

გონა ომარის ძე სირბილაძე

აკოპტოზის რილი და მისი მოღუჯანცია იმუნური პასუხით განპირობებული
ღვიპლის მსუბუქი დაზიანების დროს

14.00.36 – ალერგოლოგია, იმუნოლოგია

ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიდატის სამეცნიერო ხარისხის
მოსაპოვებლად წარმოდგენილი დისერტაციის
ა ვ თ რ ე უ ე რ ა ტ ი

თბილისი
2006

List of Publication

სელმპღვანელი: თინა ჩიქოვანი
მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი,
პროფესორი

ოფიციალური ოპონენტები: გიორგი გოგინაძე
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,
პროფესორი

ბორის კორსანტია
მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი,
პროფესორი

დისერტაციის დაცვა შედგება 2006 წლის “ ” საათზე თბილისის ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტში შექმნილ სადისერტაციო საბჭოს B03.15 №7 სხდომაზე (0143, თბილისი, უნივერსიტეტის ქ. №2)

დისერტაციის გაცნობა შესაძლებელია ივ.ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის სამეცნიერო ბიბლიოთეკაში (მისამართი: 0143, თბილისი, უნივერსიტეტის ქ. №4).

ავტორეფერატი დაიგზავნა 2006 წლის “ “ ”

სადისერტაციო საბჭოს სწავლული მდივანი, ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი

თინათინ ჯორჯაძე

1. N. Kikodze, M. Iobadze, T. Chikovani, G. Sirbiladze, N. Kukuladze, M. Jgenti. Protective effect of Plaferon LB on Liver in case of some Pathologies. Proc.Georgian Acad.Sci. Biol. 2006, vol. 32, No2, 325-329.
2. G. Sirbiladze, N. Kikodze, M. Iobadze, M. Jgenti., I. Pantsulaia, T. Chikovani. Activities of Caspases in Experimental Mild Hepatitis and their Regulation by Immunomodulators. Bulletin of the Georgian Academy of Sciences 2006, vol.173, No2, 377-380.
3. G. Sirbiladze, N. Kikodze, T. Chikovani. Modulation of NO Synthesis by Plaferon LB in Liver. Georgian Medical News 2006, Apr, (133):102-104.
3. S. Chochua, G. Sirbiladze, N. Kikodze, M. Iobadze, I. Pantsulaia, L. Sujashvili, T. Chikovani. Caspase-3 and Caspase-8 Activities in Experimental Endotoxemia and their Regulation by Immunomodulatory Drugs. Experimental and Clinical Medicine 2006, 4(29), 85-87.
5. G. Sirbiladze, S. Chochua, M. Iobadze, I. Pantsulaia, M. Jgenti, N. Kikodze, T. Chikovani. Regulation Activities of Caspases in Experimental Liver Injury by Immunomodulatory Drugs. Allergol & Immunol, 2006.
6. G. Sirbiladze, I. Pantsulaia, N. Kikodze, M. Iobadze, L. Sujashvili, T. Chikovani. Influence of Immunomodulatory Drugs on the Oxidative Stress Indicators in Experimental Mild Hepatitis. Proc. Georgian Acad. Sci. Biol., 2006, vol. 32, No. 4, 835-841.

Conclusions:

1. In mild immune-mediated hepatitis caspase-mediated apoptosis intensifies.
2. In Con-A-induced mild hepatitis, administration of Plaferon LB enhances caspase-3 and -8 activity in hepatocytes in the regenerative phase.
3. In the experimental model of Con-A-induced mild hepatitis, Plaferon LB intensifies hepatocyte apoptosis and accordingly reduces the risk of chronization.
4. In the experimental model of Con-A-induced mild hepatitis, Plaferon LB speeds up recovery of liver to its normal structure.
5. In the experimental model of Con-A-induced mild hepatitis, Plaferon LB modulates blood NO levels: in the most destructive phase it reduces NO levels while in the regenerative phase the opposite occurs in a statistically significant manner.
6. In a mild immune-mediated liver injury, Plaferon LB prevents development of oxidative stress.
7. Under the influence of Plaferon LB, increase in hepatocyte apoptosis and their simultaneous enhanced proliferative activity facilitates acceleration of regeneration processes in liver.

Practical Recommendations:

1. In weak immune-mediated infections (mild forms of Hepatitis B and Hepatitis C), Plaferon LB and other pro-apoptotic immunomodulators are recommended in the treatment of immune-mediated liver diseases.
2. To investigate the mechanism of Plaferon LB effects thoroughly, it is reasonable to study its influence on the balance of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines via Con-A induced hepatitis and other experimental models of autoimmune diseases.
3. Identification of Plaferon LB fraction with immunomodulatory potential is reasonable to conduct using Con-A induced hepatitis model.

With the rights of a manuscript

Gocha Sirbiladze

**Role of Apoptosis and its Modulation in Immune-mediated
Mild Liver Injury**

14.00.36 Allergology and Immunology

ABSTRACT

of Dissertation Thesis in Fulfillment of the Requirements
for the Scientific degree of Candidate in Biology

**TBILISI
2006**

The work has been done at the Institute of Medical Biotechnology

Scientific Supervisor: **Tinatin Chikovani,**
M.D, Dr. Sci,
Professor

Official Opponents: **Giorgi Gogichadze,**
Dr. of Biol Sci,
Professor

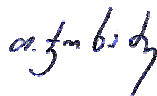
Boris Korsantia,
M.D, Dr. Sci,
Professor

The dissertation will be defended on the session of the Dissertation Council B03.15. No7 at Iv. Javakhishvili Tbilisi State University (0143, Tbilisi, University St. No2), on _____ of 2006 at pm _____

This dissertation thesis is available for scrutiny in the Scientific Library of Iv. Javakhishvili Tbilisi State University (0143, Tbilisi, University Str. No2).

The abstract has been distributed on _____ 2006

**Scientific Secretary
of the Council
Dr. of Biol. Sc., Professor**



Tinatin Jokhadze

or because of inherited deficiencies in GSH synthesis. Thus, low GSH levels are observed during sepsis, acetaminophen intoxication, chronic alcohol consumption, and in acute Wilson's disease. Moreover, hepatic GSH is subject to pronounced circadian alterations. Pharmacological enhancement of hepatic GSH renders the liver less vulnerable and protects against many direct hepatotoxins (Prescott et al., 1982). Increasing evidence argues for a dichotomous role of GSH with respect to cellular damage.

