γ-დასხივებული (დოზით 6 Gr) ვირთაგვების სისხლში დასხივებიდან 1 და 24 საათის შემდეგ მკვეთრად იზრდება სუპეროქსიდრადიკალების (O_2^-) და ლიპოპეროქსიდების (LOO·) შემცველობა, რაც მათი სპინ-მონიშნული ეპრ სიგნალების მომატებით ვლინდება და თავისუფალრადიკალური ჟანგვის პროცესების ინტენსიფიკაციის შესახებ მეტყველებს (დიაგრამა №1). შესაბამისად, იცვლება სისხლის ანტიოქსიდანტური სისტემის აქტივობა. კატალაზას აქტივობა დასხივებიდან ერთი საათის შემდეგ 71%-ით, ხოლო 24 საათის შემდეგ – 96%-ით მცირდება; სუპეროქსიდდისმუტაზას და გლუტათიონრედუქტაზას აქტივობა კი იზრდება და დაკვირვების დაწყებიდან 24 საათისათვის შეადგენენ საკონტროლო მაჩვენებლების, შესაბამისად, 166% და 160%-ს. (დიაგრამა №2). მკვეთრად იზრდება დაჟანგული ცერულოპლაზმინის და მცირდება Fe^{3+}-ტრანსფერინის შემცველობა. ეს მონაცემები მეტყველებენ რადიაციული ზემოქმედების დროს ორგანიზმში პრო- და ანტიოქსიდანტურ სისტემებს შორის დისბალანსის განვითარების შესახებ.

დასხივებული ცხოველების სისხლის ეპრ სპექტრში დასხივებიდან 1 და 24 საათის შემდეგ ვლინდება Mn^{2+}-შემცველი კომპლექსების ინტენსიური ეპრ სიგნალი, რაც ლიპოპეროქსიდების (LOO·) ეპრ სიგნალის გამოჩენასთან ერთად მემბრანული სტრუქტურების დაზიანებაზე მიუთითებს (დიაგრამა [1]3). რადიაცია-ინდუცირებული ოქსიდაციური სტრესის განვითარება იწვევს ცხიმოვანი მჟავების რეორგანიზაციას, რაც თავის მხრივ განაპირობებს მემბრანების ბიოფიზიკური თვისებების შეცვლას, ლიპიდური მატრიქსის დენადობის შემცირებას, ლიპიდურ-ცილოვანი მემბრანული ზედაპირის სიხისტის მომატებას (Benderitter M., et al., 2002). რადიაციის შემდგომი დესტრუქციული პროცესები ვითარდება მემბრანის როგორც ჰიდროფობურ, ასევე ჰიდროფილურ შრეებში (Shadyro O.I., et al., 2000).

რადიაციული გამოსხივების ზემოქმედების შემდეგ ვირთაგვების სისხლში ჩვენს მიერ გამოვლენილია ერითროციტების დეფორმაბელობის უნარის შემცირება და მეთჰემოგლობინის დაგროვება: დასხივებიდან ერთი საათის შემდეგ ერითროციტების დეფორმაბელობა 28%-ით მცირდება, მეთჰემოგლობინის შემცველობა 25%-ით იზრდება; დასხივებიდან 24 საათის შემდეგ ერითროციტების დეფორმაბელობის მაჩვენებელი მცირდება კიდევ 24%-ით, ხოლო სისხლში მეთჰემოგლობინის შემცველობა 135%-ით მატულობს საკონტროლო მაჩვენებლებთან შედარებით (დიაგრამა №4; 5).

დასხივებული ვირთაგვების ერითროციტული მემბრანების ჟანგვითი დაზიანების შედეგს სისხლში მეთჰემოგლობინის მკვეთრი მომატება წარმოადგენს. მეთჰემოგლობინის დაგროვება სისხლში Fe^{3+}-ტრანსფერინის შემცველობის მკვეთრი შემცირების და ერითროპოეზის დაქვეითების ფონზე ორგანიზმში ჰიპოქსიის

განვითარების და თავისუფალრადიკალური ჟანგვის ინტენსიფიკაციის ახალ პათოგენეზურ რგოლს წარმოადგენს.

როგორც ცნობილია, ცოცხალ ორგანიზმში ქოლესტეროლი მონაწილეობს მრავალ ფიზიოლოგიურ პროცესებში, მათ შორის, განაპირობებს უჯრედული მემბრანების მორფო-ფუნქციურ და პლასტიურ თვისებებს, უზრუნველყოფს მათ სიხისტეს, შერჩევით განვლადობას და ამ გზით ხელს უწყობს უჯრედთა შიგთავსის სტაბილობის შენარჩუნებას. ქოლესტეროლის მონაწილეობა მემბრანების განვლადობის რეგულაციაში ხორციელდება მათი დენადობის და მემბრანული პოტენციალის ცვლილების მეშვეობით (Крылов В.И. и др., 1985). დადგენილია, რომ მემბრანული ლიპიდების რადიაცია-ინდუცირებული დაზიანების დროს ადგილი აქვს ქოლესტეროლის სტრუქტურულ ცვლილებებს, ხოლო დაზიანების ხარისხი დამოკიდებულია ამ აგენტების კონცენტრაციაზე (Mishra K.P., 2004).

ჩვენს მიერ გამოვლენილი დასხივებული ცხოველების სისხლის პლაზმაში საერთო ქოლესტეროლის შემცველობის მკვეთრი მომატება (დიაგრამა №6). ლიპოლიზის გაძლიერების და ამ ნაერთის მემბრანებიდან გაძლიერებული განთავისუფლების შედეგს წარმოადგენს. ქოლესტეროლის მემბრანული სტრუქტურებიდან განთავისუფლება განპირობებული შეიძლება იყოს მემბრანების ლიპიდების პეროქსიდაციური პროცესების ინიციაციით, მათი ლიპიდო-ცილოვანი მატრიქსის სტრუქტურული ცვლილებებით, ქოლესტეროლსა და მემბრანის სხვა კომპონენტებს შორის კავშირების შესუსტებით ან დარღვევით.

ერითროციტების მემბრანებში ქოლესტეროლის შემცველობის შემცირება განაპირობებს მათი სიხისტეს და დენადობის დაქვეითებას, სისხლის უჯრედების დეფორმაბელობისა და რეზისტენტობის შემცირებას.

მაშასადამე, ჩვენი შედეგების ანალიზის საფუძველზე შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ რადიაციული დაზიანებისათვის დამახასიათებელი თავისუფალრადუკალური ჟანგვის პროცესების ინტენსიფიკაცია ორგანიზმში ლიპოლიზის აქტივაციას და ერითროციტების ფუნქციებისა და სტრუქტურის შეცვლას განაპირობებს, რაც მათი დეფორმაბელობის დაქვეითებით და მეთჰემოგლობინის დაგროვებით ვლინდება.

ღვიძლი – ორგანიზმის მრავალფუნქციური ორგანოა, ის ორგანიზმში მეტაბოლიზმის საკვანძო რგოლებს არეგულირებს. ჰეპატოციტების მეტაბოლიზმის დარღვევა ლიპიდური ცვლის, ცილების სინთეზის, დეტოქსიკაციური და მრავალი სხვა პროცესების მოშლას განაპირობებს. ამის გარდა, ჰეპატოციტები შეიცავენ რკინას დიდი რაოდენობით და მათი დაზიანება ორგანიზმში რკინის იონების მიერ ინიცირებული თავისუფალრადიკალური ჟანგვის ინტენსიფიკაციის საშიშროებას ქმნის.

