

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი

ხელნაწერის უფლებით

მერაბ ხიზანიშვილი

**Jurkat უჯრედების კულტურაში NO-ინდუცირებული
აპოპტოზის კორექცია პლაფერონ ღბ-ს საშუალებით**

14.00.15 – პათოლოგიური ანატომია

მედიცინის მეცნიერებათა კანდიდატის სამეცნიერო ხარისხის
მოსაპოვებლად წარმოდგენილი დისერტაცია

- სამეცნიერო ხელმძღვანელები:
- ნოდარ ჭიჭინაძე, მედიცინის
მეცნიერებათა დოქტორი,
პროფესორი

 - თამარ სანიკიძე, ბიოლოგიის
მეცნიერებათა დოქტორი,
პროფესორი

თბილისი
2006

ნაშრომის ზოგადი დახასიათება	4
გამოკვლევის მიზანი და ამოცანები	6
ნაშრომის მეცნიერული სიახლე	7
დაცვაზე გამოსატანი ძირითადი დებულებები	8
ნაშრომის პრაქტიკული ღირებულება	8
ნაშრომის აპრობაცია	8
ნაშრომის ირგვლის გამოქვეყნებული ლიტერატურა	9
დისერტაციის სტრუქტურა და მოცულობა	9
დისერტაციაში გამოყენებული შემოკლებანი	10
1. ლიტერატურის მიმოხილვა	12
1.1 უჯრედის სიკვდილის მექანიზმი	12
1.2 აპოპტოზის მოლეკულური მექანიზმი	17
1.3 ადამიანის ექსტრაემბრიონული ქსოვილების ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებები და პლაცენტიდან სინთეზირებული პრეპარატის პლაფერონ ლბ-ს ფარმაკოლოგიური დახასიათება	39
2. გამოკვლევის მასალა და მეთოდები	59
2.1 კვლევის ობიექტი	59
2.2 გამდინარე ციტომეტრიის მეთოდი	60
2.2.1 უჯრედულ კულტურაში მიტოქონდრიების მემბრანული პოტენციალის $\Delta\psi$ -ს ცვლილებების განსაზღვრა	60
2.2.2 უჯრედულ კულტურაში უჯრედების უჯრედული ციკლის ფაზებში გადანაწილების შესწავლა	61
2.3 ეპრ სპექტროსკოპული კვლევები	62
2.4 ელექტრონული მიკროსკოპია	63
3. გამოკვლევის შედეგები	64
3.1 Jurkat უჯრედების კულტურაში მიტოქონდრიული პოტენციალის ($\Delta\psi$) ცვლილებები ნატრიუმის	64

ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან ინკუბაციის შემდეგ	
3.2. Jurkat უჯრედების კულტურაში უჯრედების უჯრედული ციკლის ფაზებში გადანაწილების შესწავლა ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან ინკუბაციის შემდეგ	68
3.3 Jurkat უჯრედების კულტურაში ეპრ სიგნალების ინტენსივობის ცვლილებები ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან ინკუბაციის შემდეგ	71
3.4 ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ინკუბირებული Jurkat უჯრედების ელექტრონულმიკროსკოპული კვლევის შედეგები	78
3.5 ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან ინკუბირებული Jurkat უჯრედების ელექტრონულმიკროსკოპული კვლევის შედეგები	101
4. მიღებული შედეგების განსჯა	111
დასკვნები	118
პრაქტიკული რეკომენდაციები	120
გამოყენებული ლიტერატურა	121

ნაშრომის ზოგადი დახასიათება

თემის აქტუალობა: აპოპტოზი, ანუ უჯრედის თვითლიკვიდაციის პროცესი, უჯრედის სიკვდილის აქტიური, ორგანიზებული ფორმაა. იგი ვითარდება როგორც ფიზიოლოგიური, ისე პათოლოგიური პროცესების დროს.

ფიზიოლოგიური აპოპტოზი ვითარდება ემბრიოგენეზის დროს, აუტორეაქციული ლიმფოციტების ელიმინაციისას პერიფერიული სისხლიდან და სხვა. იგი ასრულებს მიტოზის საწინააღმდეგო ფუნქციას და მნიშვნელოვანია ქსოვილის ზომების რეგულირებისა და ჰომეოსტაზის შენარჩუნებისათვის ჯანმრთელ ორგანიზმში. ფიზიოლოგიური აპოპტოზის განვითარების დარღვევამ, შესაძლოა, გამოიწვიოს კანცეროგენეზი, აუტოიმუნური დაავადებები (მაგ. Lupus erythematosus (E. Mysler et al.,1994)) და სხვ. თავის ტვინის ინფარქტის, ინსულტის დროს უჯრედების უმეტესი ნაწილი აპოპტოზის გზით კვდება (R.Eskes et al.,1998,S. Love., R.Barber., G.Wilcock.,2000) აპოპტოზის მაინდუცირებელ სტიმულებს გარკვეულ პირობებში ნეკროზის გამოწვევაც შეუძლია. ასე რომ, აპოპტოზის ან ნეკროზის განვითარების შესაძლებლობას ამ პროცესების მაინდუცირებელი სტიმულების ინტენსივობა განსაზღვრავს.

ზემოთქმულიდან გამომდინარე, აპოპტოზის ფარმაკოლოგიურ რეგულაციას მნიშვნელოვანი როლი ენიჭება. პრეპარატები, რომლებიც არეგულირებენ აპოპტოზის ინტენსივობას, მოქმედებენ, ერთის მხრივ, აპოპტოზის გამომწვევ ლოკალურ ფაქტორზე, პროაპოპტოზური სტიმულების ინტენსივობაზე და მეორეს მხრივ, პირდაპირ იწვევენ

აპოპტოზის დათრგუნვას. აპოპტოზის დათრგუნვა ხდება კასპაზების აქტივობის (c Jun-ტერმინალური და p-38-კინაზების დაბალმოლეკულური მასის მქონე ინჰიბიტორები (T.L.Yue et al., 1999)), ან ჟანგბადის რეაქციული ნაერთების რაოდენობის რეგულაციით. ეს უკანასკნელი ანტიოქსიდანტური ბუნების მქონე ნაერთებით მიიღწევა. ანტიოქსიდანტური თერაპია ფართოდ გამოიყენება სხვადასხვა დაავადების დროს, კერძოდ, ათეროსკლეროზის, გულის იშემიური დაავადების, პრეეკლამპსიის, დიაბეტის, მწვავე პანკრეატიტის და სხვათა დროს.

ასეთ პრეპარატთა რიგს მიეკუთვნება პლაფერონ ლბ, რომლის ოქსიდაციურ ჰომეოსტაზზე ზემოქმედების, ენერგოგენეზის ინტენსივობის და აპოპტოზის მოდულაციის შესაძლებლობები მრავალი კვლევის შედეგით დასტურდება.

როგორც ცნობილია, უჯრედის სიკვდილის მექანიზმი (აპოპტოზი/ნეკროზი) მნიშვნელოვანწილად დამოკიდებულია ენერგოგენეზის ინტენსივობაზე. უჯრედის ენერგეტიკული რესურსების დაქვეითება ოქსიდაციური სტრესის განვითარებას და აპოპტოზის ინიცირებას განაპირობებს. ენერგოგენეზის მკვეთრი დაქვეითება და უჯრედში ენერგიის მარაგის გამოლევა აპოპტოზის ნეკროზით შენაცვლებას იწვევს. ენერგოგენეზის პროცესი მჭიდროდაა დაკავშირებული მიტოქონდრიული სუნთქვის ინტენსივობასთან, რომლის რეგულაციაში მოლეკულა-მესენჯერი NO მნიშვნელოვან როლს ასრულებს – სუნთქვითი ჯაჭვის ელექტრონების გადამტანი ცილების ნიტროზილირებით.

გამომდინარე ყოველივე ზემოთქმულიდან, როგორც შემეცნებით, ისე პრაქტიკულ მნიშვნელობას იძენს NO-ინდუცირებული აპოპტოზის

განვითარების ზოგიერთი მექანიზმისა და მისი კორექციის ეფექტურობის დადგენა პლაფრონ ლბ-ს მეშვეობით.

კვლევის მიზანი და ამოცანები

ჩვენი კვლევის მიზანს შეადგენდა Jurkat უჯრედების კულტურაში (ლეიკემიით ტრანსფორმირებული მომწიფებული T უჯრედები) NO-ინდუცირებული აპოპტოზის განვითარების ზოგიერთი მექანიზმისა და მისი კორექციის ეფექტურობის დადგენა პლაფრონ ლბ-ს მეშვეობით.

აღნიშნული მიზნის მისაღწევად დაისახა შემდეგი ამოცანები:

1. Jurkat უჯრედების კულტურაში NO-ინდუცირებული აპოპტოზის მოდელირება;

აღნიშნული მოდელირების პირობებში:

2. ოქსიდაციური სტრესის ინტენსივობის, თავისუფალი აზოტის ჟანგის (NO), აზოტის ნიტროზილური კომპლექსებისა (რომელიც სუნთქვითი ჯაჭვის ჰემშემცველ და არაჰემურ ცილებთან NO-ს ურთიერთქმედებისას წარმოიქმნება) და მიტოქონდრიული სუნთქვითი ცვლილებების განსაზღვრა;
3. მიტოქონდრიების მემბრანული პოტენციალის ($\Delta\Psi$) ცვლილებების დინამიკის დადგენა;
4. უჯრედული ციკლის ფაზების გადანაწილების ცვლილებათა დადგენა უჯრედებში;
5. უჯრედებში ულტრასტრუქტურული ცვლილებების დადგენა;
6. Jurkat უჯრედების კულტურაში NO-ინდუცირებულ აპოპტოზზე პლაფრონ ლბ-ს ეფექტურობისა და მოქმედების ზოგიერთი მექანიზმის დადგენა.

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე

- პირველად იქნა შესწავლილი აპოპტოზის განვითარების მექანიზმები Jurkat უჯრედების კულტურაში ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან (რომელიც ჩვენს შემთხვევაში, წარმოადგენდა NO-ს ეგზოგენურ დონორს) ხანგრძლივი ინკუბაციის პირობებში.
- პირველად იქნა ნაჩვენები, რომ Jurkat უჯრედების კულტურაში უჯრედების აპოპტოზის უმნიშვნელოვანესი მარკერის – მიტოქონდრიების მემბრანული პოტენციალის დაქვეითება მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის მუშაობის დარღვევითაა განპირობებული. ეს კი, თავის მხრივ, ელექტრონების სატრანსპორტო ცილების NO-ინდუცირებული ნიტროზილირებითაა გამოწვეული.
- ნაჩვენებია, რომ Jurkat უჯრედების კულტურაში NO-ინდუცირებულ ოქსიდაციურ სტრესს წამყვანი როლი ენიჭება აპოპტოზის განვითარებაში.
- Jurkat უჯრედების მიტოქონდრიებში პირველად იქნა გამოვლენილი NO-ინდუცირებული მრავალი კრისტის წარმოქმნა, რაც კომპენსაციური რეაქციაა დათრგუნული ენერგოგენეზის ინტენსიფიკაციისათვის.
- პირველად იქნა დადგენილი Jurkat უჯრედების კულტურაში პლაფერონ ლბ-ს ანტიაპოპტოზური მოქმედების ზოგიერთი მექანიზმი.

დაცვაზე გამოტანილი ძირითადი დებულებები

1. Jurkat უჯრედების ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან, NO-ს ეგზოგენურ დონორთან, ხანგრძლივი ინკუბაციის პირობებში NO-ინდუცირებული აპოპტოზის განვითარებისას დაქვეითებული ენერგოგენეზის ადღგენისათვის შესაძლებელია დაცვითი – კომპენსაციური რეაქციის ინიცირება, რომელიც ვლინდება ნაწილ მიტოქონდრიებში მრავალი კრისტის წარმოქმნითა და უჯრედის ფუნქციური აქტივობის მატებით.
2. Jurkat უჯრედების კულტურაში NO-ინდუცირებული აპოპტოზის დროს პლაფერონ ლბ განაპირობებს ოქსიდაციური სტრესის ინტენსივობის შემცირებას, მიტოქონდრიული სუნთქვისა და ენერგოგენეზის ინტენსიფიკაციას, მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალის მატებას, და შედეგად, მიტოზების მომატებული რაოდენობისა და უჯრედების გაძლიერებული პროლიფერაციის ფონზე აპოპტოზის ინტენსივობის კლებას.

ნაშრომის პრაქტიკული ღირებულება

ჩატარებული გამოკვლევის საფუძველზე დადგენილია პლაფერონ ლბ-ს ანტიაპოპტოზური მოქმედება, რის გამოც რეკომენდაციას ვუწევთ აღნიშნული პრეპარატის გამოყენებას ინტენსიური აპოპტოზის ფონზე მიმდინარე დაავადებების დროს.

დისერტაციის აპრობაცია

დისერტაციის ძირითადი დებულებები მოხსენებულია ალ. ნათიშვილის სახელობის ექსპერიმენტული მორფოლოგიის

ინსტიტუტის ანდროლოგიის განყოფილების გაფართოებულ
სხდომაზე (ოქმი №2, 25.04.06)

პუბლიკაციები:

დისერტაციის თემაზე გამოქვეყნებულია 3 სამეცნიერო სტატია:

- 1. Khizanishvili M.,** Nasrashvili M., Enukidze M., Janashia N., Datunashvili V.
The changes in mitochondria respiration chain during NO-induced apoptosis and influence preparation Plaferon LB in Jurkat cell culture. ANNALS OF BIOMEDICAL RESEARCH AND EDUCATION VOLUMES, ISSUE 4 OCTOBER-DECEMBER 2005 p. 288-289
- 2. Хизанишвили М.,** Насрашвили М. Есиашвили М. Мchedlishvili Т. Чхиквишвили И. ВЛИЯНИЕ КАТЕХИНОВ НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКУЮ ФУНКЦИЮ МИТОХОНДРИЙ КЛЕТОК JURKAT. ექსპერიმენტული და კლინიკური მედიცინა №1 (26) 2006 გვ. 54-57
- 3. Хизанишвили М.,** Мchedlishvili Т. Мачавარიანი М. Чичинадзе Н. Саникидзе Т. Влияние Плаферона ЛБ на SNP-индуцированный апоптоз в клеточной культуре Jurkat. ექსპერიმენტული და კლინიკური მედიცინა №3 (28) 2006 გვ. 56-58

დისერტაციის მოცულობა და სტრუქტურა

სადისერტაციო ნაშრომი მოიცავს 131 ნაბეჭდ გვერდს. იგი შედგება შემდეგი თავებისაგან: შესავალი, ლიტერატურის მიმოხილვა, კვლევის მასალა და მეთოდები, საკუთარი გამოკვლევები, მიღებული შედეგების განხილვა, დასკვნები და პრაქტიკული რეკომენდაციები, გამოყენებული ლიტერატურის სია. ნაშრომი ილუსტრირებულია 6 ცხრილით, 25 ფოტოსურათით.

ნაშრომში გამოყენებული ძირითადი შემოკლებანი

AIF – აპოპტოზის მაინდუცირებელი ფაქტორი

ATP- ადენოზინტრიფოსფატი

CARD– კასპაზას აქტივაციის და მიზიდვის დომენი

CD – ლიმფოციტების რეცეპტორების ოჯახი

DD - სიკვდილის დომენი

DED - სიკვდილის ეფექტორის დომენი

ეპრ – ელექტრონულპარამაგნიტური რეზონანსი

ER - ენდოპლაზმურ რეტიკულუმზე

Fas – აპოპტოზში მონაწილე გენი

H9 - ლიმფობლასტოიდური T-უჯრედები ხაზის

IL - ინტერლეიკინი

IL-1ra – IL-1 რეცეპტორის ანტაგონისტი

LOO – ლიპიდების პეროქსირადიკალები

Me – ცვალებადვალენტოვანი მეტალის იონი.

NAD– ნიკოტინამიდდინუკლეოტიდი

NF-κB – ბირთვის ტრანსკრიფციის ფაქტორი-κB

NO – აზოტის ოქსიდი (ჟანგი)

O₂⁻ - სუპეროქსიდი

PG- პროსტაგლანდინები

PGHS - პროსტაგლანდინ-ენდოპეროქსიდ–H სინთაზა

PLA₂ – ფოსფოლიპაზა A₂

RAIDD - პროტეინი, რომელიც ურთიერთქმედებს რეცეპტორთან

ROS – ჟანგბადის რეაქტიული შენაერთები

SKW - ლიმფობლასტოიდური B-უჯრედების ხაზი

SNP – ნატრიუმის ნიტროპრუსიდი

TGF- β – ტრანსფორმაციული ზრდის ფაქტორი- β

TNF – სიმსივნის ნეკროზის ფაქტორი

TNF- α – სიმსივნის ნეკროზის ფაქტორი

1. ლიტერატურის მიმოხილვა

1.1 უჯრედის სიკვდილის მექანიზმები

ცნობილია უჯრედის სიკვდილის ორი განსხვავებული მექანიზმი: ნეკროზი და აპოპტოზი.

ნეკროზი, უჯრედის სიკვდილის პათოლოგიური მექანიზმი ვითარდება მწვავე დაზიანების (იშემიური დაზიანება) ან ანთებითი პროცესის შემდეგ. ნეკროზის დროს უჯრედი მოცულობაში იზრდება იონური დისბალანსის შედეგად (Majno, Joris, 1995), ენდოპლაზმური რეტიკულუმი და მიტოქონდრიები ფართოვდება, რიბოსომები ექვემდებარებიან დისპერსიას (Wyllie A.H., et al., 1980), პლაზმური მემბრანა ირღვევა და უჯრედის შიგთავსი თავისუფლდება უჯრედთაშორის არეში, რაც შემდგომში იწვევს ანთებითი რეაქციის განვითარებას (Arends M.J. Wyllie A.H., 1991). სისხლძარღვების დაზიანება, ანთება და ედემა ქსოვილში ნეკროზის განვითარების ძირითადი სიმპტომებია. ნეკროზი წარმოადგენს უჯრედების სიკვდილის პასიურ დეზორგანიზებულ ფორმას. იმის მიუხედავად, რომ ნეკროზის დროს ქრომატინი ექვემდებარება კონდენსაციას, დნმ-ის მთლიანობა არ ირღვევა. ფაგოციტოზი მიმდინარეობს მხოლოდ უჯრედის ღიზისის შემდეგ. ნეკროზი არასოდეს არ ვითარდება ნორმალურ ახალგაზრდა ქსოვილში და წარმოადგენს უჯრედის სიკვდილის პასიურ მექანიზმს.

აპოპტოზი განიხილება როგორც უჯრედის თვითლიკვიდაციის პროცესი, რომელიც წარმოადგენს უჯრედის სიკვდილის აქტიურ, ორგანიზებულ ფორმას, იგი ვითარდება ნორმალური ჯანმრთელი ქსოვილის განვითარების და პათოლოგიური პროცესების დროს (სიმსივნე). აპოპტოზის მორფოლოგიური მახასიათლებია - უჯრედის შეჭმუხნვა, ენდოპლაზმური რეტიკულუმის ენდოპლაზმურ მემბრანასთან

შეერთება, შემდგომში ბუშტუკების წარმოქმნით და ციტოჩონჩხის რეორგანიზაციით, ქრომატინის კონდენსაცია, დნმ-ის ინტრანუკლეოსომული გახლეჩვა, ფოსფატიდილსერინის ექსპრესია და “აპოპტოზური სხეულაკების” ფორმირება, რომლებიც ელიმინირდება ფაგოციტური უჯრედების მიერ ანთებითი პასუხის გამოწვევის გარეშე (Arends M.J., Wyllie A.H., 1991, Willie A.H., et al., 1980). აპოპტოზის დროს პლაზმური მემბრანა არ ირღვევა, უჯრედი და უჯრედის შიგთავსი იყოფა მემბრანებით შემოსაზღვრული ვეზიკულებში (აპოპტოზურ სხეულაკებში).

აპოპტოზი ვითარდება ემბრიოგენეზის, T და B ლიმფოციტების პოზიტიური და ნეგატიური სელექციის დროს, ასრულებს მიტოზის საწინაამდგომლო ფუნქციას, რაც მნიშვნელოვანია ქსოვილის ზომების რეგულაციისათვის და უზრუნველყოფს ჰომეოსტაზის შენარჩუნებას ნორმალურ ჯანმრთელ ორგანიზმში. აპოპტოზის დარღვევებს შეუძლია კანცეროგენეზის, აუტოიმუნური დაავადებების, როგორცაა lupus erythematosus (Mysler E. et al., 1994), გამოწვევა. თავის ტვინის ინფარქტის, ინსულტის დროს უჯრედების უმეტესი ნაწილი კვდება აპოპტოზის გზით (Esker R., et al 1998, Love S., Barber R., Wilcock G.K., 2000). განსაზღვრულ პირობებში აპოპტოზის მაინდუცირებელ სტიმულებს შეუძლია იგივე ქსოვილში ნეკროზის გამოწვევა (ინსულტი, ინფარქტი). შესაძლებელია, რომ აპოპტოზის და ნეკროზის განვითარებას განსაზღვრავს ამ პროცესების მაინდუცირებელი სტიმულის ინტენსივობა. ცნობილია, რომ ინსულტის დროს კასპაზების ფარმაკოლოგიური ინჰიბიცია იწვევს როგორც აპოპტოზის, ასევე ნეკროზის დათრგუნვას (Leist M., Nicotera P., 1998).

აპოპტოზის კონცეპცია წარმოდგენილ იქნა 1970 წელს, მაგრამ ნორმალურ ქსოვილებში ერთეული უჯრედების სიკვდილი აღწერილ იყო გაცილებით ადრე. უჯრედის სიკვდილის ფენომენი ცნობილია თვით უჯრედის აღმოჩენის დროიდან, ჯერ კიდევ 1665 წელს Hooke-მ აღწერა დაღუპული უჯრედებიდან მუხის ქერქის წარმოქმნის პროცესი (Greenberg J.T., 1996). მაგრამ უჯრედის სიკვდილის ჰისტოლოგიური სურათი პირველად აღწერა Vogt-მა 1842 წელს. 1885 წელს Flemming-მა რეგრესული საკვერცხის ფოლიკულების დეგენერაციის შესწავლის დროს აღწერა და ჩამოაყალიბა “ქრომატოლიზისის” პროცესის განმარტება. 1972 წელს ტერმინი “აპოპტოზი” შემოთავაზებულ იქნა Kerr, Willyue და Currie-ს მიერ (Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. 1972) ნორმალურ ქსოვილებში უჯრედების სპეციფიური სიკვდილის მორფოლოგიური თავისებურებების აღწერის დროს. შემდეგ აპოპტოზის და მისი მექანიზმების შესწავლა შემოისახდვრა ბოქიმიური და მორფოლოგიური კვლევებით.

ოლიგონუკლეოსომურ ფრაგმენტებში დნმ-ის დარღვევის დახასიათება აპოპტოზის პირველ ბოქიმიურ დადასტურებას წარმოადგენს. დემონსტრირებულ იქნა, რომ დნმ-ის გახლეჩვა აპოპტოზის დროს მრავალსაფეხურიანი პროცესია, დნმ-ის ფრაგმენტაცია მიმდინარეობს მაღალმოლეკულური (50-700 kbp) და დაბალმოლეკულური ფრაგმენტების წარმოქმნით (180 x bp) (Filipski J., et al., 1994). დნმ-ის ფრაგმენტების ორივე ტიპი განიხილება როგორც აპოპტოზის არსებითი მარკერი. აპოპტოზის დროს ირღვევა პლაზმური მემბრანის სიმეტრია და ადგილი აქვს მის შემადგენლობაში ცვლილებების განვითარებას (Savill J., et al., 1993). ფოსფატიდილსერინი გადაადგილდება ციტოპლაზმური მემბრანის შიდა ფოსფოლიპიდური

მონოშრიდან მის გარეთა მონოშრეზე. ამას მოჰყვება უჯრედის მოცულობის შემცირება, ციტოპლაზმური მემბრანის შეჭმუხნვა, ბირთვის კონდენსაცია, ბირთვული დნმ-ის ძაფების გაწყვეტა და შემდგომში ბირთვის ფრაგმენტებად, ანუ მემბრანით შემოსაზღვრულ ვეზიკულებად (აპოპტოზური სხეულაკები) დაყოფა. ეს სხეულაკები ექვემდებარებიან ფაგოციტოზს მაკროფაგებისა და მეზობელი უჯრედების მიერ. ფოსფატიდილის ექსპრესია პლაზმურ მემბრანის გარეთა ზედაპირზე პროფესიული მაკროფაგებისა ან მეზობელ უჯრედებისათვის წარმოდგენს გამომცნობ მარკერს აპოპტოზური უჯრედის ან აპოპტოზური სხეულაკების ფაგოციტოზისათვის. აპოპტოზის სხეულაკების კლირენსი განაპირობებს ანთების განვითარების პრევენციას. ფაგოციტოზისაგან გადარჩენილი აპოპტოზური უჯრედები, მოგვიანებით ექვემდებარებიან ლიზისს. ეს ფენომენი ცნობილია “მეორადი ნეკროზის” სახელწოდებით.

აპოპტოზი შეიძლება განვითარდეს ინფექციების გავრცელების, ან სიმსივნური ზრდის დროს. პირველ შემთხვევაში ვირუსები, ზოგიერთი ბაქტერიები, სოკოები და მარტივი ორგანიზმები, ეგრეთ წოდებული უჯრედული პარაზიტები, სახლდებიან რეციპიენტის ორგანიზმის უჯრედულ ციტოპლაზმაში, სადაც დაცულნი არიან მასპინძელ ორგანიზმში მათ საწინააღმდეგოდ გამომუშავებული სპეციფიური ანტისხეულებისაგან. ამ შემთხვევაში ციტოტოქსიური T-ლიმფოციტები (T კილერები), რომლებსაც გააჩნია დაინფიცირებული უჯრედის (სამიზნე უჯრედის) გამოცნობის მექანიზმი, იწვევენ უჯრედის პროგრამული სიკვდილის მექანიზმის (აპოპტოზის) ჩართვას. აპოპტოზს ექვემდებარებიან, აგრეთვე, უჯრედები, რომლებმაც დაკარგეს საკუთარი ფუნქციები ონტოგენეზის პროცესში, მაგალითად, ლიმფოციტები

ინფექციური პროცესის ბოლო სტადიებზე, როცა ორგანიზმს აღარ სჭირდება ანტისხეულების გამომუშავება, ან მუტანტური უჯრედები განიცდიან აპოპტოზს.

უჯრედული სიკვდილის პათოლოგიური ფორმა, ნეკროზი, ვითარდება იმ შემთხვევაში, როცა ინფექციის გენერალიზირებული გავრცელების შედეგად ვერ ხერხდება ინიფიცირებული უჯრედის დროული მოცილება აპოპტოზის გზით. უჯრედში გამრავლებული ვირუსი, ან სხვა პარაზიტი იწვევს მის დაზიანებას. უჯრედი განიცდის ლიზისს, მისი შიგთავსი გამოდის გარეთ უჯრედთაშორის სივრცეში. ზოგიერთ შიდაუჯრედოვან პარაზიტებს (*Toxoplasma gondii*) შეუძლია აპოპტოზის დათრგუნვა. პარაზიტების ახალი თაობა აინიფიცირებს მეზობელ უჯრედებს და იწვევს ანთებითი პროცესის განვითარებას, რასაც მოჰყვება რეციპიენტის ორგანიზმის გადარჩენა, ან დაღუპვა. ნეკროზი შეიძლება განვითარდეს ფიზიკური ან ქიმიური დაზიანების შედეგად (მოყინვა, დამწვრობა, ორგანული გამსხნელები, ჰიპოქსია, ჰიპოტონიური შოკი (Cohen J.J., 1993, Jacobson M.D., et al., 1997). ნეკროზისათვის დამახასიათებელი ანთების ნიშნები აღწერილ იქნა ჯერ კიდევ Celsus მიერ – “rubor, color, tumor et dolor“. ანთებას შეუძლია ორგანიზმის ფუნქციის დარღვევა და სიკვდილის გამოწვევა. ქსოვილში დამაზიანებელი ხასიათის ელემენტები ანთების ნიშნების ჩამოყალიბებას უწყობენ ხელს. ანთების ნიშნები გამოიყენება ნეკროზის გამოცნობისათვის. ნეკროზისათვის დამახასიათებელია პლაზმური და შიდაუჯრედოვანი მემბრანის დარღვევა, რასაც მოსდევს სუბუჯრედული ორგანელების მთლიანობის დარღვევა, ლიზოსომური ფერმენტების განთავისუფლება, და ციტოპლაზმის უჯრედთაშორის სივრცეში გამოსვლა. ნეკროზისაგან განსხვავებით აპოპტოზის დროს

(Oliver F.J., et al., 1999) ATP-ის დონის მკვეთრი შემცირება იწვევს ნეკროზის ინდუქციას (Tsujimoto Y., 1997, Nicotera P., Leist M., 1997, Leist M., et al., 1997). შენარჩუნებულია მემბრანების მოლიანობა, ორგანელებს გააჩნია მორფოლოგიურად ინტაქტური სტრუქტურა, ხოლო აპოპტოზური ვეზიკულები შემოსაზღვრულია მემბრანით.

უჯრედის სიკვდილის ფორმა, აპოპტოზი, ან ნეკროზი, მნიშვნელოვანწილად დამოკიდებულია NAD^+ -ის და ATP-ის შიდაუჯრედოვან კონცენტრაციაზე. NAD^+ -ის და ATP-ის დონის მკვეთრი შემცირება იწვევს ნეკროზის ინდუქციას (Tsujimoto Y., 1997, Nicotera P., Leist M., 1997).

1.2 აპოპტოზის მოლეკულური მექანიზმები

პირველად აპოპტოზი განსაზღვრულ იქნა როგორც უჯრედის ბირთვში და ორგანელებში მორფოლოგიური ცვლილებების კომპლექსი (Kerr J.F. 1971, Kerr J.F. et al., 1972). მოგვიანებით, შეხედულება აპოპტოზზე შეიცვალა, მორფოლოგიური ფენომენი უბრალო ტერმინიდან განვითარდა გენეტიკურად და ბიოქიმიურად განსაზღვრულ “უჯრედულ პროგრამამდე” და მისი განხილვის დროს განსაკუთრებული ყურადღება დაეთმო მისი მარეგულირებელი პროტეაზების ოჯახის წევრებს, კასპაზებს (Miura M. et al. 1993). აპოპტოზის მექანიზმი დამოკიდებულია პრო- და ანტი-აპოპტოზური ცილების ურთიერთქმედებაზე და უერთიერთრეგულაციაზე. აპოპტოზის მექანიზმის აქტივაცია იწვევს უჯრედის სიკვდილს, მისთვის დამახასიათებელი მორფოლოგიური და ბიოქიმიური ცვლილებების განვითარებით. აპოპტოზის გზით უჯრედი კვდება “ჩუმად”,

ფიზიოლოგიურ პირობებში, ქსოვილის მთლიანობა შენარჩუნებულია და უჯრედის ლიკვიდაცია ხდება ანთების გარეშე.

აპოპტოზი – მრავალეტაპობრივი პროცესია და შეიძლება დაიყოს სამ ფაზად: საინიციაციო ფაზა, ეფექტორული ფაზა და დეგრადაციის ფაზა. პირველი ეტაპი – ინფორმაციის მიღება უჯრედის სიკვდილის შესახებ გარედან მოსული, ან უჯრედის შიგნით წარმოქმნილი სიგნალის სახით.

არსებობს ორი (Hengartner M.O., 2000), ან, შეიძლება სამი (Mehmer H., 2000) აპოპტოზური გზა, რომელიც დამოკიდებულია აპოპტოზური კასკადის აქტივაციის გზებზე (შიდაუჯრედული და უჯრედგარე სტიმულები). უჯრედშიდა სტიმულებს მიეკუთვნება მეტაბოლური დისბალანსის განვითარება, დნმ-ის დაზიანება; უჯრედგარეს კი - სიკვდილის რეცეპტორების აქტივაცია პროანთებითი ციტოკინების მიერ. სხვადასხვა უჯრედებს გააჩნია აპოპტოზის აქტივაციის უნარი, როგორც მიტოქონდრია-დამოუკიდებელი (უჯრედების ტიპი I), ასევე მიტოქონდრია- დამოკიდებული გზით, რომელიც იწვევს კასპაზა-8-ს და 3-ის აქტივაციას მხოლოდ მიტოქონდრიალური პროაპოპტოზური პროტეინის განთავისუფლების შემდეგ (უჯრედების ტიპი II). მიტოქონდრია ამ შემთხვევაში წარმოადგენს ფუნქციურ და არა მაინდუცირებელ სისტემას და არ ასრულებს ამ მექანიზმის პირდაპირი ეფექტორის როლს. უჯრედების I ტიპს მიეკუთვნებიან ლიმფობლასტოიდური B-უჯრედების ხაზი SKW და T-უჯრედების ხაზი H9. (Scaffidi C. et al., 1998). II ტიპის უჯრედებს მიეკუთვნებიან T-უჯრედების ხაზი Jurkat და CEM.

აპოპტოზის საინიციაციო გზებს შორის მნიშვნელოვანი როლი ენიჭება სხვადასხვა ფიზიოლოგიური ინდუქტორებით გაშუალდებულ

გზას, რომლის რეალიზაცია ხდება სპეციალური უჯრედული რეცეპტორების საშუალებით. სიგნალები რეცეპტორების მიერ მიღების შემდეგ ექვემდებარებიან ანალიზს. შემდგომში, რეცეპტორების საშუალებით მიღებული სიგნალი მოლეკულების-მესენჯერების გზით გადაეცემა ბირთვს, სადაც ლეტალური გენების აქტივაციით ან ანტილეტალური გენების რეპრესიის გზით ირთვება უჯრედის თვითმკვლელობის პროგრამა. ძუძუმწოვრების და ადამიანის უჯრედებში აპოპტოზი, როგორც წესი, დაკავშირებულია კასპაზების (ევოლუციურად კონსერვატიული ცისტეინური პროტეაზების) კასკადის პროტეოლიზურ აქტივაციასთან, რომლებიც იწვევენ ცილების სპეციფიურ გახლეჩვას ასპარაგინის ნაშთის შემდეგ (Cohen G.M., Biochem J., 1997. Thornbery N.A., Lazebnik Y. Science 1998).