In some paradigms of cell death where the primary event is apoptosis, a protective (i.e., anti-apoptotic), and not an aggravating, effect of GSH depletion was reported. To date, NO-induced apoptosis of macrophages, CD95-mediated apoptosis of T cells, and cytokine-mediated hepatocyte apoptosis in vivo (Hentze et al, 1999) were found to depend on a sufficient intracellular GSH level of the respective cells. In these studies, the redox sensitivity of apoptosis-executing caspases, i.e. aspartate-specific cysteine proteases, was hypothesized to be responsible for the observed protection because of decreased GSH levels. However, elevated intracellular GSH levels can also abrogate apoptosis in various cell lines (Uhlir et al., 1992).

At the next stage of the research, we studied changes of glutathione reductase (GR) in animal serum. Analysis of the results indicated that 8hr after the Con-A injection, the GR level was reduced in a statistically significant manner ($p < 0.01$). Throughout the experiment, Plaferon LB maintained GR level at a certain level but did not reduce it to the normal one (Diag. 5). Assumably, Plaferon LB keeps GR at a level necessary for the proper operation of mitochondria.

Similar to the activity of Plaferon LB, dexamethasone kept GR levels high over the experiment. However, at 8hr Plaferon weakened the GR activity significantly ($p < 0.01$).

The results of our study fully correspond to the data of other studies that indicated an increase in GR activity in cirrhosis and hepatocellular carcinoma compared to the control tissue (Czeczot et al., 2006). At the cellular level, GSH homeostasis is ensured by the balance of biosynthesis, consumption, oxidation and export. The homeostasis disorder can affect the liver capacity to protect itself from oxidative stress (Fernandez-Checa et al., 1997).

At the last stage of our experiment, we studied mitochondrial activities of hepatocytes by means of MTT test. Spontaneous stimulation index (SI) of intact mice hepatocytes was equal to 1.14 ± 0.2 . In Con-A-induced mild hepatitis, at 24hr this parameter was 1.5 ± 0.3 (compared to the control figure, $p < 0.05$), while at 48hr it amounted to 1.16 ± 0.11 .

Plaferon LB influence 24hr after the Con-A-injection did not differ from I group. However, at 48hr the figure increased (2.06 ± 0.12) so that it became statistically significant to exceed the analogous figure for the intact mice ($p < 0.01$). It is noteworthy that in case of dexamethasone mitochondrial function was inhibited at 48hr (Diag. 6).

Thus, given the results, it can be concluded that Plaferon LB strengthens mitochondrial function and boosts hepatocyte proliferation stimulating regenerative processes.

Hampton and Orrenius demonstrated that prolonged or excessive oxidative stress inhibits caspase activities and accordingly blocks apoptosis (Hampton et al., 1998).

In order to find out possible relationship between hepatocyte apoptosis and changes of redox potential, as well as to elucidate pro-caspase activity of Plaferon LB potentially arising from its anti-oxidant nature, we studied NO and glutathione reductase levels in the blood, as well as the hepatocyte mitochondrial activity.

Metabolic changes occurring in various organs eventually come down to changes in the blood. This is why the blood is the most suitable object to study metabolic processes taking place in the organism. Our study conducted on the animal blood through the Con-A induced hepatitis gave the picture that is characteristic of oxidative stress.

As seen from Diag. 3, NO levels are elevated at 8 hours after Con-A treatment without any further significant change till the end of the experiment.

Administration of dexamethasone does not affect NO levels in Con-A-induced mild hepatitis. Thus, it lacks an antioxidant capacity and hence the power to reduce lipid super-oxidation.

Treatment by Plaferon LB significantly decreases NO level at 24h compared to I and III groups. However, under influence of Plaferon LB the synthesis of nitric oxide was significantly intensified at 48h (Diag. 4), the stage that coincides with regenerative phase.

It is known from the previous studies that nitric oxide participates in the regulation of the apoptotic process. It exhibits both anti- and pro-apoptotic qualities. The anti-apoptotic activity proceeds via two main mechanisms: cGMP-dependent and cGMP-independent. By stimulating production of cGMP, NO induces activation of soluble guanylyl cyclase which protects cells against apoptosis (Kim et al., 1997). This type of mechanism is not fully studied yet. The second one – cGMP-independent mechanism – involves inhibition of lipid super-oxidation, peroxy radical bonding, Bcl-2 cleavage, cytochrome c release (Kim et al., 1998) and induction of proteins such as Hsp70 and Bcl-2 (Mosser et al., 1997; Genaro et al., 1995). Besides, NO expresses its protective nature by S-nitrosylating proteins. By S-nitrosylating 62nd cysteine of p50 and p65 proteins, it can inhibit activation of NF- κ B. NO donors inhibit activation of NF- κ B by TNF α by stabilization of I κ B- α and increasing expression of its gene. Due to high content of cysteines, caspases represent ideal targets of sS-nitrosylation.

It is also interesting to examine influence of NO on regulation of NF- κ B and inflammation. Its mechanism is not quite known yet. However, both positive and negative effects have been described. These activities depend on NO levels, redox status, stimulus and cell type (Kim et al., 1997). Endogenously produced by eNOS and/or nNOS, small quantities of NO, can play a crucial role in modulation of NF- κ B activation in the presence of various stimuli.

It has been shown that *in vitro* and *in vivo* iNOS prevented TNF or Fas induced apoptosis (Bogdan et al., 2001). Even more, in iNOS deficient mice *in vivo* liver regeneration was inhibited.

Besides, Sass et al. (2001) could not find 3-nitrotyrosine - the marker of tissue injury by NO - in Con-A treated liver indicating that inducible nitric oxide had cytoprotective effects. Even more, it can be deduced that this enzyme at least partially protects the cells.

According to our results, Plaferon LB modulates NO levels. At 24hr, it reduces NO levels ($p < 0.01$) to stop expansion of destructive activities, while at 48hr it raises inducible NO levels (up to the threshold concentrations) to accelerate proliferative processes.

The intracellular concentration of reactive oxygen species (ROS) is tightly regulated by multiple defense mechanisms involving ROS scavenging enzymes and small antioxidant molecules. Among these antioxidant systems acting as antioxidants or scavengers are glutathione and GSH dependent enzymes, which are one of the protective mechanisms vs. oxidative damage, both in the circulation and in various tissues, including liver.