სხვა ქსოვილებთან შედარებით ღვიძლი რადიორეზისტენტური ორგანოა. მას არ ახასიათებს განსაკუთრებული მაღალი მგრძნობელობა რადიაციული დასხივების მიმართ. ჩვენი კვლევების შედეგებიდან გამომდინარეობს, რომ ვირთაგვების რადიაციული დასხივებიდან 1 საათის შემდეგ ღვიძლის ქსოვილში ადგილი აქვს ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის ზომიერ ინტენსიფიკაციას, რაც ღვიძლის ეპრ სპექტრში ლიპოპეროქსიდების ($LOO^{\cdot}$) და Mn^{2+} იონების დაბალი ინტენსივობის ეპრ სიგნალების გამოჩენით ვლინდება; ადგილი აქვს ციტოქრომ P-450-ზე დამოკიდებული დეტოქსიკაციური პროცესების ინტენსიფიკაციას, რაც ფერიციტოქრომ P-450-ის ეპრ სიგნალის შემცირებას განაპირობებს (დიაგრამა№7). ცნობილია, რომ რადიაცია იწვევს მიკროსომული ციტოქრომ P-450-ის დესტრუქციას და მის კონვერსიას ინაქტივირებულ

ციტოქრომ P-420-ად, ლიპიდების პეროქსიდაციის ინტენსიფიკაციას, მემბრანული SH-ჯგუფების დაჟანგვას (Zavidnik L.B., 2003). დასხივებიდან 24 საათის შემდეგ ღვიძლის ეპრ სპექტრში იზრდება ($LOO^{\cdot}$) და Mn^{2+} იონების ეპრ სიგნალების ინტენსივობა, ადგილი აქვს მიტოქონდრიული ელექტრონების სატრანსპორტო ჯაჭვში ელექტრონების ტრანსპორტის დარღვევას NADH:უბიქინონ-ოქსიდორედუქტაზულ უბანზე (რაც უბისემიქინონების დაგროვებით და აღდგენილი NADH-დეჰიდროგენაზას მომატებით ვლინდება).ანუ, მიღებული შედეგების ანალიზიდან გამომდინარეობს, რომ ჰეპატოციტების პირველადი დაზიანება წარმოადგენს პოსტრადიაციული ოქსიდაციური სტრესის განვითარების შედეგს, რომელიც ლიპოპეროქსიდაციის ჯაჭვური რეაქციების ინიციაციას და ჰეპატოციტების მემბრანების დაზიანებას განაპირობებს. ლიპოპეროქსიდების მიერ ინიცირებული ჟაჭვური რეაქციის ინტენსიფიკაციის შედეგად ღრმავდება ჰეპატოციტების დაზიანების ხარისხი. დასხივებიდან 24 საათის შემდეგ სახეზეა მიტოქონდრიული და მიკროსომული ელექტრონების სატრანსპორტო ჯაჭვების დარღვევა. აღსანიშნავია, რომ წარმოქმნილი NADH:უბიქინონ-ოქსიდორედუქტაზას კომპლექსი თვით სუპეროქსიდ-რადიკალების მძლავრ გენერატორს წარმოადგენს. ჟანგვითი სტრესით განპირობებული მემბრანული პროტეინების რადიაცია-ინდუცირებული მოდიფიკაცია დამოკიდებულია გარდამავალი ჯგუფის მეტალთა იონების კონცენტრაციაზე (Khalil A.V., Fulop T., 2001). უკანასკნელი განაპირობებს ცვალებად ვალენტოვან მეტალთა ატომების ქელატორების რადიოპროტექტორულ თვისებებს (Gueiman L.R., et al., 2004, Badzhinian S.A., et al., 2004). ჰეპატოციტების დაზიანების შედეგად რკინის დეპოდან უჯრდთაშორის არეში განთავისუფლებული რკინის იონები თავისუფაკრადიკალური ჟანგვის ინტენსიფიკაციის დამატებით წყაროს წარმოადგენს.

მაშასადამე, ორგანიზმის რადიაციაინდუცირებული დაზიანების პათოგენეზში ჟანგბადის თავისუფალ რადიკალებს მნიშვნელოვანი როლი ენიჭება. უჯრედების პოსტრადიაციული საპასუხო რეაქცია ვლინდება ანტოქსიდაციური დაცვის სისტემის აქტივობის ცვლილებებით, რაც მრავალი ლიტერატურული მონაცემებით მტკიცდება (Biaglow J.E., et al., 2003, Guo G., et al., 2003, Ustinova A.a., Riabinin V.E., 2003). რადიაციული ზემოქმედების დროს ჟანგბადის თავისუფალი რადიკალების სიჭარბით განპირობებული მემბრანებული სტრუქტურების დაზიანება უჯრედული მეტაბოლიზმის დარღვევას, ჰომეოსტაზის მოშლას და ოქსიდაციური სტრესის განვითარებას განაპირობებს. ჰეპატოციტების γ-ინდუცირებული დაზიანების პროგრესირებაში რადიოინდუცირებულ თავისუფალრადიკალურ ჯაჭვურ პროცესებს მნიშვნელოვანი როლი ენიჭება.

რადიაცია-ინდუცირებული დაზიანების პათოგენეზში აზოტის ჟანგს მნიშვნელოვანი როლი ნიჭება (Lestaevel P. et al., 2003). ნაჩვენები იქნა, რომ რადიაციული ზემოქმედების დროს NO-ს შეუძლია როგორც რადიოპროტექციის, ასევე რადიოტოქსიურობის გამოვლინება, რაც განპირობებულია ამ მოლეკულის მაღალი რეაქციულობით. NO-ს მოქმედების ხასიათი დამოკიდებულია ორგანიზმის რედოქს-სტატუსზე.

ჩვენი კვლევების შედეგებიდან გამომდინარეობს, რომ დასხივებიდან 1 საათის შემდეგ სისხლში და ღვიძლში თავისუფალი აზოტის ჟანგის შემცველობა მკვეთრად მცირდება (დიაგრამა №8), რაც განპირობებული შეიძლება იყოს სუპეროქსიდრადიკალთან ინტენსიური ურთიერთქმედების შედეგად მისი

პეროქსინიტრიტად ტრანსფორმაციით. შემდგომში, დასხივებიდან 24 საათის შემდეგ, სისხლში აზოტის ჟანგის შემცველობა იწყებს მომატებას, რაც განპირობეული შეიძლება იყოს ჟანგვითი სტრესის მიერ ინდუცირებული NO-სინთაზას გაძლიერებული ექსპრესიით. ლიტერატურაში არსებობს მონაცემები დასხივების ზემოქმედებიდან 24 საათის შემდეგ iNOS აქტივობის და ნიტრიტ/ნიტრატების შემცველობის მნიშვნელოვნი მომატების შესახებ (Lestaevel P. et al., 2003). ანუ რადიაციას გააჩნია NO-ერგულ სისტემაზე ზემოქმედების უნარი. ამ დროს ღვიძლის ეპრ სპექტრში ჰემური და არაჰემური რკინის ნიტროზილირებული კომპლექსების ინტენსიური ეპრ სიგნალები ვლინდება (დიაგრამა №7 (ბ)), რაც აზოტის ჟანგის გაძლიერებული პროდუქციის შედეგს წარმოადგენს.

აზოტის ჟანგი – უმნიშვნელოვანესი ბიოლოგიური მოლეკულაა, რომელიც მონაწილეობს მრავალი ბიოლოგიური პროცესების რეგულაციაში, იმუნური პასუხის, ციტოტოქსიურობის, ნეიროტრანსმისიის და ვაზოდილატაციის ჩათვლით (Aloni-Grinstein R. et al., 1995). NOS სელექტიური ინჰიბიტორების გამოყენების საფუძველზე ნაჩვენებია, რომ რადიოინდუცირებული NO-ს შემცველობის მომატება ხორციელდება ინდუცირებული NO-სინთაზას ხარჯზე. დადგინილია, რომ რადიაცია-ინდუცირებული NO-ს სინთეზის გაძლიერებას საფუძვლად უდევს რედოქს-მგრძნობიარე NF-kappaB-ს აქტივაცია და iNOS ექსპრესიის გაძლიერება. რადიაციული დაზიანების დროს NO ასრულებს დუალურ, რადიოპროტექტორულ და რადიოტოქსიურ როლს. NO-ს რადიოპროტექტორული როლი, განპირობებულია ამ მოლეკულის ანტიოქსიდანტური თვისებებით (Gisone P., et al., 2003). ნაჩვენებია, რომ NO-ს დონორის შეყვანა ამცირებს HeLa უჯრედებში ქრომოსომულ აბერაციებს (Zhong G.Z., et al., 2004). ამავე დროს, რადიაცია-ინდუცირებუულ დაზიანებას საფუძვლად უდევს რადიაცია-ინდუცირებული ოქსიდაციური სტრესის პირობებში NO-ს ციტოტოქსიურ პეროქსინიტრიტად ბიოლოგიური დეგრადაცია (Soloviov A. I., 2003). ნაჩვენებია, აგრეთვე, iNOS ინჰიბიტორის, L-NAME-ს რადიოპროტექტორული ეფექტი, რომელიც შეიძლება განპირობებული იყოს iNOS მიერ რეაქციული ჟანგბადის ექსპრესის შეზღუდვით (Giliano N.I., et al., 2004). დადგენილია NO-ს ინჰიბიტორების რადიაცია-ინდუცირებულ აპოპტოზის პრევენციული მოქმედება, რომელსაც საფუძვლად უდევს დაღმავალი კასპაზების ინჰიბირება მიტოქონდრიების დაზიანების ხარისხის შემცირება და p-53-ის აქტივაციის დათრგუნვა (Chen Y., et al., 2001).NNO-ს მონაწილეობით მიმდინარე ბიოლოგიური რეაქციებს შორის აღსანიშნავია დნმ-ის დაზიანება (Christersson L.A., et al., 1987, Comayras C.C., et al., 1997, Cortes0Bratti X., et al., 2001). NO-ს მაღალი კონცენტრაციები იწვევენ დეოქსინუკლეოტიდების დეამინირებას (Christersson L.A., et al., 1987) და მუტაციების განვითარებას (Dulie V., et al., 1994). NO-ინდუცირებული დნმ-ის დაზიანება მიმდინარეობს სხვადსხვა მექანიზმების მეშვეობით ნიტროზური დეამინირების (Wink D.A., et al., 1991), დნმ-ის ძაფის გაწყვეტის (Gorsdorf S., AppelK.E., Engeholm C., Obe G. Carcinogenesis., 1990, 11, 37-41) და პეროქსინიტრიტით ინდუცირებული ჟანგვითი დაზიანების ჩათვლით (Beckman J.S., et al., 1994). ამ დროს DNA-ს რადიაციული დაზიანების საპასუხოდ გააქტივებული პოლი(ADP-რიბოზა) პოლიმერაზა (PARP) წარმოადგენს ოქსიდაციური სტრესის ინტენსიფიკაციის დამატებით წყაროს (Ibuki Y., et al., 2003, Conde C., et al., 2001). NOOაგრეთვე მონაწილეობს სიმსივნურ უჯრედებში ციტოკინ- და აქტივირებული მაკროფაგების მიერ ინდუცირებული აპოპტოზის განვითარებაში (Dyson N.P., et al., 1989).