რეცეპტორ-ინდუცირებული აპოპტოზის დროს სასიკვდილო პროგრამის ჩართვა რეალიზდება უჯრედული რეცეპტორების საშუალებით, რომელთა აქტივაციას აინდუცირებენ სპეციალიზირებული ფიზიოლოგიური ინდუქტორები (Thornbery N.A., Lazebnik Y., Science , 1998). ასე, მაგალითად, Fas რეცეპტორის აქტივაცია ხორციელდება შესაბამისი ლიგანდით FasL (CD95L). CD95 რეცეპტორების და CD95 ლიგანდების სისტემა წარმოადგენს ფიზიოლოგიური აპოპტოზის კლასიკურ რეგულატორს. CD95 (აგრეთვე APO-1, ან Fas) უჯრედული მემბრანის რეცეპტორია, რომელიც ინტენსიურად ექსპრესირდება *in vivo* იმუნური სისტემის ორგანოებში, ღვიძლში, ფილტვებში, და გულში. T კილერის ტრანსმემბრანული ცილა FasL მონაწილეობს ვირუსით ინიფიცირებულ, ან ანთებითი პროცესის ჩაქრობის შემდეგ უსარგებლო B ლიმფოციტების აპოპტოზის ინიციაციაში. FasL მიეკუთვნება სიმსივნური ნეკროზის ფაქტორის (TNF-

ა) ლიგანდების მრავალრიცხოვან ოჯახს, რომელიც მოიცავს აგრეთვე TNF-β-ს (ლიმფოტოქსინი), TRAIL (Apo2L), CD95L, CD40L, CD27L, CD30L, OX40L. Fas – TNF ოჯახის რეცეპტორების წევრია, რომლებიც წარმოდგენილია ტრანსმემბრანული ცილებით, რომელთა უჯრედგარეთა უბნები ურთიერთქმედებენ ლიგანდ-ინდუქტორების ტრიმერებთან. რეცეპტორის და ლიგანდის ურთიერთქმედება იწვევს რეცეპტორული მოლეკულების კლასტერების წარმოქმნას და მათი შიდაუჯრედული უბნების ადაპტერებთან შეკავშირებას.

აპოპტოზის სიგნალი ექვემდებარება ანალიზს და შემდგომში გადაიცემა შუამავალ ეფექტორულ მოლეკულებს. აპოპტოზის ეფექტორულ ფაზაში აქტიურდება აღმასრულებელი მოლეკულური მექანიზმები. დეგრადაციის ფაზაში ადგილი აქვს აპოპტოზისათვის დამახასიათებელი მორფოლოგიური ცვლილებების განვითარებას და დნმ-ის ფრაგმენტაციას (Lazebnik Y.A. et al. 1993. Solary E. et al. 1993).

აპოპტოზის ეფექტორული პროგრამის შესრულება ხორციელდება სპეციალიზირებული ფერმენტების, კასპაზების სასიგნალო გზის მეშვეობით (Alnemri E.S. 1996. Hengartner M.O. 2000).

კასპაზები (ცისტეინამოკიდებული, ასპარტასპეციფიური პროტეაზები) მიეკუთვნებიან ევოლუციურად კონსერვატიულ პროტეაზების ოჯახს, ფერმენტებს, რომლებიც აკატალიზებენ უჯრედული ცილების გახლეჩვას (Salvesen G.S., 1999.). იდენტიფიცირებულია კასპაზების ოჯახის 14-ზე მეტი წევრი (Yuan J. et al. 1993). კასპაზების აქტიურ ცენტრში ცისტეინის ნაშთია. კასპაზები გამოიხატავენ ცილების სპეციფიურ ტეტრაპეპტიდულ ჯაჭვებს ასპარაგინის მუავას ნაშთის კარბოქსილური დაბოლოების მიხედვით. უჯრედებში კასპაზები სინთეზირდება ლატენტური წინამორბედების –

პროფერმენტების, ეგრეთ წოდებული პროკასპაზების, სახით. პროკასპაზები (მოლეკულური მასა 50კდა) შედგება სამი შემადგენელი სუბერთეულისაგან: N-დამაბოლოებელი ჯაჭვისაგან (პრედომენისაგან), შუალედური დომენის დიდი სუბერთეულის წინამორბედისაგან (20 კდა) (p20 სუბერთეული) და C-დამაბოლოებელი დომენი, მომწიფებული ფერმენტის მცირე სუბერთეულის წინამორბედისაგან (10 კდა) (p10 სუბერთეული). აქტიური კასპაზები წარმოადგენენ ჰეტეროტეტრამერებს, რომლებიც შეიცავენ ორ p10 და ორ p20 სუბერთეულს, მიღებულს ორი პროკასპაზული მოლეკულიდან. კასპაზები წარმოადგენენ ფარულ პრეკურსორს, რომლის აქტივაციის შემთხვევაში ადგილი აქვს უჯრედული სიკვდილის პროგრამის ინიციაციას. უკანასკნელი ხორციელდება უჯრედული ინფრასტრუქტურის საკვანძო კომპონენტების დარღვევით და უჯრედის დამაზიანებელი ფაქტორების აქტივაციით.

ცნობილია კასპაზების ოჯახის 14 წევრი და ყოველივე წევრს გააჩნია მაღალი სპეციფიურობა მათ სუბსტრატებში ასპარტატის ნაშთების გახლეჩვის მიმართ. ყველა კასპაზა არსებობს ზიმოგენის სახით და მოითხოვს პროტეოლიზურ გააქტივებას (Nickolson D.W., Thornberry N.A. 1997). კასპაზების განვითარების პროცესში წარმოიქმნება სუბსტრატის მიერთებისა და კატალიზისათვის აუცილებელი ორი აქტიური სუბერთეული (Walker N.P. et al. 1994). ვინაიდან კასპაზები პოტენციურად წარმოადგენენ უჯრედის სიკვდილის იარაღს, უჯრედების ცხოველქმდების პროცესში ისინი იმყოფებიან მკაცრი რეგულაციის ქვეშ. აპოპტოზის სტიმულებს მიეკუთვნება ულტრაიისფერი გამოსხივება, დნმ-ის დაზიანება, ზრდის ფაქტორების უკმარისობა, კინაზების ინჰიბიცია, მიტოქონდრიების დაზიანება, და

სიკვდილის რეცეპტორების ოჯახის წევრების, მემბრანული რეცეპტორების, აქტივაცია.

კასპაზები შეიძლება დაიყოს ორ ჯგუფად, მათი აქტივაციის მამოღულირებელი მოლეკულების, ანუ სუბსტრატული სპეციფიურობის მიხედვით. განასხვავებენ ინიციაციურ და ეგzekტორულ, ანუ აღმავალ და დაღმავალ კასპაზებს. კასპაზების მიერ ინიცირებული უჯრედების სიკვდილის, ანუ აპოპტოზის პროცესი, რეგულირდება საინიციაციო და ეგzekტორული კასპაზების მეშვეობით. აღმავალი ინიციაციური კასპაზები (კასპაზა 2, 8, 9, 10 და 12) პროაპოპტოზური სიგნალის მატარებლები არიან, დაღმავალი ეგzekტორული კასპაზები (კასპაზა 3, 6 და 7) პასუხს აგებენ უჯრედის მორფოლოგიურ ცვლილებებზე აპოპტოზის დროს.

საინიციაციო პროკასპაზებს (პროკასპაზები 1, 2, 4, 5, 9, 11, 12, და 13) აქვთ გრძელი N-ტერმინალური პროდომენი (100-ზე მეტი ამინომჟავური ნაშთი), რომელიც არეგულირებს მათ აქტივობას (E.S. Alnemri et al. 1996, M.O. Hengartner 2000, Y. Shi 2002). კასპაზები 8 და 10-ს აგრეთვე გააჩნია გრძელი N-ტერმინალური პროდომენი, ეგრეთ წოდებული death-effector domain (DED).

ეგzekტორები (პროკასპაზები) – კასპაზების (საინიციაციო კასპაზების) არააქტიური წინამორბედებია. ადაპტერ-რეცეპტორული ურთიერთქმედება ხორციელდება მცირე დომენების პროტეინ-პროტეინური ურთიერთქმედებით: DD (death domain- სიკვდილის დომენი), (DED (death-effector domain – სიკვდილის ეგzekტორის დომენი), CARD (caspase activation and recruitment domain – კასპაზას აქტივაციის და მიზიდვის დომენი). ყველა ამ დომენებს გააჩნია მსგავსი სტრუქტურა, ისინი შეიცავენ 6 α -სპირალურ უბანს. დომენები DD მონაწილეობენ Fas

რეცეპტორების FADD (Fas-associated DD-protein) ადაპტორთან და TNFR1 და DR3 (death receptor 3) რეცეპტორების TRADD (TNFR1-associated DD-protein) ადაპტორთან ურთიერთქმედებაში. DED დომენები მონაწილეობენ FADD ადაპტორის ურთიერთქმედებაში პროკასპაზებთან 8 და 10. ადაპტორი RAIDD (RIP-associated Ich-1/CED-3 homologous protein with a death domain, RIP- receptor interacting protein-პროტეინი, რომელიც ურთიერთქმედებს რეცეპტორთან კავშირდება პროკასპაზა-2-თან CARD-დომენის მეშვეობით. პროკასპაზა 8, მაგალითად, (FLICE/MACH/Mch5) აქტივდება Fas რეცეპტორის მეშვეობით FADD ადაპტორის საშუალებით. წარმოიქმნება აგრეგატები FasL-Fas-FADD-პროკასპაზა-8. მსგავს აგრეგატებს, რომლებშიც მიმდინარეობს კასპაზების აქტივაცია უწოდებენ აპოპტოსომას, აპოპტოზურ ჩაპერონს, ან სიკვდილის მაინდუცირებელ სასიგნალო კომპლექსებს (49). პროკასპაზებს გააჩნია უმნიშვნელო პროტეოლიზური აქტივობა, რომელიც შეადგენს მომწიფებელი კასპაზას აქტივობის 1-2%-ს. პროკასპაზების კონცენტრაცია უჯრედში მცირეა, მონომერულ ფორმაში ისინი იმყოფებიან ლატენტურ მდგომარეობაში. ითვლება, რომ პროკასპაზების აგრეგაცია ხელს უწყობს აქტიური კასპაზების წარმოქმნას პროტეოლიზური ან თვით- ან ჯვარედინი გახლეჩვის გზით (აუტო- ან ტრანსპროცესინგი). ამ პროცესში პროკასპაზას (მოლეკულური მასა 30-50 კდა) ცილდება რეგულატორული N-დაბოლოების დომენი (პროდომენი), ხოლო მოლეკულის დარჩენილი ნაწილი იყოფა დიდი (20 კდა) და მცირე (10კდა) სუბერთეულებად. შემდეგ ადგილი აქვს დიდი და მცირე სუბერთეულების ასოციაციას. ორი გეტეროდიმერი წარმოქმნის ორ დამოუკიდებელი კატალიზური მონაკვეთის მქონე ტეტრამერს.

აქტივირებული აღმავალი კასპაზები იწვევენ დაღმავალი კასპაზების აქტივაციას (Alnemri E.S. et al. 1996, Hengartner M.O. 2000, Shi Y., Bouchier-Hayes L., Martin D.J. 2002). ეფექტორული კასპაზები მოკლე პროდომენის მქონე კასპაზებია (Wyllie A.H. et al. 1980, Alnemri E.S. et al. 1996, Hengartner M.O. 2000, Kuhn G.G. et al., 2001). კასპაზა 14 ირთვება ციტოკინების გამოყოფის პროცესში. აღმასრულებელი კასპაზები იწვევენ უჯრედის სიკვდილს ორი ძირითადი მექანიზმის, უჯრედის საკვანძო სუბსტრატების დესტრუქციის და ციტოკინების აქტივაციის მეშვეობით. სიკვდილის პროცესი იწყება ტერმინალურ ფაზაში, როცა აღმასრულებელი კასპაზები ააქტივებენ დნმ-ის დეგრადაციის გამომწვევ მექანიზმს (Liu X., et al., 1997, Sakahira H. et al., 1998, Enari M., et al., 1998, Liu X., et al., 1998).

ეფექტორული კასპაზები, რომლებიც დეგრადაციის ფაზის აქტივაციას და დნმ-ის ფრაგმენტაციას იწვევენ, ინიციატორები და აღმასრულებელი არიან. ეფექტორული პროკასპაზების პროდომენები უფრო მოკლეა (შეიცავენ 30-ზე ნაკლებ ამინომჟაურ ნაშთს) და ასრულებენ პროკასპაზების ინჰიბიტორის ფუნქციას. გამოვლენილ იქნა ცილები (IAP), რომლებიც აბლოკირებენ ეფექტორული პროკასპაზების პროდომენის მოცილებას და ამ გზით უშლიან ხელს მათ აქტივაციას. კასპაზა 2, 8, 9, და 10 აპოპტოზის ინიციატორები არიან, ხოლო კასპაზები 1, 4, 5, 11, 12 და 13 ირთვებიან ციტოკინების აქტივაციაში. (Bouchier-Hayes L., Martin D.J., 2002, Shi Y. 2002). არსებობს მრავალი დამადასტურებელი მონაცემი, რომ კასპაზა 1 პროანთებითი ფუნქციის გარდა მნიშვნელოვან აღმავალ კასპაზას როლს ასრულებს (Li M. et al. 2000, Chgen M. et al. 2000).

საინიციაციო კასპაზების აქტივაციის ეტაპზე ჯერ კიდე შეიძლება აპოპტოზის განვითარების შეჩერება. ეფექტორული კასპაზების აქტივაციის შემდეგ პროგრამული სიკვდილის მექანიზმი, აპოპტოზი, შეუქცევადი ხდება. კასპაზა 3 ააქტივებს მთელ რიგი სხვა კასპაზებს და აგრეთვე დნმ-ის აქტივაციის ფაქტორს, იწვევს დნმ-ის შეუქცევად დაშლას ფრაგმენტებად.

არსებობს რეგულატორები, რომლებიც აბლოკირებენ, ან პირიქით აძლიერებენ საინიციაციო კასპაზების დამანგრეველ მოქმედებას. მათ მიეკუთვნება Bcl-2 (აპოპტოზის ინჰიბიტორები: A1, Bcl-2, Bcl-W, Bcl-X_L, Brag-1, Mc-1, NR13) და Bax (აპოპტოზის პრომოტორები: Bad, Bak, Bax, Bcl-X_s, Bid, Bik, Bim, Hrk, Mtd). ეს ცილები ევოლუციურად ძველია.

აპოპტოზის ინიციაციის შიდაუჯრედული სტიმული დაკავშირებულია მიტოქონდრიების ფუნქციურ ცვლილებებთან. მიტოქონდრია-დამოკიდებული აპოპტოზის განვითარების დროს აპოპტოზის ინდუქტორების ზემოქმედების შედეგად, უჯრედებში მკვეთრად მცირდება მიტოქონდრიების მემბრანული პოტენციალი ($\Delta\psi$). $\Delta\psi$ -ის შემცირება განპირობებულია მიტოქონდრიის შიდა მემბრანის განვლადობის მომატებით გიგანტური ფორების წარმოქმნის გამო. ამ ფორების წარმოქმნას იწვევს სხვადასხვა ფაქტორების ზემოქმედება, მათ შორის უჯრედის გამოლევა აღდგენილი გლუტათიონის-, NAD(p)H-ის, ATP-ის და ADP-ისაგან, ჟანგბადის აქტიური ნაერთების წარმოქმნა, ჟანგვითი ფოსფორილირების გათიშვა პროტონური იონოფორების საშუალებით, ციტოპლაზმაში Ca^{2+} -იონების შემცველობის მომატება, ციტოქრომ c ლოკალიზებულია სივრცეში გარეთა და შიდა მიტოქონდრიულ მემბრანებს შორის. დადებითად დამუხტული ცილა,

იგი ელექტროსტატიურად უკავშირდება მიტოქონდრიის შიდა მემბრანის უარყოფითად დამუხტულ ზედაპირთან.

ფორების წარმოქმნა არ წარმოადგენს მიტოქონდრიების მემბრანათოშორისო ცილების ციტოპლაზმაში გასვლის ერთადერთ მექანიზმს. ითვლება, რომ მიტოქონდრიის გარეთა მემბრანის გახლეჩვა განპირობებული შეიძლება იყოს შიდა მემბრანის ჰიპერპოლარიზაციით. შესაძლებელია, აგრეთვე, ალტერნატიული მექანიზმი მემბრანის გახლეჩვის გარეშე, მიტოქონდრიის გარეთა მემბრანაში გიგანტური ცილოვანი არხის გასხნით.

კასპაზების აქტივაციას განაპირობებს აპოპტოზის ტიპური მარკერების, მიტოქონდრიაში ლოკალიზებული პროაპოპტოზური პროტეინების (ციტოქრომ C-ს, Apoptosis Inducing Factor (AIF)), განთავისუფლება (Li P. et al. 1997, Susin S.A. et al., 1999). ეს ცილები გადაადგილდებიან მიტოქონდრიიდან ციტოზოლში და ბირთვში და პასუხს აგებენ პროაპოპტოზური მოვლენების ინდუქციაზე (დნმ-ის მაღალმოლეკულურ ფრაგმენტებად დაშლა, ფოსფატიდილსერინის ექსპოზიცია და ქრომატინის კონდენსაცია) (Daugas E. et al. 2000, Susin S.A. et al. 2000).

ციტოქრომ c - მიტოქონდრიების ელექტრონების სატრანსპორტო ჯაჭვის ცილაა, რომელიც მონაწილეობს ATP-ის გენერაციაში. ფიზიოლოგიურ პირობებში ციტოქრომ c ლოკალიზებულია სივეცეში გარეთა და შიდა მიტოქონდრიულ მემბრანებს შორის. ეს დადებითად დამუხტული ცილა უკავშირდება მიტოქონდრიის შიდა მემბრანის უარყოფითად დამუხტულ ზედაპირს. სტრესული ზემოქმედებების (ციტოტოქსიური ნაერთების, ზრდის ფაქტორების დეფიციტის, ჟანგბადის აქტიური ნაერთების, დნმ-ის დაზიანების) ფონზე

შესაძლებელია მიტოქონდრიის გარეთა მემბრანაში გიგანტური ფორის წარმოქმნა. მისი დიამეტრი (3 ნმ) იძლევა 1,5 კდა-მდე მოლეკულური მასის მქონე ნივთიერებების მემბრანაში გავლის საშუალებას, რაც განაპირობებს მიტოქონდრიული მატრიქსის შესიებას, მიტოქონდრიის გარეთა მემბრანის დაზიანებას და მემბრანათაშორისო სივრცის ხსნადი ცილების ციტოპლაზმაში გასვლას. ამ ცილებს შორის აღსანიშნავია ციტოქრომ c და რამოდენიმე აპოპტოზური ფაქტორი: პროკასპაზები 2, 3, 9, ცილა AIF (apoptosis inducing factor- აპოპტოზის გამომწვევი ფაქტორი).

ციტოქრომ c თავისუფლდება მიტოქონდრიული მემბრანათაშორისო სივრციდან ციტოზოლში, შემდგომში იწვევს მემბრანის დეპოლარიზაციას და წარმოქმნის კომპლექს (ეგრეთ წოდებულ აპოპტოსომას) Apaf-1-თან, ადენოზინტრიფოსფატთან (ATP) და პროკასპაზა 9-სთან, რომელიც შემდეგ აქტიურდება. აქტიური კასპაზა 8-ს (და შესაძლოა კასპაზა 10) DISC-იდან, ან კასპაზა 9-ს (მიტოქონდრიული სასიგნალო სისტემიდან) შეუძლია შემდეგ დადმავალი კასპაზების (კასპაზა 3, -6 და -7) აქტივაცია. აპოპტოზი, მაშასადამე, აინდუცირებს პროტეოლიზის კასკადს, რომელშიც კასპაზები-ინიციატორები უერთდებიან და ააქტივებენ დადმავალ კასპაზებს, რომლებიც უჯრედული პროტეინების დამუშავების მეშვეობით ხელს უწყობენ უჯრედის დაშლას.

პროკასპაზა 3 ვლინდება როგორც მიტოქონდრიების მემბრანათაშორისო სივრცეში, ასევე ციტოპლაზმაშიც. ენერგოპროდუქციაში მისი მნიშვნელოვანი როლის გარდა ციტოქრომ c კასპაზების კასკადის მნიშვნელოვანი ტრიგერია. ციტოქრომ c გაშუალებებული აპოპტოზის გზა ირთვება ციტოქრომ c-ს მიტოქონდრიიდან ციტოპლაზმაში განთავისუფლების შემთხვევაში.

ციტოპლაზმაში ციტოქრომ c უერთდება APAF-1-ს (apoptosis protease activating factor-1 – აპოპტოზური პროტეაზას გამააქტივებელი ფაქტორი) აპოპტოსომის (მოლეკულური კომპლექსი, შემცველი cytochrome c, Apaf-1, ATP, და პროკასპაზა 9) წარმოქმნით. აპოპტოსომა ააქტივებს - აპოპტოზის აღმავალ ინიციატორს, კასპაზა 9-ს (Liu X. et al. 1996, Li P. Nijhawan D. 1997). ეს მექანიზმი რეგულირდება აპოპტოზის ინიციაციის საკვანძო რგოლის, ციტოქრომ c-ს განთავისუფლების შედეგად (Hengartner M.O., 2000, Wang X., 2001).

APAF-1 – 130 კდა მოლეკულური მასის მქონე ცილა, N-დაბოლოებაზე შეიცავს CARD დომენს (caspase activation and recruitment domain), ხოლო C- დაბოლოებაზე 12 განმეორებად და WD-40 მიმდევრობებს (WD – ტრიპტოფანისაგან და ასპარტატისაგან შემდგარი დიპეპტი, რომელიც აბოლოებს 40 ამინომჟავური ნაშთისაგან შემდგარ მიმდევრობას). WD-გამეორებები დამახასიათებელია უჯრედების გაყოფის და დიფერენციაციის, გენების ტრანსკრიპციის რნმ-ის მოდიფიკაციის რეგულაციაში მონაწილე ცილებისათვის. APAF-1 წარმოქმნის კომპლექსს პროკასპაზა 9-სთან ციტოქრომ c-ს და dATP-ის, ან ATP-ის თანაობისას (Liu X. et al. 1996, Zou H. et al. 1997, Li P. et al 1997, Kuida K. 2000). ამ კომპლექსის წარმოქმნისას APAF-1 იწვევს CARD დომენის ოლიგომერიზაციას (Kuida K., 2000). კომპლექსი, წარმოქმნილი Apaf-1-ის, Cyt c-ს, dATP-ს ან ATP-ს და კასპაზა-9-ს მიერ იწოდება “აპოპტოსომად”. აპოპტოსომას მოლეკულური მასა > 1,3 მლნ დალტონ, ხოლო მისი აქტიური ფორმის მოლეკულური მასა 700 kDa (Cain K., et al., 2000). აპოპტოსომა წარმოადგენს კომპლექსს, რომელიც აერთიანებს ციტოპლაზმიდან და მიტოქონდრიიდან ინდუცირებულ

სიგნალებს, და არეგულირებს კასპაზების აქტივაციას. პროკასპაზა 9-ს მოლეკულის APAF-1-ციტოქრომ-c-კომპლექსთან მიახლოება იწვევს პროკასპაზა-9-ს პროტეოლიზურ გარდაქმნას აქტიური კასპაზა 9-ს წარმოქმნით (76-78). მომწიფებული კასპაზა 9 შემდგომში იწვევს პროკასპაზა-3-ის აქტივაციას.

მიტოქონდრიის მემბრანათაშორისო სივრცეს მეორე ცილა, AIF – ფლავოპროტეინია. ფლავოპროტეინი AIF იზოლირებული HeLa უჯრედების ბირთვებთან დამატებისას იწვევს ქრომატინის კონდენსაციას და დნმ-ის ფრაგმენტაციას, ხოლო ვირთაგების ღვიძლის იზოლირებულ მიტოქონდრიებთან დამატებისას – ციტოქრომ c-ს და კასპაზა-9-ს განთავისუფლებას უწყობს ხელს. ითვლება, რომ AIF ასრულებს აპოპტოზის კასპაზების დამოუკიდებელი მიტოქონდრიული ეფექტორის როლს. ციტოპლაზმაში იგი განიცდის ტრანსლოკაციას უჯრედის ბირთვში, სადაც ააქტივებს ბირთვული დნმ-ის მსხვილ ფრაგმენტებად (50000 და მეტი ნუკლეოტიდების წყვილი) გამწვევებ ნუკლეაზას. AIF-ის მიერ გამოწვეული აპოპტოზი მიმდინარეობს კასპაზების გარეშე. ზოგიერთ შემთხვევაში დაღმავალ კასპაზებს გააჩნია აპოპტოზის ხელისშემშლელი პროტეინების ინაქტივაციის უნარი. მაგალითად, DNM-ის ფერმენტი-რეპარატორი, პოლი(ადენოზინ დიფოსფატ [ADP]-რიბოზა) პოლიმერაზა (PARP), რომელიც აკატალიზებს ADP რიბოზა ერთეულების NAD-დან ბირთვულ პროტეინებზე მიერთებას, განიცდის ინაქტივაციას კასპაზა 3 –ის მიერ ინიცირებული დაშლის გამო, რაც განაპირობებს ენერგია-დამოკიდებული აპოპტოზისათვის აუცილებელ ATP-ის ზრდას. სხვა შემთხვევებში, აქტიურ დაღმავალ კასპაზებს შეუძლია ფერმენტების აქტივაცია. მაგალითად, კასპაზა 3 იწვევს კასპაზა-აქტივირებული

DNA-აზას ინჰიბიტორის (ICAD) დაშლას, რაც განაპირობებს მისი აპოპტოზურ ენდონუკლეაზასთან (CAD) მიერთების და რეპრესიის უნარის დარღვევას. საბოლოოდ ICAD-ის დაშლის შედეგად ადგილი აქვს CAD-ის აქტივაციას, და აპოპტოზისათვის დამახასიათებელი DNM-ის ფრაგმენტაციას (Nagata S. et al., 2003). ეფექტორული კასპაზების სუბსტრატები წარმოდგენილია სხვადასვა ცილებით (60-ზე მეტი). ფუნქციური კუთვნილების მიხედვით ეს ცილები იყოფა რამდენიმე ჯგუფად: დნმ-ის ფრაგმენტაციაზე პასუხისმგებელი დნმ-აზები. დნმ-ის დეგრადაცია და ფრაგმენტაცია ხორციელდება კასპაზა-დამოკიდებული დნმ-აზების მეშვეობით, როგორცაა DFF40 (DNA fragmentation factor - დნმ-ის ფრაგმენტაციის ფაქტორი) (Liu X. et al. 1998), CAD (caspase activated DNA-se – დნმ-აზა გამააქტივირებელი კასპაზა) (Enari M. et al. 1998, Sakahira H. et al. 1998). DFF40 და CAD ნორმალურ უჯრედებში წარმოდგენილი არიან ინაქტივირებული ჰეტეროდიმერების სახით მაინჰიბირებელ DFF45 (Liu X, Zou H, 1997.) და ICAD (CAD-ის ინჰიბიტორი) ცილებთან (Sakahira H. Enari M. Nagata S. 1998). ამ ფერმენტების აქტივაცია ხორციელდება სელექტიურად კასპაზა 3-ის (Sakahira H. et al. 1998, Stamler J.S. et al. 1898), ან კასპაზების ოჯახის სხვა წევრების მიერ (Tang D. Kidd VJ. 1998). აქტივირებული CAD-ის ან DFF40-ის მოქმედება იწვევს აპოპტოზისათვის დამახასიათებელ ბირთვის მორფოლოგიურ ცვლილებებს (Enari M. et al. 1998, Liu X. Li P. et al. 1998).

მიტოქონდრიების გარეთა მემბრანის დარღვევისას მემბრანათაშორისო არიდან თავისუფლდება თერმოლაბილური ფაქტორი, რომელიც იწვევს ქსანტიდეჰიდროგენაზას შეუქცევად

გარდაქმნას ქსანტინოქსიდაზად. ქსანტინდეჰიდროგენაზა აკატალიზებს ქსანტინის NAD^+ -დამოკიდებულ დაჟანგვას ჰიპოქსანტინამდე და შარდოვანას მჟავამდე. ქსანტინოქსიდაზა იგივე რეაქციების კატალიზატორია, მაგრამ არა NAD^+ -თან, არამედ O_2^- -თან ელექტრონების აქცეპტორების როლში. ამ დროს წარმოიქმნება ჟანგბადის რეაქციული ნაერთები, რომლებიც ხელს უწყობენ მიტოქონდრიების დაზიანებას და აპოპტოზის ინდუქციას. ჟანგბადის რეაქციული ნაერთების წარმოქმნა, რა თქმა უნდა არ შემოიფარგლება ქსანტინოქსიდაზური რეაქციით. უჯრედებში ჟანგბადის რეაქციული ნაერთების ძირითად წყაროს მიტოქონდრია წარმოადგენს. ჟანგბადის რეაქციული ნაერთების წარმოქმნა მკვეთრად იზრდება მემბრანული პოტენციალის მომატებისას.

ზოგიერთ შემთხვევაში აპოპტოზი ვითარდება რეცეპტორული და მიტოქონდრიული სასიგნალო სისტემების (პლაზმური მემბრანის რეცეპტორების და მიტოქონდრიული ციტოქრომი c) შეთანხმებული მოქმედების შედეგად. ასე, დნმ-ის დაზიანება განაპირობებს უჯრედში გენის p53-ის ცილოვანი პროდუქტის დაგროვებას, რომელსაც შესწევს უჯრედების გაყოფის შეჩერების ან აპოპტოზის ინდუქციის უნარი. სიმსივნური უჯრედების 50%-ზე მეტს გენი p53 ინაქტივირებული აქვს, და უჯრედული ჰომეოსტაზის p53 დამოკიდებული რეგულაცია დარღვეულია.

ცილა p53 – ტრანსკრიპციული ფაქტორია, რომელიც არეგულირებს მთელი რიგი გენების აქტივობას. ითვლება, რომ p53-ის წარმოქმნასთან დაკავშირებული საპასუხო რეაქცია დამოკიდებულია უჯრედული გენომის დარღვევის ხარისხზე. გენომის ზომიერი დარღვევის შედეგად ადგილი აქვს უჯრედული გაყოფის შეჩერებას, დნმ-ის რეპარაციას და

უჯრედი აგრძელებს ცხოველქმედებას. გენომის მძიმე დაზიანების შემთხვევაში დნმ ველარ ექვემდებარება რეპარაციას, ირთვება კასპაზების აქტივაციის რეცეპტორული და ციტოქრომ c-დამოკიდებული აპოპტოზური კასკადები.

ზოგიერთ შემთხვევაში შესაძლებელია აპოპტოზის სხვადასხვა ინიციატორების ურთიერთქმედება. ასე, მაგალითად, რეცეპტორ-დამოკიდებული გზა იწვევს პროკასპაზა 8-ს დაბალეფექტურ აქტივაციას. ამ შემთხვევაში ირთვება მიტოქონდრია დამოკიდებული აპოპტოზის გზა: მცირე რაოდენობით წარმოქმნილი კასპაზა-8 ურთიერთქმედებს ციტოპლაზმაში Bax ოჯახის ცილა Bid-თან და იწვევს მის ორად გახლეჩვას. შედეგ C-დაბოლოების დომენი Bid შედის მიტოქონდრიულ მემბრანაში, აინდუცირებს მიტოქონდრიიდან ციტოქრომ c-ს განთავისუფლებას და APAF-1-თან შეკავშირებას.

შესაძლებელია აპოპტოზური სიგნალის გავრცელება ენდოპლაზმური რეტიკულუმის მონაწილეობით. ენდოპლაზმურ რეტიკულუმში ლოკალიზებულია პროკასპაზა-12. შიდაუჯრედული Ca^{2+} -ჰომეოსტაზის დარღვევა იწვევს პროკასპაზა-12-ის კასპაზა 12-ად გარდაქმნას და უჯრედში აპოპტოზის განვითარებას. ენდოპლაზმურ რეტიკულუმთან დაკავშირებული აპოპტოზი დამახასიათებელია ალცჰაიმერის დაავადებისათვის.

ციტოტოქსიური ლიმფოციტები, T-კილერები, იწვევენ ინიფიცირებულ უჯრედებში პერფორინ-დამოკიდებული აპოპტოზის განვითარებას. $CD8^+$ ციტოტოქსიური T უჯრედები და NK უჯრედები ათავისუფლებენ პერფორინს, რომელიც ერთვება სამიზნე უჯრედების მემბრანაში ტურბულური სვრეტული კომპლექსების სახით და ქმნის მასში ტრანსმემბრანულ არხებს. ამ არხების მეშვეობით სამიზნე

უჯრედების ციტოზოლში ხვდება T უჯრედების გრანულების მეორე კომპონენტი, გრანზიმი (ფრაგმენტი), რომელიც წარმოადგენს პროტეოლიზური ფერმენტების ნარევეს. გრანზიმი წარმოადგენს პროტეაზას, რომელიც ააქტივებს უჯრედში მისი სიკვდილის გამომწვევი ნუკლეოზურ და კასპაზურ სასიგნალო გზებს. ამ ნარევის მნიშვნელოვანი კომპონენტია – გრანზიმი B – სერინის პროტეაზა, სპეციფიური ასპარაგინის მუავას ნაშთის მიმართ. გრანზიმი B მონაწილეობს პროკასპაზა 3-ის კასპაზა 3-ად გარდაქმნაში და ხასიათდება ამ პროცესში გაცილებით მაღალი აქტივობით, ვიდრე საინციციტო კასპაზები 8 და 10 (შესაბამისად 2 და 7 ჯერ).