The total intracellular glutathione (GSH) concentration varies considerably, especially in the liver, and hepatic GSH can dramatically decrease as a result of drug metabolism after oxidative stress,

შესავალი

პრობლემის აქტუალობა

მედისინის განვითარების მნიშვნელოვანი ტემპების მიუხედავად, XXI საუკუნის დასაწყისში ვირუსული ჰეპატიტები კვლავ მიიმე და გლობალურ პრობლემად რჩება. ჯანდაცვის მსოფლიო ორგანიზაციის მონაცემებით ვირუსული ჰეპატიტით დაავადებულთა რაოდენობა განუხრელად მატულობს და მილიარდზე მეტს შეადგენს. უფრო მეტიც, სხვადასხვა სახის ჰეპატიტით დედამიწის მოსახლეობის თითქმის მესამედი არის ან ოდესმე იყო ინფიცირებული. მსოფლიოში ყოველწლიურად ამ დაავადებით ან მისი გართულებით 2 მლნ-მდე ადამიანი იღუპება.

საქართველოში 2004 წელს ვირუსული ჰეპატიტების (B და C) 1000-მდე ახალი შემთხვევა დაფიქსირდა. აღსანიშნავია, რომ B ჰეპატიტის შემთხვევაში მწვავე მიმდინარეობა აღინიშნებოდა დაავადებულთა 64%-ში, ხოლო ქრონიკული – 35%-ში, მაშინ როცა C ჰეპატიტის დროს ფაქტიურად ნახევარზე მეტი (დაახლოებით 55%) ქრონიკული იყო. უფრო მეტიც, საქართველოს მოსახლეობის 5-7% ჰეპატიტის სხვადასხვა ვირუსის მატარებელია.

B და C ჰეპატიტის ვირუსებით დაინფიცირება ორგანიზმს ორი მთავარი საშიშროების წინაშე აყენებს: ერთი მხრივ, დაავადების ფულმინანტური მიმდინარეობის შემთხვევაში (ღვიძლის კომა, ელვისებური ჰეპატიტი) მაღალი ლეტალური გამოსავალი (90% ლეტალურად მთავრდება), მეორეს მხრივ კი, პროცესის ქრონიზაცია, რაც საბოლოოდ ღვიძლის ციროზის ან ჰეპატოციტული კარცინომის განვითარებით მთავრდება. ჰეპატიტის ელვისებურად მიმდინარეობას ადგილი აქვს B და D ჰეპატიტების ვირუსით ერთდროულად დაინფიცირების 80%-ში.

მსოფლიოს წამყვანი ჰეპატოლოგიური ცენტრების მონაცემებით, HBV ინფექციის ფულმინანტური მიმდინარეობის საშიშროება ინფიცირებულთა 80%-ში შეინიშნება (Grob et al., 1998). მსოფლიო ჯანდაცვის ორგანიზაციის მონაცემებით, დაახლოებით 2 მილიარდ ადამიანს გადატანილი აქვს B ჰეპატიტი, ხოლო 350 მილიონზე მეტი HBV მტარებელია, ქრონიკულ მტარებელთა 25%-ში კი დაავადება ღვიძლის კიბოს განვითარებით მთავრდება (Alter, 1995). მსოფლიოში ღვიძლის კიბოთი ყოველწლიურად 1 მილიონზე მეტი ადამიანი იღუპება. ქრონიკული HBV ინფექციის პერსისტენტობის ერთ-ერთი მიზეზი ისაა, რომ ინფიცირდება ჰეპატოციტების 100% და არ ხდება მათი მოცილება.

მწვავე ვირუსული ჰეპატიტის გადატანის შემდეგ გამოჯანმრთელების პროცესი დიდხანს მიმდინარეობს. ეს განსაკუთრებით ეხება C ჰეპატიტს, რომელიც ყველაზე რთული მიმდინარეობით ხასიათდება. მსოფლიო ჯანდაცვის ორგანიზაციის მონაცემებით, C ჰეპატიტით მსოფლიოში 300 მილიონი ადამიანია ინფიცირებული, რომელთაგან 130 მილიონი ამ ვირუსის ქრონიკული მტარებელია. C ჰეპატიტი შემთხვევათა 70-80%-ში განიცდის ქრონიზაციას და ამთავან 50%-ს ციროზი უვითარდება. უფრო მეტიც, ზოგჯერ ქრონიკული ჰეპატიტის დიაგნოსტიკა არ ხდება და დაავადება მხოლოდ ციროზის სტადიაზე გამოვლინდება. საკმაოდ ხშირად C ჰეპატიტის მქონე პაციენტებს ახასიათებთ “ცრუ გამოჯანმრთელება”, როცა სისხლის ბიოქიმიური ანალიზები ნორმაში მოდის (Scheuer et al, 1990). ეს ფენომენი შეიძლება გაგრძელდეს რამდენიმე თვიდან რამდენიმე წლამდეც კი. ამიტომ არც თუ უსაფუძვლოდ მას სიმძიმის მიხედვით შიდა ადარებენ. ყოველივე ზემოთ თქმულიდან გამომდინარე, ვირუსული ჰეპატიტების მკურნალობას ძალიან დიდი მნიშვნელობა აქვს.

არაციტოპათიური ვირუსებითა (HBV, HCV) და აუტომუნური გენეზით გამოწვეული ჰეპატიტების დროს ღვიძლის დაზიანების მექანიზმები საბოლოოდ გარკვეული არ არის, თუმცა მასში T უჯრედული იმუნური პასუხის განმსაზღვრელი როლი დღეისათვის დასაბუთებულია (Ando et al., 1997). ადგილობრივი იმუნური პასუხი პრაქტიკულად გამორიცხავს ქრონიკული ჰეპატიტის განვითარების შანსს. სუსტი იმუნური პასუხის შემთხვევაში კი დაავადების მწვავე ფაზა მსუბუქად, ხშირად უსიმპტომოდ მიმდინარეობს, რაც შესაძლოა პროცესის შემდგომ ქრონიზაციას და ჰეპატოციტული კარცინომის ან ციროზის განვითარებას განაპირობებდეს.