როგორც წესი, UF-, მაიონიზირებლი გამოსხივების და ზოგიერთი ეგზოგენური მუტაგენებით ინიცირებული დნმ-ის დაზიანება და დნმ-ის ჯაჭვის გაწყვეტა ხორციელდება ცილა Pp53–ს მონაწილეობით (Hartwell L.H., et al., 1989). ცილა p53-ის აქტივაცია რეგულირდება პოსტტრანსლაციურ დონეზე. სტრესორული ზემოქმედების შედეგად ადგილი აქვს ცილა p53-ის სტაბილიზაციას და დაგროვებას ბირთვში, სადაც ის DNA-ს სპეციფიურ მონაკვეთებთან შეკავშირების შედეგად რიგი p53-რეგულირებადი გენების (p21/Waf-1, 14-3-3-σ, *bax*, და ა.შ.) ტრანსკრიფციას ამოდულირებს. ცილა p53 ააქტივებს, ზრდის მარეგულირებელ გენებს, მაგალითად, p21WAF-1/Cip1, GADD45, ციკლინ G-ს, რაც იწვევს უჯრედის ციკლის არესტს G_1 ფაზაში (Forrester K., et al., 1996, Kastan M.B., et al., 1994), აპოპტოზის განვითარებაში მონაწილე გენების, მაგალითად, *bax,* ტრანსკრიფციას. ამის გარდა, p53-ს შეუძლია დნმ-ის რეპარაციულ სისტემასთან ურთიერთქმედება, დაზიანებული დნმ-ის რეპარაცია, ან უჯრედების აპოპტოზის რეგულაცია (Clarke A.R., 1993, Lane D.P., 1992). NO-ს ინდუციბელური იზოფორმა (iNOS) წარმოქმნის NO-ს მაღალ კონცენტრაციებს ოქსიდაციური სტრესის და პროანთებითი ციტოკინების ზემოქმედებით, პოტენციურად უზრუნველყოფს ციტოტოქსიურობას, დნმ-ის დაზიანებას და ქსოვილის დესტრუქციას. ნაჩვენებია, რომ NO-ს შეუძლია p53–ის ექსპრესიის და აპოპტოზის განვითარების ინიციაცია, რაც მეტყველებს იმის შესახებ, რომ NO-ინდუცირებული აპოპტოზი მიმდინარეობს დნმ-ის დაზიანებით და p53–ის აკუმულაციის გზით (Mesmer U.K., et al., 1994). p53-ის პროაპოპტოზური ტრანსკრიპციული აქტივობის მომატება ხორციელდება NH_2Fტერმინალის სერინ 15-ის NO-ინდუცირებული ფოსფორილირების გზით, რომელიც ხორციელდება დნმ-დამოკიდებული პროტეინკინაზას და p38 მიტოგენ აქტივირებული პროტეინკინაზას სტიმულაციის მეშვეობით (Abraham J, et al., 1999; Brooks CL, Gu W ., 2003, Schneiderhan N, et al., 2003, Unger T, et al., 1999). Forrester K. და თანაავტორებმა აჩვენეს, რომ p53 ასრულებს მნიშვნელოვან როლს iNOS გენის ექსპრესიის და მაშასადამე, NO-ს პოტენციურად მუტაგენური და კანცეროგენური აქტივობის რეგულაციაში. p53 მნიშვნელოვან როლს ასრულებს გენომის შენარჩუნების პროცესში.

ჟანგბადის რეაქციულ ნაერთებს, აგრეთვე, მნიშვნელოვანი როლი ენიჭება p53 – დამოკიდებული აპოპტოზის ინიციაციაში (Li P.-F., et al., 1999).

γ--დასხივებული ვირთაგვების ღვიძლში დასხივებიდან 24 საათის შემდეგ პარენქიმის შესწავლილ უბნებში ექსტრა- და შეგაუჯრედოვანი შეშუპების ფონზე გვხდება ჰეპატოციტები დისტროფიის სხვადასხვა სტადიაზე. ზოგიერთ მათგანში, განსაკუთრებით ცენტრალური ვენების ირგვლივ გამოვლენილია ნეკრობიოტური ცვლილებები ნეკროზის ჩათვლით.

ჰეპატოციტები მიეკუთვნებიან უჯრედების სტაბილურ პოპულაციას, შედარებით დაბალი პროლიფერაციული აქტივობით. ამის გამოK γ-დასხივების ზემოქმედების დროს ღვიძლის ქსოვილში p53–დამოკოდებული აპოპტოზი არ ატარებს მასიურ ხასიათს, როგორც რადიომგრძნობიარე ორგანოებში. თუმცა, განსაზღვრული რაოდენობის ჰეპატოციტების და მეზენციალური წარმოშობის უჯრედების, მაკროფაგების, ბირთვებში ექსპრესირდება ცილა p53. დასხივებული ვირთაგვების ღვიძლის ცენტრალური ვენის კედელში, კერძოდ, ინტიმაში, გამოვლენილია ცილა p53-ის სუსტი ექსპრესია; მაკროფაგებში (კუპფერის უჯრედებში) პროაპოპტოზური ცილა p53-ის ექსპრესია გაძლიერებულია. უჯრედების ზომები გაზრდილია, ყველგან

აღინიშნება ცილა p53-ის ექსპრესია. აღსანიშნავია, რომ p53-ის ექსპრესიის სიხშირე იზრდებოდა ღვიძლის ცენტრალობულარული წილიდან პრეპორტალურ ზონამდე. ზოგიერთ ჰეპატოციტებში გამოვლენილია აპოპტოზური სხეულაკები, რაც მეტყველებს უჯრედის ბირთვის ფრაგმენტაციის შესახებ. ნეკროზის და ჰეპატოციტების ჰომოგენიზაციის კერებში პროაპოტოზური ცილის p53-ის ექსპრესია იყო უარყოფითი.