უჯრედის უჯრედშორისო არესთან ურთიერთქმედება ხორციელდება ინტეგრინების საშუალებით. ინტეგრინები – ჰეტეროდიმერული მემბრანული ცილების დიდი ოჯახია, რომლებიც მონაწილეობენ უჯრედების ადჰეზიის განხორციელებაში შიდაუჯრედული ციტოჩონჩხის უჯრედგარეთა მატრიქსის ლიგანდებთან შეკავშირების მეშვეობით. უჯრედის ადჰეზიის დარღვევა განაპირობებს აპოპტოზის ინდუქციას. ინტეგრინების უმრავლესობა სპეციფიურად ურთიერთქმედებს უჯრედგარეთა მატრიქსის შემადგენლობაში შემავალი ცილების ფრაგმენტთან, ტრიპეპტიდთან RGF (არგინინი-გლიცინი-ასპარტატი). ხსნადი დაბალმოლეკულური RGF-შემცველი პეპტიდები – აპოპტოზის ეფექტური ინდუქტორებია: ისინი ააქტივებენ უჯრედებში ლატენტურ კასპაზა-3-ს. კასპაზების მთელი რიგი შეიცავს RGF-მიმდევრობას ფერმენტის აქტიური ცენტრის ახლოს.

აპოპტოზის ზოგიერთი რეგულატორები, იდენტიფიცირებულია, როგორც მუდმივად არსებული ჯანმრთელ უჯრედებში პროტეინები. Bcl-2 იდენტიფიცირებულ იქნა ფოლიკულურ ლიმფომაში, როგორც

ანტი-აპოპტოზური პროტეინი, რომელიც ხელს უწყობდა უჯრედებში აპოპტოზის დაქვეითებას და პროლიფერაციის ინტენსიფიკაციას და, მაშასადამე, სიმსივნის განვითარებას. Bcl-2 ცილა პირველად გამოვლენილია ავთვისებიანი ლიმფომის B უჯრედებში (Tsujimoto Y. et al., 1985). ძუძუმწოვრებში გამოვლენილია *bcl-2* გენთან ჰომოლოგიური ცილების დიდი რიცხვი. *bcl-2*-ს ოჯახის ცილები იყოფა ორ ძირითად კლასად, მახასიათებელი პროაპოპტოზური და ანტიაპოპტოზური ფუნქციებით. ყველა *bcl-2*-ს ოჯახის ცილები ხასიათდებიან განსაკუთრებული უბნით, ეგრე წოდებული BH-დომენით (Bcl-2 ჰომოლოგიური). ყველა ანტიაპოპტოზური წევრი (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1) შეიცავს 4 BH დომენს (BH1-BH4). პროაპოპტოზური წევრები (Bax, Bad, Bak) შეიცავენ მხოლოდ 3 ჰომოლოგიურ დომენს (BH1-BH3), ან მხოლოდ BH3 დომენს (Bid, Bad, Bak, Egl-1, Bax და სხვა). D.I. Vaux და თანაავტორებმა (Vaux D.I., et al., 1998) პირველად აღწერეს Bcl-2-ის ანტიაპოპტოზური ეფექტი B ლიმფოციტურ უჯრედებში. შემდგომში ნაჩვენები იქნა, რომ Bcl-2 აინჰიბირებს აპოპტოზის ძუძუმწოვრების ყველა უჯრედებში (Greenlund L.J.S. et al. 1995, Reed J.S. 1996, Jager R. et al. 1997). BH3-ერთადერთი პროტეინები (Bid) მოქმედებენ ანტიაპოპტოზური Bcl-2 ოჯახის წევრებთან მიერთებით და მათი მოქმედების პრევენციის მეშვეობით, მაშინ როცა სხვებს (შესაძლოა Bax) გააჩნია გარეთა მიტოქონდრიულ მემბრანაში შეღწევის და პროაპოპტოზური მესენჯერის (ციტოქრომ c-ს) მიმართ მისი განვლადობის გაზრდის უნარი (Korsmeyer S.J. et al., 2001).

ანტიაპოპტოზური თვისებები პირველ რიგში განპირობებულია Bcl-2-ის მიერ APAF-1-ის სეკვესტრაციის უნარით (Hu Y. et al. 1998, Pan G. et

al. 1998). ამ თვალსაზრისით გამოთქმულია აზრი, რომ პროაპოპტოზურ წევრებს შეუძლია ანტიაპოპტოზურ წევრებთან ურთიერთქმედება და APAF-1-ის სეკვენსტრაციის ინჰიბირება. შემდგომში ეს თეორია დაყენებული იქნა ეჭვის ქვეშ, ვინაიდან სტაბილური ურთიერთქმედება APAF-1-ის და Bcl-2-ის შორის ვერ დამტკიცდა (Moriishi K. et al. 1999).

Bcl-2 ან Bcl-X_L პროტეინები როგორც ჩანს აკონტროლებენ კასპაზების აქტივაციას. ამ პროტეინების გადაჭარბებული ექსპრესია აბლოკირებს კასპაზების აქტივაციას და უჯრედების სიკვდილის განვითარებას აპოპტოზის გზით (Allsopp T.E. et al. 1993, Chinnaiyan A. M. et al. 1996).

Bcl-2-ს ახასიათებს ანტიოქსიდანტური ეფექტი, რომელიც წარმოადგენს აპოპტოზის პროტექციის შესაძლებელ მექანიზმს (Hockenbery D.M. et al. 1993). BH1 და BH2 დომენის შემცველი ყველა პროტეინებს, ანტიაპოპტოზური ოჯახის წევრების ჩათვლით, გააჩნია არსების წარმოქმნის უნარი სინთეტურ ლიპიდურ მემბრანაში (Antonsson B. et al. 1997, Schendel S.I. et al. 1997, Schendel S.I. et al., 1998). ნათელია, რომ Bcl-2-ის მსგავს პროტეინებს შეუძლია აპოპტოზის დროს მიტოქონდრიის დაზიანების პრევენცია. შესაძლებელია, რომ მიტოქონდრიული ფუნქციის და სტრუქტურის კონტროლი Bcl-ის მიერ ასრულებს მნიშვნელოვან როლს აპოპტოზის რეგულაციაში.

აპოპტოზური პროცესის მოდულაცია ხორციელდება Bcl-2-ის და მისი ჰომოლოგიური პროტეინის Bax და Bcl-x_L-ის მეშვეობით (Yang E. Korsmeyer S.J. 1996), რომლებიც ურთიერთქმედებენ ერთმანეთთან ჰომო- და ჰეტეროდიმერების წარმოქმნით (Kandouz M. et al. 1996, Oltvai Z.N. et al. 1993). Bcl-2-ის ოჯახის წევრები ხასიათდებიან პროაპოპტოზური და

ანტიაპოპტოზური მოქმედებით. ბალანსი Bcl-2 ოჯახის პროაპოპტოზურ და ანტიაპოპტოზურ სიგნალებს შორის ასრულებს გადამწყვეტ როლს ციტოქრომ c-ს განთავისუფლებაში (Gross A. et al. 1999, Hengartner M.O. 2000, Wang X. 2001, Deveraux Q.L. et al. 2001). უფრო მეტიც, კასპაზების ოჯახის წევრებს გააჩნია Bcl-2-ის პროაპოპტოზური და ანტიაპოპტოზური სიგნალის რეგულაციის უნარი. მაგალითად, კასპაზა 8 და 1 იწვევს Bcl-2-ის ოჯახის წევრის, ID-ის გახლეჩვას და აგენერირებს პროაპოპტოზური აქტივობის მქონე ფრაგმენტს (Li H. et al. 1998). როცა ანტიაპოპტოზური მოლეკულები, Bcl-2 ან Bcl-xL, ურთიერთქმედებენ Bax-თან, Bcl/Bax ან Bcl-xL/Bax ჰეტეროდიმერი აინჰიბირებს Bax-ის აპოპტოზურ ეფექტს (Oltvai Z.N. et al. 1993, Adams J.M. Cory S. 1998).

აპოპტოზის გამომწვევი კასპაზების აქტივაცია კონტროლდება კასპაზების მაინჰიბირებელი მოლეკულების მიერ. მათ მიეკუთვნება აპოპტოზის მაინჰიბირებელი პროტეინები, რომლებიც ძირითადად ურთიერთქმედებენ აპოპტოზის მოდულატორებთან. მაგალითად, X-შეკავშირებული აპოპტოზის ინჰიბიტორი -პროტეინი, რომელიც აინჰიბირებს კასპაზა 30-ის აქტივობას (Xu D. et al. 1999, Deveraux Q.L. et al. 2001, Shi Y. 2002, Bouchier-Hayes L. Martin D.J. 2002) კარგავს გადარჩენის შანსს.

ანტიაპოპტოზური ოჯახის წევრები ასოცირდებიან მიტოქონდრიულ მემბრანასთან ასევე როგორც ენდოპლაზმურ რეტიკულუმთან და ბირთვულ მემბრანასთან. არსებობს მოსაზრება, რომ ისინი განაპირობებენ მემბრანული მთლიანობის შენარჩუნებას და მიტოქონდრიიდან ციტოქრომ c-ს განთავისუფლების პრევენციას. აპოპტოზის ინჰიბიტორების (IAP) ოჯახის წევრები მოქმედებენ

როგორც კასპაზების ენდოგენური ინჰიბიტორები (Salvesen G.S., Duckett C.S., 2002). ისინი შეიცავენ ორიდან სამამდე გადარჩენილ საიტს (BIR), რომელიც ურთიერთქმედებს კასპაზებთან, აბლოკირებს მათ კატალიზურ საიტებს. ზოგიერთი IAP აგრეთვე შეიცავს C-ტერმინალურ დაბოლოების (RING) დომენს, რომელიც განაპირობებს პროტეინების დესტრუქციას პროტეოსომებში. ბოლო წლებში იდენტიფიცირებულია რიგი სხვა პროტეინების, რომლებსაც გააჩნია მიტოქონდრიდან განთავისუფლების, მემბრანის დეპოლარიზაციის და აპოპტოზის აქტივაციის უნარი (Van Loo G. et al. 2002). მათ შორის, Smac / DIABLO და HtrA2/Omi. პირველი უერთდება და აინჰიბირებს IAP-ს და ამ გზით აბლოკირებს კასპაზების აქტივაციას. HtrA2/Omi აგრეთვე ააქტივებს კასპაზა-დამოუკიდებელი უჯრედების სიკვდილს მისი სერინ-პროტეაზული აქტივობის მეშვეობით. სხვა პროტეინები თავისუფლდებიან მიტოქონდრიდან და ააქტივებენ აპოპტოზს კასპაზებისგან დამოუკიდებლად. მათ შორის ენდონუკლეაზა G და აპოპტოზის მაინდუცირებელი ფაქტორი (AIF), ნუკლეაზების აქტივატორი, რომელიც იწვევს ქრომატინის კონდენსაციას და მაღალი მოლეკულური მასის დნმ-ის ფრაგმენტაციას. ბოლო წლებში აღწერილია აპოპტოზის ინიციაციის მესამე გზა, რომელიც ხორციელდება კასპაზა 12-ის მონაწილეობით, რომელიც ლოკალიზირებულია ენდოპლაზმურ რეტიკულუმზე (ER) და აქტიურდება ER-ის სტრესის შემდეგ უჯრედშიდა კალციუმის მარაგის გათავისუფლების მეშვეობით (Nakagawa T. et al. 2000). მაგრამ კასპაზა 12 პროტეინი არ ექსპრესირდება ადამიანის უჯრედებში, ასე რომ, მისი როლი ადამიანის უჯრედების ცხოველქმედების პროცესში გაუგებრია.

მაშასადამე, ზემოთქმულიდან გამომდინარე, ჩვენ შეგვიძლია

მოვახდინოთ აპოპტოზში მონაწილე მოლეკულების კლასიფიკაცია:

- კასპაზები ახორციელებენ უჯრედთაშორისო სიგნალიზაციაში მონაწილე ცილების და ბირთვული ფაქტორების მოდიფიკაციას. ეფექტორული კასპაზებიდან განსაკუთრებით მაღალი აქტივობით ხასიათდება კასპაზა 3.

- უჯრედების გაყოფის მარეგულირებელი ცილები და ციკლინდამოკიდებული კინაზების დამათრგუნველი ცილები (p21 და p27) წარმოადგენენ კასპაზების სამიზნეს.

- დნმ-ის რეპარაციაში მონაწილე ცილები – პოლი(ADP-რიბოზო) პოლიმერაზა (PARP). ეს ფერმენტი აკატალიზებს ჰისტონების და დნმ-თან დაკავშირებული სხვა ცილების ADP რიბოლიზირებას და წარმოადგენს კასპაზების სამიზნეს. PARP-ის აქტივობა 500 ჯერ იზრდება დნმ-ის გახლეჩილ უბნებთან შეკავშირებისას. უჯრედის აპოპტოზური სიკვდილი მიმდინარეობს PARP-ის დაშლით. დნმ-ის მასიური დაზიანების დროს PARP-ის ჭარბი აქტივაცია იწვევს ამ ფერმენტის სუბსტრატის (ADP-რიბოზას) დონორის, NAD^+ -ის გამოლევას, რაც იწვევს გლიკოლიზის და მიტოქონდრიული სუნთქვის დათრგუნვას – უჯრედების სიკვდილს ნეკროზის გზით.

უჯრედების სიკვდილი შეიძლება ვითარდებოდეს სხვადასხვა გზებით, რომლებისთვისაც დამახასიათებელია განსაზღვრული მორფოლოგიური კრიტერიუმები. ნეკროზის დროს უჯრედის სიკვდილი განპირობებულია ძლიერი გარეგანი ინსულტით, რომელიც აზიანებს უჯრედულ ორგანელებს, მიტოქონდრიებს, არღვევს მემბრანის მთლიანობას და განდევნის ციტოპლაზმას უჯრედშორის მატრიქსში. პირიქით, უჯრედები, რომლებიც იღუპებიან აპოპტოზის გზით, ასრულებენ კარგად განსაზღვრულ და მაღალ რეგულირებად უჯრედის

სიკვდილის გენეტიკურ პროგრამას. ისინი არ კარგავენ მემბრანის მთლიანობას და ორგანოები ძირითადად რჩება ინტაქტური. ბოლო სტადიაზე უჯედული ფრაგმენტები იფარება შეჭმუსხული მემბრანით და წარმოიქმნება აპოპტოზური სხეულები, რომლებიც განიცდიან ფაგოციტოზს ჯანმრთელი მეზობელი უჯრედების მიერ.

აპოპტოზი ბიოქიმიურად და გენეტიკურად ახორციელებს დაპროგრამებულ უჯრედების სიკვდილს, რომელსაც ესაჭიროება დრო, ენერგია, ახალი გენების ტრანსკრიპცია და ტრანსლაცია. მაგრამ, განსხვავება ნეკროზსა და აპოპტოზს შორის არ არის ყოველთვის მკვეთრად გამოხატული და უჯრედის სიკვდილის ეს ორი ტიპი ენაცვლება უჯრედის დაზიანების საპასუხოდ.

1.3 ადამიანის ექსტრემბრიონული ქსოვილების ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებები და პლაცენტრიდან სინთეზირებული პრეპარატის პლაფერონ ლბ-ს ფარმაკოლოგიური დახასიათება

ადამიანის პლაცენტა განეკუთვნება ჰემოქორიონულ ტიპს. მას ახასიათებს ქორიონისა და დედის სისხლის უშუალო კონტაქტი, რაც დედის ორგანიზმსა და ნაყოფს შორის რთული ურთიერთობის სრულფასოვან განხორციელებას უზრუნველყოფს (Савельева Г.М. и др. 1991). პლაცენტის მრავალრიცხოვანი ფუნქციები განვითარების სხვადასხვა ეტაპზე მჭიდროდაა დაკავშირებული მის აგებულებასთან (იმპლანტაცია, პლაცენტაცია, ფეტალიზაცია). მისი საშუალებით ხორციელდება ნაყოფის კვება, აირთა ცვლა, მეტაბოლიზმის პროდუქტების გამოყოფა, ჰორმონალური და იმუნური სტატუსის

ფორმირება; პლაცენტა ასრულებს ჰემატოენცეფალური ბარიერის როლს, იცავს რა ნაყოფს ტოქსიკური ფაქტორების ზემოქმედებისაგან.

დედის ორგანიზმსა და ნაყოფს შორის აირებისა და საკვები ნივთიერებების ცვლის განხორციელებაში მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ფერმენტული სისტემები. ამნიონის ეპითელიუმში, ქორიონსა და ჭიპლარში ნაჩვენებია კარბონიკ-ანჰიდრაზას იზოფორმების მაღალი აქტიურობა (HCA1, HCA2), რაც ხაზს უსვამს ბიკარბონატის ფერმენტული გადატანის უპირატესობას მარტივ დიფუზიასთან შედარებით (Muhlhauer J. et al 1994).

ცილების, ცხიმებისა და ნახშირწყლების ტრანსპორტი ფერმენტული დაშლისა და სინთეზის პროცესების შედეგად ხდება, რასაც ქორიონის ეპითელიუმში არსებული ფერმენტები ახორციელებენ.

ლიპიდების ტრანსპორტი ლიპოლიზური ფერმენტების (ლიპაზები, მონო- და ტრიბუტირაზები) მიერ მათი წინასწარი დაშლის შედეგად ხორციელდება; დედისეული წინამორბედისაგან პლაცენტის მიერ სინთეზირებული ლიპიდები ძირითადად ქორიონის ხაოების სინტიციუმის ციტოპლაზმაში ლოკალიზდება და პლაცენტის საერთო მასის 5-12%-ს შეადგენს. მათი 2/3 წარმოდგენილია ფოსფოლიპიდებით, 1/3 – სტეროიდებით, ხოლო მცირე ნაწილი – ნეიტრალური ცხიმებით. ექსტრამემბრიონულ ქსოვილებში ბიოლოგიურად აქტიური ფოსფოლიპიდური მეტაბოლიტების წარმოქმნაში მონაწილეობს ფოსფოლიპაზა A2-ის ორი იზოფორმა – სეკრეციული და ციტოლიზური (Freed et al. 1994).

უცხო ცილების ინაქტივაციას უზრუნველყოფს ტროფობლასტის პროტეოლიზური ფერმენტი. პროტეოლიზური აქტიურობის წყალობით

პლაცენტა ბოჭავს და ანეიტრალებს დედის სისხლის AB სისტემის იზოანტისხეულებს, ანტილეიკოციტურ ანტისხეულებს და სხვა.

პლაცენტაში აგრეთვე იდენტიფიცირებულია რიგი სხვა ფერმენტები, მათ შორის: ოქსიდაზები (მონოამინოქსიდაზა, ციტოქრომოქსიდაზების სისტემა), კატალაზა, NAD, NADP დიაფორაზა, დეჰიდროგენაზები (Федорова М.В., Калашникова Е.П. 1986).

ფეხმძიმობის ბოლოს ამნიონის გარსში იზრდება პროსტაგლანდინ-ენდოპეროქსიდ – H – სინთაზას (PGHS) ექსპრესია, რაც შესაძლოა ხელს უწყობდეს პროსტაგლანდინის გაძლიერებულ საშვილოსნო-შიგნითა სინთეზს მშობიარობის წინ და აგრეთვე ნაადრევი მშობიარობის დროს (Jane E., et al. 1999).

ბოლო წლებში მრავალი შრომა მიექდვნა NO-ს როლს ადამიანის მშობიარობის პროცესში. სუპეროქსიდი, რომელიც ამცირებს NO-ს ნახევარდაშლის პერიოდს, მეტაბოლიზდება და სინთეზდება სუპეროქსიდისმუტაზას და ქსანტინოქსიდაზას მიერ. ადამიანის ნორმალური ორსულობისა და მშობიარობის დროს შესაბამისად ნაჩვენებია აღნიშნული ფერმენტების ექსპრესია მიომეტრიუმში, ნაყოფის გარსებსა და პლაცენტაში. დადგენილია, რომ სუპეროქსიდისმუტაზა და ქსანტინოქსიდაზა მონაწილეობენ ორსულობის შენარჩუნებაში და არა მშობიარობის ინიციაციაში (Telfer J.F. et al.1998).

პლაცენტაში ფართოდაა წარმოდგენილი სხვა ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებები. მაგალითად სისტემები: ჰისტამინ-ჰისტამინაზა, აცეტილქოლინ-აცეტილქოლინესტერაზა, აგრეთვე სისხლის შედედებისა და ფიბრინოლიზის ფაქტორები.

პლაცენტის ერთ-ერთი ფუნქციაა ვიტამინების დაგროვება და ნაყოფისათვის მათი მიწოდების რეგულაცია. პლაცენტაში დიდი რაოდენობით დეპონირდება ვიტამინები და კაროტინი; ვიტამინი B1 დეპონირდება კოკარბოქსილაზას სახით, ვიტამინი B2 ფლავინადენინდინუკლეოტიდის ან ფლავინმონონუკლეოტიდის სახით; ვიტამინი PPAD- ან NADP-ის სახით; B6 და ფოლის მუავას შემცველობა სეზონური ცვლილებებით ხასიათდება, ასკორბინის კი პლაცენტაში მუდმივად დიდი რაოდენობითაა წარმოდგენილი (73,7-2126 მკ მოლ/ლ). ვიტამინები ხელს უწყობენ ქორიონში მიმდინარე ბიოლოგიური პროცესების აქტივაციას. ვიტამინი D არეგულირებს Ca^{2+} ცვლას; ვიტამინი E (ტოკოფეროლი) აუცილებელია ფესმძიმობის ნორმალური მიმდინარეობისათვის, ნერვული და კუნთოვანი სისტემების ფუნქციონირებისათვის (Говорка Е. 1970, Савельева Г.М. и др. 1991).

პლაცენტა დიდი რაოდენობით შეიცავს მიკროელემენტებს: კალციუმს, რკინასა და ფოსფორს.

ასრულებს რა ენდოკრინული ჯირკვლების როლს, პლაცენტა ასინთეზებს ცილოვან-პეპტიდური და სტეროიდული ბუნების ჰორმონებს: ქორიონულ გონადოტროპინს, პლაცენტურ ლაქტოგენს, პროლაქტინს, ენდორფინს, მელანოციტომასტიმულირებელ ჰორმონს, პროპრიომელანოკორტინს, ესტროგენებს, პროგესტერონს. პლაცენტური ჰორმონები სინთეზირდება სინციტიო- და ციტოტროფობლასტებში, აგრეთვე დეციდუალურ ქსოვილში (Савельева Г.М. и др. 1991).

პლაცენტარული ლაქტოგენის ბიოლოგიური როლი მდგომარეობს ნახშირწყლებისა და ლიპიდების ცვლის რეგულაციაში, ნაყოფში ცილის სინთეზის გაძლიერებაში. სტრუქტურით იგი ზრდის ჰორმონის მსგავსია. პლაცენტისათვის სპეციფიური ზრდის ჰორმონი (როგორც

ნორმალური, ასევე პათოლოგიური ფეხმძიმობის დროს) პლაცენტურ ლაქტოგენზე უკეთ ცვლის დათრგუნულ ჰიპოფიზის ზრდის ჰორმონს. ფეტოპლაცენტარული ნაწილის დარღვევებით მიმდინარე პათოლოგიური ფეხმძიმობის დროს პლაცენტის ზრდის ჰორმონის დაბალი დონე იწვევს დედის ინსულინისმსგავსი ზრდის ფაქტორის დონის დაქვეითებას. ინსულინისმსგავსი ზრდის ფაქტორი კი, როგორც ცნობილია, განსაზღვრავს ნაყოფის ზომას. ბავშვის წონა დაბადებისას პოზიტიურად კორელირებს დედის ინსულინისმსგავსი ზრდის ფაქტორის სიდიდესთან ნორმალური ფეხმძიმობის დროს (Carsten U., et al., 1998).

პროლაქტინის ფუნქციები პლაცენტარული ლაქტოგენის მსგავსია. მას გარკვეული მნიშვნელობა აქვს აგრეთვე ფეტო-პლაცენტარულ ოსმორეგულაციაში.

ქორიონული გონადოტროპინი (36-40000 მოლ მასის გლიკოპროტეინი) ფეხმძიმობის ადრეულ ეტაპზე სტეროიდოგენეზს, ხოლო მის მეორე ნახევარში – ესტროგენების სინთეზს აძლიერებს. ის მონაწილეობს აგრეთვე ნაყოფის სქესის დიფერენციაციაში. პროგესტერონი მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ფეხმძიმობის წარმართვაში; ესტროგენები მოქმედებენ საშვილოსნოს ზრდაზე, მასში ნივთიერებათა ცვლის პროცესებზე, ხელს უწყობენ ნაყოფის ზრდას, მშობიარობის აქტის განვითარებას (Савельева Г.М. и др. 1991).

პლაცენტა წარმოქმნის იმუნურ ბარიერს დედის ორგანიზმსა და ნაყოფს შორის, რაც ხელს უშლის ფეხმძიმობის შეწყვეტას. პლაცენტის მიერ სინთეზირებული ნივთიერებები მოქმედებენ დედის იმუნოკომპეტენტური სისტემის სხვადასხვა რგოლებზე. ისინი თრგუნავენ ლიმფოპოეზის აქტიურობას, აბლოკირებენ ეფექტორული

უჯრედების რეცეპტორებს, ხელს უწყობენ ნაყოფის იმუნოკომპეტენტური სისტემის ჩამოყალიბებას.

ფესმძიმობის დროს პლაცენტაში, კერძოდ კი სინციტიოტროფობლასტში აქტიურდება სეკრეტორული ცილების სინთეზი, რომელთა უმეტესობას იმუნოდეპრესანტული თვისებები აქვთ. მათ მიეკუთვნება გლობულინები, გლიკოპროტეიდები, პროტეინი (PAPP-A), გლიკოპროტეინები: PP-5, PP-10, PP-14, PP-15, მიკროგლობულინები და სხვანი (Morrow D. et al. 1994).

პლაცენტა დიდ როლს ასრულებს ნაყოფის იმუნურ დაცვაში და მისი იმუნიტეტის ფორმირებას უზრუნველყოფს. ნაყოფი იმუნოგლობულინების მარაგს დედის ორგანიზმიდან იღებს. იმუნოგლობულინების სხვადასხვა კლასები შეიცნობა ტროფობლასტური უჯრედების მიერ და სეკრეტირდება ნაყოფის სისხლის მიმოქცევის სისტემაში. J. McNabb და თანაავტორების მიერ 1976 წელს ნაჩვენები იყო პლაცენტაში სპეციალური ცილა-რეცეპტორის არსებობა, რომელიც ცნობს IgG-ს და განასხვავებს მას იმუნოგლობულინების სხვა კლასებისაგან. ტროფობლასტსა და ქორიონის ხაოებში აღმოჩენილია IgG, C3 და C4 – იმუნოპროტეინები და აგრეთვე კომპლემენტი. ეს მონაცემები ადასტურებს პლაცენტას მონაწილეობას იმუნოგლობულინების ბალანსში (Савельева Г.М. и др. 1991).

ადამიანის პლაცენტას ტროფობლასტური უჯრედების ზრდისა და დიფერენციაციის რეგულაციაში მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ისეთი ციტოკინები, როგორცაა ინტერფერონები, ინტერლეიკინები, სიმსივნური ნეკროზის ფაქტორები (Berkowitz R. et al. 1988, Assreuy J. et al. 1993).

ტროფობლასტის მიერ პროდუცირებული ინტერფერონები ხასიათდებიან აუტოკრინული მოქმედებით და მონაწილეობენ ისეთ ფიზიოლოგიურ პროცესებში, როგორცაა პროლიფერაცია და დიფერენციაცია (Fisher P. et al. 1993). გარდა ამისა, ტროფობლასტური ინტერფერონები ავლენენ ანტივირუსულ მოქმედებას, რის საფუძველზეც ადამიანის პლაცენტას ტროფობლასტური შრე ასრულებს ვირუსული ინფექციებისაგან ნაყოფის დამცავი ბარიერის როლს. ინტერფერონის არსებობა ნაჩვენებია ამნიონის სითხეში, პლაცენტის ქსოვილებსა და ნაყოფის სისხლში (Chabot C. et al. 1996).

ინტერლეიკინები მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ ალოტრანსპლანტატის დაცვაში, ფეხმძიმობის შენარჩუნებასა და მშობიარობის პროცესში. მშობიარე ქალებში ინტერლეიკინ-1 ბეტასა და ინტერლეიკინ-6-ის გამომუშავება მნიშვნელოვნად არის გაზრდილი. მათ გამოყოფენ პლაცენტის ენდოთელური უჯრედები (Steinborn A. et al. 1998). ნაჩვენებია ინტერლეიკინ-4-ისა და მისი რეცეპტორის არსებობა პლაცენტისა და ნაყოფის გარსებში (კერძოდ ამნიონში) (Carsten U. et al. 1998). ადამიანის პლაცენტა გამოიმუშავებს აგრეთვე ინტერლეიკინ – 1-სა და სიმსივნის ნეკროზის ფაქტორს, რომლებიც თავის მხრივ ასტიმულირებენ ინტერლეიკინ – 8-ის წარმოქმნას (ნეიტროფილების ქემოტაქსისისა და აქტივაციის ფაქტორი). ინტერლეიკინ – 8 ჭარბად წარმოიქმნება ქორიამნიონიტის დროს. ამ შემთხვევაში ციტოკინების ეს კასკადი ძლიერდება პოლისაქარიდის წარმოქმნით, რაც ხელს უწყობს ფეტო-მატერნალურ დაცვით მექანიზმს (Shimoya K. 1999).

ტროფობლასტის ზრდისა და დიფერენცირებისათვის აუცილებელია მეზენქიმური ინდუქცია. ალანტოისის მეზენქიმის პარაკრინული სიგნალების ერთ-ერთი მაგალითია ჰეპატოციტების ზრდის ფაქტორი –

scatter ფაქტორი (HGF-SF). ეს ფაქტორი და მისი რეცეპტორი მნიშვნელოვან როლს ასრულებს პლაცენტის განვითარებაში. HGF-SF ეპითელური დიფერენცირების მედიატორია ემბრიოგენეზის დროს (Stewart F. 1998).

ენდომეტრიუმის ფუნქციონირებისათვის, ემბრიო-ენდომეტრიუმის ურთიერთქმედებისათვის მნიშვნელოვანია ენდომეტრიუმში იდენტიფიცირებული ცილოვანი და პეპტიდური ბუნების ფაქტორები. ადგილობრივი ფაქტორების მაგალითია ინსულინისმსგავსი ზრდის ფაქტორების სისტემა (IGF) (Seppala M. 1999).

პლაცენტისა და ნაყოფის ზრდის რეგულაციაში მნიშვნელოვან როლს ასრულებს აგრეთვე ეპიდერმისის ზრდის ფაქტორი და მისი რეცეპტორი (EGFR). EGFR კოდირებულია ერთი გენით, რომელიც დასაბამს აძლევს 2 სრული სიგრძისა და ერთ დამოკლებულ ტრანსკრიპტს პლაცენტაში. დამოკლებული ტრანსკრიპტის ექსპრესია მაღალია პრეექლამპსიისა და საშვილოსნოსშიდა ზრდის რესტრიქციის (IUGR) დროს. პლაცენტის პათოლოგია ამ შემთხვევაში დაკავშირებულია პლაცენტური EGFR-ის ცვლილებებთან (Faxen M. 1999). ეპიდერმისის ზრდის ფაქტორი იწვევს ადამიანის პლაცენტის სინციტიოტროფობლასტის პლაზმური მემბრანებიდან პლაცენტური ტუტეფოსფატაზას ატფ-დამოკიდებულ გამოთავისუფლებას (Kenton P. 1994). EGF-ის გავლენა ამინომჟავების ტრანსპორტზე შესწავლილია ვირთაგვას პლაცენტაში. ინსულინისა და ინსულინისმსგავსი ზრდის ფაქტორის - 1-ის მსგავსად EGF-ით დამუშავება ასტიმულირებს ამინომჟავების აქტიურ შთანთქმას პლაცენტური ექსპლატატების მიერ. ამინომჟავების ტრანსპორტის სტიმულირების გზით EGF ნაყოფის ზრდაზე ახდენს გავლენას (Masuyama H. et. Al. 1996).

ემბრიონის სხვადასხვა ქსოვილებში, ნაყოფის გარსებში ექსპრესირდება სისხლძარღვების ენდოთელური ზრდის ფაქტორი (VEGF), რომელიც ენდოთელური უჯრედების ცნობილი მიტოგენი და ანგიოგენეზის ერთ-ერთი რეგულატორია. მისი ექსპრესია იზრდება ფეხმძიმობასთან ერთად. გამოვლინდა, რომ პლაცენტა VEGF-ის გავრცელებული, იოლად სეკრეტირებადი იზოფორმის გარდა (მაგალითად: VEGF121, VEGF165, VEGF183) კიდევ რამდენიმე ტრანსკრიპტი (VEGF206, VEGF 145) პროდუცირებს, რაც ამდიდრებს უჯრედგარეთა მატრიქსის ზრდის ფაქტორების ფონდს (Anthony F. et al., 1994). VEGF-ის არსებობა პლაცენტის ქსოვილებში მიუთითებს აღნიშნული ფაქტორის როლზე პლაცენტის ვასკულარული ფუნქციის განვითარებასა და შენარჩუნებაში; VEGF-ის ლოკალიზაცია ნაყოფის გარსებში და პლაცენტის ნაყოფისეულ ნაწილში შესაძლებელს ხდის მის მონაწილეობას ამნიონური სითხის მოცულობისა და შედგენილობის რეგულაციაში. სისხლძარღვების ენდოთელურ უჯრედებში და პლაცენტის ქსოვილებში იდენტიფიცირებულია აგრეთვე VEGF-ის ორი რეცეპტორი – KDR და Flt-1. ადამიანებში უპირატესად წარმოდგენილია Flt-1, ხოლო ძროხებსა და ცხვრებში KDR (Cheung CY., 1997). ავტორების მიერ გამოვლენილია Flt-1-ის ახალი, ორსულობასთან დაკავშირებული ხსნადი ფორმა, რომლის სუბერთეულის მოლეკულური წონაა 150 kD. ჩვეულებრივ ის წარმოდგენილია 400–550 kD წონის მულტიმერული სტრუქტურის სახით; VEGF-ის მოლეკულების მიერთების შემდეგ კი ყალიბდება 600–700 kD კომპლექსები (Banks R.E. et al. 1998). სავარაუდოა, რომ ხსნადი Flt-1 მნიშვნელოვან როლს ასრულებს VEGF-ის მოქმედების რეგულაციაში და შესაძლოა, თერაპიული გამოყენება ჰპოვოს

არანორმალური ანგიოგენეზით მიმდინარე დაავადების დროს (მაგალითად, როგორცაა პროლიფერაციული რეტინოპათიები და სიმსივნეები).