ღვიძლის ფუნქციონირების შენარჩუნებაში გადამწყვეტი მნიშვნელობა აპოპტოზის საშუალებით ვირუსით ინფიცირებული უჯრედების სწრაფ და დროულ მოცილებას ენიჭება. ჯანმრთელ ორგანიზმში მკვდარი უჯრედები სწრაფად ჩაინაცვლება მიტოზის გზით წარმოშობილი ახალი უჯრედებით, ანუ ორგანიზმში უჯრედული ჰომეოსტაზი ნარჩუნდება, მაშინ როცა მწვავე დაზიანების დროს ჭარბი და/ან ხანგრძლივი აპოპტოზი ღვიძლის ფუნქციისა და რეპერფუზიის მოშლის მიზეზი ხდება. ჭარბი აპოპტოზი აღინიშნება მწვავე ვირუსული, ალკოჰოლური ჰეპატიტების, ღვიძლის ქოლესტაზური დაავადების, ვილსონის დაავადებისა და “ტრანსპლანტანტი მასპინძლის წინააღმდეგ” დაავადებისთვის (GVHD). მეორე მხრივ, ვირუს-ინფიცირებული ჰეპატოციტების აპოპტოზის დეფიციტი მუტირებული გენების მატარებელი უჯრედების მოცილების მოშლასა და უჯრედების უსაზღვრო გამრავლებას იწვევს, რაც გამუდმებული ანთების პირობებში ღვიძლისა და ნაღვლსადენი სისტემის სიმსივნეების განვითარებას უწყობს ხელს. აქედან გამომდინარე, სხვადასხვა პათოლოგიის დროს ღვიძლის ქსოვილში აპოპტოზის მაინჰიბირებელი თუ მასტიმულირებელი პრეპარატები პოტენციურად ძლიერი თერაპიული საშუალებები შეიძლება გახდეს.

ვირუსული ჰეპატიტების პათოგენეზიდან გამომდინარე, ზოგიერთი ავტორი ვირუსული ჰეპატიტების სამკურნალოდ უპირატესობას იმუნოტროპულ და ანტიოქსიდაციურ პრეპარატებს ანიჭებს (Zein et al., 1998; Schwarz, 1996; დ.მეტრეველი, 1999; დ. პავლიაშვილი, 1999). აღნიშნული ფაქტის გათვალისწინებით საინტერესოა ისეთი იმუნომამოღებელი თვისების მქონე პრეპარატების შესწავლა, როგორცაა პლაფერონი ლბ.

პლაფერონი ლბ შექმნილია სამედიცინო ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტში პროფესორ ვლადიმერ ბახუტაშვილის მიერ. მას როგორც იმუნომამოღებელი, ისე ანთების საწინააღმდეგო, ანტიიშემიური და ანტიოქსიდაციური თვისებები გააჩნია (თ. ჩიქვანი, 1997; დ. ჭავჭავაძე, 1999; რ. რუხაძე, 1999; მ. გონგაძე, 2004). გარდა ამისა, დადგინდა, რომ პლაფერონი ლბ-ს გამოყენება ღვიძლის სხვადასხვა პათოლოგიის დროს ღვიძლს მეტაბოლური და მორფოლოგიური ცვლილებების განვითარებისგან იცავს (მ. ფაშალაშვილი, 1995; დ.პავლიაშვილი, 1999; Rukhadze et al., 1998; Chikovani et al., 1999). უფრო მეტიც, შესწავლილია პლაფერონი ლბ-ს ანტი-აპოპტოზური თვისებაც (ტოტუა და სხვ., 2006). პრეპარატის ჰეპატოპროტექტორული მოქმედების ზუსტი მექანიზმი კი დღემდე უცნობია.

დღეისათვის ღვიძლის იმუნური დაზიანების მექანიზმების შესასწავლად სხვადასხვა ექსპერიმენტული მოდელია მოწოდებული. Con-A-თი გამოწვეული ღვიძლის დაზიანება ღვიძლის კლინიკური დაზიანების იდენტურია (Tiegs et al., 1992). ამიტომ Con-A-თი გამოწვეული ღვიძლის იმუნური დაზიანების ექსპერიმენტული მოდელი ფართოდ გამოიყენება როგორც დაავადების პათოგენეზის შესასწავლად, ასევე ჰეპატიტების მკურნალობის ახალი გზების შესამუშავებლად.

Apart from caspase-3, activity of caspase-8 was assessed too. Changes in its levels were similar to those of caspase-8. Namely, caspase-8 levels soared ($p < 0.01$) 8 hr after the Con-A injection but decreased at 24 hr and 48hr without reaching the normal value. (Diag. 3).

Next we elucidated that Plaferon LB was raising caspase-8 levels at all levels: at I and II time points these increases were not statistically significant; at III time point, however, the change was prominent compared to the control group ($p < 0.01$). The results of our analysis showed that the treatment with immunosuppressor dexamethasone did not have influence on caspase-8 levels. At I time point, dexamethasone tends to suppress caspases without statistically significant effect (Diag. 3). In contrast, Plaferon LB was clearly pro-apoptotic in the regenerative phase of mild hepatitis as it boosted caspase-3 and -8 activities significantly.

As a an additional instrument, TUNEL method was employed to study apoptotic processes in liver. The results of the study revealed that administration of Plaferon in experimental mild hepatitis model increases the number of apoptotic hepatocytes at 48 hr but not in previous time points. One more noteworthy fact was that dexamethasone did not have similar effects (Table 1).

Table 1 Quantitative figures for apoptotic nuclei in mice hepatocytes, Con-A-induced experimental mild liver injury

Time Point / Group	Healthy	Concanavalin-A	Concanavalin-A+PLB	Concanavalin-A+Dex
8 hr	54.23 ± 9.09	154.39±15.22	180.39±17.2	164.39±15.02
24 hr	“ – “	76.41±12.12	82.34±11.15	86.14±9.11
48 hr	“ – “	75.41±10.11	280.23±15.21	84.12±9.10

The excessive apoptosis is identified in acute and chronic viral hepatitis, alcoholic and non-alcoholic hepatitis, cholestatic liver disease, Wilson’s disease, and graft versus host disease (GVHD). Sustained apoptosis is linked to the development of hepatic fibrosis. In contrast, insufficient apoptosis has been associated with development and progression of tumors in liver and biliary tree. Furthermore, the antiviral effect of interferon may be mediated through the induction of apoptosis (Castelli et al., 1998).

Our studies allow us to suggest that Plaferon LB could be used in case of a variety of liver injuries such as acute viral hepatitis and tumors stemming from opposing mechanisms. It seems Plaferon LB modulates apoptotic processes differently depending on the type of disease and its severity. In case of severe liver injury, it acts in an anti-apoptotic manner (S. Chochua et al., 2006), whereas in mild immune-mediated liver injuries it becomes pro-apoptotic.

Thus it can be concluded that Plaferon LB is a modulator of apoptosis.