მაშასადამე, როგორც ჩვენი კვლევის შედეგებიდან გამომდინარეობს, დასხივებული ვირთაგვების ჰეპატოციტებში ოქსიდაციური სტრესის და აზოტის ჟანგის სინთეზის ინტენსიფიკაცია განაპირობებს ცილა p53–ის გაძლიერებულ ექსპრესიას, ღვიძლის ქსოვილში აპოპტოზის და ნეკროზის ინტენსიფიკაციას. ლიტერატურული მონაცემების და ჩვენი კვლევების შედეგების ანალიზის საფუძველზე შეგვიძლია გავაკეთოთ დასკვნა, რომ:

1. რადიაციული დაზიანების პათოგენეზში ოქსიდაციურ სტრესს მნიშვნელოვანი როლი ენიჭება;
2. მიტოქონდრიების მაღალი მგრძნობელობა რადიაცია-ინდუცირებული ოქსიდაციური სტრესის მიმართ ამ ორგანელების მნიშვნელოვან როლს განაპირობებს რადიაცია-ინდუცირებული აპოპტოზის განვითარების მექანიზმში;
3. NO-ს ციტოპროტექტორული და ციტოტოქსიური თვისებების გამოვლინება რადიაციული დაზიანების დროს დამოკიდებულია ოქსიდაციური სტრესის ინტენსივობაზე და ორგანიზმის ანტიოქსიდანტური დაცვის პოტენციალზე.

ზემოთქმულიდან გამომდინარე, ქსოვილების რადიაციული დაზიანების დროს აპოპტოზის ინჰიბიციის მიზნით მიზანშეწონილია ანტიოქსიდანტური, NO-მამოდულირებელი აქტივობის მქონე პრეპარატების გამოყენება. ჩვენ შევისწავლეთ საყოველთაოდ მიღებული რადიოპროტექტორის, C ვიტამინის და პლაფერონ ლბ-ს პრევენციული და პოსტრადიაციული დაცვითი ეფექტები.

ჩვენი კვლევის შედეგებიდან გამომდინარეობს, რომ C ვიტამინი თავისი ანტიოქსიდანტური აქტივობის გამო თუმცა ხელს უწყობს კატალაზას, გლუტათიონრედუქტაზას და ცერულოპლაზმინის აქტივობის აღდგენას, მაგრამ სისხლში სუპეროქსიდრადიკალების და ლიპოპეროქსიდების მაღალი შემცველობის ფონზე ვერ უზრუნველყოფს სოდ-ის აქტივობის და Fe^{3+}-ტრანსფერინის შემცველობის ნორმალიზაციას. პლაფერონი ლბ–ს როგორც წინასწარმა, ასევე პოსტრადიაციულმა გამოყენებამ განაპირობა კატალაზას, სოდ-ის, გლუტათიონრედუქტაზას აქტივობის სტაბილიზაცია, ცერულოპლაზმინის აქტივობის აღდგენა და Fe^{3+}-ტრანსფერინის დონის მომატება დასხივებული ცხოველების სისხლში. Pპლაფერონ ლბ-ს Fe^{3+}-ტრანსფერინის შემცველობაზე მასტიმულირებული მოქმედება გამოვლენილი იყო ადრინდელ კვლევებშიც თირკმლის ლიპოტრიფსიის და ვირუსული B ჰეპატიტის დროს (PavliaSvili D., et al., 2000, Chavchanidze D., et al., 1998). როგორც ცნობილია, ტრანსფერინის ექსპრესია რეგულირდება HIF-1α-ს (hipoxia inducible factor) მიერ ინდუცირებული IRP (airon responsive protein) და IRE (iron responsive element) შორის ურთიერთქმედებით, რომელიც ტრანსფერინის გენის ექსპრესიის აქტივაციას განაპირობებს. Aამ პროცესის ინდუქცია NO-დამოკიდებული მექანიზმით ხორციელდება. დადგენილია, რომ ოქსიდაციური სტრესის პირობებში NO-ს პეროქსინიტრიტად რედოქს-დამოკიდებული ტრანსფორმაციის შედეგად ადგილი აქვს ციტოზოლური აკონიტაზას ნიტროლიზირებას, რომელიც IRP-ად გარდაიქმნება. IRP-ი რედოქს-დამოკიდებულად უკავშირდება ტრანსფერინის რეცეპტორს (ჰიპოქსიის

პირობებში) და ფერიტინის (ოქსიდაციური სტრესის დროს) mRNA-ის IRE-ს და ამ ცილების სინთეზის სუპრესია-ექსპრესიის ინტენსივობის რეგულაციას უზრუნველყოფს (Турпаев А., 2000). აქედან ნათლად ჩანს, რომ პლაფერონ ლბ-ს Fe^{3+}-ტრანსფერინზე მასტიმულირებელი მოქმედება განპირობებულია ამ პრეპარატის ორგანიზმის ჟანგვითი ჰომეოსტაზის და NO-ს აქტივობის რეგულაციით. პლაფერონ ლბ-ს პრევენციული გამოყენების შედარებით მაღალი ეფექტურობა განპირობებული შეიძლება იყოს პრეპარატის გამოყენებით შედარებით ხანგრძლივი დროის განმავლობაში (5 დღე).

რადიაციაინდუცირებული დაზიანების დროს ვიტამინ C და პლაფერონ ლბ-თი პრე- და პოსტრადიაციული გამოყენების პირობებში ჟანგბადის, ლიპიდების, და აზოტის ჟანგის თავისუფალი რადიკალების შემცველობა მცირდება საკონტროლო…ჯგუფის შესაბამის მაჩვენებლებთან შედარებით. შესაბამისად, მცირდება ერითროციტების ოქსიდაციური დაზიანების ხარისხი, რაც ვლინდება ბიოლოგიური მემბრანების ლიპიდური მატრიქსის, ჟანგბადის თავისუფალი რადიკალების მიერ ინდუცირებული სტრუქტურული დარღვევების შემცირებით და ერითროციტების დეფორმაბელობის უნარის მომატებით საკონტროლო მაჩვენებლების დონემდე. ერითროციტების დეფორმაბელობის უნარის შენარჩუნება სისხლის რეოლოგიური თვისებების ნორმალიზაციას უწყობს ხელს. აღსანიშნავია, რომ თხევადი არეების ძლიერი ანტიოქსიდანტი, ვიტამინი C, თუმცა ზრდის ერითროციტების დეფორმაბელობის ხარისხს, ვერ უზრუნველყოფს ერითროციტების ჰემოლიზისაგან დაცვას, რაც მეთჰემოგლობინის მაღალი შემცველობით ვლინდება. პლაფერონ ლბ-ს ზემოქმედებით მცირდება ერითროციტების ჰემოლიზის ხარისხი, რაც ამ პრეპარატის ზემოქმედებით უჯრედების მემბრანების სტაბილიზაციის შედეგს წარმოადგენს.

აღსანიშნავია, რომ ერითროციტების დეფორმაბელობაზე გამოყენებული რადიოპროტექტორების დადებითი ზემოქმედების მიუხედავად, სისხლის პლაზმაში ქოლესტეროლის და ტრიგლიცერიდების დონე მაღალი რჩება. Eეს მონაცემები საშუალებას გვაძლევს ვივარაუდოთ, რომ ჩვენს ექსპერიმენტებში ქოლესტეროლის მომატების ძირითად მიზეზს არა ერითროციტების მემბრანების დაზიანება, არამედ, მთელი ორგანიზმის დონეზე ლიპიდური ცვლის დარღვევა წარმოადგენს, რაც რადიაციაინდუცირებული ჟანგვითი სტრესის პირობებში ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის დარღვევით და ლიპოლიზის ინტენსიფიკაციითაა განპირობებული.