თრომბოციტების აქტივაციის ფაქტორი (PAF) ასტიმულირებს თრომბოქსანი A₂-ისა და პროსტაგლანდინ 2-ის ბიოსინთეზს ადამიანის პლაცენტის ხაოებსა და ჭიპის არტერიებში. მათი ლოკალური დონის რეგულირების გზით PAF შესაძლოა მოქმედებდეს ფეტო-პლაცენტურ ცირკულაციაზე (Wang G.L. et al. 1995).

პლაცენტის ქსოვილებსა და ენდომეტრიუმში ექსპრესირდება დეროვანი უჯრედების ფაქტორი (SCF) და მისი რეცეპტორი (KiT). პლაცენტას ქსოვილებში SCF-ის მატრიცული რნმ-ის დონე 4–8-ჯერ მაღალია, ვიდრე დეციდუალურ გარსში. როგორც ჩანს, ენდომეტრიუმისა და ხაოების SCF პარაკრინულ გავლენას ახდენს ტროფობლასტებზე KiT რეცეპტორის საშუალებით. KiT და SCF ასტიმულირებენ ადრეული ჰემოპოეზური უჯრედების ტიპების ჩანასახოვანი უჯრედებისა და მელანოციტების პროლიფერაციას. SCF აძლიერებს აგრეთვე რამდენიმე ჰემოპოეზური ზრდის ფაქტორის მოქმედებას (Khauma S. et al. 1996).

ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ პლაცენტას გააჩნია ჰემოპოეზური ზრდის ფაქტორების პროდუცირების უნარი *in vitro*. ერთ-ერთი ასეთი ფაქტორია – გრანულოციტების კოლონიების სტიმულაციის ფაქტორი (GCGF).

ორსულობის დროს დეციდური უჯრედები წარმოქმნიან და გამოყოფენ მაკროფაგების კოლონიების მასტიმულირებელი ფაქტორის (CSF-1) დიდ რაოდენობას. ეს ფაქტორი ასტიმულირებს ტროფობლასტების პროლიფერაციასა და დიფერენციაციას. გარდა

ამისა, CGF-1 ასტიმულირებს ტროფობლასტების მიერ ჰორმონების (ქორიონული გონადოტროპინისა და პლაცენტური ლაქტოგენის) წარმოქმნას (Hayashi M. et al. 1996).

კორტიკოტროპინის აღმასრულებელი ფაქტორი (CRF) გარდა ჰიპოთალამუსისა, პლაცენტაშიც ექსპრესირდება. უმაღლესი პრიმატების პლაცენტაში მისი ექსპრესია სახეობრივი სპეციფიურობით ხასიათდება. ადამიანის CRF – გენის პრომოტორში იდენტიფიცირებულია ელემენტები, რომლებსაც ტრანს- აქტიური ფაქტორები უკავშირდება. ეს ფაქტორები განსაზღვრავს ადამიანის CRF – გენის პლაცენტური ექსპრესიის სახეობრივ სპეციფიურობას (Scatena C.D., Adler S. 1996). CRF (პროსტაგლანდინებთან და ესტროგენებთან ერთად) გავლენას ახდენს საშვილოსნოს მიოციტებზე და აძლიერებს მის შეკუმშვას. პროსტაგლანდინ 2 და ესტრადიოლი აძლიერებს CRF – გენის ტრანსკრიპციას. CRF არეგულირებს იმუნორეაქტიული ოქსიტოცინის გამოყოფას ადამიანის პლაცენტის კულტივირებული უჯრედებიდან (ასეთივე ეფექტს ავლენს ნორადრენალინი, ვაზოპრესინი, პროსტაგლანდინ 2 ალფა და აქტინი) (Florio P. et al. 1996).

დღეისათვის ჩვენს ხელთარსებული ლიტერატურული მონაცემები უფლებას გვაძლევს დავასკვნათ, რომ ადამიანის ექსტრემბრიონული ქსოვილები წარმოადგენს სხვადასხვა მოქმედების ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების მდიდარ წყაროს და ამდენად, პერსპექტიულია ფარმაკოლოგიური თვალსაზრისით.

პლაცენტარული ფარმაკოლოგიური პრეპარატის – პლაფერონ ლბ-ს დახასიათება

პლაფერონი ლბ ადამიანის პლაცენტის ამნიონური გარსიდან მიღებული ცილა-პეპტიდური პრეპარატია. იგი შეიცავს ენდოგენური წარმოშობის ბიოლოგიურად აქტიურ ნივთიერებებს, რომლებიც განაპირობებენ მის მრავალმხრივ ფარმაკოლოგიურ მოქმედებას. პლაფერონი ლბ არ შეიცავს პლაცენტისა და ნაყოფისათვის დამახასიათებელ ზოგიერთ ცილას: ფეტოპროტეინს, ქორიონულ გონადოტროპინს, ტროფობლასტურ გლობულინს. ცილებიდან ძირითადია ალბუმინი (Мерабишвили Д., 1988).

პრეპარატის ფარმაკოლოგიური თვისებებიდან, უპირველეს ყოვლისა ყურადღებას იმსახურებს მისი იმუნომამოღულირებელი მოქმედება.

პლაფერონი ლბ სხვადასხვა ეტიოლოგიის იმუნოდეპრესიის პირობებში ზრდის ადამიანის პერიფერიული სისხლის T-ლიმფოციტების საერთო რაოდენობას და აღადგენს T-ჰელპერებისა და სუპრესორების დარღვეულ ბალანსს (ჩიქოვანი თ.ი., 1997).

ადამიანის მონონუკლეურ უჯრედებსა და თაგვის სპლენოციტებზე პლაფერონი ლბ ახდენს დოზადამოკიდებულ ანტიპროლიფერაციულ ეფექტს ბლასტრანსფორმაციის რეაქციაში. ანტიპროლიფერაციული აქტიურობა ყველაზე მეტად უჯრედის G1 და G2 ფაზაში გადასვლის დროს ვლინდება. ამ ეფექტის მოლეკულური მექანიზმი პროტეინკინაზა C-ს ინჰიბირებაში მდგომარეობს (კუკულაძე ნ.მ., 1993). პროტეინკინაზა C-ს აქტიურობის დათრგუნვის უნარი განაპირობებს პლაფერონი ლბ-ს ანთების საწინააღმდეგო მოქმედებას. პლაფერონი ლბ თრგუნავს მიტოგენით სტიმულირებული ადჰეზიური უჯრედების მიერ ინტერლეიკინ-1-ის სინთეზს, ამასთანავე იგი არ მოქმედებს

ლიმფოციტების მიერ ინტერლეიკინ-2-ის პროდუქციაზე (Бахутაშვილი А. В., 1991)

ადამიანის პერიფერიული სისხლის მონონუკლეურ უჯრედებში პლაფერონი ღბ არეგულირებს ც-ამფ-ის მეტაბოლიზმს. ციკლური ნუკლეოტიდების დარღვეული მეტაბოლიზმის აღდგენა პრეპარატის ზეგავლენით პირველად მწვავე ვირუსული ჰეპატიტის დროს იქნა შენიშნული (Квитаишвили Г.И., 1991).

იმუნომამოღებელი მოქმედების გარდა პლაფერონ ღბ-ს ანტიჰიპოქსიური, დეზინტოქსიკაციური, ანტიოქსიდანტური თვისებებიც აღმოაჩნდა (Бахутაშვილი В. И. Анджaparидзе О. Г. Кузнецов В. П., 1985, Гогитаშვილი К. В., 1992, რუსაძე რ.გ., 1999).

მიოკარდიუმის ინფარქტის ლეტალური მოდელის გამოყენებით თავდაპირველად დადგენილი იქნა წინამდებარე პრეპარატის – პლაფერონის ანტიჰიპოქსიური მოქმედება. გავრცობილი ეგექტის მიუხედავად, პრეპარატის ერთჯერადი შეყვანის შემდეგ 27 ძაღლიდან 26 გადარჩა. გამოკვლევებმა აჩვენა, რომ პლაფერონი უზრუნველყოფს კარდიოგენული შოკის, ფატალური არითმიისა და დისემინირებული მიკროინფარქტების განვითარების თავიდან აცილებას, რაც ძირითადად “დაუზიანებელი პატარა არტერიების” რეფლექსური სპაზმითაა გამოწვეული (Джавахишвили Н. А., Цагарели З.Г., Бахутაშვილი А. В, Бахутაშვილი В. И., 1989). მოგვიანებით დადგინდა, რომ პრეპარატის ასეთი მოქმედება საფუძვლად უდევს მიოკარდიუმის ქსოვილში თავისუფალი NO-ს შემცველობის მომატებას, რაც რეფლექტორული სპაზმისაგან დაცვას უზრუნველყოფს და მიოკარდიუმში ჟანგვითი პროცესების სტაბილობას განაპირობებს, რის შედეგადაც მცირდება

კარდიომიოციტების დესტრუქციის ხარისხი (Джавахишвили Н. и др., 2001).

მოგვიანებით, ვირთაგვებში გულის ადრენალური დაზიანების შემთხვევაში პლაფერონ ლბ-ს გამოყენებამ უზრუნველყო ჰიპოქსიისაგან ენდოთელიოციტებისა და კარდიომიოციტების დაცვა (Гибрадзе Т. А., Бахутაშვილი В. И., Лорткипანიძე Т. Г., 1994).

ლ. დადიანის მიერ 1993 წელს დადგენილ იქნა პრეპარატის ანტიჰიპოქსიური მოქმედება ღვიძლის უკმარისობის ექსპერიმენტულ მოდელზე. აღნიშნული ეფექტი გამოვლინდა აგრეთვე ობსტრუქციული ნეფროპათიისა და თირკმლის სითბური იშემიის პირობებშიც (Хвадаგიანი Г.Г. 1990).

ექსპერიმენტში შესწავლილ იქნა პლაფერონ ლბ-ს მოქმედება თავის ტვინში ცირკულაციური ჰიპოქსიით გამოწვეულ მიკროცირკულაციურ, მეტაბოლურ და ულტრასტრუქტურულ ძვრებზე. აღმოჩნდა, რომ პრეპარატის წინასწარი შეყვანა აძლიერებს ნერვული და გლიური უჯრედების, ასევე კაპილარების ფუნქციურ აქტივობას, აფერხებს იშემიისათვის დამახასიათებელი დესტრუქციული ცვლილებების განვითარებას.

თავის ტვინის ფოკალური იშემიის არაინვაზიური მოდელის პირობებში (ტვინის სისხლძარღვთა ფოტოქიმიური თრომბოზი) პლაფერონი ლბ-ს წინასწარი შეყვანა უზრუნველყოფს ინფარქტით დაზიანებული ზონის დაახლოებით 85%-ით შემცირებას, ნარჩენი დაზიანების ზონაში კი თრომბირებულ სისხლძარღვთა სიმკვრივე კონტროლთან შედარებით 20%-ითაა შემცირებული (ქაცარავა ზ.რ., 1995).

მწვავე ვირუსული B ჰეპატიტის დროს პრეპარატის მოქმედების გამოკვლევამ მისი ჰეპატოპროტექტური, ანტიტოქსიური და იმუნომამოღულირებელი მოქმედება დაადასტურა.

მწვავე ვირუსული B ჰეპატიტის დროს ავადმყოფთა სისხლის შრატში მიკროგლობულინების შემცველობა (რაც ღვიძლის პარენქიმის დაზიანების მაჩვენებელია) პროგრესულად კლებულობდა ავადმყოფთა იმ ჯგუფში, სადაც ტრადიციული მეთოდებით მკურნალობის ფონზე გამოიყენებოდა პლაფერონი ლბ. ამრიგად, პრეპარატის გამოყენება უზრუნველყოფდა ღვიძლის პარენქიმის დაზიანებული ფართობის შემცირებას (Квитаишвили Г.И., 1991).

პლაფერონ ლბ-ს პოზიტიური კლინიკური ეფექტი გამოვლინდა აგრეთვე ღვიძლის ქრონიკული დაავადებების დროსაც. აღინიშნებოდა სასქესო ჰორმონების დისბალანსის ნორმალიზება, ელექტროლიტური დარღვევების თავიდან აცილება, ღვიძლის ფუნქციური მდგომარეობის ბიოქიმიური მაჩვენებლების გაუმჯობესება (ქაცარავა ზ.რ., 1995).

პლაფერონ ლბ-ს ჰეპატოპროტექტური ეფექტი შესწავლილია აგრეთვე მწვავე ექსპერიმენტული ჰიპო- და ჰიპერთირეოზის დროს. პრეპარატი უზრუნველყოფს უჯრედების ანტიოქსიდანტური უნარის შენარჩუნებას, თავისუფალი რადიკალების გენერატორების წარმოების შეფერხებას და ლიპიდების ზეჟანგვითი ჟანგვის ნორმალიზებას. ეს ეფექტი გამოხატულებას ჰპოვებს მემბრანების სტაბილიზაციის, უჯრედებში დესტრუქციული ცვლილებების შემცირების, ქსოვილის ნორმალური სტრუქტურის შენარჩუნების სახით. აღდგენით პერიოდში კი პრეპარატი აჩქარებს ეპრ-სიგნალების მაჩვენებლების ნორმაში მოყვანას (რუხაძე რ.გ., 1999), სტრუქტურული ცვლილებების უკუგანვითარებას და ხელს უწყობს რეგენერაციის პროცესის მიმდინარეობას.

პრეპარატის ანტიტოქსიური მოქმედების შესწავლისას დადგინდა, რომ ორგანული შხამით CC14 –ით მოწამლულ ვირთაგვებში პრეპარატი აბრკოლებს ჰეპატოციტების მიტოქონდრიების მემბრანებიდან CC14–ის გავლენით ციტოქრომ C-ს ერთ-ერთი გადამტანის გამორეცხვას. CC14 ოთხდღიანი ინექციის შედეგად ვირთაგვების მიტოქონდრიათა სუნთქვითი კონტროლის კოეფიციენტი მინიმალურ დონემდე მცირდება, რაც ატფ-ის სინთეზის შეწყვეტის მაუწყებელია. პლაფერონ ლბ-ს გამოყენების შემთხვევაში კი სუნთქვის კონტროლის კოეფიციენტი საკონტროლო მაჩვენებელთან შედარებით მხოლოდ 80%-მდე ქვეითდება; ე.ი პრეპარატის გამოყენება ატფ-ის სინთეზის შენარჩუნებას უზრუნველყოფს (აზიკური გ.შ., 1997).

ექსპერიმენტული ქოლესტაზის დროს პლაფერონ ლბ-ს გამოყენებით დადგინდა, რომ ჰეპატოციტების მიტოქონდრიების სუნთქვით ჯაჭვში პრეპარატი ასწორებს ელექტრონთა ტრანსპორტს NADH უბიქინონ-ოქსირედუქტაზულ უბანზე, სტაბილურს ხდის უჯრედებში ენერგეტიკულ პროცესებს და აძლიერებს ანტიოქსიდანტური და დეტოქსიკაციური სისტემების ფუნქციურ აქტივობას.

პლაფერონ ლბ-ს ორგანიზმში ნახშირწყლოვანი ცვლის რეგულაციის უნარი აქვს. ძაღლებში და ვირთაგვებში ალოქსანური დიაბეტის დროს ადგილი ჰქონდა სრულ შესაბამისობას პრეპარატის შეყვანასა და სისხლის შაქრის შემცველობის დაქვეითებას შორის (გამყრელიძე მ., 2005) ჰეპატოციტებსა და კარდიომიოციტებში პრეპარატის გავლენით გლიკოგენის შემცველობის ნორმალიზება აღნიშნული უჯრედების ფუნქციური აქტიურობის აღდგენაზე მეტყველებს. *in vitro* ექსპერიმენტებით ნაჩვენებია იქნა, რომ გლიკოლიზის გააქტივების გზით პლაფერონი ლბ აძლიერებს უჯრედებში მიმდინარე ენერგეტიკულ

პროცესებს. პრეპარატის თანაობისას უჯრედი ენერგიას იღებს ორი წყაროდან – ჟანგვითი და სუბსტრატული ფოსფორილირებით. ამის გარდა პრეპარატი გავლენას ახდენს გლუკოზის ტრანსპორტის სისტემაზეც. გამოუფიტავ უჯრედებში იგი იწვევს გლუკოზის სწრაფ შთაანთქმას და აბლოკირებს მის გადასვლას არეში. პრეპარატის ეფექტი დამოკიდებულია უჯრედების ფუნქციურ მდგომარეობაზე (Ягужинский Л. С. Имедидзе Э.А. Дадანი Л. Н. Бахутაშვილი В. И., 1995).

აღმოჩნდა, რომ პრეპარატი დოზადამოკიდებულად აინჰიბირებს Na, K -ატფ-აზას აქტიურობას, რაც შესაძლოა მასში ენდოგენური დიგოქსინისმაგვარი ფაქტორების არსებობაზე მიუთითებდეს.

უჯრედთა რეცეპტორულ აპარატზე პლაფერონი ლბ-ს გავლენის შესწავლის შედეგად დადგინდა, რომ ეს უკანასკნელი ნერვულ უჯრედებში აქვეითებს ადრენორეცეპტორების, H1-ჰისტამინისა და M-ქოლინორეცეპტორების რაოდენობას და ზრდის ალფა-2 და ბეტა ადრენორეცეპტორების აქტიურობას. პრეპარატი შეიცავს სინაფსური მემბრანის სიგმა რეცეპტორებზე მოქმედ ნივთიერებას. საინტერესოა, რომ პლაფერონი ლბ ზემოქმედებს ჰალოპერიდოლმგრძნობიარე სუბტიპზე ანუ NMDA-გლუტამინის რეცეპტორთან დაკავშირებულ ცილაზე (Микеладзе Д. Д. Джанашия Н. Н. Джанаშვილი Ц. А. Бахутაშვილი В. И. Картозия Л. Б., 1995).

ნერვული, ზოგიერთი სისხლძარღვოვანი, ინფექციური და აუტოგენური დაავადებების დროს პლაფერონი ლბ-ს გამოყენებამ აჩვენა, რომ იგი დადებით გავლენას ახდენს ნევროლოგიურ სიმპტომატიკაზე.

პლაფერონ ლბ-ს გამოყენებამ ნეიროქირურგიული პროფილის პაციენტებში გართულებით მიმდინარე პოსტოპერაციულ პერიოდში გამოავლინა შემდეგი თვისებები:

1. პრეპარატი ავლენს მეტაბოლიტურ ეფექტს, რაც ტვინში ნივთიერებათა ცვლის პროცესების ოპტიმიზაციით გამოიხატება;

2. მიიღება ე.წ. “გამოღვიძების ეფექტი”, რაც შეიძლება აიხსნას ოპიოიდური პეპტიდის ენდორფინის კონცენტრაციის შემცირებით; აგრეთვე, პრეპარატის გავლენით მეტაბოლურ პროცესებზე.

3. გამოვლენილია ბიოქიმიური ცვლილებები; აგრეთვე ნეირო- და პერიფერიული ჰორმონების კონცენტრაციების ცვლილებები, რაც პრეპარატის სისტემური და ნეიროტროპული მოქმედების მაჩვენებელია (Сировский Э.Б. Амчелавский В. Г. Инаури Г. Н. Дадანი Л. Н. Пагава К. И. Бахутაშვილი В. И., 1995).

პლაფერონ ლბ-ს NO-ს სინთეზზე მამოღულირებელი მოქმედება გააჩნია. პლაფერონ ლბ-ს წინასწარი ზემოქმედების შედეგად მცირდება აზოტის ჟანგის შემცველობა ჰემორაგიული შოკის (Kakulia S.V. et al. 2001, Нозадзе и др., 2005), თირკმლის ლითოტრიპსის (Chavchanidze D. et al., 1998), ექსპერიმენტული ინსულტის (მითაგვარია ნ., და სხვ., 2000), კრამ სინდრომის (Германашвили Т. и др., 1999) დროს. ამავე დროს აღსანიშნავია პლაფერონ ლბ-ს NO-ს სინთეზზე გამააქტივებელი მოქმედება ექსტრემალურ მდგომარეობაში მყოფი ბავშვების და B ვირუსული ჰეპატიტით დაავადებულთა ორგანიზმში (Барамидзе и др., 1999, პავლიაშვილი დ., და სხვ., 1999). ტრავმული შოკის (Накашидзе И. и др., 2003) დროს პლაფერონ ლბ აზოტის ჟანგის სინთეზის მოდულაციას და შესაბამისად ფერმენტების ნიტროზილირების შემცირებას უზრუნველყოფს, რაც მათი ფუნქციური აქტივობის

აღდგენით, ჟანგბადის მოხმარების გაუმჯობესებით და ორგანიზმის რედოქსსტატუსის კორექციით ვლინდება. ამავდროულად, სისხლში ნორმალიზდება ანტიოქსიდანტური ფერმენტების (სუპეროქსიდ-დისმუტაზას, კატალაზას, გლუტათიონრედუქტაზას, ცერულო-პლაზმინის, Fe³⁺-ტრანსფერინის) აქტივობა.

ექსპერიმენტული ვიტრეორეთინოპათიის მოდელზე პლაფერონ ლბ ხელს უწყობს როგორც აზოტის ჟანგის, ასევე რეაქციული ჟანგბადის ჭარბი წარმოქმნის შემცირებას (Chichua G. et al., 2001).

დამტკიცებულია პლაფერონ ლბ-ს LPS-ინდუცირებული NO-ს სინთეზის დათრგუნვის უნარი *in vitro* და *in vivo* (Gongadze M. et al., 2001, ნიუარაძე ნ., და სხვ., 2002). აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ, პლაფერონ ლბ-ს დაცვითი ეფექტი უფრო ძლიერია, ვიდრე ჰიდროკორტიზონის (Chichua G., et al, 2001, Gongadze M., et al., 2001, Kakulia S.V, 2001).

არსებობს მონაცემები პლაფერონ ლბ-ს მიტოქონდრიების ელექტრონების სატრანსპორტო ჯაჭვის მუშაობის აღდგენის უნარის შესახებ (Насрашвили М.Г и др., 2005). პლაფერონ ლბ-ს მემბრანომასტაბილიზებელი მოქმედება კი მიტოქონდრიებში ენერგოწარმოქმნელი პროცესების ნორმალიზაციას უზრუნველყოფს, რასაც თან მოჰყვება მიტოქონდრიების ტრანსმემბრანული პოტენციალის აღდგენა და ციტოზოლში აპოპტოზის ინიციაციის მიტოქონდრიული ფაქტორების (cyt-c, AIF, cas-3) გათავისუფლების შემცირება. უკანასკნელი კი პრეპარატის ანტიაპოპტოზურ მოქმედებას უდევს საფუძვლად (Bachutashvili A. et al., 2001).

ის გარემოება, რომ პლაფერონ ლბ-ს შენარჩუნებული აქვს ამნიონის უნიკალური თვისება – დააინჰიბიროს უჯრედის პროგრამული

სიკვდილი (აპოპტოზი) და გააძლიეროს უჯრედთა პროლიფერაცია ამ პრეპარატის ფართო გამოყენების პრესპექტივას განაპირობებს.

ამრიგად, დღემდე წარმოებული კლინიკურ-ექსპერიმენტული კვლევის საფუძველზე შეიძლება ითქვას, რომ პლაფერონი ღბ მრავალმხრივი მოქმედების პრეპარატია. მას ახასიათებს იმუნომარეგულირებელი, ანტიტოქსიური, ანტიჰიპოქსიური, ანტიოქსიდანტური მოქმედება; იგი აუმჯობესებს ტვინის, გულის, თირკმელებისა და ღვიძლის მიკროცირკულაციას; აღადგენს იშემიისა და ინტოქსიკაციის შედეგად დარღვეულ უჯრედულ ენერგოწარმომქნელ და ანტიოქსიდანტურ ფუნქციას, უზრუნველყოფს ორგანიზმში ოქსიგენ-ნიტროგენული სტრესის შემცირებას.

2. მასალა და მეთოდები

2.1 კვლევის ობიექტი

კვლევები ჩატარებულ იქნა ადამიანის ლეიკემია ტრანსფორმირებულ მომწიფებულ T უჯრედებზე (Jurkat უჯრედები) (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Germania)). უჯრედები მრავლდებოდნენ სუსპენზიაზე, რომელიც შეიცავდა ბიოლოგიურ აქტიურ არეს RPMI 1640 (GIBCO), ინაქტივირებულ ემბრიონულ ხბოს შრატს, -გლუტამინს (4მ), პენიცილინს (100 ერთ/მლ), სტრეპტომიცინს (100 ერთ/მლ) ტემპერატურაზე 37⁰ჩ ნოტიო 5% CO₂ შემცველ არეში. ექსპერიმენტები ტარდებოდა უჯრედების კონცენტრაციაზე 0,3 -0,6 x 10⁶ უჯრედი 1 მლ არეში. აპოპტოზის მოდელირების მიზნით უჯრედულ სუსპენზიაში ვამატებდით 1Mm ნატრიუმის ნიტროპრუსიდს (Naniprus, Sopharma) და ვაწარმოებდით ინკუბაციას 24, 48 და 72 საათის განმავლობაში (I ჯგუფი). უჯრედების ნაწილს ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ერთად ვუმატებდით პლაფერონ ლბ (დოზით 0,2 μ გ და 0,4 μ გ) ზემოაღნიშნულ საქსპერიმენტო ვადებში (II ჯგუფი). საკონტროლო ჯგუფს შეადგენდნენ ინტაქტური Jurkat უჯრედები. ინკუბაციის შემდეგ დროის სხვადასხვა ვადებში უჯრედულ კულტურაში გამდინარე ციტომეტრიის მეთოდით ვსწავლობდით Jurkat უჯრედების უჯრედული ციკლის ფაზებში გადანაწილებას, ვსაზღვრავდით მიტოქონდრიული პოტენციალის ($\Delta\psi$) ცვლილებებს; ელექტრონული პარამაგნიტური რეზონანსის და სპინ-ხაფანგების მეთოდით ვსაზღვრავდით უჯრედულ კულტურაში თავისუფალი აზოტის ოქსიდის (NO), რკინის ნიტროზილირებული

კომპლექსების (FeSNO, HbNO), სუპეროქსიდ- (O_2^-) და ლიპოპეროქსიდრადიკალების (LOO \cdot) შემცველობას.

2.2 გამდინარე ციტომეტრიის მეთოდი

2.2.1 უჯრედულ კულტურაში მიტოქონდრიების მემბრანული პოტენციალის $\Delta\psi$ -ს ცვლილებების განსაზღვრა

უჯრედულ კულტურაში გამდინარე ციტომეტრიის მეთოდით ლიპოფილური კათიონური სინჯის 3,3'-dihexyloxacarbo-cyanine iodide - DiOC₆ გამოყენებით ვსაზღვრავდით მიტოქონდრიული პოტენციალის $\Delta\psi$ მნიშვნელობას. გამდინარე ციტომეტრია ფლუორესცენციულ სინჯთან ერთად უჯრედების დიდი რაოდენობის ჰეტეროგენულ პოპულაციაში მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალის განსაზღვრის საშუალებას იძლევა. ანალიზათვის საკმარისია უჯრედების შედარებით მცირე რაოდენობა (10^3 - 10^5), რომლებიც ითესება დაბალ კონცენტრაციებში (1 μ M-ზე ნაკლები) (Castedo M. et al., 2002). მიტოქონდრიული პოტენციალის განსაზღვრის მიზნით ვაწარმოებდით 1×10^5 უჯრედის ინკუბაციას DiOC₆-ის 0.2 μ M-ური ხსნარის 120 μ ლ –ში 15 წუთის განმავლობაში 37 C ტემპერატურაზე . კვლევები ტარდებოდა აპარატის (Becton Dickinson, US) საშუალებით. DiOC₆ –ის აგზნება რეგუსტრირებულ იქნა 488 ნმ-ზე, ემისიას ვსაზღვრავდით 530 ნმ-ზე.

მიტოქონდრიულ-მემბრანული პტენციალის ცვლილებების მიხედვით ვადგენდით უჯრედების პროცენტულ შემცველობას ექსპერიმენტის ყველა ვადაში.

2.2.2 უჯრედულ კულტურაში უჯრედების უჯრედული ციკლის ფაზებში გადანაწილების შესწავლა

უჯრედული ციკლი ფაზებში გადანაწილების შესწავლას ვაწარმოებდით გამდინარე ციტომეტრიის საშუალებით პროპოდიუმ იოდით შედგების მეთოდით. პროპოდიუმ იოდით შედგების მეთოდი ფართოდ გამოიყენება უჯრედული ციკლის სურათის მისაღებად. პროპოდიუმ იოდით უკავშირდება დნმ-ის დიპლოიდურ ჯაჭვებს და უჯრედული ციკლის ფაზებში დნმ-ს გაორმაგებული ჯაჭვების განაწილების შესახებ ინფორმაციას გვაწვდის. უჯრედები ფიქსირდება 70%-ან ეთანოლში ტემპერატურაზე $+4^{\circ}\text{C}$ 12 საათის განმავლობაში. ეთანოლის მოშორების შემდეგ უჯრედულ ნალექს ვუმატებდით რნმ-აზას (Sigma) ($10\ \mu\text{r}/\mu\text{ლ}$) და ინკუბაციას ვახდენდით 30 წუთის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე. შემდეგ უჯრედებს უტარებდით სუსპენზირებას პროპოდიუმ იოდის ხსნარში. ვაწარმოებდით უჯრედების ინკუბაციას 30 წუთის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე და ვაანალიზებდით გამდინარე ციტომეტრიის მეთოდით. დნმ-ის შემცველობის მიხედვით გამოვყოფდით: 1. ჰაპლოიდურ უბანს – აპოპტოზური უჯრედები; 2 – დიპლოიდურ უბანს – უჯრედები ფაზაში G_0/G_1 ; 3. გარდამავალი უბანი დნმ-ის დიპლოიდურ და ტეტრაპლოიდურ მდგომარეობას შორის – უჯრედები S ფაზაში; 4. ტეტრაპლოიდური უბანი – უჯრედები G_2/M ფაზაში. ვადგენდით უჯრედების პროცენტულ შემცველობას თითოეულ უბანში.

2.3 ეპრ სპექტროსკოპული კვლევები

უჯრედული კულტურის სუსპენზიის ეპრ სპექტრების რეგისტრაცია ხდებოდა რადიოსპექტრომეტრზე P9-1307, რომელიც ოპერირებს ზემოდალ სიხშირეზე 9.77 GHz მოდულაციური სიხშირით 50 kHz თხევადი აზოტის ტემპერატურაზე (-196°C). ვსაზღვრავდით აზოტის ჟანგის მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის ელექტრონული სატრანსპორტო ცილების ჰემური და არაჰემური რკინის ნიტროზილირებული კომპლექსების (HbNO, FeSNO) და მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის ინტენსივობის და მთლიანობის ამსახველი თავისუფალი რადიკალების ეპრ სიგნალებს.

თავისუფალი აზოტის ჟანგის განსაზღვრის მიზნით ვიყენებდით სპინ-ხაფანგს ნატრიუმის დიეთილდითიოკარბამატს (DETC) (SIGMA). DETC (დოზით 500 მგ/კგ) და Fe²⁺-ციტრატი (50 მგ FeSO₄·6H₂O+ 250 მგ ნატრიუმის ციტრატი კგ-1). NO-Fe²⁺-(DETC)₂ კომპლექსების ეპრ სპექტრები ისაზღვრებოდა თხევადი აზოტის ტემპერატურაზე მიკროტალღოვან სიმძლავრეზე 20 მვტ.

ლიპოპეროქსიდრადიკალების (LOO[•]) განსაზღვრის მიზნით ვიყენებდით სპინხაფანგს α-ფენილ-tert-ბუტილნიტროს (PBN) (SIGMA), რომელიც დოზით 25მგ/კგ(17). PBN-თან 5 წუთიანი ინკუბაციის შემდეგ. ლიპოპეროქსიდრადიკალების (LOO[•]) ეპრ სპექტრებს ვსაზღვრავდით ოთახის ტემპერატურაზე მიკროტალღოვან სიმძლავრეზე 20 მვტ.

ჟანგბადის თავისუფალი რადიკალების (სუპეროქსიდრადიკალების) განსაზღვრის მიზნით ვიყენებდით სპინ-ხაფანგს 5,5 დიმეთილ-1-პიროლინ-IV-ოქსიდი (DMPO) (SIGMA). ვაწარმოებდით ინკუბაციას DMPO-თან (დოზით 50 mM სუსპენზიის 1 მლ-

ზე) 3 წუთის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე. სუპეროქსიდრადიკალების ეპრ სპექტრებს ვსაზღვრავდით ოთახის ტემპერატურაზე 20მვტ. მიკროტალღოვან სიმძლავრეზე.

2.4 ელექტრონული მიკროსკოპია

აღებული მასალა ფიქსირდება გლუტარალდეჰიდის 2,5%-იან ხსნარით (pH-7,4). ეპონის ყალიბებიდან მიღებული ანათალები იღებებოდა ტელუიდინით. ულტრაბლელი ანათალების კვლევა ტარდებოდა ელექტრონული მიკროსკოპით tesla BS 500.