It is known that apoptosis promoting enzymes – caspases are most susceptible to oxidative stress. It is generally recognized that in many cells presence of small reactive oxygen species (ROS) concentrations initiate apoptosis, while their super-excessive levels cause necrotic alterations. Critical cysteins are characterized by different redox potential. While small amounts of oxidants lead to oxidation of thiols in certain proteins, they leave other proteins unaffected. Small concentrations of oxidants promote apoptosis by altering a redox status via activation of pro-apoptotic factors such as JNK. Besides, they inhibit NF-kB without altering the redox status of pro-apoptotic caspases. Higher concentrations of oxidants tend more towards incitement of necrotic processes (Halliwell et al., 1990; Dypbunkt et al., 1994). They inhibit caspases, which are required for apoptosis, and put cells to the necrotic death. Strong changes in the redox state caused by high levels of H₂O₂ and glutathione (GSH), whereas moderate redox changes fluctuations do not affect apoptotic process. However, changes of antioxidant and GSH levels regulate TNF- and Fas-mediated apoptotic processes. Even more,

preserved. In case of coupled injection of Con-A and Plaferon LB at this time point, the overall majority of hepatocytes were subject to vacuolar dystrophy. However, trabecular structure of the lobes remained completely unchanged. Also, lymphoid infiltration sites were rare and insignificant.

24hr following the injection of Con-A, intensive changes in the liver of the control group animals persisted. Most hepatocytes underwent vacuolar dystrophy and necrotic transformation. With dexamethasone, the number of double-nucleus hepatocytes increased prominently. What is more, destructive alterations were intensifying. However, the case was not characterized by lymphoid infiltration. Influenced by Plaferon LB, most hepatocytes were still undergoing dystrophial changes but necrotic sites did not develop.

48hr following the experiment, in the control group of animals some sites seemed to have retained the normal liver trabecular structure suggesting that active regenerative processes were underway. At the same time point, some normal hepatocytes had also emerged. With dexamethasone, the picture hardly was different. Under the influence of Plaferon LB though, the normal constitution of the lobes is basically re-gained. Necrotic sites and lymphoid infiltrates did not emerge at all.

Thus, in Con-A induced hepatitis Plaferon LB and dexamethasone protect the liver tissue against profound destructive changes. Besides, in contrast to the effect of dexamethasone, Plaferon LB speeds up recovery of the normal liver tissue structure.

As noted above, both drugs – Plaferon LB and dexamethasone – protect liver tissue against immune injury. It is known that corticosteroids realize their effect via inhibiting the expression of genes for IL-1, IL-2, IL-6, IFN- γ , and TNF- α . Assumably, the effects of Plaferon LB too derive from the shift in the cytokine balance (Chikovani, 1997; Khetsuriani et al., 1997). It should be noted that Plaferon LB exhibits not only immunomodulatory but anti-oxidant and anti-apoptotic effects too. The previous studies reported strong anti-apoptotic quality of Plaferon LB in acute severe hepatitis models and clinical trials. Namely, Plaferon LB inhibits hepatocyte apoptosis in the experimental model of LPS induced severe hepatitis. Metreveli showed that in patients with mild and moderately severe hepatitis Plaferon LB led to full recovery in 96.9%. Furthermore, it significantly reduced probability of the chronic state development augmenting protective immunity formation (Metreveli et al., 1999). Based on this and other studies, we have proposed the hypothesis that in mild hepatitis the protective effects of Plaferon LB were related to its pro-apoptotic quality.

Caspase activation is a characteristic feature of the apoptotic process. Based on the nature of the caspase cascade, regulation of the apical caspases may be critical for the apoptotic cascade. Self-activation of caspase 8 leads to the direct activation of caspase 3 and cleavage of Bid (Li et al., 1999).

According to the literature, the functional state of the transcriptional machinery decides whether apoptosis involves activation of caspase-3-like proteases or alternative signaling pathways in vivo might be of relevance for the immunopathology of the liver. Data on the activity of caspase-3 in Con-A-induced hepatitis is controversial. One study reported a significant increase of caspase-3 levels (Ding et al, 2004), while another was not able to detect them (Kunstle et al, 1999).

Hence, at the next stage of the research, we studied activities of caspase-3 and -8 *in vivo* following Con-A injection and effects of immunomodulators, namely, Plaferon LB and dexamethasone on them. According the results of this stage, at the first time point from the Con-A injection in the control group a drastic increase in caspase-3 levels reaching the maximum for the whole experiment was observed. Then the level drops gradually but without re-gaining the normal value even at 48 hr (Diag. 2).

In case of Plaferon LB, caspase-3 levels did not appear influenced at I and II time points and did not differ from the similar parameter for the control group statistically significantly. However, at 48hr the increase of caspase-3 activity was clearly detectable ($p < 0.01$). In contrast, dexamethasone suppresses caspase-3 activity at I time point ($p < 0.01$) but evens it up to the control group at subsequent two time points.

ყოველივე ზემოთქმულიდან გამომდინარე, მიზანშეწონილად ჩავთვალეთ, შეგვესწავლა აპოპტოზის როლი Con-A ინდუცირებული მსუბუქი ჰეპატიტის ექსპერიმენტულ მოდელში და მასზე იმუნომამოძღვლირებელი პრეპარატების გავლენა.

კვლევის მიზანი და ამოცანები: კვლევის მიზანს ექსპერიმენტული მსუბუქი ჰეპატიტის დროს ღვიძლში განვითარებული აპოპტოზური ცვლილებებისა და მასზე იმუნომამოძღვლატორების გავლენის შესწავლა წარმოადგენდა.

აღნიშნული მიზნის მისაღწევად შემდეგი კონკრეტული ამოცანების გადაწყვეტა დაისახა:

1. Con-A ინდუცირებული მსუბუქი ჰეპატიტის ექსპერიმენტული მოდელის შემუშავება (კონკანავალინ A-ს დოზის შერჩევა ტრანსამინაზების დონის ცვლილებით);
2. იმუნომამოძღვლატორების (პლაფერონი ლბ, დექსამეტაზონი) გავლენის შესწავლა Con-A ინდუცირებული მსუბუქი ჰეპატიტის დროს პლაზმაში ტრანსამინაზების აქტივობაზე;
3. Con-A ინდუცირებული მსუბუქი ჰეპატიტის დროს კასპაზების (3, 8) აქტიურობისა და მათზე იმუნომამოძღვლატორების გავლენის შესწავლა;
4. იმუნომამოძღვლატორების გავლენის შეფასება Con-A ინდუცირებული მსუბუქი ჰეპატიტის დროს ღვიძლში განვითარებულ ჰისტოლოგიურ ცვლილებებზე;
5. იმუნომამოძღვლატორების გავლენის შესწავლა Con-A ინდუცირებული მსუბუქი ჰეპატიტის დროს სისხლში განვითარებული ოქსიდაციური პროცესების მაჩვენებლებზე (ოქსიდანტური და ანტიოქსიდანტური სისტემის შეფასება).