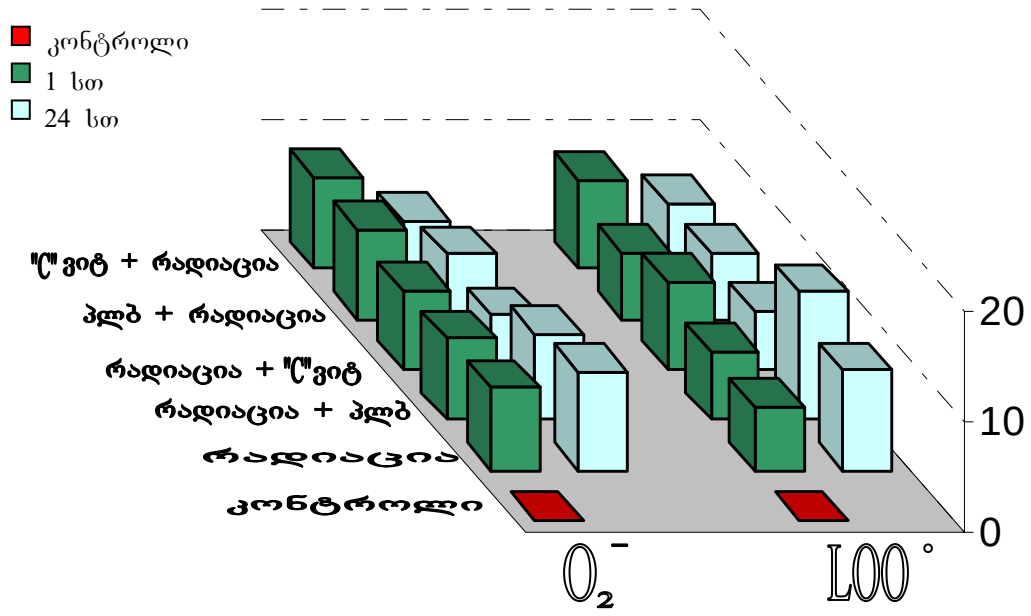
C ვიტამინის და პლაფერონ ლბ-ს პრევენციული ზემოქმედების დროს დასხივებული ცხოველების სისხლში თავისუფალი NO-ს შემცველობა იზრდება საკონტროლო მაჩვენებლის დონემდე. C ვიტამინის პოსტრადიაციული შეყვანა აღმოჩნდა არაეფექტური; პლაფერონ ლბ-ს პოსტრადიაციული ზემოქმედების ფონზე თავისუფალი NO-ს შემცველობა სტატისტიკურად სარწმუნოდ მატულობს. ვვარაუდობთ, რომ პლაფერონ ლბ-ს ასეთი მოქმედების მექანიზმი მდგომარეობს არა NO-ს პეროქსინიტრიტად რედოქს-დამოკიდებული ტრანსფორმაციის პრევენციაში (რასაც ადგილი აქვს C ვიტამინის შემთხვევაში), არამედ განპირობებულია ამ პრეპარატის NO-ს სინთეზზე მამოდულირებელი მოქმედებით, შესაძლოა ბირთვული ფაქტორების და გენების რეგულაციის დონეზე, რასაც პრეპარატის გარშემო ჩატარებული მრავალი კვლევები ადასტურებს (Gongadze M. et al., 2001, Нозадзе Л., и др., 2005, Насрашвили М. И др., 2005).

ღვიძლის ქსოვილში პლაფერონ ლბ-ს წინასწარი და პოსტრადიაციული ზემოქმედების პირობებში ადგილი აქვს მიტოქონდრიული ელექტრონების

სატრანსპორტო ჯაჭვის აღდგენას, აზოტის ჟანგის მეტაბოლიზმის კორექციას და მისი შემცველობის შენარჩუნებას საკონტროლო მაჩვენებლების დონეზე (დიაგრამა 6). ეს განპირობებული უნდა იყოს, პირველ რიგში, პრეპარატის ანტიოქსიდანტური, მემბრანამასტაბილიზირებელი თვისებებით (Бахуташвили З. В., и др., 2004, Мегреладзе И.И., и др., 2004, Джавахишвили Н., и др., 2001, Саралидзе М.А., и др., 2005). დასხივებიდან 1 საათის შემდეგ ჟანგვითი მეტაბოლიზმის კორექციის საშუალებით პლაფერონ ლბ ამცირებს ჟანგბადის თავისუფალი რადიკალების პოსტრადიაციული წარმოქმნის ინტენსივობას და აზოტის ჟანგის პეროქსინიტრიტად ტრანსფორმაციის პრევენციას უზრუნველყოფს. დასხივებიდან 24 საათის შემდეგ პლაფერონ ლბ ზღუდავს პოსტრადიაციული ოქსიდაციური სტრესით და სხვა ფაქტორებით ინდუცირებული iNOS-ის გაძლიერებულ ექსპრესიას და ხელს უწყობს ღვიძლის ქსოვილში მისი შემცველობის შემცირებას (Мегреладзе И.И., и др., 2004, Джавахишвили Н., и др., 2001, Gongadze M., et al., 2002). ამ ფაქტს დიდი მნიშვნელობა ენიჭება, ვინაიდან NO მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ქსოვილების რადიომგრძნობელობის მომატების დროს. როგორც ცნობილია, ცილა p-53-ის პროაპოპტოზური ტრანსკრიპციული აქტივაცია განპირობებულია NO-ინდუცირებული დნმ-დამოკიდებული პროტეინ კინაზას და p38 მიტოგენაქტივირებული პროტეინკინაზას აქტივაციით და 15 в NH_2 ტერმინალის ფოსფორილირებით (Abraham J, et al., Brooks CL, Gu W., 2003, Schneiderhan N, et al., 2003, Unger T, et al., 1999).