3. საკუთარი კვლევის შედეგები

3.1 Jurkat უჯრედების კულტურაში მიტოქონდრიული პოტენციალის ($\Delta\psi$) ცვლილებები ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან ინკუბაციის შემდეგ

Jurkat უჯრედების კულტურის ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან 24, 48, და 72 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ მაღალი მიტოქონდრიული პოტენციალის მქონე უჯრედების პროცენტული შემცველობა მცირდება საკონტროლო მაჩვენებლებთან შედარებით (ცხრილი 1), შესაბამისად იზრდება დაბალი მიტოქონდრიული პოტენციალის მქონე უჯრედების პროცენტული შემცველობა.

ცხრილი 2 ნაჩვენებია, რომ Jurkat უჯრედების კულტურის ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან 24 საათიანი და პლაფერონ ლბ-სთან (დოზით 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ და 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ერთდროული ინკუბაციის დროს უჯრედების უმრავლესობაში შენარჩუნებულია მაღალი მიტოქონდრიულ-მემბრანული პოტენციალი. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან 48 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ Jurkat უჯრედების პოპულაციაში დაბალი მიტოქონდრიული პოტენციალის მქონე უჯრედების პროცენტული შემცველობა იზრდება კონტროლთან შედარებით.

საინკუბაციო არეში პლაფერონ ლბ-ს დამატებისას იზრდება მაღალი მიტოქონდრიულ-მემბრანული პოტენციალის მქონე უჯრედების პროცენტული შემცველობა პლაფერონ ლბ-ს დოზაზე დამოკიდებულების პრპორციულად და შესაბამისად მცირდება დაბალი მიტოქონდრიული პოტენციალის მქონე უჯრედების პროცენტი.

ცხრილი 1. Jurkat უჯრედების კულტურაში უჯრედების პროცენტული გადანაწილება მიტოქონდრიულ-მემბრანული პოტენციალის ($\Delta\psi$) ცვლილებების მიხედვით ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან (Na-ნიტროპრუსიდი) ინკუბაციის შემდეგ

Jurkat უჯრედები	კონტროლი	Na-ნიტროპრუსიდი 24 სთ	Na-ნიტროპრუსიდი 48 სთ	Na-ნიტროპრუსიდი 72 სთ
სულ	100%	100%	100%	100%
M1	66,7%	51,0%	33,9%	13,2%
M2	33,3%	49,0%	66,1%	86,8%

M1-უჯრედები მაღალი მიტოქონდრიულ-მემბრანული პოტენციალით
M2-უჯრედები მაღალი-მიტოქონდრიულ მემბრანულ პოტენციალით

ცხრილი 2. Jurkat უჯრედების კულტურაში უჯრედების პროცენტული გადანაწილება მიტოქონდრიულ-მემბრანული პოტენციალის ($\Delta\psi$) ცვლილებების მიხედვით ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან ინკუბაციის შემდეგ

Jurkat უჯრედები	კონტროლი	Na-ნიტროპრუსიდი 24 სთ	Na-ნიტროპრუსიდი 48 სთ	Na-ნიტროპრუსიდი 72 სთ	Na-ნიტროპრუსიდი + PLB 24სთ 0,2 μ g/ml	Na-ნიტროპრუსიდი + PLB 48სთ 0,2 μ g/ml	Na-ნიტროპრუსიდი + PLB 72სთ 0,2 μ g/ml	Na-ნიტროპრუსიდი + PLB 24სთ 0,4 μ g/ml	Na-ნიტროპრუსიდი + PLB 48სთ 0,4 μ g/ml	Na-ნიტროპრუსიდი + PLB 72სთ 0,4 μ g/ml
სულ	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
M1	66,%	51,0%	33,9%	13,2%	76,6%	53,0%	37,0%	76,0%	71,0%	69,9%
M2	33,%	49,0%	66,1%	86,8%	23,4%	47,0%	63,0%	24,0%	29,0%	30,1%

M1-უჯრედები მაღალი მიტოქონდრიულ-მემბრანული პოტენციალით(%-ში)

M2-უჯრედები დაბალი მიტოქონდრიულ-მემბრანული პოტენციალით(%ში)

მიღებული შედეგებიდან შეგვიძლია გავაკეთოთ დასკვნა, რომ პლაფერონ ლბ დოზით 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Jurkat უჯრედებთან და ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან 48 საათიანი ინკუბაციის პირობებში ავლენს მკვეთრად გამოხატულ ანტიაპოპტოზურ აქტივობას.

Jurkat უჯრედების ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან 72 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ დაბალი მიტოქონდრიულ-მემბრანული პოტენციალის მქონე უჯრედების პროცენტული შემცველობა კვლავ იზრდება.

Jurkat უჯრედების კულტურის ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან (დოზით 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 72 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ მაღალი მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალის მქონე უჯრედების პროცენტული შემცველობის მაჩვენებელი იმატებს მნიშვნელოვნად, ხოლო დაბალი მიტოქონდრიულ-მემბრანული პოტენციალის მქონე უჯრედების პროცენტული შემცველობა მნიშვნელოვნად იკლებს ნატრიუმის ნიტროპრუსიდისათვის დამახასიათებელ მაჩვენებლებთან შედარებით. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან (დოზით 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 72 საათიანი ერთდროული ინკუბაციის პირობებში მაღალი თუ დაბალი მიტოქონდრიულ-მემბრანული პოტენციალის მქონე უჯრედების პროცენტული შემცველობის აღნიშნული მატება თუ კლება, შესაბამისად კვლავ გრძელდება. ჩვენი კვლევების შედეგები ნატრიუმის ნიტროპრუსიდის Jurkat უჯრედებზე დროდამუკიდებელი მოქმედების შესახებ კორელირებს ლიტერატურულ მონაცემებთან. I. Murgia და თანაავტორებმა აჩვენეს, რომ ნატრიუმის ნიტროპრუსიდი იწვევს Jurkat უჯრედულ კულტურაში პროაპოპტოზური ბირთვული ფაქტორის NF-kB-ის მაქსიმალურ აქტივაციას 24 საათიანი ინკუბაციის პირობებში,

ხოლო შემდეგ მისი აქტივობა საგრძნობლად მცირდება (Murgia , Delledonne , Soave , 2002).

ცნობილია, რომ ნატრიუმის ნიტროპრუსიდი კონცენტრაციით $10\mu\text{M}$ გამოყოფს NO-ს კონცენტრაციით დაახლოებით 10nM (Camacho M. et al. 2004). ანუ, ჩვენს მიერ გამოყენებული ნატრიუმის ნიტროპრუსიდის მიკრომოლარული დოზა გამოყოფს აზოტის ოქსიდს ტოქსიურ დოზებზე გაცილებით დაბალი რაოდენობით.

ლიტერატურაში არსებობს უამრავი მონაცემები NO-ს დროზედამოკიდებული პრო- და ანტიაპოპტოზური მოქმედების შესახებ. (Melino, 1997). როგორც ცნობილია, NO-ს პროაპოპტოზური აქტივობა ვლინდება მიტოქონდრიული ელექტრონების სატრანსპორტო ცილების ნიტროზილირებით და მიტოქონდრიული სუნთქვის დათრგუნვით და $\Delta\psi$ -ს შემცირებით, ამავე დროს, კასპაზების (კასპაზა 3 და კასპაზა 9) ნიტროზილირების მეშვეობით აზოტის ჟანგს შეუძლია გამოავლინოს ანტიაპოპტოზური მოქმედება.

როგორც ცნობილია, მიტოქონდრიული სუნთქვის ჯაჭვში ელექტრონების ტრანსპორტის შედაგად ადგილი აქვს მოლეკულური ჟანგბადის აღდგენას და წყლის მოლეკულის წარმოქმნას (IV კომპლექსი). ეს პროცესი შეუძლებელია პროტონების (H^+) მიტოქონდრიული მატრიქსიდან მემბრანათაშორისო არეში განდევნის პროცესთან, რომელსაც თან სდევს ელექტროქიმიური გრადიენტის გენერირება, ცნობილი პროტონების მამოძრავებელი ძალის სახელწოდებით. ენერგია, დაგროვებული ამ გრადიენტის სახით გამოყენებული შეიძლება იყოს ATP-ის სინთეზზე (ATP-სინთაზას მონაწილეობით), ან სხვა ენერგია-დამოკიდებულ მიტოქონდრიულ პროცესებში (Boyer P.D., 1975). პროტონ-მამოძრავებელი ძალა

განაპირობებს მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალის ($\Delta\psi$) წარმოქმნას. $\Delta\psi$ - მიტოქონდრიის ენერგეტიკული სტატუსის და მთლიანი უჯრედული ჰომეოსტაზის მნიშვნელოვანი ინდიკატორია.

მრავალი კვლევები მოწმობენ მიტოქონდრიების მნიშვნელოვანი როლის შესახებ აპოპტოზის განვითარებაში. მიტოქონდრიების მემბრანების განვლადობის და პოტენციალის $\Delta\psi$ მაჩვენებლები უჯრედების ფუნქციონირების და დისფუნქციის მნიშვნელოვანი ინდიკატორებია (Kroemer et al., 2000, Castedo et al., 2002).

აღსანიშნავია, რომ $\Delta\psi$ -ის ვარდნა ასოცირდება აპოპტოზთან ტრანზიციული განვლადობის ფორმის გახსნით (Marchetti P. et al., 1996). ნაჩვენებია იქნა, რომ აპოპტოზი ვითარდება მემბრანული პოტენციალის შემცირებიდან რამოდენიმე საათის შემდეგ (Fall C. P., Bennet J.P., 1999).

აპოპტოზის განვითარებისათვის საჭიროა ATP-ის ენერგია, ენერგიის გამოლევა განაპირობებს აპოპტოზის მექანიზმის ნეკროზით შეცვლას (Choi I.Y., et al., 2000). აპოპტოზის დროს მიტოქონდრიული შიდა მემბრანა, გარეთა მემბრანის დაზიანების მიუხედავად, ინარჩუნებს ჟანგვითი ფოსფორილირების უნარიანობას და ამარაგებს მომაკვდავ უჯრედს აპოპტოზის განვითარებისათვის საჭირო ენერგიით გარკვეული დროის განმავლობაში. ნეკროზის შემთხვევაში მიტოქონდრიული ჰომეოსტაზის დარღვევის და უჯრედის მოცულობის ზრდის მიზეზს წარმოადგენს ჟანგვითი ფოსფორილირების უნარის დაკარგვა და ენერგეტიკული რესურსების (ATP) გამოლევა (Decker, Widenthal 1980).

3.2 Jurkat უჯრედების კულტურაში უჯრედების უჯრედული ციკლის ფაზებში გადანაწილების შესწავლა ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან ინკუბაციის შემდეგ

ცხრილში 3 მოცემულია Jurkat უჯრედების კულტურაში უჯრედების უჯრედული ციკლის ფაზებში გადანაწილების ცვლილებები ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან (Na- ნიტროპრუსიდი) ინკუბაციის შემდეგ. როგორც ჩანს, ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან 48 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ უჯრედულ პოპულაციაში იზრდება ჰაპლოიდური (აპოპტოზური) უჯრედების პროცენტული შემცველობა კონტროლთან შედარებით. ამ დროს დიპლოიდურ უჯრედების პროცენტული შემცველობა (ფაზა G_0/G_1) მცირდება, ასევე მცირდება S ფაზაში მყოფი უჯრედების და ტეტრა-პლოიდური უჯრედების (ფაზა G_2/M) პროცენტული შემცველობები. Jurkat უჯრედების ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან 72 საათიანი ინკუბაციის დროს აპოპტოზის ინტენსივობა იზრდება ექსპერიმენტის წინა ვადასთან შედარებით, დიპლოიდური უჯრედების (ფაზა G_0/G_1) შემცველობა მცირდება, ხოლო უჯრედების შემცველობა S ფაზაში და ტეტრა-პლოიდური უჯრედების პროცენტი, თუმცა მნიშვნელოვნად არ იცვლება 48 საათიანი ინკუბაციასთან შედარებით, მაგრამ მაინც კლების ტენდენციას ავლენს. ცხრილში 4 ნაჩვენებია, რომ Jurkat უჯრედების ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან 48 საათიანი ერთდროული ინკუბაციის დროს აპოპტოზის ინტენსივობა მნიშვნელოვნად მცირდება როგორც ნატრიუმის ნიტროპრუსიდის მაჩვენებლებთან, ისე საკონტროლო მაჩვენებლებთან შედარებით. დიპლოიდური უჯრედების (ფაზა G_0/G_1) პროცენტული შემცველობა, ისევე როგორც უჯრედი S

ცხრილი 3. Jurkat უჯრედების კულტურაში უჯრედების პროცენტული გადანაწილება უჯრედული ციკლის ფაზების მიხედვით ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ინკუბაციის შემდეგ.

Jurkat უჯრედები	SubG0(Apopt.)	G0/G1	S	G2/M
კონტროლი	16,8%	55,2%	13,0%	15,0%
Na-ნიტროპრუსიდი 48სთ	43,6%	37,6%	11,5%	7,5%
Na-ნიტროპრუსიდი 72სთ	55,9%	27,0%	11,2%	5,9%

ცხრილი 4. Jurkat უჯრედების კულტურაში უჯრედების პროცენტული გადანაწილება უჯრედული ციკლის ფაზების მიხედვით ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან ინკუბაციის შემდეგ

Jurkat უჯრედები	SubG0(Apopt.)	G0/G1	S	G2/M
კონტროლი	16,8%	55,2%	13,0%	15,0%
Na-ნიტროპრუსიდი 48სთ	43,6%	37,6%	11,5%	7,5%
Na-ნიტროპრუსიდი 72სთ	55,9%	27,0%	11,2%	5,9%
Na-ნიტროპრუსიდი + PLB 0,4 µg/ml 48სთ	29,5%	39,5%	16,5%	14,5%
Na-ნიტროპრუსიდი +PLB 0,4 µg/ml 72სთ	21,0%	39,0%	21,0%	19,0%

ფაზაში მნიშვნელოვნად არ იცვლება მხოლოდ ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან შედარებით, მაშინ როცა ტეტრაპლოიდური უჯრედების შემცველობა გამოსატულად იზრდება, ანუ პლაფერონ ლბ-ს ზემოქმედებით მცირდება აპოპტოზის და იზრდება მიტოზების ინტენსივობა. Jurkat უჯრედების ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან 72 საათიანი ერთდროული ინკუბაციის დროს აპოპტოზის ინტენსივობა კიდევ უფრო მცირდება ექსპერიმენტის წინა ვადის მაჩვენებელთან შედარებით. დიპლოიდური უჯრედების (ფაზა G₀/G₁) პროცენტული შემცველობა თითქმის არ იცვლება წინა ვადისათვის (48 საათი) დამახასიათებელ მაჩვენებლებთან შედარებით, მაშინ როცა S ფაზაში მყოფი უჯრედების და ტეტრაპლოიდური უჯრედების შემცველობა იზრდება.

მაშასადამე, ჩატარებული კვლევის შედეგების ანალიზის საფუძველზე შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ლეიკემია ტრანსფორმირებულ T ლიმფოციტებში (Jurkat cell) ნატრიუმის ნიტროპრუსიდი უზრუნველყოფს აპოპტოზის ინდუქციას და პროლიფერაციის (მიტოზის) დათრგუნვას.

პლაფერონი ლბ ხელს უწყობს აპოპტოზის ინტენსივობის დაქვეითებას და უჯრედების პროლიფერაციის ინტენსიფიკაციას, რაც ვლინდება პრეპარატის მიტოზ-მასტიმულირებელი აქტივობით.

3.3 Jurkat უჯრედების კულტურაში ეპრ სიგნალების ინტენსივობის ცვლილებები ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან ინკუბაციის შემდეგ

ცხრილში N5 მოყვანილია ეპრ სიგნალების მონაცემები Jurkat უჯრედების ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან 24, 48 და 72 საათიანი ინკუბაციის დროს.

როგორც ცხრილში მოყვანილი მონაცემებიდან გამომდინარეობს, ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ Jurkat უჯრედების კულტურაში სპინმონიშნული აზოტის ჟანგის (NO) ეპრ სიგნალის ინტენსივობა არ იცვლება საკონტროლო დონესთან შედარებით; ამ ვადაზე გამოვლენილია სუპეროქსიდრადიკალების (O⁻), ჰემური (HbNO) და არაჰემური (FeSNO) რკინის ნიტროზილური კომპლექსების ეპრ სიგნალები. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან 48 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ Jurkat-ის უჯრედების ეპრ სპექტრში სპინმონიშნული თავისუფალი NO-ს ეპრ სიგნალის ინტენსივობა არ იცვლება საკონტროლო დონესთან შედარებით, მაგრამ თავისუფალი რადიკალების ეპრ სიგნალის ინტენსივობა დაახლოებით 50%-ით მცირდება. ამ ვადაზე Jurkat უჯრედების სპექტრში ვლინდება სუპეროქსიდრადიკალების (O₂⁻) ეპრ სიგნალი, ასევე ლიპოპეროქსიდების (LOO[•]), HbNO და FeSNO კომპლექსების ეპრ სიგნალები.

Jurkat უჯრედების ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან 72 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ეპრ სპექტრში სპინ-მონიშნული თავისუფალი NO-ს ეპრ სიგნალის ინტენსივობა არ იცვლება საკონტროლო დონესთან შედარებით, მაგრამ თავისუფალი რადიკალების ეპრ

**ცხრილი 5. ეპრ-სიგნალების ცვლილებები Jurkat უჯრედების კულტურაში
ნატრიუმის ნიტროპრუსიდის ზემოქმედების დროს**

Jurkat უჯრედები		O ₂ ⁻	NO	LOO [·]	თავ. რადიკ.	FeSNO	HbNO
კონტროლი	24 სთ	-	10,0±0,5	-	10,0±0,5	-	-
	48 სთ	-	10,0±0,6	-	12,0±0,6	-	-
	72 სთ	-	10,0±0,6	-	11,0±0,6	-	-
Na- ნიტროპრუსიდი	24 სთ	3,0±0,6	10,0±0,5	-	11,0±0,6	5,0±0,6	10,0±0,6
	48 სთ	5,0±0,6	10,0±0,7	10,0±0,5	5,0±0,4*	6,0±0,5	12,0±0,4
	72 სთ	9,0±0,5	9,0±0,8	12,0±0,9	3,0±0,4*	6,0±0,6	11,6±0,6

*სარწმუნო სხვაობა საკონტროლო სერიის შესაბამის მაჩვენებლებთან შედარებით

**ცხრილი 6. ეპრ-სიგნალების ცვლილებები Jurkat უჯრედების კულტურაში
ნატრიუმის ნიტროპრუსიდის და პლაფერონ ლბ-ს ზემოქმედების დროს**

		O ₂ ⁻	NO	LOO [·]	თ. რ.	FeSNO	HbNO
კონტროლი	24სთ	-	10,0±0,5	-	10,0±0,5	-	-
	48სთ	-	10,0±0,6	-	12,0±0,6	-	-
	72სთ	-	10,0±0,6	-	11,0±0,6	-	-
Na- ნიტროპრუსიდი	24სთ	3,0±0,6	10,0±0,5	-	11,0±0,6	5,0±0,6	10,0±0,6
	48სთ	5,0±0,6	10,0±0,7	10,0±0,5	5,0±0,4*	6,0±0,5	12,0±0,4
	72სთ	9,0±0,5	9,0±0,8	12,0±0,9	3,0±0,4*	6,0±0,6	11,6±0,6
Na- ნიტროპრუსიდი + PLB 0,2 µg/ml	24სთ	-	10,0±0,5	-	13,0±0,5**	5,0±0,6	13,0±0,8**
	48სთ	3,1±0,6**	16,0±0,5**	6,0±0,7**	12,0±0,5**	4,0±0,6**	8,0±0,6**
	72სთ	3,0±0,6**	16,0±0,6**	4,7±0,6**	12,0±0,6**	4,0±0,6**	7,0±0,6**
Na- ნიტროპრუსიდი + PLB 0,4 µg/ml	24სთ	-	15,0±0,8**	-	12,0±0,5	3,0±0,6**	-
	48სთ	-	20,0±0,9**	-	10,0±0,6**	2,0±0,5**	-
	72სთ	-	19,0±0,8**	-	10,5±0,6**	1,5±0,6**	-

*სარწმუნო სხვაობა საკონტროლო სერიის შესაბამის მაჩვენებლებთან შედარებით

**სარწმუნო სხვაობა ნატრიუმის ნიტროპრუსიდისთვის დამახასიათებელი შესაბამის მაჩვენებლებთან შედარებით

სიგნალის ინტენსივობა კიდევ უფრო მცირდება საკონტროლო მაჩვენებლთან შედარებით. ამ ვადაზე Jurkat უჯრედების სპექტრში კიდევ უფრო მეტი ინტენსივობით ვლინდება სუპეროქსიდრადიკალების (O_2^-) ეპრ სიგნალი, ასევე რეგისტრირდება ლიპოპეროქსიდების (LOO), HbNO და FeSNO კომპლექსების ინტენსიური ეპრ სიგნალები.

ცხრილში 6 ნაჩვენებია რომ Jurkat ჯრედული კულტურის ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან (დოზით $0,2 \mu\text{g/ml}$) ინკუბაციის პირობებში სპინმონიშნული თავისუფალი აზოტის ჟანგის ეპრ სიგნალი 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ არ იცვლება, 48 და 72 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ 60%-ით იზრდება, ნატრიუმის ნიტროპრუსიდისათვის დამახასიათებელ დონესთან შედარებით. ამ ექსპერიმენტულ სერიაში უჯრედების ეპრ სპექტრში სუპეროქსიდრადიკალების (O_2^-) და ლიპოპეროქსიდების (LOO) ეპრ სიგნალების ინტენსივობა მნიშვნელოვნად უფრო დაბალია, ვიდრე მხოლოდ ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ინკუბაციის პირობებში; FeSNO და HbNO-ს კომპლექსების ეპრ სიგნალების ინტენსივობა მცირედ განსხვავდება ნატრიუმის ნიტროპრუსიდისათვის დამახასიათებელი მაჩვენებლების დონისაგან.

Jurkat ჯრედული კულტურის ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან (დოზით $0,4 \mu\text{g/ml}$) ინკუბაციის პირობებში სპინმონიშნული თავისუფალი აზოტის ჟანგის ეპრ სიგნალის ინტენსივობა იზრდება და 24 საათიანი ინკუბაციის შედეგად შეადგენს საკონტროლო მაჩვენებლების 150%, ხოლო 48 და 72 საათიანი ინკუბაციისათვის 200%-ს. ამ ექსპერიმენტულ სერიაში დაკვირვების არც ერთ ვადაზე უჯრედების ეპრ სპექტრში არ ვლინდება სპინმონიშნული სუპეროქსიდრადიკალების (O_2^-) და ლიპოპეროქსიდების

(LOO) სიგნალები, მნიშვნელოვნად მცირდება FeSNO-ს კომპლექსების ეპრ სიგნალის ინტენსივობა, ხოლო HbNO-ს კომპლექსების ეპრ სიგნალი საერთოდ არ ვლინდება.

მაშასადამე, მიღებული შედეგებიდან შეგვიძლია გავაკეთოთ დასკვნა, რომ ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ინკუბაცია ხელს უწყობს Jurkat უჯრედების კულტურაში ნიტროგენ-ოქსიგენური სტრესის ინტენსიფიკაციას და მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის ელექტრონების ტრანსპორტის დათრგუნვას. პლაფერონ ლბ დროზედამოკიდებულად ამცირებს ნიტროგენ-ოქსიგენური სტრესის ინტენსივობას და ხელს უწყობს მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის ელექტრონული ტრანსპორტის ნორმალიზაციას.

მიტოქონდრია – ჟანგბადის რეაქციული ნაერთების პიდაპირი გენერატორია (Boveris AS., Chance B., 1973). მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის მუშაობის შეფერხება სუპეროქსიდრადიკალების გაძლიერებულ წარმოქმნას და უჯრედში ოქსიდაციური სტრესის განვითარებას უზრუნველყოფს.

მიღებული შედეგების ანალიზიდან გამომდინარეობს, რომ Jurkat უჯრედების ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან, NO-ს ეგზოგენურ დონორთან, ინკუბაციის დროს უჯრედულ კულტურაში მნიშვნელოვნად არ იცვლება თავისუფალი NO-ს შემცველობა. როგორც ცნობილია, თავისუფალი NO ფიზიოლოგიურ პირობებში კონკურირებს ჟანგბადთან და შექცევადად აინჰიბირებს მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის ციტოქრომ-c-ოქსიდაზას (IV კომპლექსი). ამ გზით თავისუფალი აზოტის ჟანგი ჟანგბადის მოხმარების ინტენსივობის ფიზიოლოგიურ რეგულაციას უზრუნველყოფს. მაგრამ, NO-ს მაღალი კონცენტრაციებთან ხანგრძლივი ინკუბაციის დროს (რასაც ადგილი

აქვს უჯრედულ კულტურაში NO-ს დონორის, ნატრიუმის ნიტროპრუსიდის დამატების პირობებში), NO შეუქცევადად აინჰიბირებს მიტოქონდრიულ I კომპლექს (NADH-დეჰიდროგენაზას), შესაძლებელია, ფერმენტულ კომპლექსში კრიტიკული თიოლების S-ნიტროზილირების გზით. ჩვენ კვლევებში, როგორც უკვე აღვნიშნეთ, ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ინკუბაციის დროს ვლინდება HbNO-ს და FeSNO-ს კომპლექსების წარმოქმნა, რაც მეტყველებს NO-ს დონორის ზემოქმედებით მიტოქონდრიული სუნთქვის ჯაჭვის I და IV კომპლექსებში რკინის იონების ნიტროზილირების და, მაშასადამე, ელექტრონული ტრანსპორტის დათრგუნვის შესახებ. მიტოქონდრიების ელექტრონული სატრანსპორტო ჯაჭვის ინჰიბირება აღნიშნულ უბნებში განაპირობებს თავისუფალი ელექტრონების მოლეკულურ ჟანგბადზე გაუონვას, ჟანგბადის რეაქციული ნაერთების წარმოქმნას და უჯრედულ კულტურაში ოქსიდაციური სტრესის ინტენსიფიკაციას. უკანასკნელი ვლინდება Jurkat უჯრედების ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან 48 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ სპინმონიშნული სუპეროქსიდრადიკალების (O_2^-) ინტენსიური სიგნალის გამოჩენით.

NO-ს დონორის თანაობისას და სუპეროქსიდრადიკალების გაძლიერებული წარმოქმნის პირობებში არ არის გამორიცხული NO-ს პეროქსინიტრიტად ტრანსფორმაცია. ჩვენი აზრით, ზუსტად პეროქსინიტრიტის, HbNO-ს და FeSNO-ს კომპლექსების გაძლიერებული წარმოქმნა განაპირობებს Jurkat უჯრედების კულტურაში NO-ს დონორის, ნატრიუმის ნიტროპრუსიდის, შეყვანის შემდეგ NO-ს დაბალ შემცველობას. ამ შემთხვევაში ჭარბად წარმოქმნილი NO აინჰიბირებს მიტოქონდრიული სუნთქვის და ჟანგვითი ფოსფორილირების ინტენსივობას, რაც მიტოქონდრიული თავისუფალრადიკალური ეპრ

სიგნალის ინტენსივობის მკვეთრი დაქვეითებით ვლინდება. იგი ავლენს ციტოტოქსიურობას პეროქსინიტრიტის სახით და იწვევს ცილების, ნუკლეინური მჟავების და განსაკუთრებით, მემბრანული ლიპიდების დაზიანებას და პეროქსიდაციული პროცესების ინიციაციას. უკანასკნელი ვლინდება ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან 48 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ლიპოპეროქსიდების (LOO) ინტენსიური ეპრ სიგნალების გამოჩენით.

მრავალ კვლევებში ნახვენები იქნა (Beltran B., et al., 2000), რომ NO-ს ხანგრძლივი ზემოქმედება განაპირობებს უჯრედული სუნთქვის ინჰიბიციას. დადგენილია, რომ მიტოქონდრიების ელექტრონების სატრანსპორტო ჯაჭვში ჟანგბადის მოხმარების შემცირება განპირობებულია I და IV კომპლექსების აქტივობის ინჰიბიციით (Beltran B. et al., 2000).

NO-ს მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსზე მაინჰიბირებელი ზემოქმედების შედეგად ძლიერდება სუპეროქსიდრადიკალების (O_2^-) გენერაცია, რომლებსაც შეუძლია NO-სთან სწრაფი რეაგირება პეროქსინიტრიტის (NOO^-) წარმოქმნით (Beckman J.S. et al., 1990, Radi R. et al., 1991). ითვლება, რომ NOO^- წარმოიქმნება I კომპლექსში მის მიერ გენერირებული სუპეროქსიდრადიკალების მონაწილეობით (Radi R., Cassina A., 1996). I კომპლექსის ხანგრძლივი ინჰიბიციის (S-ნიტროზილირება), შესაძლოა წარმოადგენდეს საყოველთაოდ ცნობილი მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის (IV კომპლექსის) ფიზიოლოგიური ინჰიბიციის მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის პათოფიზიოლოგიური დათრგუნვით შენაცვლების საკვანძო რგოლს (Brown G.C., Coper C.E., 1994). დამტკიცებულია, რომ I კომპლექსის ინჰიბიციის ტოქსიურია და

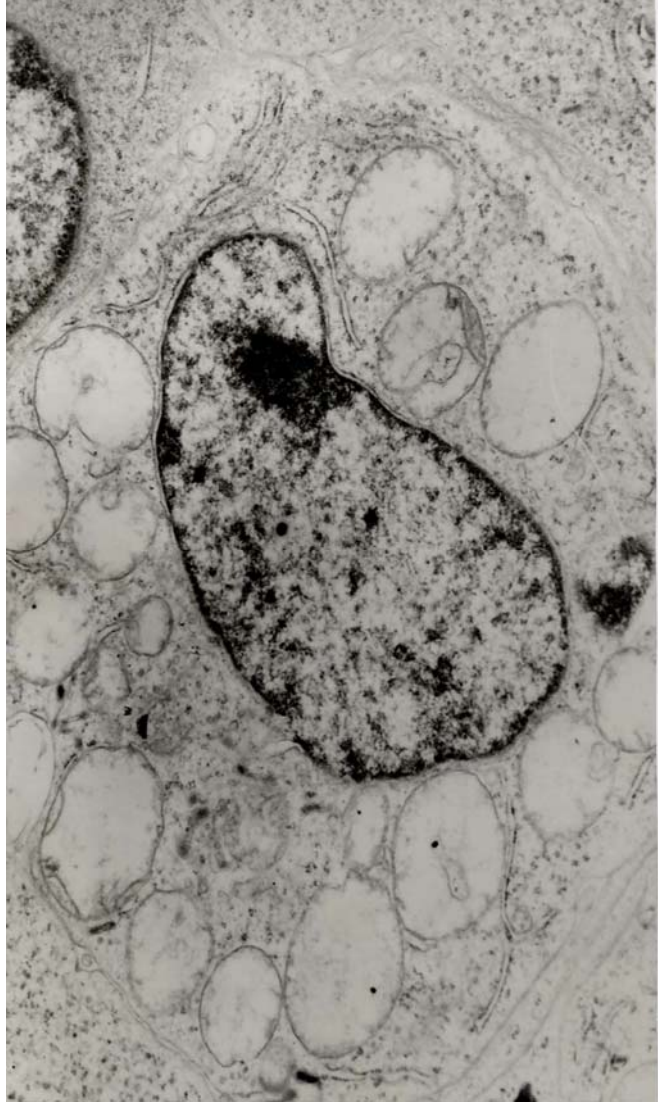
იწვევს პროაპოპტოზური პროგრამის ჩართვას (Seaton T.A. et al., 1998, Barrientos A., Moraes C.T., 1999). ვარაუდობენ, რომ IV კომპლექსის ინჰიბიციით ინიცირებული ჟანგვითი სტრესი ხელს უწყობს I კომპლექსის ელექტრონების სატრანსპორტო ცლების (და სხვა ფერმენტების) ინჰიბიციას S-ნიტროზილირების გზით (Beltran B. et al., 2000). ანუ, შეიძლება ითქვას, რომ NO-ს გააჩნია უჯრედების მიტოქონდრიული სუნთქვის რეგულაციის უნარი: IV კომპლექსთან ურთიერთქმედების გზით NO ფიზიოლოგიურად არეგულირებს მიტოქონდრიული სუნთქვის პროცესების ინტენსივობას, ხოლო აზოტის ჟანგის ხანგრძლივი ზემოქმედების პირობებში ეს მოლეკულა იწვევს მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსის აქტივობის დათრგუნვას და უჯრედში პათოლოგიური პროცესის განვითარებას განაპირობებს (Clementi E. et al., 1998).

Jurkat უჯრედების საინკუბაციო არეში პლაფერონ ლბ-ს დამატებისას პრეპარატი გამოავლინა დოზადამოკიდებული აქტივობა. როგორც ჩვენი კვლევებით დადგინდა, პლაფერონ ლბ დოზით 0,2 $\mu\text{g/ml}$ ვერ ახდენს მნიშვნელოვან ზეგავლენას უჯრედების კულტურაში NO-ინდუცირებული მიტოქონდრიული სუნთქვის ელექტრონული სატრანსპორტო ჯაჭვის ბლოკადაზე და ოქსიდაციური სტრესის ინტენსივობაზე, მაშინ როცა ეს პრეპარატი ორჯერ მაღალი დოზით (0,4 $\mu\text{g/ml}$) უზრუნველყოფს ოქსიდაციური სტრესის ინტენსივობის შემცირებას (O_2^- და LOO^- ეპრ სიგნალების ინტენსივობის დაქვეითებას), მიტოქონდრიული სუნთქვის ელექტრონული სატრანსპორტო ჯაჭვის მუშაობის აღდგენას (HbNO-ს და FeSNO-ს კომპლექსების შემცველობის შემცირებას) და ნატრიუმის ნიტროპრუსიდის მიერ გენერირებული NO-ს თავისუფალი ფორმის შემცველობის მომატებას.