კვლევის მეცნიერული სიახლე: წინამდებარე ნაშრომში პირველად დადგინდა, რომ მსუბუქი ფორმის ჰეპატიტის დროს ღვიძლში ძლიერდება კასპაზა 3 და 8-თ წარმოებული აპოპტოზი.

დადგინდა, რომ იმუნომამოძღვლატორების გამოყენება Con-A ინდუცირებული მსუბუქი ჰეპატიტის დროს ღვიძლს იცავს პათოლოგიური ცვლილებების განვითარებისაგან. ამასთანავე, პლაფერონი ლბ ღვიძლის ქსოვილში განვითარებული ცვლილებების სწრაფ აღდგენას უზრუნველყოფს.

პირველად იქნა ნაჩვენები, რომ მსუბუქი ჰეპატიტის დროს პლაფერონი ლბ ზრდის კასპაზების 3, 8 აქტიურობას და ამით ხელს უწყობს დაზიანებული უჯრედების მოცილებას აპოპტოზის გზით. დაზიანებული უჯრედების მოშორება კი, თავის მხრივ, აღკვეთს დაავადების ქრონიზაციის შესაძლებლობას.

ნაშრომის პრაქტიკული ღირებულება: წინამდებარე ნაშრომის შედეგებმა გამოავლინა პლაფერონი ლბ-ს პროაპოპტოზური თვისება და ცხადყო მისი მოქმედების ზოგიერთი მოლეკულური მექანიზმი, რაც საფუძვლად დაედება მის გამოყენებას არამარტო მწვავე ვირუსული ჰეპატიტების, არამედ, ღვიძლის ქრონიკული ინფექციის დროს.

დაცვაზე გამოტანილი ძირითადი დებულებები:

- მსუბუქი ჰეპატიტის ექსპერიმენტულ მოდელში პლაფერონი ლბ-ს გამოყენება აჩქარებს ღვიძლში რეგენერაციული პროცესების განვითარებას.
- პლაფერონი ლბ-ს გამოყენება Con A-ინდუცირებული მსუბუქი ჰეპატიტის ექსპერიმენტულ მოდელში ზრდის ჰეპატოციტებში კასპაზების (3 და 8) აქტიურობას ღვიძლის ნორმალური მორფო-ფუნქციური მდგომარეობის აღდგენის პერიოდში.

- პლაფერონი ლბ ექსპერიმენტის სხვადასხვა ვადაზე სისხლში აზოტის ოქსიდის შემცველობაზე განსხვავებულად მოქმედებს.
- ექსპერიმენტული მსუბუქი ჰეპატიტის დროს იმუნომოდულატორების გამოყენება სისხლში გლუტათიონრედუქტაზას ღონეს არეგულირებს.

ნაშრომის აპრობაცია:

დისერტაცია აპრობირებულია საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის სამედიცინო ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტში ბიომედიცინისა და ბიოტექნოლოგიის განყოფილებების გაფართოებულ სხდომაზე 2006 წლის 3 მაისს. დისერტაცია რეკომენდირებულია საჯარო დაცვისათვის.

დისერტაციის ძირითადი დებულებები მოხსენებულია:

I საერთაშორისო კონფერენცია – “სამედიცინო რეაბილიტაცია და რაიტოთერაპია” (თბილისი, 20-24 ივნისი, 2006). III საერთაშორისო კონგრესი: თანამედროვე პრობლემები ალერგოლოგიაში, იმუნოლოგიაში და სამედიცინო ბიოტექნოლოგიაში (თბილისი, 24-26 სექტემბერი, 2006).

დისერტაციის მოცულობა და სტრუქტურა:

დისერტაცია წარმოდგენილია ნაბეჭდი ტექსტის 101 გვერდზე. შეიცავს შესავალს, ლიტერატურის მიმოხილვას, მასალისა და მეთოდების აღწერას, საკუთარ გამოკვლევებს, კვლევის შედეგების ანალიზს, დასკვნებს, პრაქტიკულ რეკომენდაციებს და გამოყენებული ლიტერატურის სიას. ნაშრომი გაფორმებულია 2 სქემით, 1 ცხრილით, 6 დიაგრამით და 13 სურათით. ლიტერატურის სია წარმოდგენილია 185 დასახელებით (მათ შორის 10 ქართულენოვანი და 175 ინგლისურენოვანი წყაროთ).

პლევრის მასალა და მეთოდები

ექსპერიმენტი ჩატარდა 20-25 გრ მასის მქონე 50 ზრდასრულ თაგვზე. ნაექსპერიმენტო ცხოველები ერთნაირ პირობებში იმყოფებოდნენ.

ღვიძლის იმუნური დაზიანების ექსპერიმენტული მოდელი

ჰეპატიტის ექსპერიმენტული მოდელის შესაქმნელად 50 თაგვში ინტრაპერიტონეალურად შეყვანილი იქნა ბუნებრივი მიტოგენი კონკანავალინ-A (Con-A) 2მგ/კგ წონაზე გადაანგარიშებით. ექსპერიმენტული ცხოველები დაეყავით 3 ჯგუფად. Con-A-ს შეყვანიდან 1 სთ-ის შემდეგ ცხოველებს ერთხელ კუნთში უკეთდებოდა: 1. 0.2 მლ ფიზიოლოგიური ხსნარი (საკონტროლო I ჯგუფი), 2. პლაფერონი ლბ (0.25მგ/კგ-ზე) (II ჯგუფი); 3. დექსამეტაზონი – 4 მგ/კგ-ზე (III ჯგუფი). ექსპერიმენტის დაწყებიდან 8, 24 და 48 საათის შემდეგ ეთერით გაბრუნებულ თაგვებს ვკლავდით ცერვიკალური დისლოკაციის მეთოდით. გამოსაკვლევად ვიღებდით ღვიძლს და სისხლს. ღვიძლს მორფოლოგიური კვლევისა და ჰეპატოციტების ფუნქციური მდგომარეობის შესასწავლად, სისხლს კი - ბიოქიმიური გამოკვლევებისთვის.