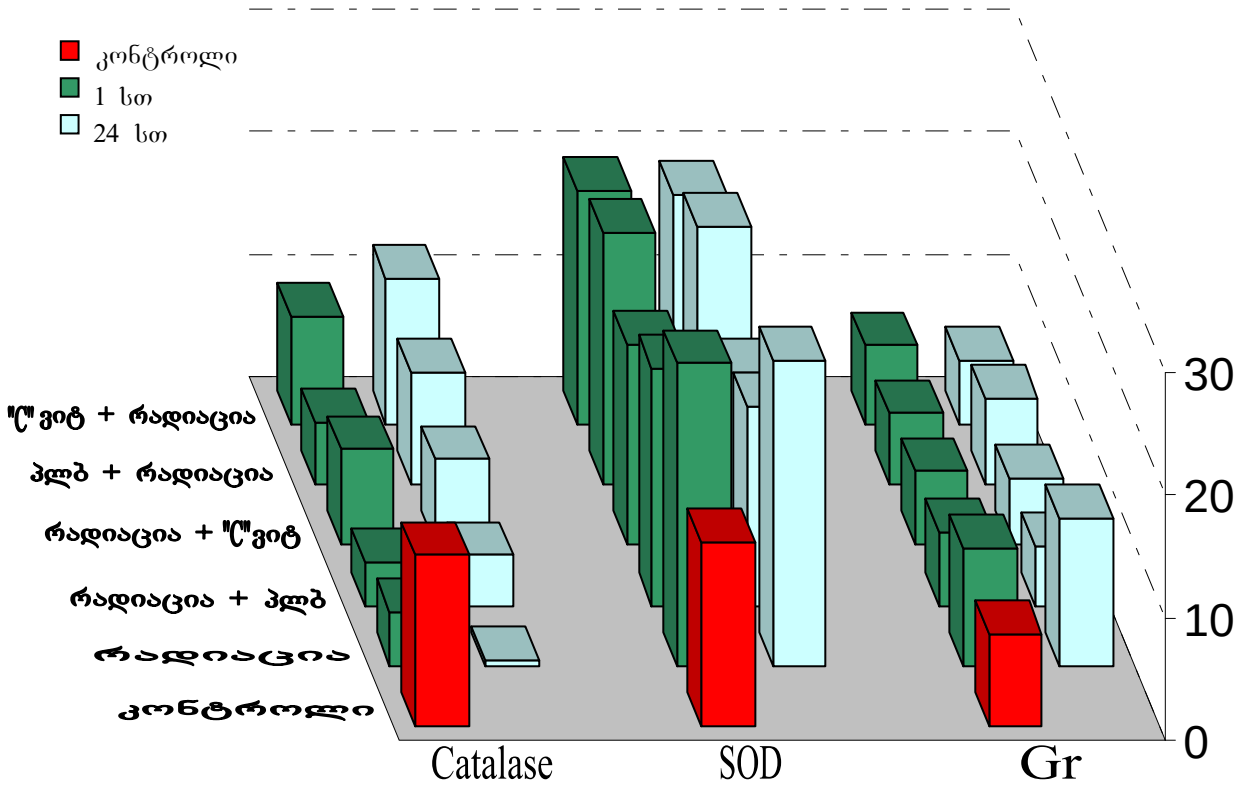
დიაგრამა 1

ვირთაგვას სისხლში O_2^- და LOO· ეპრ სიგნალების ინტენსივობის ცვლილებები



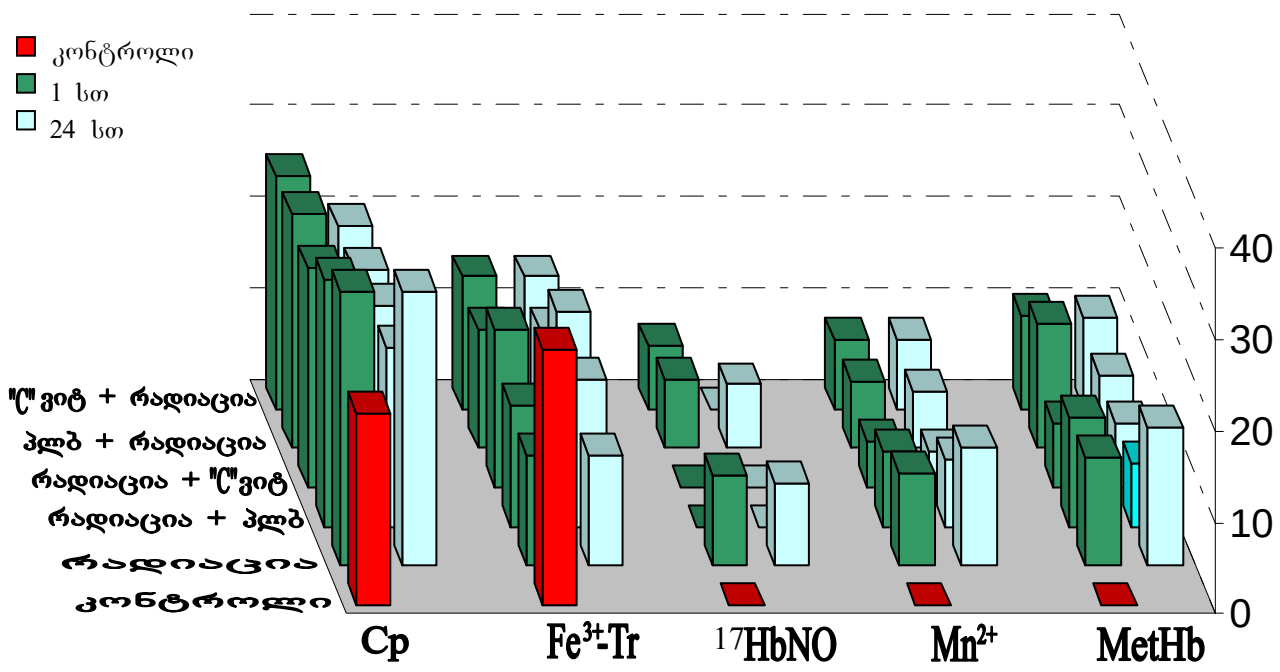
დიაგრამა №2

ვირთაგვების სისხლისAანტიოქსიდანტური ფერმენტების (კატალაზას, სოდ-ის და გრ-ას) აქტივობის რადიაცია ინდუცირებული ცვლილებები და მისი კორექცია C ვიტამინის და პლაფერონ ლბ-ს მეშვეობით



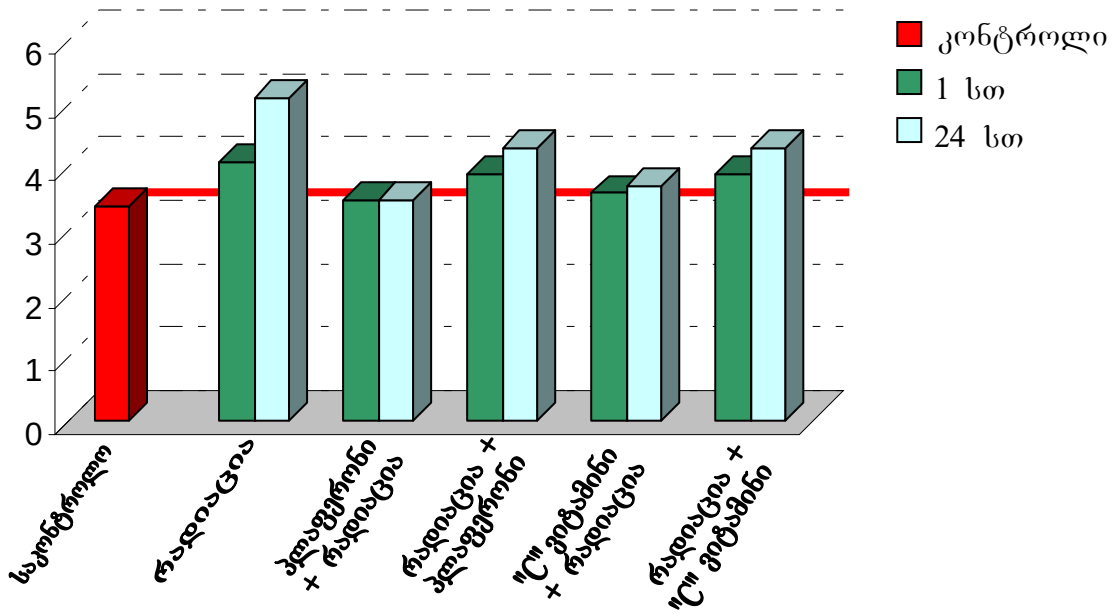
დიაგრამა 3

ვირთაგვის სისხლისAპრო- და ანტიოქსიდანტური სისტემის აქტივობის გამომხატველი ეპრ სიგნალების ინტენსივობის ცვლილებები რადიაციის ზემოქმედების დროს



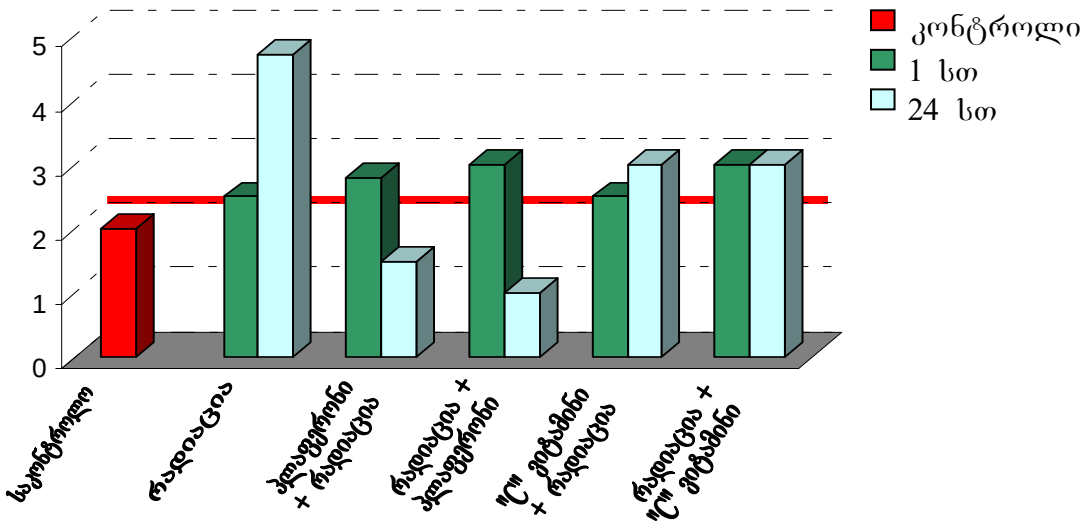
დიაგრამა №4

მოყვანილია სისხლში ერითროციტების დეფორმაბელობის ცვლილებები γ-სხივების, პლაფერონ ლბ-ს და “C” ვიტამინის ზემოქმედების დროს.