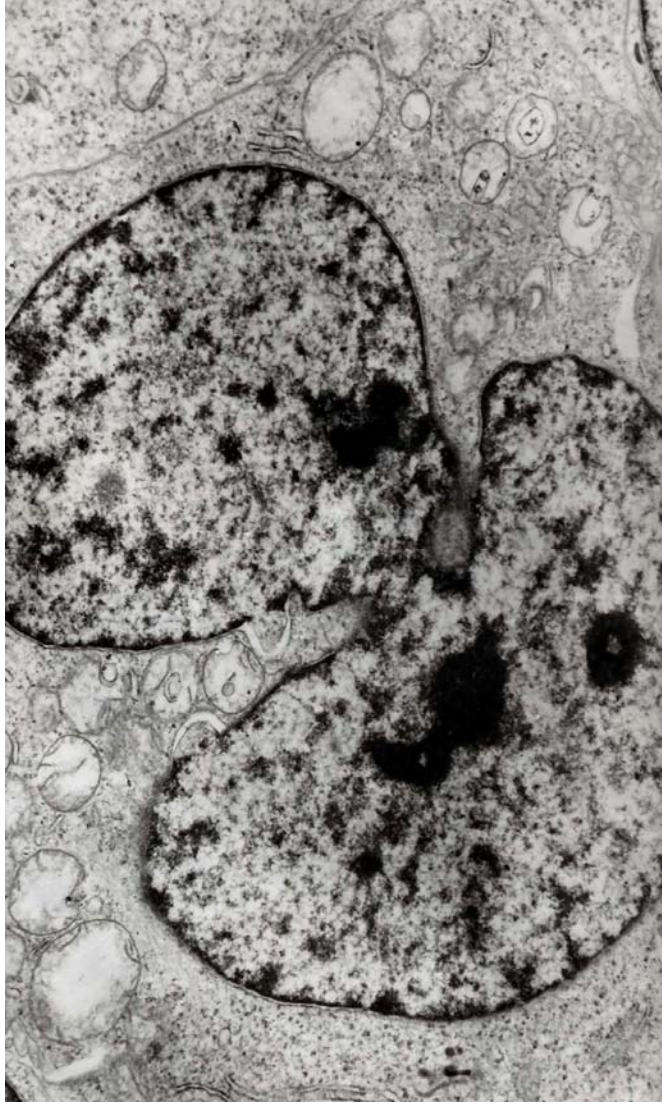
3.4 ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ინკუბირებული Jurkat უჯრედების ელექტრონულმიკროსკოპული კვლევის შედეგები

ინტაქტური Jurkat უჯრედების ელექტრონულმიკროსკოპული კვლევის შედეგად ულტრასტრუქტურის მხოდ უმნიშვნელო, უჯრედული კულტურებისათვის დამახასიათებელი ცვლილებებია გამოლენილი. უჯრედები მსხვილია, მრგვალი და ოვალური ფორმისაა. პლაზმური მემბრანა უმეტეს შემთხვევაში გლუვია, ინარჩუნებს კონტურების პარალელურობას. ბირთვი ძირითადად უჯრედის ფორმას იმეორებს, გამოვლენილია მსხვილი ოსმოფილური ბირთვაკები, მსხვილმარცლოვანი ჰეტეროგენული ქრომატინი. ცალკეული უჯრედების ბირთვებში მკვეთრად ჩანს ქრომატინის კონდენსაცია ბირთვის და მემბრანის მიდამოებში. ჰეტეროგენული ქრომატინის ფონზე ზოგიერთ უჯრედებში გამოვლენილია უჯრედების გაყოფა (სურ. 1, 2).

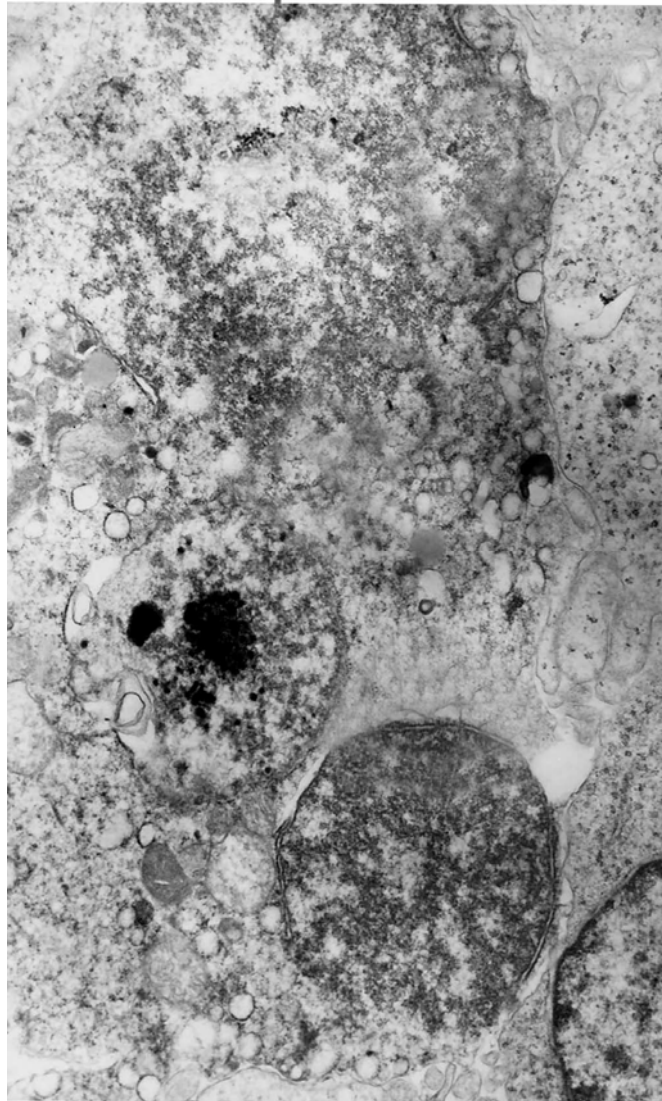
უჯრედებში კარგადაა შენარჩუნებული ნუკლეოპლაზმას ორმაგი კონტური, ლამენების პარალელიზმი და მხოლოდ იშვიათად ვლინდება პრებირთვული სივრცის შემუპება გარეთა მემბრანის ციტოპლაზმას მხარეს. ასეთი ბირთვი ხასიათდება ოსმოფილური ქრომატინის მკვეთრი აგრეგაციით კედლების მიდამოებში, ნათელ ციტოპლაზმაში ლიპოპროტეიდული გრანულების, რიბოსომების და პოლისომების დიდი რაოდენობაა (სურ. 3). ქედების მცირე რაოდენობის მქონე გლუვკონტურიანი მრგვალი მიტოქონდრიები მრავლადაა. ზოგიერთი მიტოქონდრია კრისტებს მოკლებულია და ცარიელი ოვალური სხეულის ფორმა გააჩნია (სურ. 4) ეს კი, როგორც ცნობილია, მიტოქონდრიების ენერგომაპროდუცირებელი ფუნქციის დაქვეითებაზე



სურ. 1. Jurkat უჯრედი. მკვეთრად ჩანს ქრომატინის კონდენსაცია ბირთვის მემბრანის მიდამოებში. ელექტრონული მიკროფოტოგრაფია (2000 X 2,2)



სურ. 2. Jurkat უჯრედი. ჰეტეროგენული ქრომატინის ფონზე გამოვლენილია უჯრედის გაყოფა. ელექტრული მიკროფოტოგრაფია (2000X 2,2)



სურ. 3. Jurkat უჯრედი. ციტოპლაზმაში ლიპოპროტეიდული გრანულების, რიბოსომების და პოლისომების დიდი რაოდენობაა. ლექტონული მიკროფოტოგრაფია (3000X2,2)



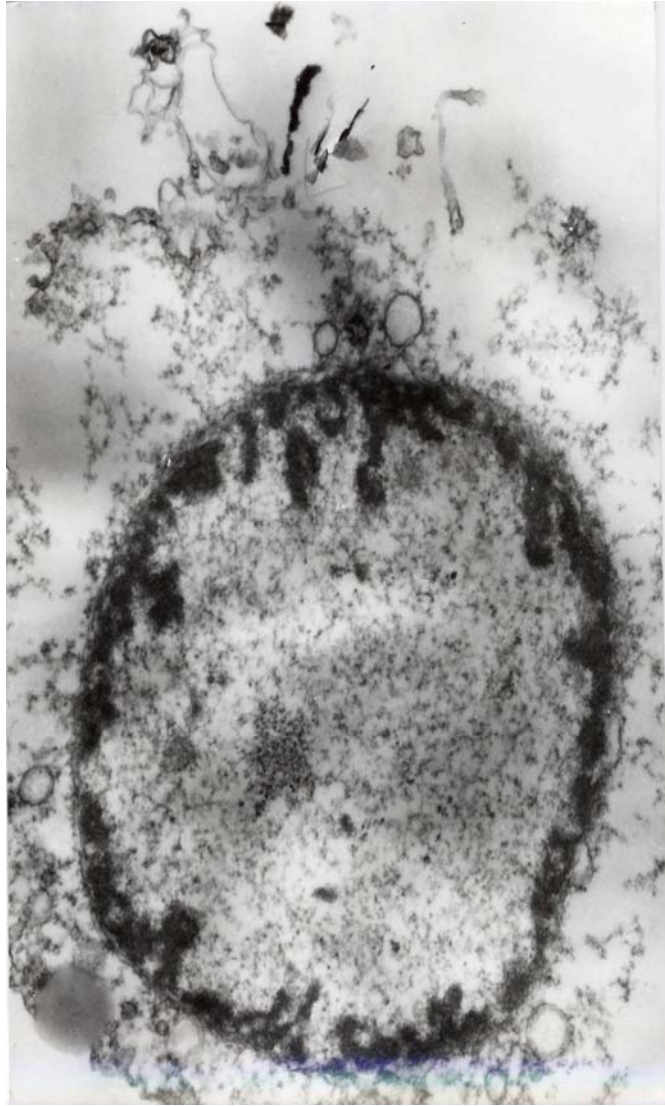
სურ.4. Jurkat უჯრედი. ზოგიერთი მიტოქონდრია მოკლებულია კრისტებს.
ელექტრონული მიკროფოტოგრაფია. (3000X2,2)

მიუთითებს. აღწერილი მიტოქონდრიების ფონზე მკვეთრად გამოხატულია გრანულარული ენდოპლაზმური რეტიკულუმის უცვლელი ცისტერნები და მილაკები.

Jurkat უჯრედების ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან მოქმედების შემდეგ უჯრედებში განვითარებული ცვლილებები ელექტრონულ-მიკროსკოპიულად განსაკუთრებით ვლინდება 72 საათიანი ინკუბაციისას. ქსპერიმენტის ამ ვადაში საპასუხო რეაქცია ვითარდება სამი მიმართულებით. უჯრედების ნაწილი განიცდის აპოპტოზს, აღინიშნება ბირთვის ქრომატინის აგრეგაცია – კონდენსაცია, ჰიპერაგრეგაცია. უჯრედის პლაზმური მემბრანის ღიზისი (სურ. 5, 6) ჩანს აგრეთვე ქრომატინის აგრეგაციის ფრაგმენტები (სურ. 7).

ლიმფოციტების ბირთვებში ვლინდება აპოპტოზის სხვადასხვა სტადიის ულტრასტრუქტურული ეკვივალენტები: გამსხვილებული ბირთვები, აპოპტოზური სხეულაკები, ციტოპლაზმის სრული ღიზისი (სურ. 8), აღინიშნება ქრომატინის ძლიერი კონდენსაცია, ზოგიერთ შემთხვევაში ბირთვის მემბრანა ჯერ შენარჩუნებულია, მაგრამ ქრომატინი უკვე შემსხვილებულია, ციტოპლაზმა მკრივია, ჰომოგენური, პლაზმური მემბრანა სადაა (სურ. 9). წარმოდგენილია ასევე უჯრედის და ბირთვის მემბრანის დაშლა, ბირთვის შიგთავსის აუტოლიზი (სურ. 10). ერთდროულად ვლინდებოდა სხვადასხვა მდგომარეობაში მყოფი ლიმფოციტები: ა) ბირთვში ქრომატინის კონდენსაციით; ბ) აპოპტოზური სხეულაკების წარმოქმნით (სურ. 11) ან პირიქით მკვეთრად შეშუპებული ციტოპლაზმით.

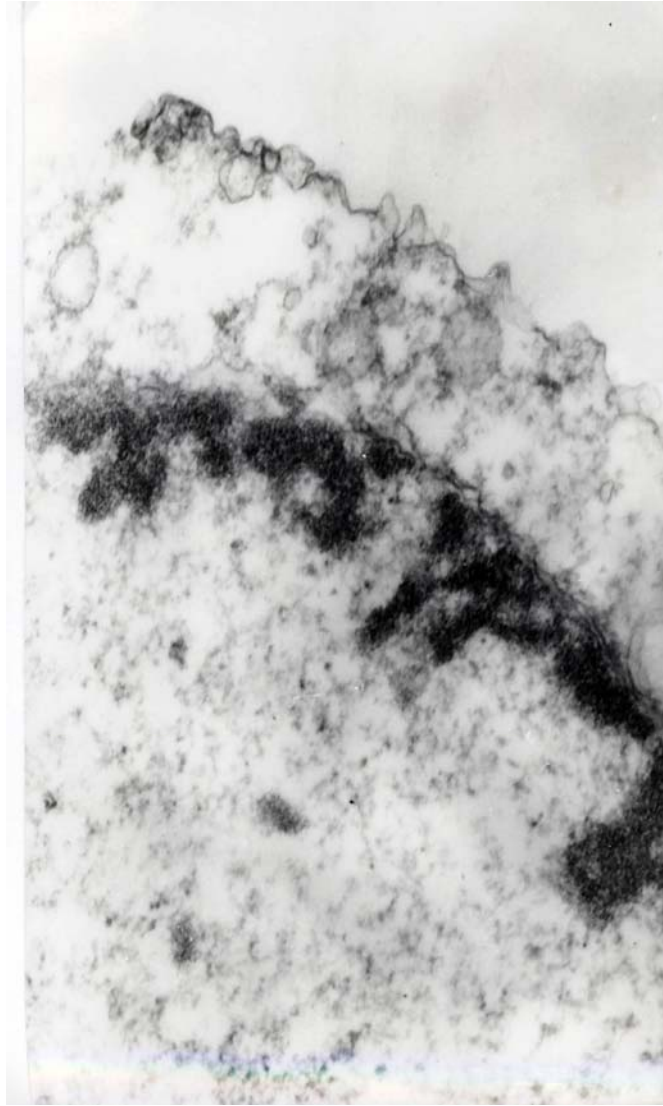
დასახელებული პროცესის პარალელურად უჯრედების ნაწილი განიცდის დესტრუქციას, ღიზისს (სურ. 12) უჯრედებში ჩანს მსხვილი ვაკუოლები, რაც ბალონური დესტრუქციის სურათს წარმოადგენს.



სურ. 5. Jurkat უჯრედი. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ინკუბაცია. ქრომატინის აგრეგაცია – კონდენსაცია, ჰიპერაგრეგაცია. უჯრედის პლაზმური მემბრანა დაშლილია. ელექტრონული მიკროფოტოგრაფია (3000X2,2)



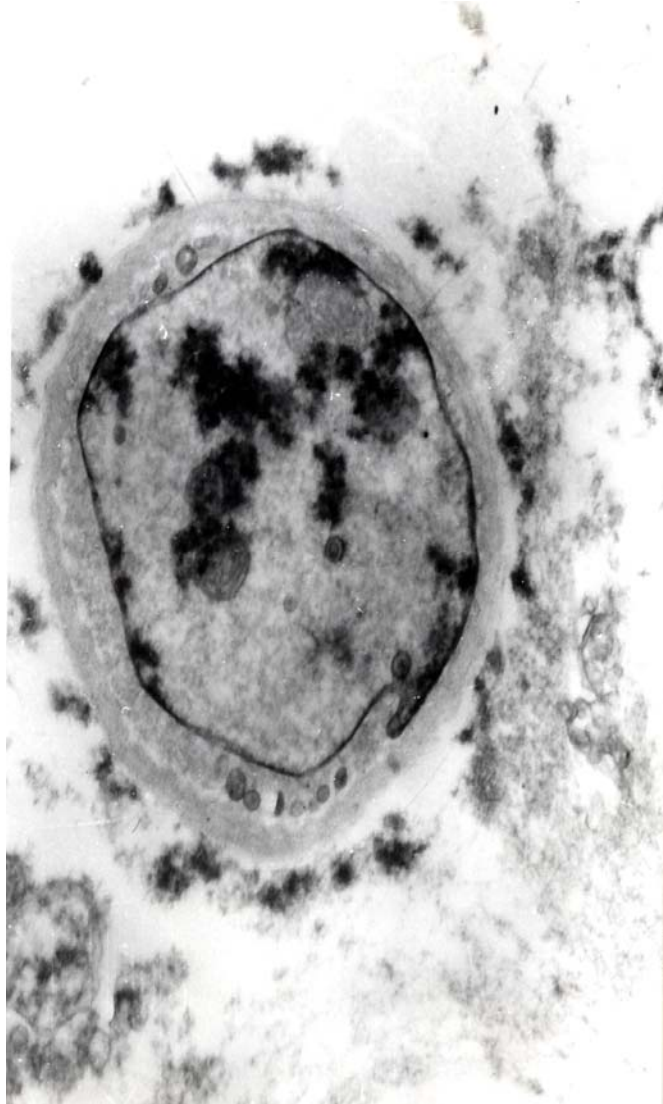
სურ. 6. Jurkat უჯრედი. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ინკუბაცია. ბირთვში ადგილი აქვს ქრომატინის აგრეგაცია – კონდენსაციასა და მარგინაციას, სახეზეა უჯრედის მემბრანის ღიზისი. ელექტრონული მიკროფოტოგრაფია (4000X2,2)



სურ. 7. Jurkat უჯრედი. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ინკუბაცია. ვლინდება ქრომატინის აგრეგაციის ფრაგმენტები. ელექტრონული მიკროფოტოგრაფია (7000X2,2)



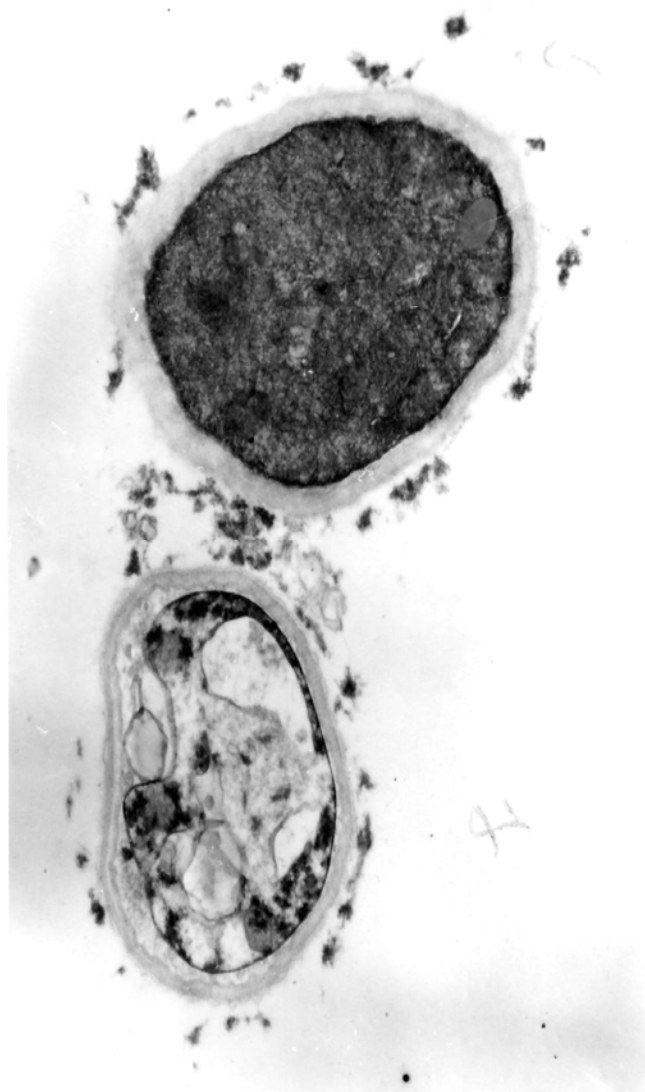
სურ. 8. Jurkat უჯრედი. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ინკუბაცია. ლიპოფოციტების ბირთვებში მრავლად ჩანს აპოპტოზური სხეულაკები. ციტოპლაზმაში სრული ლიზისია. ელექტრონული მიკროფოტოგრაფია (2000X2,2)



სურ. 9. Jurkat უჯრედი. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ინკუბაცია. ბირთვის მემბრანა
ჯერ მთლიანია, მაგრამ ქრომატინი ბუშტუკებად შემსხვილებული და
გამკვრივებული ჩანს, ციტოპლაზმა მკრივი,
პომოგენურია. ელექტრონული მიკროფოტოგრაფია (5000X2,2)



სურ. 10. Jurkat უჯრედი. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ინკუბაცია. სახეზეა უჯრედის და ბირთვის მემბრანის დაშლა, ბირთვის შიგთავსის აუტოლიზი. ელექტრონული მიკროფოტოგრაფია (4000X2,2)



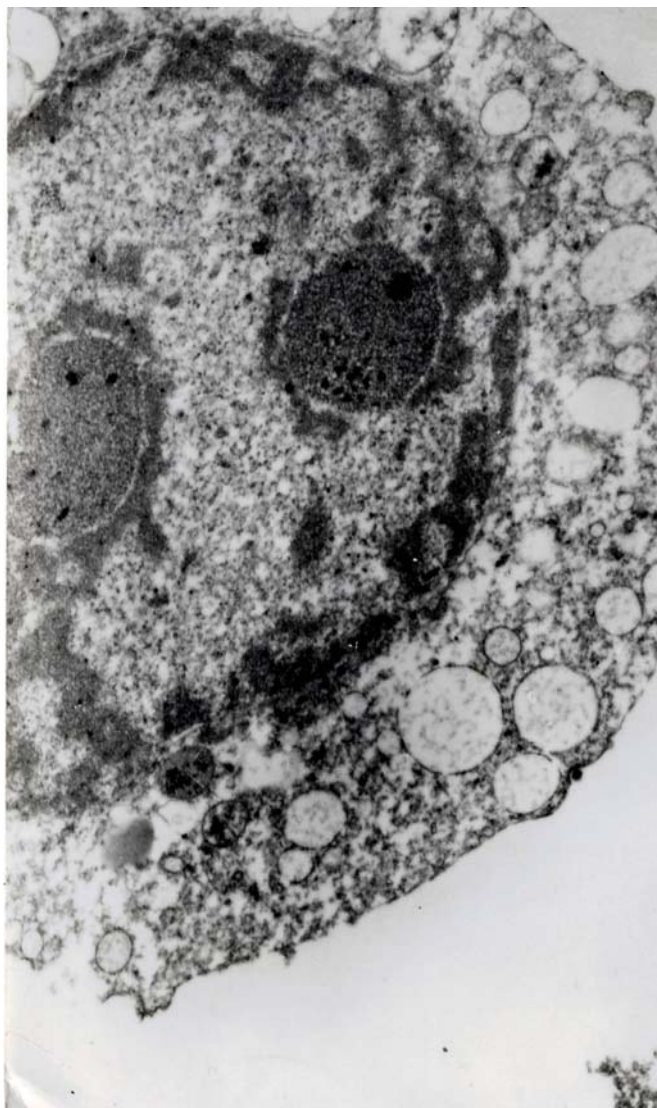
სურ. 11. Jurkat უჯრედი. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ინკუბაცია. ჩანს ორი ლიმფოციტი: ა) ბირთვში ქრომატინის კონდენსაციით; ბ) აპოპტოზური სხეულაკების წარმოქმნით. ელექტრონული მიკროფოტოგრაფია (3000X2,2)



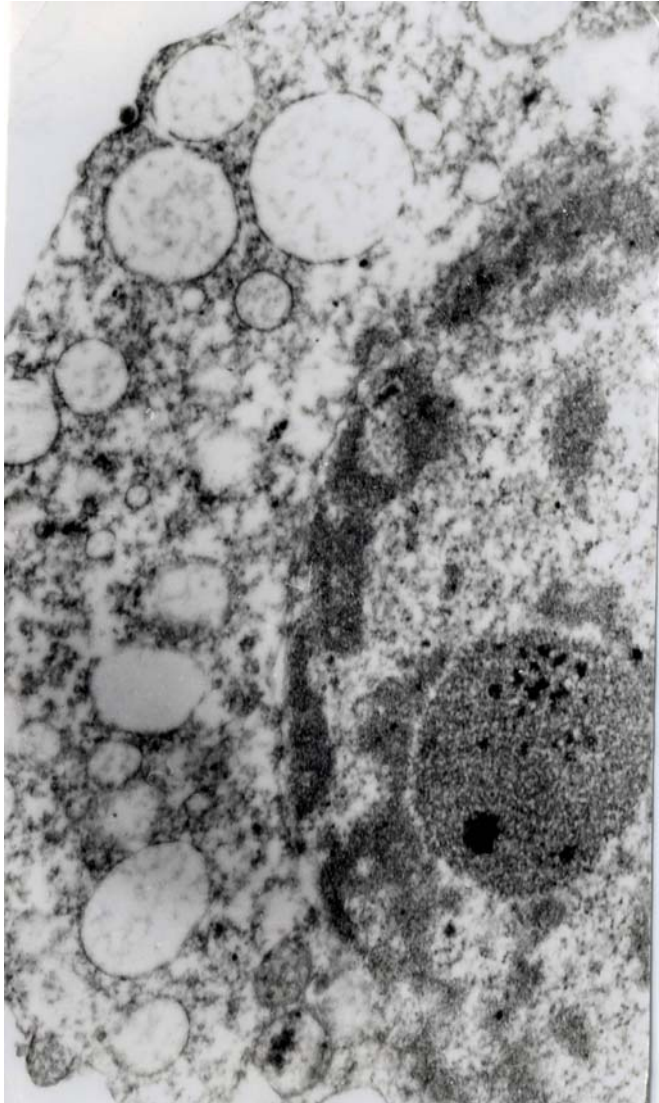
სურ. 12. Jurkat უჯრედი. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ინკუბაცია. ციტოპლაზმის და ბირთვის ღიზისი. ელექტრონული მიკროფოტოგრაფია (3000X2,2).

ისეთი უჯრედებიც არის, რომელთა ცვლილებები ატარებენ პოსტპიპერფუნქციურ ცვლილებებს: ქრომატინის მარგინაცია, ბირთვის ფრაგმენტებში შერჩენილი მსხვილი ბირთვით და ჰიდროპული დისტროფიის დამახასიათებელი სურათით (სურ. 13, 14). ასევე ვხვდებით ბირთვის და მთელი ლიმფოციტის სრულ დაშლას (სურ. 15) არაიშვიათად, ლიმფოციტებს შორის აღინიშნება მსხვილგაკუთლებიანი ციტოპლაზმა და აღსანიშნავია, რომ ტერმინალურ სტადიაზე ლიმფოციტებში ბირთვთაგანის ვაკუოლიზაცია არ ვლინდება. ნაწილი უჯრედებისა მოგრძო ფორმისაა, სადაც ციტოპლაზმური მემბრანა სადაა, ციტოპლაზმა წვრილმარცლოვანია, ბირთვი მცირე ზომის მრგვალია, სადა კონტურით, ნუკლეოპლაზმა გაიშვიათებულია, უჩვეულოა უჯრედების მიტოქონდრიები „ფიჭისებური“ ჰიპერპლაზიური კრისტებით (სურ. 16). მრგვალი ფორმის უჯრედებში ბირთვი იმეორებს უჯრედის ფორმას. პლაზმური მემბრანის ზედაპირი გადასწორებულია, ბირთვის ქრომატინი წვრილმარცლოვანია, ნუკლეოპლაზმა გაიშვიათებული. მიტოქონდრიების მემბრანათა სტრუქტურა გამოირჩევა ოსმიოფილობით (სურ. 16 17), მატრიქსის ეგრეთ წოდებული ენერგიზირებული ფორმით. მსგავსი მიტოქონდრიები ლიმფოციტებში გამოვლენილ იყო სხვა ავტორების კვლევებში ენდოგენური NO-სინთაზას სტიმულატორთან, LPS-სთან ინკუბაციის შემდეგ.

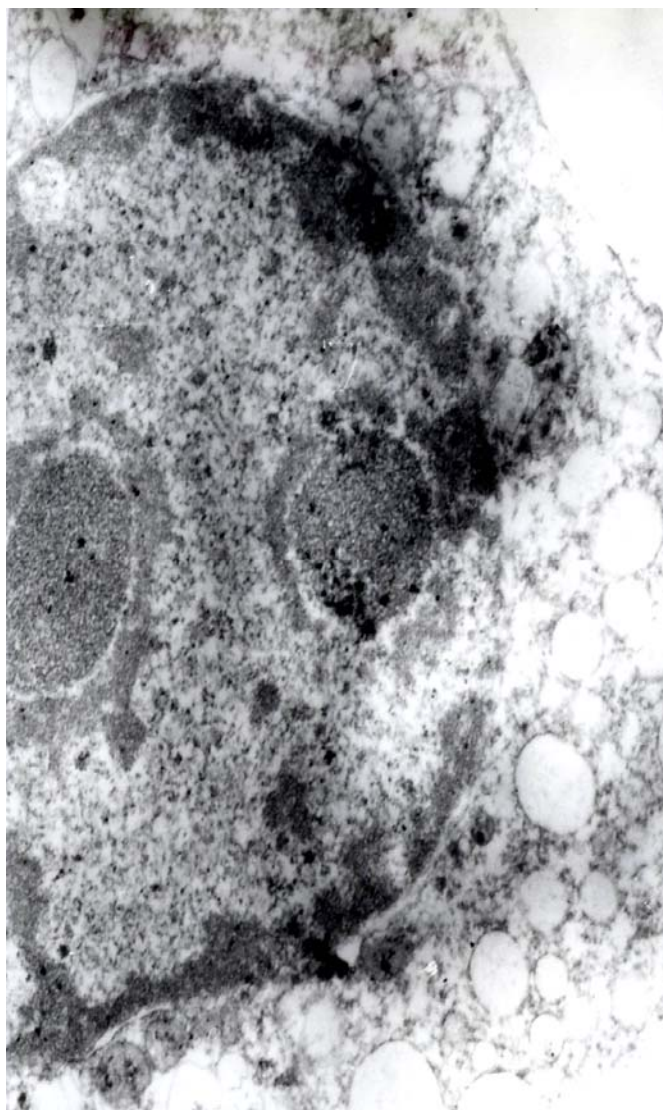
როგორც ცნობილია, აპოპტოზის დროს შიდა მიტოქონდრიული მემბრანა, გარეთა მემბრანის დაზიანების მიუხედავად, ინარჩუნებს ჟანგვითი ფოსფორილების უნარს და ამარაგებს მომაკვდავ უჯრედს აპოპტოზის განვითარებისათვის საჭირო ენერგიით ხანგრძლივი პერიოდის განმავლობაში. აპოპტოზის დროს მიტოქონდრიული ჰომეოსტაზის დარღვევა შეიძლება სხვადასხვა გზით განვითარდეს.



სურ. 13. Jurkat უჯრედი. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ინკუბაცია. ნუკლეოპლაზმა
წვრილმარცვლიანია, სახეზეა ქრომატინის მარგინაცია, ციტოპლაზმა
დესტრუქციულია. ელექტრონული მიკროფოტოგრაფია (3000X2,2)



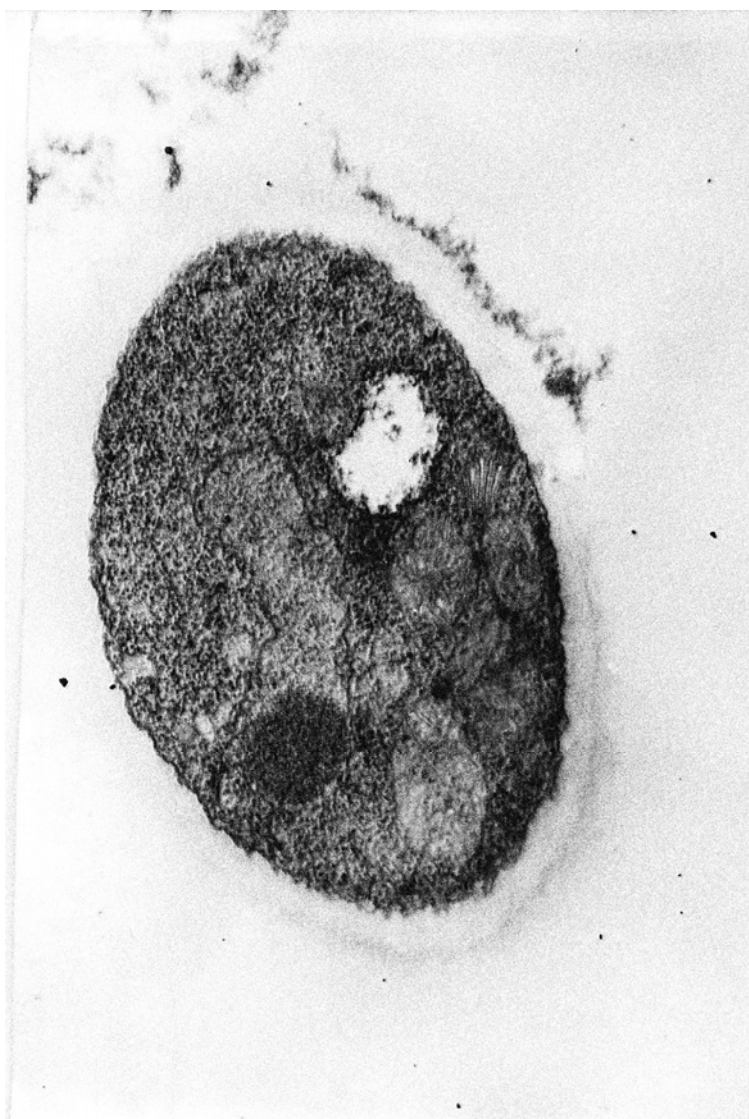
სურ. 14. Jurkat უჯრედი. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ინკუბაცია. ციტოპლაზმაში ჩანს მსხვილი ვაკუოლები, ვლინდება წვრილი ბუშტუკები დიდი რაოდენობით, სახეზეა ბირთვის ქრომატინის მარგინაცია, ფრაგმენტში ჩანს ერთი მსხვილი ბირთვაკი. ელექტრონული მიკროფოტოგრაფია (5000X2,2)



სურ. 15. Jurkat უჯრედი. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ინკუბაცია. ნუკლეოპლაზმა წვრილმარცვლიანია, ციტოპლაზმაში პიდროპული დესტრუქციაა. ელექტრონული მიკროფოტოგრაფია (4000X2,2)



სურ. 16. Jurkat უჯრედი. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ინკუბაცია. მიტოქონდრიები წარმოდგენილია მკრივი მსხვილი კრისტებით. ლექტონული მიკროფოტოგრაფია (7000X2,2)



სურ.17. Jurkat უჯრედი. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ინკუბაცია. სხეზეა მკვრივი მარცლოვანი ციტოპლაზმა, მსხვილი, მრგვალი ფორმის მიტოქონდრიები. ელექტრონული მიკროფოტოგრაფია (7000 X 2,2).