მორფოლოგიური მეთოდი

სინათლის მიკროსკოპული კვლევისათვის ექსპერიმენტულ მასალას (ღვიძლი) ფიქსაციისათვის ვათავსებდით ფორმალინის 10%-იან ხსნარში, ვაუწყლოვდით აღმაჯალი კონცენტრაციის სპირტებში და ვაყალიბებდით პარაფინში. როტაციულ მიკროტომზე დამზადებულ 2-5 მკმ სისქის ანათლებს ვღებავდით ჰემატოქსილინ-ეოზინით.

primary role. In acute liver injury, excessive apoptosis of hepatocytes causes development of fulminant liver failure and coma (Gremion et al., 2004; Kountouras et al., 2003), whereas its deficiency induces malignant transformation, viral latency and autoimmune disorders (Solary et al., 1996). By eliminating infected hepatocytes via apoptosis, the organism seeks to block and safeguard against the viral infection. However, the viral genome codes for proteins which are capable of inhibiting the apoptotic process, and enables the virus to escape the immune response. For instance, the HCV core protein regulates apoptotic process by either enhancing or inhibiting it.

Pharmacological substances that either inhibit or stimulate apoptosis, regulate production and activation of type I cytokines and/or stimulate activities of type II cytokines serve as potential tools for prophylaxis and treatment of liver injury (Okamoto et al., 1998; Hershkoviz et al., 1999; Okamoto, Kanda, 1999; Okamoto et al., 2000).

Plaferon LB is a mixture of peptides derived from the human placenta. Its effects on proliferative activity of HBs antigen stimulated lymphocytes in HBV patients depend on the stage of the disease progression. In the acute or chronic phases the drug respectively inhibits or enhances the process. Plaferon LB influences on the synthesis of cytokines, such as IL-1, IFN- γ , TNF- α and IL-4 (T. Chikovani et al., 1999). The above said made us believe that Plaferon LB could be effective in mild liver injury.

Concanavalin A (Con A) induced liver injury is a widely used experimental model of autoimmune hepatitis (Tiegs et al., 1992; Louis et al., 1997; Kato et al., 2001). Con-A causes infiltration of CD4+ T lymphocytes in liver and increases expression of CD95L, which in turn promotes development of cytotoxicity. Besides, TH1/TH2 cytokines play a crucial role in Con-A-induced hepatitis (Ksontini et al., 1998; Tiegs, 1997; Trautwein et al., 1998; Kimura et al., 1999).

In order to study the role of apoptosis in mild liver injury we used an experimental model of Con-A-induced mild hepatitis. The same model was applied to the study of effects on apoptosis by immunomodulatory drugs Plaferon LB and dexamethasone.

One hour following the Con-A injection, the mice were injected intramuscularly Plaferon LB, 0.9% physiological solution or the control drug (dexamethasone). Observations of the effects were made at three time points: 8, 24 and 48 hours after the induction of the hepatitis. The materials (liver, blood) taken at these points were analyzed with biochemical, immunohistochemical and immunological methods.

Results of the analysis showed that at the first time point (8hr) the level of ALT in the blood of the control mice appeared increased (Diag. 1). Regarding the mice treated with dexamethasone and Plaferon LB, ALT levels of both were similar and did not differ statistically significantly from the ALT level in the control group.

At the second time point (24hr), while difference between blood ALT levels of the control and the treated mice was not statistically significant, they all grew compared to the first time point. At the third time point (48hr), the trend of the ALT growth was sustained in the control group, whereas in dexamethasone-treated mice the trend had reversed and Plaferon LB-treated mice the parameter decreased in a statistically significant manner ($p < 0.01$).

Considering the above, the healing effects of Plaferon LB appeared to be stronger than those of dexamethasone. These data speak in favor of the assumption that at the end of the observation period Plaferon LB seems to have accelerated recovery of normal liver structure.

The biochemical results were confirmed by the morphological analysis. 8hr following the Con-A injection, the liver of the mice displayed changes characteristic of inflammation. A bigger part of the hepatocytes was undergoing vacuolar dystrophy. Furthermore, a few sites of focal necrosis were also visible. Cytoplasm of necrotic hepatocytes painted sharply eosinophilic. Liver parenchyma contained sites of lymphoid cell infiltration. The infiltration was most intensive at the portal spaces.

Under the influence of dexamethasone, 8hr following its injection most hepatocytes underwent vacuolar dystrophy but core trabecular structure of the lobes. Lymphoid infiltration of the portal spaces was insignificant. Sludge phenomenon showed up weakly. The shape of erythrocytes was mostly

marked deoxynucleotides at 37 degrees for 1 hour. The reaction was blocked by washing buffer. The finished samples were examined under the light microscope.

Measurement of NO and activity of glutathione reductase in serum

NO in the serum was measured by a microplate assay using Griess reagent, which produces a chromophore with the nitrite. Briefly, 100 µl of supernatants were removed and incubated with 100 µl of Griess reagent in a 96-well plate. The plate was incubated for 10 min at room temperature. Nitrite production was quantified spectrophotometrically using an automated colorimetric procedure. Absorbance at 540 nm was measured using a microplate reader (Multiscan, Lab Systems, Finland). All samples were assayed in triplicate.

Analysis of serum GR activity was performed by using glutathione reductase assay kit (Sigma-Aldrich, USA). The activity can be measured by the increase in absorbance caused by the reduction of DTNB [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)] at 412 nm (Colorimetric assay).

Mitochondrial function assessment by MTT

Mice were killed by cervical dislocation. Livers were removed in sterile conditions and hepatocytes were isolated. Then the cells were suspended in RPMI-1640 medium at a concentration of 1×10^6 cell/ml. The cell suspension was (10×10^3) seeded to a 96-well culture plate simultaneously. The cultures were incubated at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ for 2h. Two hours before completion, 10 µl of MTT (5 g/L) was added to each well. The absorbance was measured on microplate reader (Multiscan, lab systems, Finland).

Assessment of caspase-3 and caspase-8 levels in hepatocytes

Both caspase-3 and caspase-8 activities were determined with caspase assay kits (Biovision, USA) according to manufacturer's instructions. Liver samples were homogenized in caspase lysis buffer. Briefly, homogenates were incubated with either caspase-3 (Ac-DEVD) or caspase-8 (Ac-IETD) substrate that is linked to *p*-nitroaniline (*p*NA) at 37°C. Cleavage of the substrate by caspase will release *p*-NA that is then determined by a spectrophotometer (Multiscan, Lab systems, Finland) at 405 nm, and the optical density of the released *p*-NA is proportional to caspase activity present in homogenates. The optical density reading during 90-minute incubation at 37°C was taken every 5 minutes with respective calculation of caspase activity. The data was expressed as $M \pm SD$, and $P < 0.05$ was considered to be significant.