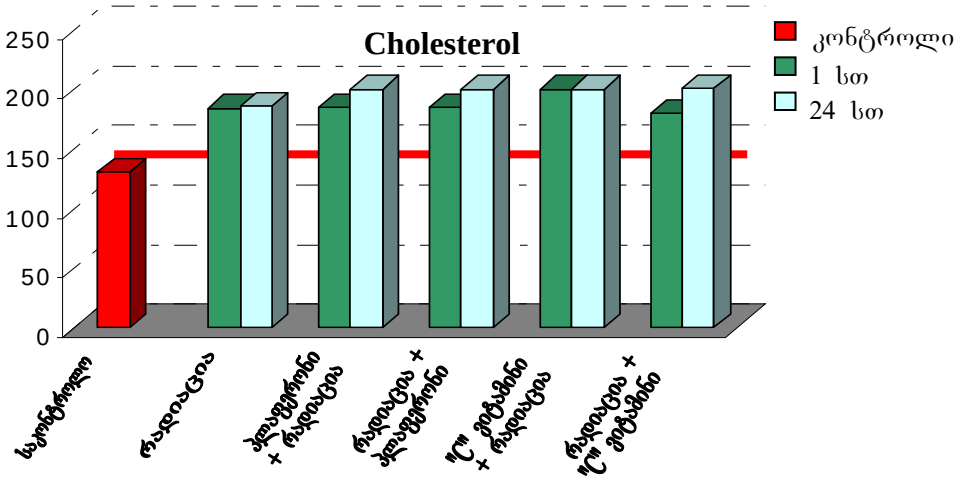
დიაგრამა №5

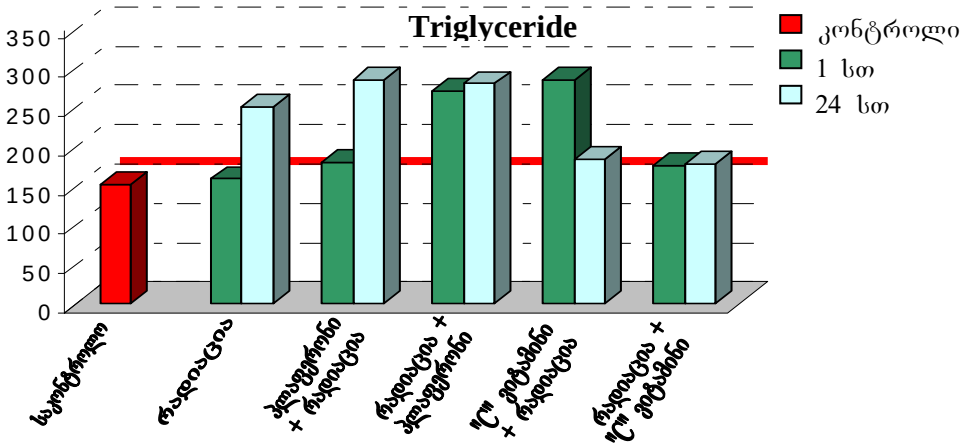
მოყვანილია მეთჰემოგლობინის შემცველობის ცვლილებები γ-სხივების, პლაფერონ ლბ-ს და “C” ვიტამინის ზემოქმედების დროს.



დიაგრამა №6

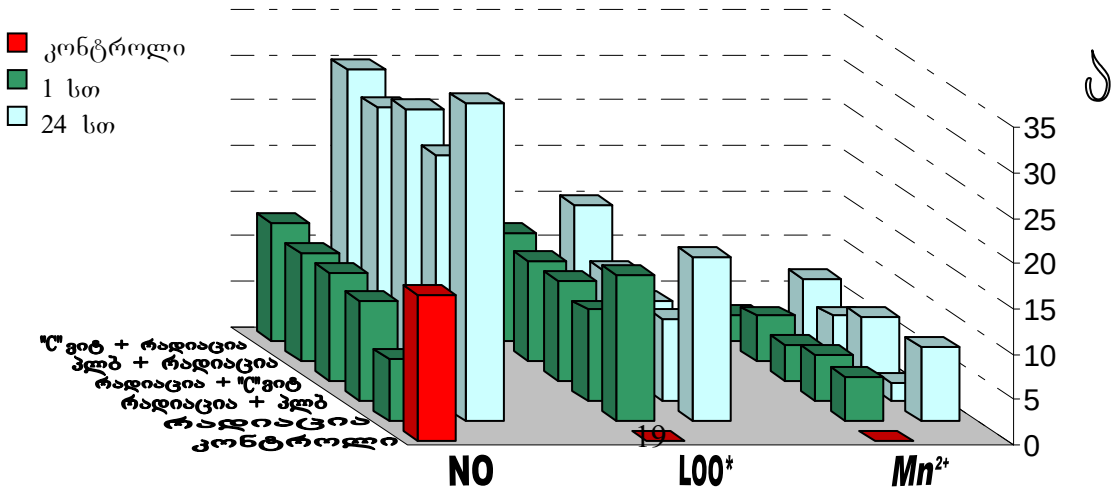
მოყვანილია ვირთაგვის სისხლის ლიპიდური ცვლის მაჩვენებლები γ-სხივების, პლაფერონ ლბ-ს და “C” ვიტამინის ზემოქმედების დროს

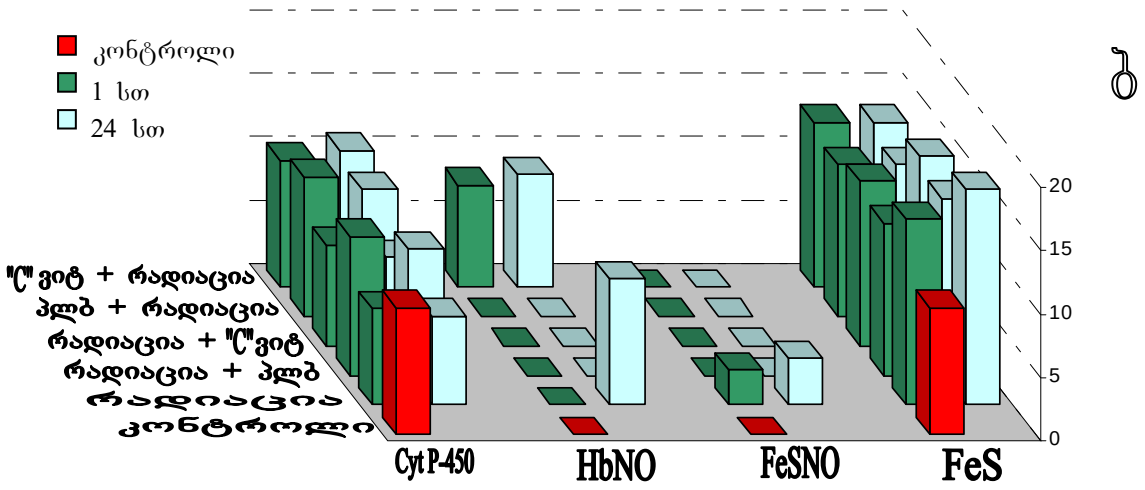


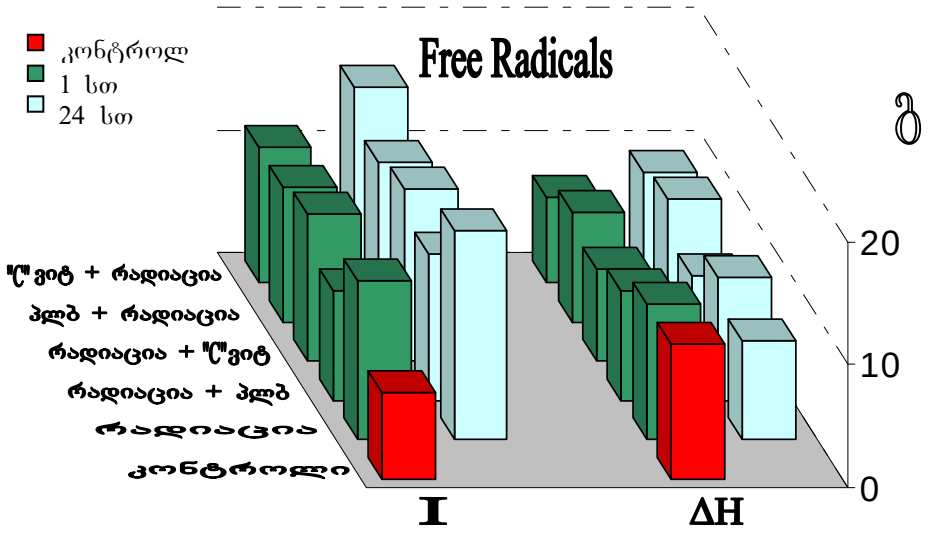


დიაგრამა №7(ა,ბ,გ)

ვირთაგვას ღვიძლის პარამაგნიტური ცენტრების ცვლილებები რადიაციული დასხივების და პლაფერონ ლბ-ს და ვიტამინ C-ს სამკურნალო და პრევენციული ზემოქმედების დროს