მაგალითად, გარეთა მემბრანის მთლიანობის დარღვევა შეიძლება გამოიწვიოს მიტოქონდრიის შესივებამ, მოფუნქციე მიტოქონდრია ინარჩუნებს შედარებით მაღალ შიგა ოსმოსურ წნევას გარემომცველ ციტოზოლთან შედარებით. სავარაუდოა, მიტოქონდრიაში მრავალი კრისტების წარმოქმნა NO-ს (ენდოგენური და ეგზოგენური) ზემოქმედების დროს წარმოადგენს უჯრედის ენერგოგენეზის გაქტივების კომპენსაციურ რეაქციას. ვინაიდან შიდა მემბრანის ზედაპირი გაცილებით დიდია, ვიდრე გარეთა მემბრანისა, მიტოქონდრიული სივრცის ოსმოსური შესივება გრძელდება მანამდე, სანამ გარეთა მემბრანა არ დაკარგავს სტრუქტურულ მთლიანობას, რაც ჩვენს მიერ გამოვლენდა უჯრედების მეორე ტიპის რეაქციაში (სურ. 12 13 14). უჯრედის აპოპტოზისაგან დაცვა შესაძლებელია მიტოქონდრიის ელექტრული-იონური ჰომეოსტაზის რეგულაციაში მონაწილე ფაქტორებზე (Bx1-xL) ზემოქმედების მეშვეობით (Heiden M.G.V., et al., 1997).

ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ინკუბირებული Jurkat უჯრედების ელექტრონულმიკროსკოპული კვლევების საფუძველზე დადგინდა, რომ ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან 72 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ უჯრედის საპასუხო რეაქცია ვითარდება სამი მიმართულებით: 1) უჯრედების ნაწილი განიცდის აპოპტოზს უჯრედული პლაზმური მემბრანის დაშლით, ქრომატინის კონდენსაციით, ჰიპერპლაზიითა და ფრაგმენტაციით ან 2) ციტოპლაზმას სრული ლიზისით, ლიმფოციტების ბირთვებში მრავლობითად ჩანს აპოპტოზური სხეულაკები. 3) შენარჩუნებულია ბირთვის მემბრანა, მაგრამ ქრომატინი გამსვილებულია ბუშტუკებად, ასევე მკრივი ჰომოგენურია ციტოპლაზმა,

პლაზმური მემბრანა სადაა და ზოგიერთი უჯრედი და ბირთვი მთლიანად წარმოდგენილია მემბრანის დაშლის და ნუკლეოპლაზმის აუტოლიზით.

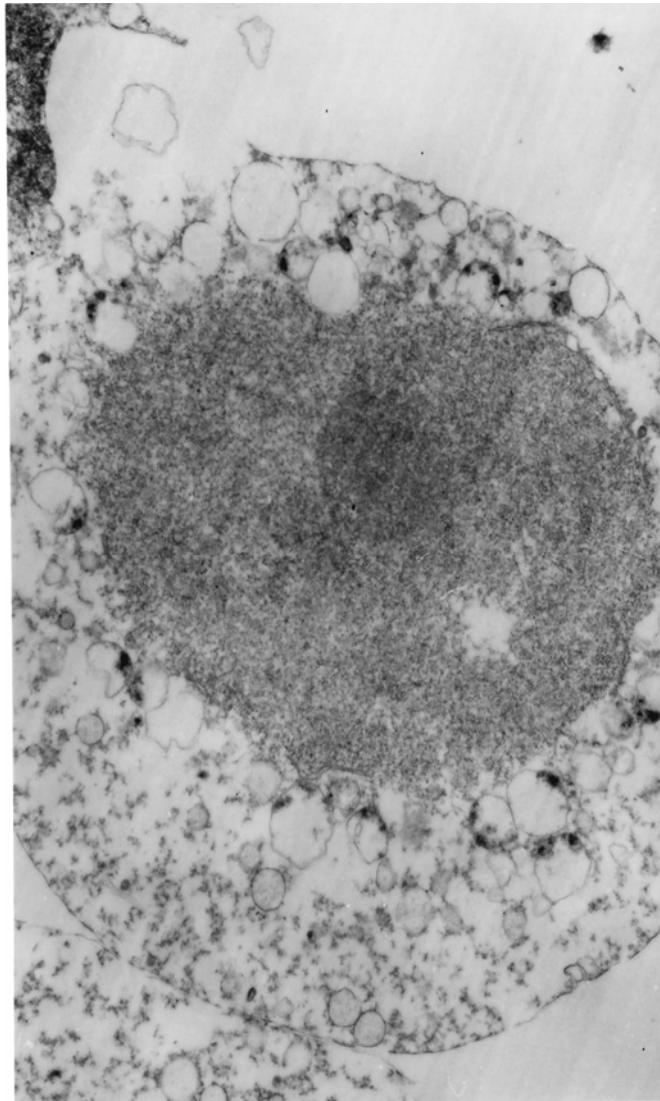
ჩვენი ვარაუდით და ელექტრონული მიკროსკოპიის შედეგებზე დაყრდნობით Jurkat უჯრედების ეგზოგენური NO-ს დონორთან, ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ხანგრძლივი ინკუბაციის დროს ადგილი აქვს მიტოქონდრიის მემბრანების სატრანსპორტო ცილების ნიტროზილირებას, ჟანგბადის რეაქციული ნაერთების გაძლიერებულ წარმოქმნას, რაც აძლიერებს ლიპოპეროქსიდაციულ პროცესებს, იმავდროულად იწვევს ენერგოგენეზის პროცესის და მიტოქონდრიათა მემბრანული პოტენციალის დაქვეითებას, ასრულებს უჯრედში ნეკროზის და აპოპტოზის ტრიგერულ მექანიზმს. მეორეს მხრივ ლიმფოციტების მცირე ნაწილს მიტოქონდრიების “ენერგიზებული” მდგომარეობა გვაფიქრებინებს, რომ უჯრედებში მიმდინარეობს ენერგოგენეზის კომპენსაცია ეგზოგენური სტიმულაციის და ოქსიდაციური ჰომეოსტაზის რეგულაციის მიზნით.

3.5 ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან ინკუბირებული Jurkat უჯრედების ელექტრონულმიკროსკოპული კვლევის შედეგები

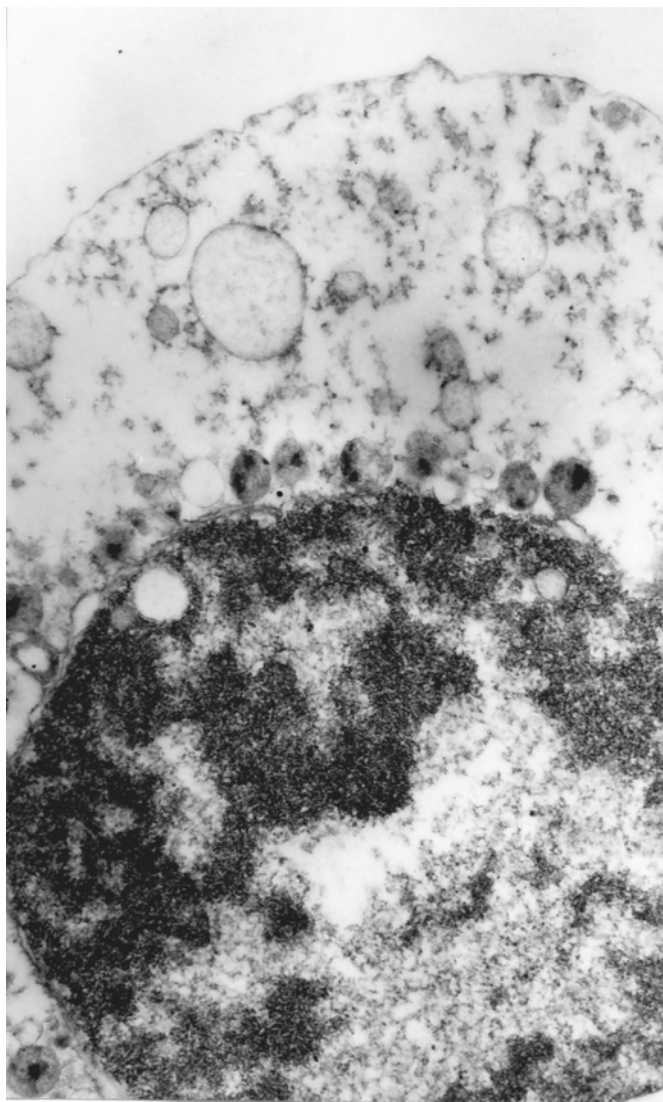
ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან ინკუბირებული Jurkat უჯრედების ელექტრონულმიკროსკოპული კვლევის შედეგად, როგორც წინა სერიებში, ვლინდება ცვლილებების მრავალფეროვნება, რაც განსაკუთრებით გამოხატულია 72 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ პლაფერონ ლბ-სთან 0,4 დოზითზემოქმედების პირობებში.

ნაწილი უჯრედების პლაზმური მემბრანა ძირითადად გლუვია, ორკონტურიანია, შენარჩუნებულია კონტურების პარალელიზმი, მხოლოდ იშიათად ვლინდება ცალკეული მონაკვეთების ლიზისი (სურ 18). რაც ხშირია მხოლოდ ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ინკუბაციის დროს. ციტოპლაზმა ნათელია ვლინდება მსხვილი ვაკუოლების დიდი რაოდენობა, მსხვილი ოსმიოფილური სხეულაკების, რიბოსომების და პოლისომების, ლიპოპროტეიდული გრანულების უმნიშვნელო რაოდენობა. მიტოქონდრიებს გააჩნია ცარიელი ოვალური სხეულების ფორმა (სურ 19, 20) ხშირად ვლინდება ენდოპლაზმური რეტიკულუმის ცისტერნები და ბუშტუკები (სურ 20). ზოგიერთ უჯრედებში ციტოპლაზმა ალავ განათებულია და მთლიანად მოკლებულია ოსმიოფილობას (სურ 21, 22).

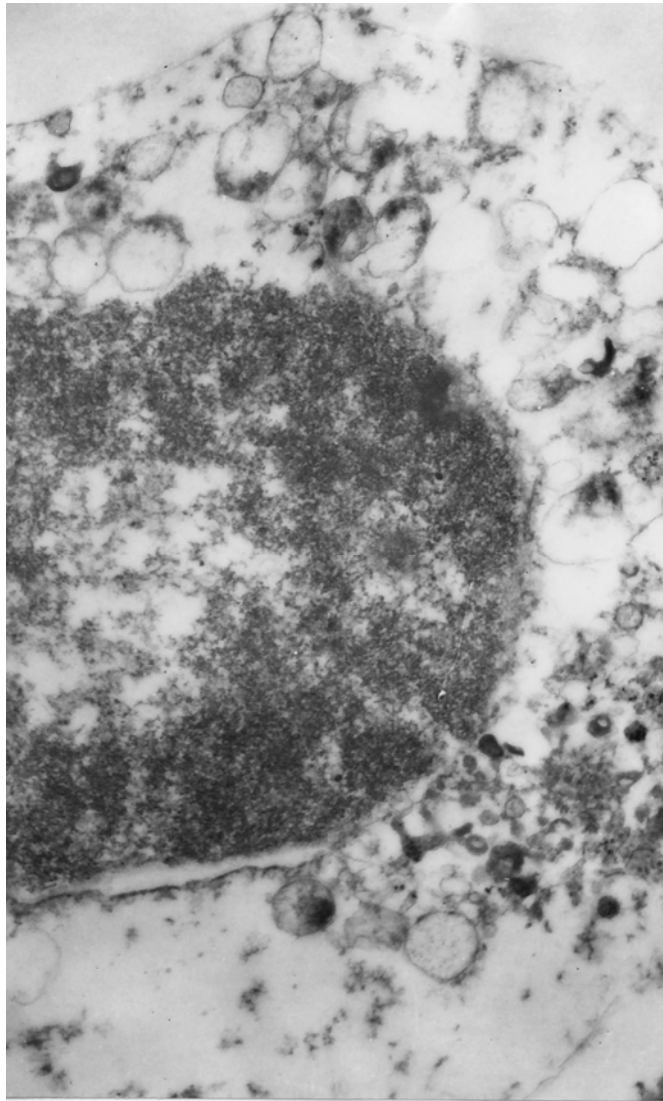
ბირთვი ძირითადად იმეორებს უჯრედის ფორმას. ზოგიერთ ბირთვებში ვლინდება მარგინაცია, ქრომატინის კონდენსაცია კედლების და ბირთვაკების ახლოს. (სურ 19, 21, 23).



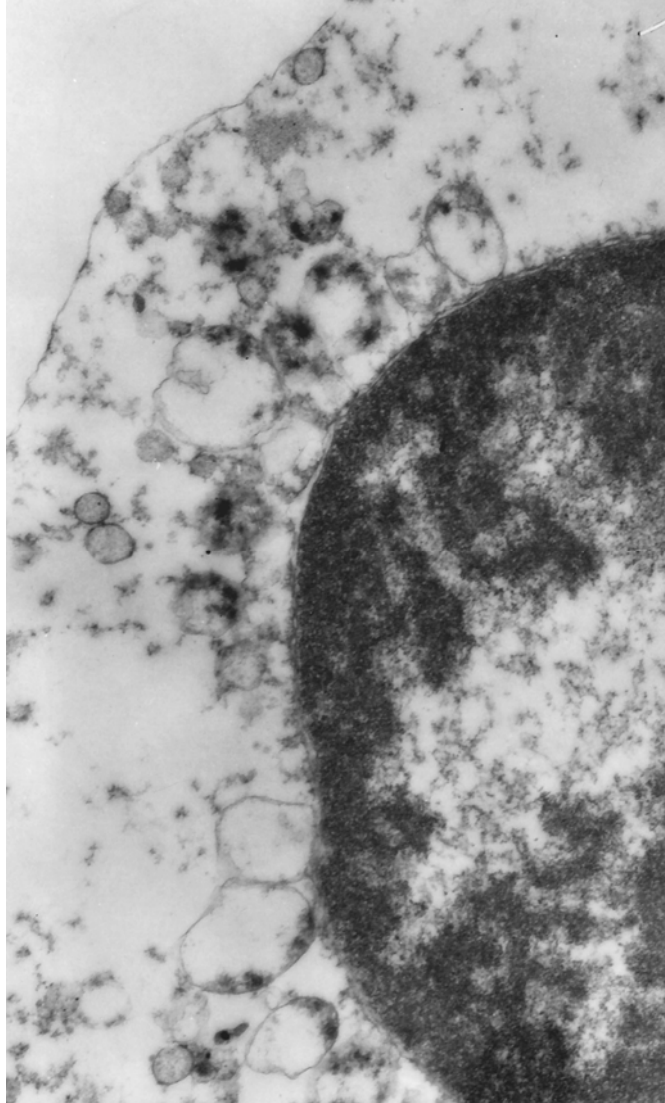
სურ. 18. Jurkat უჯრედი. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან ინკუბაცია. პლაზმური მემბრანა გლუვია, ციტოპლაზმაში მსხვილი ვაკუოლებია, მიტოქონდრიები „ცარიელია.“ ელექტრონული მიკროფოტოგრაფია (3000x2,2)



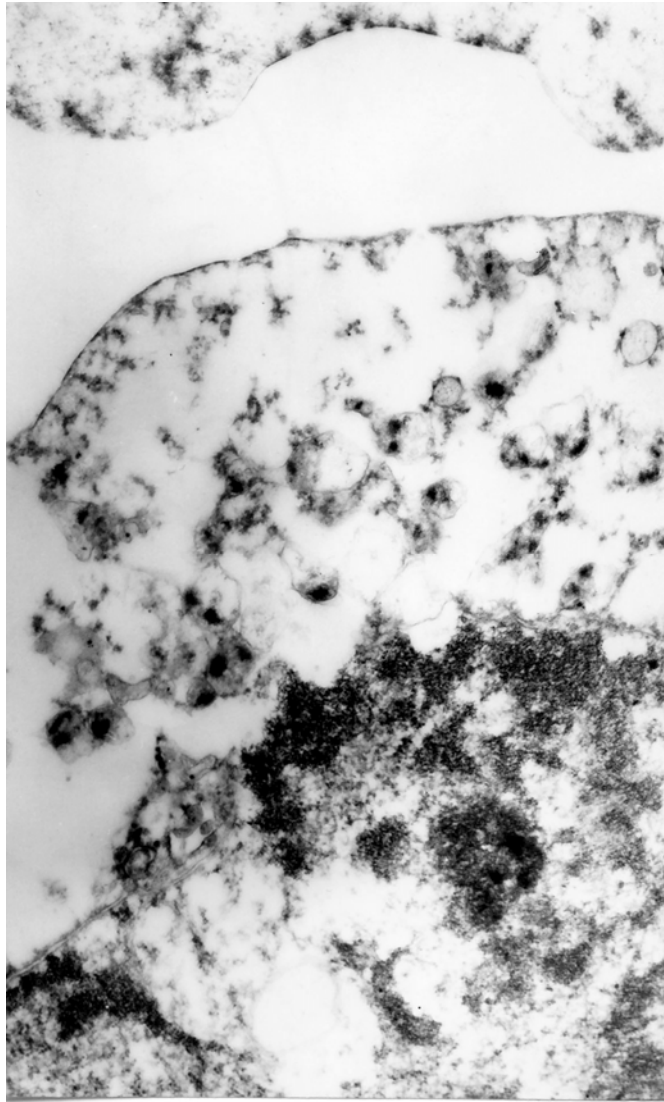
სურ. 19. Jurkat უჯრედი. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან ინკუბაცია. ვლინდება რიბოსომების, პოლისომების და ლიპოპროტეიდული გრანულების უმნიშვნელო რაოდენობა. ელექტრონული მიკროფოტოგრაფია (3000x2,2)



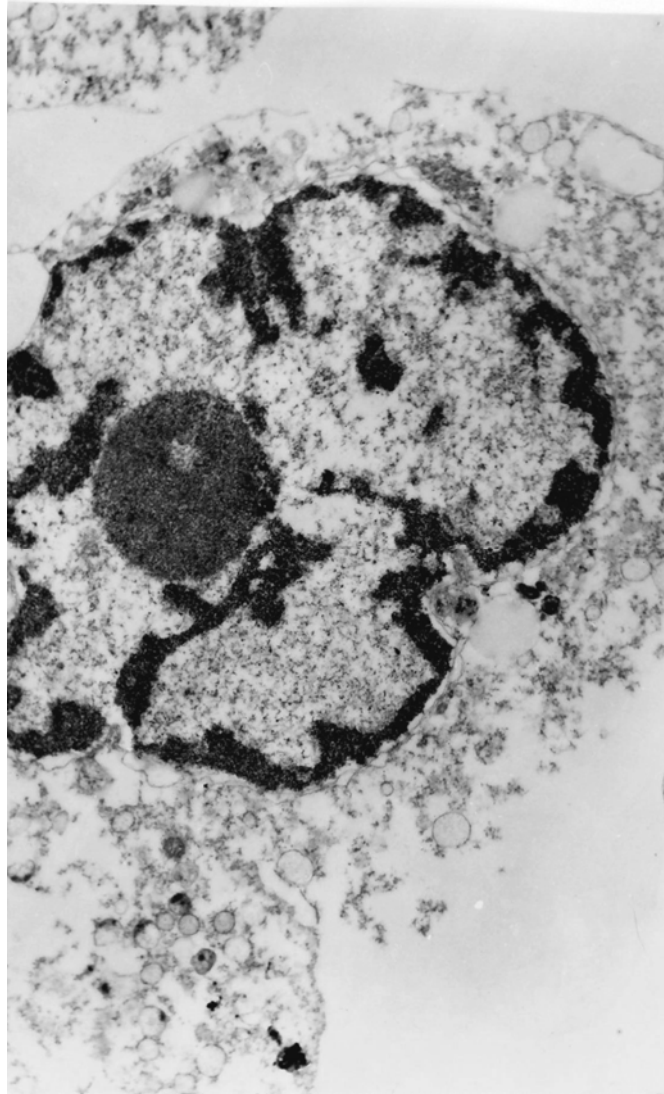
სურ. 20. Jurkat უჯრედი. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან ინკუბაცია. ვლინდება ენდოპლაზმური ბადის ცისტერნები. მიტოქონდრიებს აქვს ცარიელი ოვალური ფორმა. ელექტრონული მიკროფოტოგრაფია (3000x2,2)



სურ. 21. Jurkat უჯრედი. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან ინკუბაცია. ციტოპლაზმა ალავ ნათელია. ელექტრონული მიკროფოტოგრაფია (4000x2,2



სურ. 22. Jurkat უჯრედი. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ღბ-
სთან ინკუბაცია. ციტოპლაზმა ნათელია და მთლიანად მოკლებულია
ოსმიოფილობას. ელექტრონული მიკროფოტოგრაფია (4000x2,2)

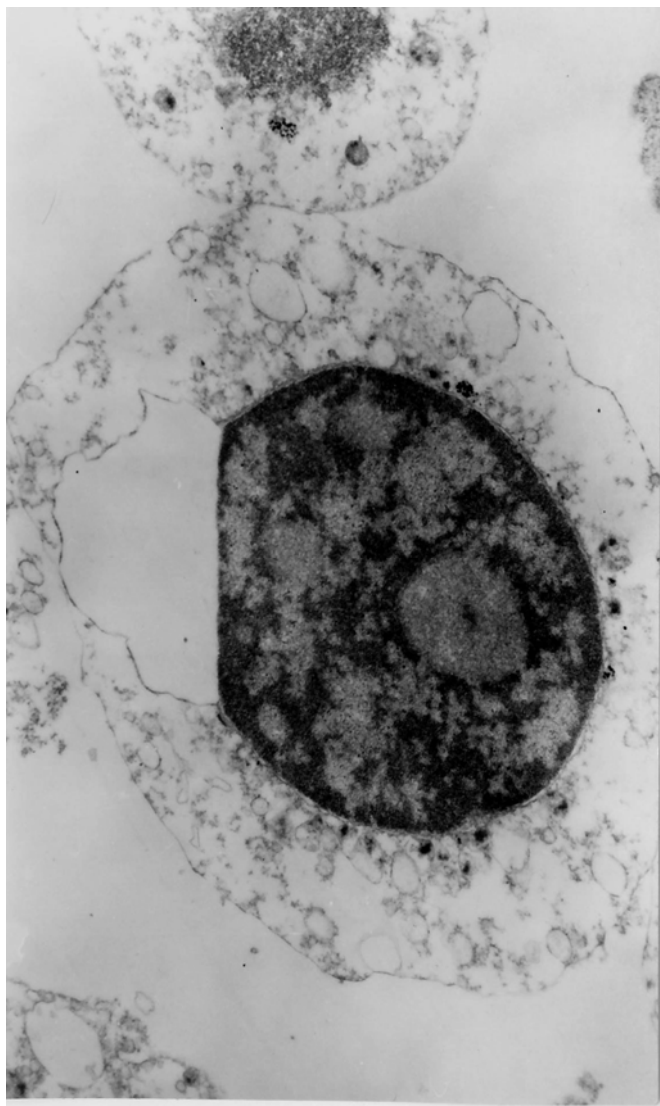


სურ. 23. Jurkat უჯრედი. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან ინკუბაცია ბირთვში ვლინდება მარგინაცია, ქრომატინის კონდენსაცია კედლების და ბირთვაკის ახლოს. ელექტრონული მიკროფოტოგრაფია (3000x2,2)

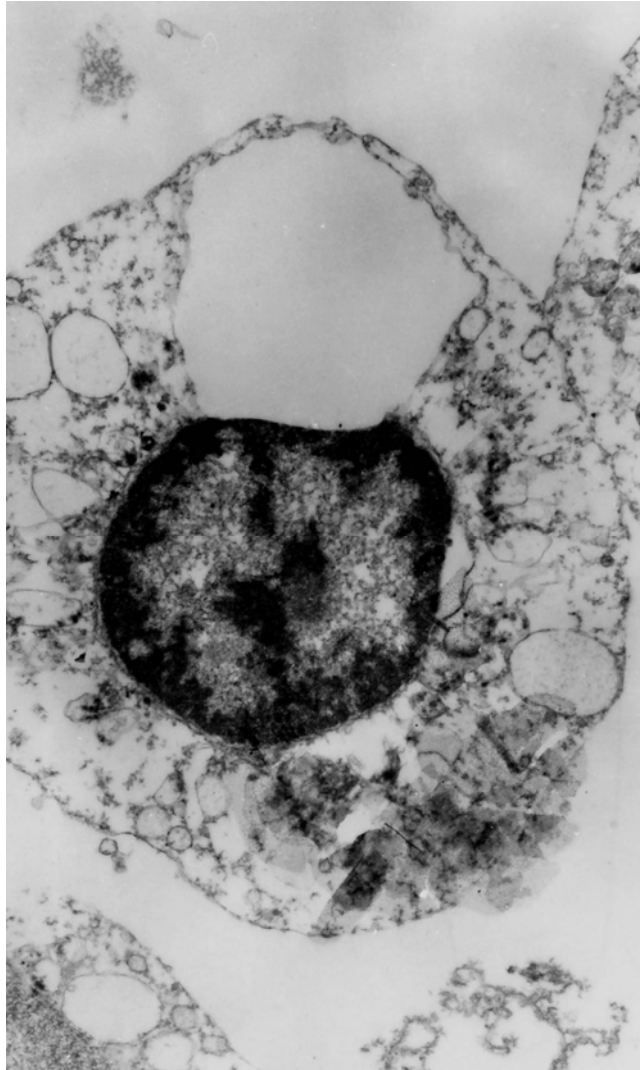
სხვა უჯრედებში ჰომოგენური ქრომატინი თანაბრად განაწილებულია მთელ ნუკლეოპლაზმაზე. ბირთვაკები მსხვილია, მკრივია, ნატრიუმის ნიტროპრუსიდისათვის დამახასიათებელი ორბირთვაკიანობა არ ვლინდება. ზოგიერთ უჯრედებში ვლინდება პერინუკლეარული სივრცის შეშუპება, (სურ 24). ასეთი ბირთვების ნუკლეოლემა ხასიათდება ქრომატინის მკვეთრი მარგინაციით კედლის სიახლოვეს, აპოპტოზის შემთხვევები ძირითადად არ ვლინდება, აპოპტოზური სხეულაკები ბირთვებში არ აღინიშნება (სურ. 25), არ ვლინდება აგრეთვე აპოპტოზისთვის დამახასიათებელი პლაზმური და ბირთვული მემბრანების ღიზისი. მხოლოდ ერთეულ შემთხვევაში გამოვლენილია უჯრედი, პლაზმო- და ნუკლეოლემის არასწორი კონტურით, მკრივი ოსმიოფილური ციტოპლაზმით, მკვრივი ოსმიოფილური სხეულაკებით და მრგვალი ვაკუოლებით.

ბირთვული მემბრანა შრეების პარალელების დარღვევით მკრივია ოსმიოფილური მატრიქსის ფონზე. გამოვლენილია აპოპტოზური ხეულაკები. ციტოპლაზმაში გვხვდება ღიპიდური ჩართვები. ამ შემთხვევაში იშვიათად ხდება ციტოპლაზმური მემბრანის დაზიანება და შიდა სტრუქტურის დარღვევა (სურ. 22, 23).

ამ ექსპერიმენტულ სერიაში ჰომოგენური უსტრუქტურო უჯრედების შრე და ოსმიოფილური მატრიქსი, რომელიც ხშირად ვლინდება ნატრიუმის ნიტროპრუსიდის ზემოქმედების ფონზე, არ ვლინდება.



სურ. 24. Jurkat უჯრედი. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან ინკუბაცია. ვლინდება პერინუკლეარული სივრცის შეშუპება. ელექტრონული მიკროფოტოგრაფია (2000x2,2)



სურ. 25. Jurkat უჯრედი. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან ინკუბაცია. ვლინდება ქრომატინის მკვეთრი მარგინაცია, აპოპტოზური სხეულაკები ბირთვში არ ვლინდება. ელექტრონული მიკროფოტოგრაფია (2000x2,2)

განსჯა

ჩვენი კვლევის შედეგად დადგინდა, რომ Jurkat უჯრედების ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან, NO-ს ეგზოგენურ დონორთან 24, 48 და 72 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ადგილი აქვს მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალის მნიშვნელობის დროდამოკიდებულ შემცირებას.

როგორც ცნობილია, მიტოქონდრიული სუნთქვის ჯაჭვში ელექტრონების ტრანსპორტის შედეგად ადგილი აქვს მოლეკულური უანგბადის აღდგენას და წყლის მოლეკულის წარმოქმნას. ეს პროცესი შეუძლებელია პროტონების (H^+) მიტოქონდრიული მატრიქსიდან მემბრანათაშორისო არეში განდევნის პროცესთან, რომელსაც თან სდევს ელექტროქიმიური გრადიენტის გენერირება, რაც ცნობილია პროტონების მამოდრავებელი ძალის სახელწოდებით. ენერგია, დაგროვებული ამ გრადიენტის სახით გამოყენებული შეიძლება იყოს ATP-ის სინთეზზე (ATP-სინთაზას მონაწილეობით), ან სხვა ენერგია-დამოკიდებულ მიტოქონდრიულ პროცესებში (Boyer P.D., 1975). პროტონ-მამოდრავებელი ძალა განაპირობებს მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალის ($\Delta\psi$) წარმოქმნას. $\Delta\psi$ - მიტოქონდრიის ენერგეტიკული სტატუსის და მთლიანი უჯრედული პომეოსტაზის მნიშვნელოვანი ინდიკატორია.

როგორც ცნობილია, უჯრედში ენერგოგენეზის ინტენსივობა მნიშვნელოვანწილად დამოკიდებულია მიტოქონდრიული სუნთქვის და ელექტრონული სატრანსპორტო ჯაჭვის მუშაობის ინტენსივობაზე. NO - მიტოქონდრიული სუნთქვის ინტენსივობის მნიშვნელოვანი რეგულატორია. ამ ფუნქციას აზოტის ოქსიდი უზრუნველყოფს მიტოქონდრიული ელექტრონების სატრანსპორტო ცილების

ნიტროზილირების მეშვეობით. Jurkat უჯრედების ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ინკუბაციის დროს გამოვლინილი რკინის შემცველი ცილების ნიტროზილური კომპლექსების ეპრ სიგნალები მიუთითებენ მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის I და IV კომპლექსების ნიტროზილირებაზე და შესაბამისად, მათი აქტივობის ინჰიბიციაზე.

NO-ს მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსზე (FeSNO) მაინჰიბირებელი ზემოქმედების შედეგად ადგილი აქვს ჟანგბადის რეაქციული ნაერთების გაძლიერებულ წარმოქმნას და ოქსიდაციური სტრესის განვითარებას. უკანასკნელი Jurkat უჯრედების სპექტრში სუპეროქსიდოკალების (O_2^-) ეპრ სიგნალების გამოჩენით ვლინდება და ნატრიუმის ნიტროპრუსიდის მიერ გენერირებული NO ჭარბი სუპეროქსიდრადიკალების დაგროვების პირობებში განიცდის სწრაფ ტრანსფორმაციას პეროქსინიტრიტად (NOO⁻). პეროქსინიტრიტი მაღალი ციტოტოქსიური რეაქციულობით ხასიათდება, იწვევს პეროქსიდაციული პროცესების ინიციაციას, მიტოქონდრიებში ელექტრონული ტრანსპორტის შეფერხებას და სუნთქვითი ჯაჭვის დათრგუნვას. უკანასკნელი Jurkat უჯრედების ეპრ სპექტრში ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან 48 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ლიპოპეროქსიდრადიკალების (LOO⁻) ინტენსიური ეპრ სიგნალების გამოჩენით და მიტოქონდრიული თავისუფალრადიკალური ეპრ სიგნალის ინტენსივობის მკვეთრი შემცირებით ვლინდება.

მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალის ($\Delta\psi$) შემცირება სუნთქვის ინტენსივობის და მასთან შეუდლებული ენერგოგენეზის ინტენსივობის დაქვეითების მაუწყებელია. უჯრედში ენერგეტიკული რესურსების შემცირება უჯრედული სიკვდილის მექანიზმების (აპოპტოზის და ნეკროზის) ჩართვას უწყობს ხელს. არსებობს

მონაცემები, რომ I კომპლექსის ინჰიბიცია (FeSNO კონპლექსების გამოჩენა) იწვევს პროაპოპტოზური პროგრამის ჩართვას (Seaton et al., 1998, Barrientos A., Moraes C.T., 1999).

მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის გადამტანი ცილების ჰემშემცველი ჯგუფების ნიტროზილირება (HbNO კომპლექსი) (ციტოქრომ c-ს, ციტოქრომოქსიდაზას (IV კომპლექსი)) ამ ცილების აქტივობას და ფუნქციის რეგულაციას უზრუნველყოფს (Schounhoff C.M., et al., 2003). ასეთი რეგულაციის მექანიზმი ხორციელდება ცილების კონფორმაციაზე და ფოსფოლიპიდებით მდიდარი მიტოქონდრიული მემბრანების ანიონურ ფოსფოლიპიდურ ვეზიკულებთან ურთიერთქმედებაზე ზემოქმედების მეშვეობით. როგორც ცნობილია, მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის IV კომპლექსის აქტივობა და ციტოქრომ c-ს მიტოქონდრიულ შიდა მემბრანასთან შეერთება მნიშვნელოვან წილად დამოკიდებულია კარდიოლიპინის შემცველობაზე. დადგენილია, რომ კარდიოლიპინის NO-ინდუცირებული, ან ოქსიდაციური დეგრადაცია (პეროქსიდაცია) ხელს უწყობს ციტოქრომ c-ს მიტოქონდრიიდან გათავისუფლებას და კასპაზების შემდგომ აქტივაციას (Kluck et al., 1997, Ushmorov et al., 1999). მაშასადამე, მიტოქონდრიული ელექტრონების სატრანსპორტო ცილების (NADH-დეჰიდროგენაზა, ციტოქრომ c) ნიტროზილირება აპოპტოზის განვითარებას უწყობს ხელს.

აღსანიშნავია, რომ Δψ-ს შემცირება ასოცირდება გარეთა მიტოქონდრიულ მემბრანაზე ტრანზიტული განვლადობის ფორების გახსნასთან და ციტოქრომ c-ს გათავისუფლებასთან. ნაჩვენები იქნა, რომ აპოპტოზი ვითარდება მემბრანული პოტენციალის შემცირებიდან რამოდენიმე საათის შემდეგ (Fall C.P., Bennet J.P., 1999). ანუ,

მიტოქონდრიის ფუნქციის (მემბრანული პოტენციალის) დაღვევა წარმოადგენს უჯრედის აპოპტოზური სიკვდილის ადრეულ მარკერს.

Jurkat უჯრედების ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ინკუბაციის შემდეგ უჯრედული ციკლის ფაზებში გადანაწილების შესწავლის სფუქველზე დადგინდა, რომ ინკუბაციის ვადის ზდასთან ერთად იზრდება უჯრედების აპოპტოზის ინტენსივობა, მცირდება დიპლოიდური და მიტოზის ფაზაში მყოფი უჯრედების რაოდენობა, რაც პროლიფერაციული პროცესების დაქვეითებაზე მიუთითებს.

ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ინკუბირებულ Jurkat უჯრედების ელექტრონულმიკროსკოპიული კვლევის საფუძველზე დადგინდა, რომ ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან 72 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ უჯრედის საპასუხო რეაქცია ვითარდება სამი მიმართულებით. ამ უჯრედების ნაწილი განიცდის აპოპტოზს. უჯრედის პლაზმური მემბრანა დაშლილია. კარგად ჩანს ქრომატინის აგრეგაციის ფრაგმენტები - კონდენსაცია, ჰიპერაგრეგაცია. ციტოპლაზმაში სრული ლიზისია. ბირთვი გამსხვილებულია, სახეზეა ქრომატინის ძლიერი კონდენსაცია. ბირთვებში მრავლობითად ჩანს აპოპტოზური სხეულაკები. ზოგიერთ შემთხვევაში ბირთვის მემბრანა ჯერ მთლიანია, მაგრამ ქრომატინი ბუშტუკებად შემსხვილებული და გამკვრივებული ჩანს, ციტოპლაზმა მკრივი, ჰომოგენურია, პლაზმური მემბრანა სადაა. ზოგიერთი უჯრედში და ბირთვში გამოვლენილია მემბრანის დაშლა, ბირთვის შიგთავსის აუტოლიზი.

ნაწილი უჯრედები მოგრძო ფორმისაა. პლაზმური მემბრანა სადაა, ციტოპლაზმა წვრილმარცლოვანი, ბირთვი მცირე ზომის მრგვალი, სადა კონტურით, ნუკლეოპლაზმა გაიშვიათებული. უჩვეულოა უჯრედების მიტოქონდრიები „ფიჭისებური“ ფორმის კრისტებით.

მსგავსი მიტოქონდრიები ლიმფოციტებში გამოვლინდა სხვა ავტორების კვლევებშიც ენდოგენური NO-სინთაზას სტიმულატორთან, LPS-სთან ინკუბაციის შემდეგ.

როგორც ცნობილია, აპოპტოზის დროს მიტოქონდრიის შიდა მემბრანა, გარეთა მემბრანის დაზიანების მიუხედავად, ინარჩუნებს ჟანგითი ფოსფორილირების უნარს და ამარაგებს მომაკვდავ უჯრედს აპოპტოზის განვითარებისათვის საჭირო ენერგიით გარკვეული დროის განმავლობაში. აპოპტოზის დროს მიტოქონდრიული ჰომეოსტაზის დარღვევა შეიძლება განვითარდეს სხვადასხვა გზით. მაგალითად, გარეთა მემბრანის მთლიანობის დარღვევამ შეიძლება გამოიწვიოს მიტოქონდრიის შესივება. მოფუნქციე მიტოქონდრია ინარჩუნებს შედარებით მაღალ შიდა ოსმოსურ წნევას გარემომცველ ციტოზოლთან შედარებით. სავარაუდოა, მიტოქონდრიებში მრავალი კრისტის წარმოქმნა NO-ს (ენდოგენური და ექზოგენური) ზემოქმედების დროს წარმოადგენს უჯრედის კომპენსატორულ რეაქციას, მიმართულს ენერგოგენეზის გააქტივებისაკენ. ვინაიდან შიდა მემბრანის ზედაპირი გაცილებით დიდია, ვიდრე გარეთა მემბრანისა, შიდამიტოქონდრიული არეს ოსმოსური შესიება გრძელდება მანამ, სანამ გარეთა მემბრანა ფიზიკურად არ დაკარგავს მთლიანობას, რაც გამოვლენილი იყო ჩვენს მიერ მეორე ტიპის უჯრედებში. უჯრედის აპოპტოზისაგან დაცვა შესაძლებელია მიტოქონდრიის ელექტრული და ოსმოსური ჰომეოსტაზის რეგულაციაში მონაწილე ფაქტორებზე (Bcl-x_L) ზემოქმედების მეშვეობით (Heiden et al., 1997).

მაშასადამე შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ Jurkat უჯრედების ექზოგენური NO-ს დონორთან, ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ხანგრძლივი ინკუბაციის დროს ადგილი აქვს მიტოქონდრიული

ელექტრონების გადამტანი ცილების ნიტროზილირებას, ჟანგბადის რეაქციული ნაერთების გაძლიერებულ წარმოქმნას, ლიპოპეროქსიდაციული პროცესების ინტენსიფიკაციას, ენერგოგენეზის პროცესის, მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალის დაქვეითებას, უჯრედებში ნეკროზის და აპოპტოზის ინტენსიფიკაციას. უჯრედების მცირე ნაწილში მრავალი კრსტის კომპენსაციური წარმოქმნა გვაფიქრებინებს, რომ უჯრედებში ენერგოგენეზის ეგზოგენური სტიმულაცია და ოქსიდაციური ჰომეოსტაზის რეგულაცია მიმართულია ერგოგენეზის ინტენსიფიკაციისა და უჯრედის გადარჩენისაკენ.

Jurkat უჯრედების ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან და პლაფერონ ლბ-სთან ერთდროული 24, 48 და 72 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ჩვენს მიერ გამოვლენილია მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალის დროდამოკიდებულ მომატება. ამ დროს Jurkat უჯრედების კულტურაში მცირდება (ან საერთოდ არ ვლინება) ჟანგბადის, ლიპიდების რეაქციული ნაერთების შემცველობა, მიტოქონდრიული ელექტრონების სატრანსპორტო ცილების ნიტროზილირების ხარისხი (FeSNO , HbNO), იზრდება თავისუფალი NO-ს შემცველობა (პეროქსინიტრიტად ოქსიდაციური ტრასფორმაციის შემცირების გამო) და მიტოქონდრიული სუნთქვის ინტენსივობა (თავისუფალი რადიკალების ეპრ სიგნალის ინტენსივობის მომატება). მიტოქონდრიული სუნთქვის ინტენსიფიკაცია ენერგოგენეზის გაძლიერებას განაპირობებს და მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალის მომატებით ვლინდება, რაც აპოპტოზის დაქვეითებას უწყობს ხელს. უკანასკნელი Jurkat უჯრედების უჯრედების ციკლის ფაზებში გადანაწილების შესწავლისას გამოვლინდა – აპოპტოზური უჯრედების რაოდენობის შემცირებით. ამავდროულად, როგორც

კვლევის შედეგებიდან გამომდინარეობს პლაფერონ ლბ-ს ზემოქმედებით აღინიშნა მიტოზების რაოდენობის ზრდა, რაც პროლიფერაციული პროცესების ინტენსიფიკაციაზე მიუთითებს.

მაშასადამე, ჩატარებული კვლევების საფუძველზე დადგინდა, რომ პლაფერონ ლბ უზრუნველყოფს Jurkat უჯრედების კულტურაში NO-ინდუცირებული ოქსიდაციური სტრესის ინტენსივობის დაქვეითებას, მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალის ზრდას, აპოპტოზის ინტენსივობის შემცირებას, მიტოზების ინტენსიფიკაციას.

დასკვნები

1. Jurkat უჯრედების ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან, NO-ს ეგზოგენურ დონორთან, ხანგრძლივი ინკუბაციის დროს ადგილი აქვს მიტოქონდრიული ელექტრონების გადამტანი ცილების ნიტროზილირებას, ჟანგბადის რეაქციული ნაერთების გაძლიერებულ წარმოქმნას, ლიპოპეროქსიდაციული პროცესების ინტენსიფიკაციას და ოქსიდაციური სტრესის განვითარებას.
2. Jurkat უჯრედებში NO-ინდუცირებული ოქსიდაციური სტრესის ინტენსიფიკაცია და მიტოქონდრიული სუნთქვის ინტენსივობის დაქვეითება მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალის დროზედამოკიდებულ დაქვეითებას განაპირობებს.
3. Jurkat უჯრედებში NO-ს დონორთან ხანგრძლივი ინკუბაციის პირობებში ადგილი აქვს აპოპტოზის დროზედამოკიდებულ ინტენსიფიკაციას, უჯრედების დიპლოიდობის ხარისხის და მიტოზების ინტენსივობის შემცირებას, რაც უჯრედების პროლიფერაციის დაქვეითებაზე მიუთითებს.
4. Jurkat უჯრედების კულტურაში მიტოქონდრიულ-მემბრანული პოტენციალის NO-ინდუცირებული შემცირების და მიტოქონდრიის გარეთა მემბრანის დაზიანების პირობებში ენერგეტიკულად აქტიურ მიტოქონდრიებში აღინიშნება შიდამიტოქონდრიული არის ოსმოსური შეშუპება, რაც მიტოქონდრიების დამრგვალებით და შემდგომი ღიზისით ვლინდება.
5. Jurkat უჯრედებში ნატრიუმის ნიტროპრუსიდთან ხანგრძლივი (72 საათი) ინკუბაციის პირობებში ნაწილ მიტოქონდრიებში მრავალი

კრისტის წარმოქმნა უჯრედებში NO-ინდუცირებული ენერგოგენეზის დაქვეითების საპასუხო კომპენსაციური რეაქციის გამოვლინებას წარმოადგენს.

6. პლაფერონ ღბ Jurkat უჯრედების კულტურაში უზრუნველყოფს NO ინდუცირებული ოქსიდაციური სტრესის ინტენსივობის დაქვეითებას, მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალის გაზრდას, რაც თავის მხრივ, აპოპტოზის ინტენსივობის შემცირებას, მიტოზების მომატებას და უჯრედების პროლიფერაციის ინტენსიფიკაციას უზრუნველყოფს.

პრაქტიკული რეკომენდაციები

1. აპოპტოზის მექანიზმებში პროქსიდაციური პროცესების მნიშვნელოვანი როლის გათვალისწინებით რეკომენდაციას ვუწევთ აპოპტოზის დათრგუნვის მიზნით ანტიოქსიდანტური ბუნების პრეპარატების გამოყენებას.
2. ჩატარებული კვლევის შედეგად გამოვლენილი პლაფერონ ლბ-ს ანტიაპოპტოზური აქტივობა Jurkat უჯედულ კულტურაზე საშუალებას გვაძლევს, რეკომენდაცია გავუწიოთ ამ პრეპარატის გამოყენებას T ლიმფოციტების აპოპტოზის პრევენციის მიზნით სხვადასხვა ინფექციური სნეულებების, ნეიროდეგენერაციული პათოლოგიების, იშემიური დაავადებების, შექენილი იმუნოდეფიციტის სინდრომის (შიდსი), ბაქტერია helicobacter pylor ზემოქმედებით ინდუცირებული გასტრიტის და კუჭის წყლულის დროს.

ლიტერატურა

1. აზიკური გ.შ. პლაფერონ ლბ-ს ცერებრო-პროტექტორული მოქმედება თავის ტვინის ქერქის ლოკალური ინფარქტით გამოწვეულ ქცევით დარღვევებზე. სადისერტაციო მაცნე ბიოლოგიურ მეცნიერებათა კანდიდატის სამეცნიერო ხარისხის მოსაპოვებლად, თბილისი 1997 წელი, გვ.22
2. ჩიქოვანი თ.ი. პლაფერონ ლბ-ს იმუნოფარმაკოლოგია. სადისერტაციო მაცნე მედ მეცნ. დოქ. სამეცნიერო ხარისხის მოსაპოვებლად, თბილისი 1997 წელი 90გვ.
3. კუკულაძე ნ.მ. ახალი სამედიცინო პრეპარატის პლაფერონ ლბ-ს იმუნოლოგიური მოქმედების ზოგიერთი მექანიზმი. სადისერტაციო მაცნე ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიდატის სამეცნიერო ხარისხის მოსაპოვებლად, თბილისი 1993 წელი, 23გვ.
4. ქაცარავა ზ.რ. პლაფერონ ლბ-ს გავლენა ფოტოქიმიური თრომბოზის მეთოდით გამოწვეული ცერებრული იშემიური კერის ჩამოყალიბებაზე ექსპერიმენტის პირობებში. სადისერტაციო მაცნე მედიცინის მეცნიერებათა კანდიდატის სამეცნიერო ხარისხის მოსაპოვებლად, თბილისი 1995 წელი, 25გვ.
5. რუხაძე რ.გ. ფარისებრი ჯირკვლისა და ზოგიერთი ორგანოს სტრუქტურულ-ფუნქციური თავისებურებანი ჰიპერ- და ჰიპოთირეოზის დროს. სადისერტაციო მაცნე მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორის სამეცნიერო ხარისხის მოსაპოვებლად, თბილისი 1999 წელი, 93გვ.
6. Адамия Э. Г. Изменение плаферона при хронических заболеваниях печени. Плаферон- Сборник трудов, Изд-во « Мецниереба», 1995, стр.54-57.
7. Адамия Э. Г. Изменение плаферона при хронических заболеваниях печени. Плаферон- Сборник трудов, Изд-во « Мецниереба», 1995, стр.54-57.

8. Гибрадзе Т. А., Бахуташвили В. И., Лорткипанидзе Т. Г. Воздействие плаферона на миокард и его кровеносные сосуды при адреналиновом повреждении сердца. Кардиология, 1994, стр. 34, №. 3-4, стр. 42-43.
9. Гогиташвили К. В. Влияние препарата плаферон на некоторые иммунологические показатели при псориазе. Автореф. дисс.докт.биол.наук, Тбилиси, 1992, 26-стр.
10. Джавахишвили Н. А., Цагарели З.Г., Бахуташвили А. В, Бахуташвили В. И. Влияние плаферона на инфаркт миокарда в эксперименте. Всем. сем. «Актуальные проблемы сердечной недостаточности», Тбилиси, 1989, 115-116.
11. Джавахишвили Н., Цагарели З., Саникидзе Т., и др. Антиоксидантный эффект Плаферона ЛБ во время инфаркта миокарда в экспериментею экспериментальная и клиническая медицина., 2001, в. 6, стр. 11-14.
12. Квитаишвили Г.И. Влияние плаферона на некоторые клинические, биохимические и иммунологические показатели при остром вирусном гепатите В. Автореф. дисс.докт. мед.наук, Тбилиси, 1991, 22-стр.
13. Мерабишвили Д., Автореф. дисс.докт. биол.наук, Тбилиси 1988. Бахуташвили А. В. Иммуномодулирующее действие препарата плаферон в эксперименте и клинике. Автореф. дисс.докт. мед.наук, 1991, 38-стр.
14. Микеладзе Д. Д., Джанашия Н. Н., Джанашвили Ц. А., Бахуташвили В. И., Картозиа Л. Б. Действие Плаферона на основные возбуждающие и тормозные нейротрансмитерные системы мозга. Плаферон-Сборник трудов, Изд-во «Мецниереба », 1995, стр.137-140.
15. Савельева Г.М. и др. Плацентарная недостаточность. Москва, Медицина 1991, стр. 270.
16. Сировский Э.Б., Амчелавский В. Г., Инаури Г. Н., Дадзани Л. Н., Пагава К. И., Бахуташвили В. И. (Применение плаферона у нейрохирургических больных в условиях раннего послеоперационного периода) Плаферон-Сборник трудов, Изд-во «Мецниереба », 1995, стр.110-127. Бахуташвили А. В. Иммуномодулирующее действие препарата плаферон в эксперименте и клинике. Автореф. дисс.докт. мед.наук, 1991, 38-стр.

17. Федорова М.В., Калашникова Е.П. Плацента и ее роль при беременности. Москва, Медицина, 1986, 253 стр.
18. Хвадиани Г.Г. Защитный эффект плаферона при острой тепловой ишемии почек. Автореф. дисс. канд. мед. наук, 1990, 21-стр.
19. Ягужинский Л. С., Имедидзе Э.А., Дадиани Л. Н., Бахутапшвили В. И. Действие препарата плаферон на энергетику митохондрии. В кн. Плаферон, 1992
20. Alnemri E.S., Livingston D.J., Nicholson D.W., et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. Cell, 1996, 87, 171.
21. Anthony F. W., Wheeler T., Elcock C.L., Pickett M., Thomas E.J. Identification of a specific pattern of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human placenta and cultured placental fibroblasts // Placenta 1994 Jun;15(5):557-61.
22. Assreuy J., et al. 1993 Brit. Pharmacology, 108, 833-837.
23. Banks R.E., Forbes M.A., Serles J., Pappin D., Canas B., Rahman D., Kaufmann S., Walters C.E., Jackson A., Eves P., Linton G., Keen J., Walker J.J and Selby P.J. Evidence for the existence for novel pregnancy associated soluble variant of the vascular endothelial growth factor receptor, FLf-1 // Molecular Human Reproduction, Vol. 4, 377-386, 1998.
24. Barrientos A., Moraes C.T. Titrating the effects of mitochondrial complex impairment in the cell physiology. J. Biol. Chem., 1999, 274, 16188-16197
Beltran B., Mathur A., Duchon M., Erusalimsky J.D., Moncada S. The effect of nitric oxide on cell respiration; a key to understanding its role in cell survival or death. PNAS, 2000, 97, 14603-14607
25. Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Mardhall P.M., Freeman B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1990, 87, 1620-1624.
26. Beltran B., Orsi A., Clementi E., Moncada S. Oxidative stress and S-nitrosylation on proteins in cells. British J. of Pharmacol., 2000, 129, 953-960

27. Berkowitz R., et al. Effects of activated leukocytes on the growth of malignant trophoblast cells in vitro. *Am J Obstetric and Gynecologic.*, 1988, 158, 199-203.
28. Bouchier-Hayes L. Martin D.J., CARD games in apoptosis and immunity. *EMBO. Rep.*, 2002, 3, 616-621.
29. Boveris AS., Chance B. The mitochondria generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.*, 1973, 74, 597-608.
30. Brown G.C., Coper C.E. Nanomolar concentration of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett.*, 1994, 356, 295-298
31. Camacho M., Machado J.D., Montesinos M.S., Criado M., Borges R. Secons messenger control the kinetics of exocytosis by modifying the intravesicular pH. *Cell Biology of the Chromaffin Cell.* Borges vR., Gandia L., Eds., 2004.
32. Carsten U., Henriquesta., Gregory E., Receb, May H. Wongl, Klaus Bendtzenc immunolocaliZation of interleiken-4 and interleiken-4 receptor in placenta and fetal membranes in association with preterm labour andpreclampsia *Gynecologic and Obstetric Investigation* 46:3:1998, 172-177
33. Castedo, M., Ferri, K., Roumier, T., Metivier, D., Zamzami, N., Kroemer, G. Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis. *Journal of Immunological Methods*, 2002, 265, 39-47.
34. Cheung CY., Vascular endothelial growth factor: possible role in fetal development and placental function (*J Soc Gynecol investing* 1997 Jul-Aug;4:169-77.
35. Chgen M., Ona V.O., Li M., et al., Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington diase. *Nat med.* 2000, 797-801, 35-45.
36. Clementi E., Brown G.C., Feelisch M., Moncada S. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: Crucial role of S-nitrosylation of mitochondria complex I and protective avtion of glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1998, 95, 7631-7636

37. Conradt B., Horcitz H.R., The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the BCl-2 like protein CED-9., 1998, 93, 519-529.
38. Decker R.S., Widenthal K. Lysosomal alteration in hypoxic and reoxygenated hearts. I. ultrastructural and cytochemical changes. *Am. J. Patol.* 1980, 98, p. 425- 444.
39. Deveraux Q.L., Schender S.I., Reed J.C., Antiapoptotic proteins: the bcl-2 and inhibition of apoptosis protein families. *Cardiol. Clin.*, 2001, 19, 57-74.
40. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998;391:43–50.
41. Fall C.P., Bennet J.P.J. *J. Neurosci. Res.*, 1999, 55, 620-628
42. Faxen M., Nasiell J., Blanck A., Nissel H., Lunell N.O. Altered mRNA expression pattern of placental epidermal growth factor receptor(EGFR) in pregnancies complicated by preclampsia and/or intrauterine growth retardation. *AM J Perinato* 1998 Jan; 15:9-11.
43. Fisher P., et al., Effects of interferons on differentiation of normal and tumor cells. *Pharmacology and Therapeutics*, 27, 143 -166.
44. Florio P., Lombardo M, , Gallo R.,Dicarlo C.,Sutton S., Geenazzani A.R., Patraglia F. Activin A, corticotrophin-releasing factor and prostaglandin F2 alpha increase immunoreactive oxitocin release from cultured human placental cells. *placenta* 1996 Jul-Aug. 17:307-11.
45. Freed K.A. et al. Differential expression of type 2,4 and cytosolic PLA2 messenger RNA in human intrauterine tissues at term. *Mol Hum Rep*, 1998, 4,377-386.
46. Greenberg J,T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1996, 93, 12094-12097.
47. Gross A., McDonnell J.M., Korsmeyer S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, 1999, 13, 1899-1911.
48. Hayashi M., Numaguchi M., Watabe H., Yaoi Y. High blood levels of macrophage colony-stimulating factor in preclampsia. *Blood* 1996, Dec. 15;88. 4426-4428.

49. Heale S.J.R., Bolanos J.P., Lang J.M., Clark J.B., Bernardi P. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites., *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 6746.
50. Heiden M.G.V., Chander N.S., Williamson E.K., Schumacker P.T., Thompson C.B. Bcl-x_L regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell*. V91, 627-637, 1997
51. Hengartner M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature.*, 2000, 407, 770-776.
52. Hengartner M.O., Horvitz H.R., *C elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell.*, 1994, 76, 665-676.
53. Hengartner M.O. The biochemistry of apoptosis., *Nature*, 2000, 407, 770-779., Alnemri E.S., Livingston D.J., Nicholson D.W., et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 1996, 87, 171.
54. Higdon J.V., Frei B. Tea catechins and polyphenols health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 2003, 43, 89-143.
55. Horvitz H.R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.*, 1999, 59, 1701-1706.
56. Jacobson M.D., Weil M., Raff M.C., *Cell.*, 1997, 88, 347-354.
57. Jane E., et al. Prostaglandin endoperoxidase H synthase mRNA expression in the human amnion and deciduas during and in the amnion at preterm labour. *Mol Hum Rep*, 1999, 5(2), 182-187.
58. Kandouz M., Gompel A., Therwarth A., Bcl-2 protooncogene, apoptosis and oncogenesis: an overview. *Int. J. Oncol.*, 1996, 9, 536-566.
59. Kenton P., Jonson P. M. Growth factor-induced release of placental alkaline phosphatase from human syncytiotrophoblast membranes. *reprod fertile* 1994 Jan. 100:71-6.
60. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239–257.
61. Khauma S., Huff T., Krystal G., Ryan J., Tacacs P., Turner T. The expression of stem cell factor and its receptor c-kit in human endometrium and placental tissues during pregnancy. *Clin Endocrinol metab*, 1996, Mar; 81:1261-6.

62. Kluck R.M., Bossy-Wetzler E., Green D.R., Newmeyer D.D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, 1997, 275, 1132-1136
63. Korsmeyer S.J. et al., Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell death differ.*, 2001, 7. 116.
64. Krammer P.H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature.*, 2000, 407, 789.
65. Kroemer, G., Reed, J.C., Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine* 2000, 6, 513-519.
66. Kuhn G.G., Palmer T.D., Fuchs E., Adult neurogenesis: a compensatory mechanism for neuronal damage. *Europ. Arch. Psychiatry Clin Neurosci.*, 2001, 251, 152-158.
67. Lazebnik YA, Cole S, Cooke CA, Nelson WG, Earnshaw WC. Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis. *J Cell Biol* 1993;123:7-22..
68. Li M., na V.O. Chen M., et al. Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic signal cord injury. *Neuroscience.*, 2000, 99, 333-342.
69. Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., et al., Cytochrome c and dATP-dependent foration of Apaf-1/caspase-0 complex initiates an apoptotic protease cascade., *Cell.*, 1997, 91, 479-489..
70. Liu X, Li P, Widlak P, Zou H, Luo X, Garrard WT, Wang X. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induce DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:8461-8466..
71. Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R., Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 1996, 86, 147-157.
72. Liu X., Zou H., Slaughter C., Wang X., DFF, a heterodimeric protein that functions down-stream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis., *Cell.*, 1997, 89, 175-184.

73. Livingston D.J., Nicholson D.W., et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 1996, 87, 171.
74. Marchetti P., Castedo M., Susin S.S., Zamzami N., Hirsch T., Macho A., Haeflner A., Hirsch F., Geuskens M., Kroemer G. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J. Exp. Med.*, 1996, 184, 1155.
75. Masuyama H., Hiramatsu Y., Kudo T. Effects of epidermal growth factor on placental amino acid transport and regulation of epidermal growth factor receptor expression of hepatocyte in rats. *Perinat med* 1996;24:213-20.
76. Melino G., Bernassola F., ZKnight R.A., Corasaniti M.T., Finazzi-Agro A. S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature.*, 1997, v. 388, 31, 432-433.
77. Miura M., Zhu H., Rocello R., Hartweig E.A., Yuan J. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL1 β converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell.*, 1993, 75, 653-660.
78. Morrow D., et al. Hematopoietic placental protein 14 an immunosuppressive factor in cells of megakaryocytic lineage. *Biol Reprod* 1994(12), 51:1206-12.
79. Muhlauer J et al. Immunohistochemistry of carbonic anhydrase in human placenta and fetal membranes. *Histochemistry*. 1994. 101[2]: 91-98.
80. Murgia I., Delledonne M., Soave C., Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 2002., 30(5), 521-528.
81. Nagata S. et al., Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ*. 2003, 10, 108.
82. Nakagawa T. et al. Caspase-12 mediates endoplasmic reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature.*, 2000, 403, 98.
83. Nijhawan D., et al. Apoptosis in neural development and disease. *Annu. Rev. Neurosci.*, 2000, 23, 75.
84. Oliver F.J., Menissier de Murcia J., de Murcia G. *Am. J. Hum. Genet.*, 1999, 64, 1282-1288.
85. Oltvai Z.N., Mollman C.L., Korsmeyer S.J., Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog Bax that accelerates programmed cell death. *Cell.*, 1993, 74, 609-619.

86. Radi R., Beckman J.S., Bush K.M., Freeman B.A., Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 4244-4250
87. Radi R., Cassina A. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1996, 2, 309-316.
88. Rytomaa M., Kinnunen P.K. Evidence for two distinct acidic phospholipid-binding sites in cytochrome c. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 17770.
89. Sakahira H., Enari M., Nagata S., Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.*, 1998, 391, 96-99.
90. Salvesen G.S. Programmed cell death and caspases. *APMIS.*, 1999, 107, 73.
91. Salvesen G.S., Duckett C.S. IAP proteins blocking the road to death' door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002, 6, 401.
92. Scatena C.D., Adler S. Trans-acting factors dictate the species-specific placental expression of corticotrophin-releasing factor genes in choriocarcinoma cell line // *Endocrinology* 1996 Jul; 137(7): 3000-8.
93. Schounhoff C.M., Gaston B., Mannick J.B. Nitrosylation of cytochrome c during apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 20, 18265-18270
94. Schwartz A., Bhardwaj R., Aragane Y., Mahnke k., Reimann H., Metze D., Luger T.A., Schwartz T. Ultraviolet B-induced apoptosis of keratinocytes: evidence for partial involvement of tumor necrosis factor- α in the formation of sunburn cells. *J. Invest. Dermatol.*, 1995, 104, 922-927.
95. Seaton T.A., Cooper J.M., Schapira A.H. Cyclosporin reverses the apoptosis stimulated by complex I inhibitor. *Brain Res.*, 1998, 809, 12-17.
96. Seppala M., Akhiro Moryiama, Noboru Matsutaki, Isao Ogata, Masayasy Kyama, Chiniro Azuma human placental cells show enhanced production on interleukin (LL)-8 in response to lipopolysaccharide(LPS), IL-1 and tumor necrosis factor (TNF), but not to IL-6. *Molecular Human Reproduction*, Vol 5, 182-187, February 1999.
97. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell.*, 2002, 9, 459-470.
98. Shimoya K., Akhiro Moriama, Noboru Matsutaki, Isao Ogata, Masayasy Kyama, ChiniroAzuma human placental cells show enhanced production on

- interleukin (LL)-8 in response to lipopolysaccharide(LPS), IL-1 and tumor necrosis factor (TNF), but not to IL-6. *Molecular Human Reproduction*, Vol 5, 183-187, February 1999.
99. Solary E, Bertrand R, Kohn KW, Pommier Y. Differential induction of apoptosis in undifferentiated and differentiated HL-60 cells by DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Blood* 1993;81:1359–1368.
 100. Stamler, J.S., Singel, D.J., Loscalzo, J., 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258, 1898.
 101. Steinborn A., von Gall C., Hildenbrand R., Stutte HJ., Kaufmann M. Identification of placental cytokine-producing cells in term and preterm labor. *Obstet Gynecol.*1998, May 91:329-335.
 102. Stewart F. Roles of mesenchymal-epithelial interactions and hepatocyte growth factor –scatter factor (HGF-SF) in placental development. *Rev reprod* 1996 Sep, 1:144-8.
 103. Takahashi H., Konayashi H., Hahimoto Y., Marsuo S., Iizuka H. Interferon- γ -dependent stimulation of Fas antigen in SV40-transformed human keratinocytes modulation of the apoptotic process by protein kinase C. *J. Invest Dermatol.*, 1995, 105, 810-815.
 104. Tang D, Kidd VJ. Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis. *J Biol Chem* 1998;273:28549–28552.
 105. Telfer J.F., et al. Expression of superoxide dismutase gene. *J Biol Chem*, 1998, 273, 15148-15156.
 106. Tsujimoto Y. *Cell Death Differ.*, 1997, 4, 429-434. Nicotera P., Leist M., *Cell Death Differ.*, 1997, 4, 435-442.
 107. Ushmorov A., Ratter F., Lechmann V., Droge W., Schirmacher V., Umansky V. Nitric oxide-induced apoptosis in human leukemic lines requires mitochondrial lipid degradation and cytochrome c release. *Blood.*, 1999, 93, 7, 2342-2352.
 108. Van Loo G. et al., The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell death Differ.*, 2002, 9, 1031.

109. Wang G.L., Jiang B.H., Plet E.A., semeza G.L. (1995) Hypoxia inducible factor I is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellur O tension. *Proc. Natl.Acad. Sci USA*, 92, 561-5614.
110. Wang X. The expending role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, 2001, 15, 2922-2933.
111. Wyllie A.H. Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J. Pathol.*, 1987, 153, 313-316., Steler H., Mechanisms and genes of cellular suicide., *Science.*, 1995, 267, 1445-1449.
112. Wyllie A.H., Kerr J.F., Currie A.R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev. Cytol.*, 1980, 68, 251-306.
113. Xu D., Bureau Y., Mcintyre D.C., t al., Attenuation of ischemia-induced cellular and behavioral deficits by X chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein overexpression in the rat hippocampus. *J. Neurosci.*, 1999, 19, 50, 26-33.
114. Yang E.,Korsmeyer S.J. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood.*, 1996, 88, 386-401.
115. Yuan J., Shaham S., Ledoux S., Ellis H.M., Horvitz H.R. The C elegans xell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleikin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993, 75, 641-652.