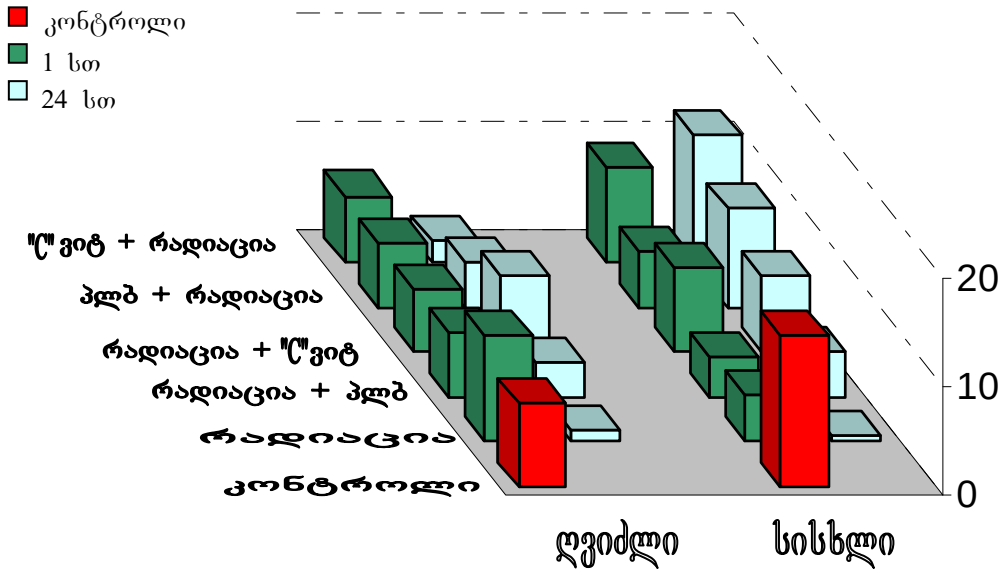






დიაგრამა 8

ღვიძლის და სისხლის აზოტის ჟანგის ცვლილებები



ექსპერიმენტებში C ვიტამინის გამოყენების დროს გამოვლენილია ცილა p53-ის მკვთრად გამოხატული ექსპრესია მაკროფაგებში და სისხლძარღვების კედლების უჯრედებში, ენდოთელიოციტებში. ცილა p53-ის ექსპრესირებულ ენდოთელიოციტებში მკვეთრად ჩანს ბირთვების შეჭმუხნვა. მაკროფაგებში ცილა p53-ის ჩართვის ინტენსივობა ნაკლებია, ანუ, C ვიტამინის რადიოპროტექტორის როლში გამოყენებისას არ ვლინდება ცილა p53-ის სუპრესია.

ექსპერიმენტებში პლაფერონ ლბ-ს რადიოპროტექტორის როლში გამოყენების დროს გამოვლენილია აპოპტოზის სტადიაში მყოფი უჯრედების გაცილებით უფრო მცირე რაოდენობა, ვიდრე C ვიტამინის შემთხვევაში. ღვიძლის წილების საერთო სურათი შეუცვლელია, შენარჩუნებულია წილების ძელისებური აგებულება, დამახასიათებელი ჰეპატოციტების ორიენტაციისათვის. პლაფერონ ლბ-ს ზემოქმედების ფონზე მნიშვნელოვნად მცირდება აპოპტოზის მარკერის, ცილა p53-ის ექსპრესია. ღვიძლის წილების სტრუქტურის ნორმალიზაცია, ნეკროზის და ჰომოგენიზაციის კერების მკვეთრი შემცირება და პროაპოტოზური ცილა p53-ის ექსპრესიის შეზღუდვა პლაფერონ ლბ-ს γ-რადიაციული დაზიანების დროს ამ პრეპარატის დაცვითი მოქმედების შესახებ მეტყველებს.

მაშასადამე, ჩვენი კვლევის შედეგებიდან გამომდინარეობს, რომ γ-ინდუცირებული დაზიანების დროს დროს ოქსიგენ- ნიტროგენული სტრესის ინტენსიფიკაცია ღვიძლის ქსოვილში ცილა p53 დამოკიდებული აპოპტოზის განვითარებას განაპირობებს. პლაფერონ ლბ- უზრუნველყოფს რადიაციული დასხივებით ინდუცირებული აზოტის ჟანგის ჰიპერპროდუქციის შეზღუდვას, ორგანიზმის რედოქს-ჰომეოსტაზის აღდგენას, NO-ინდუცირებული ცილა p53-ის აქტივაციის და NO-დამოკიდებული p53-ინდუცირებული აპოპტოზის პრევენციას.

დ ა ს კ ვ ნ ე ბ ი:

1. ორგანიზმის რადიაცია-ინდუცირებული დაზიანების მექანიზს საფუძვლად უდევს ჟანგბადის თავისუფალი რადიკალების ჭარბი წარმოქმნა და ანტოქსიდაციური დაცვის სისტემის აქტივობის ცვლილებები.
2. ვირთაგვებზე γ-რადიაციული გამოსხივების ზემოქმედებით ადგილი აქვს ერითროციტების მემბრანებში ლიპიდების პეროქსიდაციური პროცესების ინიციაციას, ქოლესტეროლის განთავისუფლებას, რაც მემბრანული სტრუქტურების სიხისტის და დენადობის დაქვეითებით, სისხლის უჯრედების დეფორმაბელობისა და რეზისტენტობის შემცირებით და მეთჰემოგლობინის დაგროვებით ვლინდება.
3. ჰეპატოციტების პირველადი (1 საათის შემდეგ) γ-რადიაციული დაზიანება პოსტრადიაციული ოქსიდაციური სტრესის განვითარების შედეგს წარმოადგენს, რომელიც ლიპოპეროქსიდაციის ჯაჭვური რეაქციების ინიციაციით და ჰეპატოციტების მემბრანების დაზიანებით და ლიპოპეროქსიდების ($LOO^{\cdot}$) და Mn^{2+} იონების დაგროვებით, ციტოქრომ P-450-ზე დამოკიდებული დეტოქსიკაციური პროცესების ინტენსიფიკაციით ვლინდება.
4. ჰეპატოციტების γ-რადიაციული დაზიანების მე-2 ეტაპზე (დასხივებიდან 24 საათის შემდეგ) ადგილი აქვს ლიპოპეროქსიდაციის ჟაჭვური რეაქციების

ინტენსიფიკაციას ჰეპატოციტების დაზიანების ხარისხის გაღრმავებას, მიტოქონდრიული ელექტრონების სატრანსპორტო ჯაჭვის მუშაობის დარღვევას NADH:უბიქინონ-ოქსიდორედუქტაზულ უბანზე, რკინის იონების განთავისუფლებას NO-ს გაძლიერებულ წარმოქმნას და ოქსიგენ- ნიტროგენული სტრესით ინდუცირებული p53-დამოკიდებული აპოპტოზის განვითარებას.

5. პლაფრონ ლბ პრე- და პოსტრადიაციული ზემოქმედების დროს უზრუნველყოფს ორგანიზმის რედოქს–ჰომეოსტაზის აღდგენას და NO-ს მეტაბოლიზმის ნორმალიზაციას.
6. პლაფერონ ლბ- NO- ინდუცირებული ცილა p53-ის აქტივაციას და NO-დამოკიდებული p53-ინდუცირებული აპოპტოზის პრევენციას უზრუნველყოფს.

პრაქტიკული რეკომენდაციები:

1. პროოქსიდანტური პროცესების, ანტიოქსიდანტური სისტემის, უჯრედული მემბრანების თავისუფალრადიკალური დაზიანების სიღრმის გათვალისწინებით ორგანიზმის რადიოთერაპიის და რადიაცია-ინდუცირებული დაზიანების დროს რეკომენდაციას ვუწევთ ანტიოქსიდანტური თერაპიის გამოყენებას.
2. ჩატარებული კვლევის შედეგად გამოვლენილი პლაფერონ ლბ-ს რადიოტექტორული მოქმედების ეფექტურობა საშუალებას გვაძლევს რეკომენდაცია გავუწიოთ ამ პრეპარატის გამოყენებას რადიოთერაპიის დროს რადიოპროტექტორის სახით.

დისერტაციის თემაზე გამოქვეყნებული ნაშრომების სია

1. Плаферон ЛБ как протектор радиационно-индуцированного изменения показателей липидного обмена и степени деформабельности эритроцитов крыс. Georgian Medical News №2 (119). Февраль, 2005, с. 61-64 (соавт. М.В.Касрашвили, Н.Г.Тхилава, А.Т.Павлиашвили, В.И.Бахуташвили).
2. Эффективность Плферона ЛБ при γ-радиотерапии. Georgian Medical News №7-8 (124-125). Июль-Август, 2005, с. 75-79 (соавт. М.Б.Папава, И.Т.Датунашвили, Т.В.Саникидзе, В.И.Бахуташвили).
3. Плаферон ЛБ как протектор радио-индуцированного повреждения. Georgian Medical News №12 (129). Декабрь, 2005, с. 110-113 (соавт. И.В.Датунашвили, М.Г.Мачавариани, М.Г. Энукидзе, А.Т.Павлиашвили).