Analysis of serum ALT activity

Blood samples were obtained by puncture of heart with heparin. Liver specimen was fixed immediately in formalin for histological examination with HE stain. The degree of liver injury was assessed by determination of serum alanine aminotransferase (ALT) activity (Sigma). The optical density was measured at 530nm. The data expressed as $M \pm SD$, and $P < 0.05$ was considered to be significant.

Statistical Analysis

The data were analysed by using Statistica 6.0 (Statsoft, Mineapolis, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Viral hepatitis is the gravest problem in hepatology. In terms of prevalence rates, severity of complications, lethality rates and chronization, Hepatitis B (HBV) and C (HCV) stand out of the range. Yearly Hepatitis B kills 2 mln people worldwide. According to the WHO estimates, in the next 10-20 years, the death toll of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma resulting from chronic Hepatitis C will rise by 60-68%.

It is known that both – Hepatitis B and C - viruses are hepatotropic but not directly cytopathic (Lok et al., 2001; Liang et al., 2000). According to epidemiological studies, 80-85% of persons with HCV cannot be gotten rid of virus fully. This factor subsequently leads to the development of chronic hepatitis (Liang et al., 2000; Lauer et al, 2001). In this regard, apoptosis of hepatocytes may play a

დეიდში აპოპტოზის შეფასება TUNEL-ის მეთოდით

ჰეპატოციტების აპოპტოზი ფასდებოდა დნმ-ის ფრაგმენტაციით ტერმინალური დეოქსინუკლეოტიდილ ტრანსფერაზაზე-დამოკიდებული (ტდტ) dUTP-ბიოტინის (TUNEL) მონიშვნის მეთოდის გამოყენებით. ყველა საფეხური სორციელდებოდა თანდართული სქემის მიხედვით. პარაფინში ჩაყალიბებული, როტაციულ მიკროტომზე დაჭრილი 5-მიკრონიანი ანათლების დეპარაფინიზაციისა და რეჰიდრაციის შემდეგ ინკუბაცია მიმდინარეობდა პროტეინაზა K-ით (20მგ/მლ 100mM და 50 mM ელტა) 25°C-ზე. შემდეგ ყველა ანათალი ირეცხებოდა დისტილირებული წყლით, ანათლები ინკუბირდებოდა ბუფერში 5წთ. შემდეგ ემატებოდა ტდტ და ბიოტინმონიშნული დეოქსინუკლეოტიდების თანაობისას ტენიან ყუთში მიმდინარეობდა ინკუბაცია 1 საათით 37C-ზე. რეაქციის შეწყვეტა ხდებოდა გამრეცი ბუფერის საშუალებით. მონიშნული სლაიდების დათვალიერება ხდებოდა სინათლის მიკროსკოპში.

აზოტის ოქსიდისა და გლუტათიონ რედუქტაზას აქტიურობის განსაზღვრა

სისხლის შრატში აზოტის ოქსიდის რაოდენობა ფასდებოდა არაპირდაპირი მეთოდით გრისის რეაქტივის გამოყენებით, რომელიც წარმოქმნის ქრომოფორს ნიტრიტთან ურთიერთქმედების შედეგად. შრატისა და გრისის რეაქტივის თანაბარ რაოდენობას ერთად ვაინკუბირებდით 10წთ-ის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე. ნიტრიტის კონცენტრაცია ფასდებოდა სპექტროფოტომეტრულად მულტისკანზე (Multiscan, Lab Systems, ფინეთი). აბსორბცია ისაზღვრებოდა 540ნმ ტალღის სიგრძეზე. ყველა ნიმუში კეთდებოდა ტრიპლიკეტში.

გლუტათიონრედუქტაზას აქტიურობის განსაზღვრა ხდებოდა გლუტათიონ რედუქტაზას ნაკრების საშუალებით (Sigma-Aldrich, USA). აქტიურობა იზომებოდა აბსორბციის ზრდის ცვლილებით DTNB [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)] სუბსტრატის დამატებისას 412ნმ ტალღის სიგრძეზე.

ჰეპატოციტების გამოყოფა და მათი მიტოქონდრიული აქტიურობის შესწავლა

ტეტრაზოლიუმზე დაფუძნებული კოლორიმეტრიული - MTT ტესტი

დეიდლის ჰომოგენიზაციისა და გარეცხვის შემდეგ ვამზადებდით ჰეპატოციტების კულტურას. უჯრედთა სუსპენზიას (1 მლნ/მლ) ვათავსებდით სინჯარებში. შემდეგ ჰეპატოციტების სუსპენზიას 150 მკლ რაოდენობით ვასხამდით 96-ფოსლიან ბრტყელძირიან მიკროპლანშეტის ფოსლებში (Libro Plastics). ექსპერიმენტის ყოველ ვარიანტში ცდა და კონტროლი სრულდებოდა 3 ფოსოში. შემდეგ მიკროპლანშეტის ინკუბირებას ვახდენდით თერმოსტატში 100% ტენიანობის, ჰაერში ნახშირორჟანგის 5%-იანი შემცველობისა და 37°C ტემპერატურის პირობებში 4 საათის განმავლობაში.

თითოეულ ფოსოს ვუმატებდით 10მკლ MTT-ის დიმეთილთიაზოლილ დიფენილ ტეტრაზოლიუმ ბრომიდის, Sigma) ახლად მომზადებულ ხსნარს (5 მგ რეაქტივი 1მლ ფოსფატური ბუფერის მარილხსნარზე).

შემდეგ პლანშეტს საინკუბაციოდ ვდგამდით 1 სთ-ით 37°C ტემპერატურაზე CO₂ ინკუბატორში. ფორმაზანის კრისტალების წარმოქმნის შემდეგ, სუპერნატანტს ფრთხილად ავიწოვდით და თითოეულ ფოსოში ვუმატებდით 100მკლ 10%-იან ნატრიუმდოდეცილსულფატს. შედეგების წაკითხვას ვახდენდით მულტისკანის საშუალებით 540-570ნმ ტალღის სიგრძეზე.

ჰეპატოციტებში კასპაზების აქტიურობის განსაზღვრა

კასპაზა 3 და კასპაზა 8-ს აქტიურობის განსაზღვრა ხდებოდა კოლორიმეტრული ნაკრების საშუალებით მწარმოებლის ინსტრუქციის მიხედვით, ჰეპატოციტების სუსპენზიას ვუმატებდით ლიზისურ ბუფერს. შემდეგ ემატებოდა კასპაზა-3-ის (Ac-DEVD) ან 8-ს (Ac-IETD) სუბსტრატი, რომელიც დაკავშირებული იყო *p*-nitroanilline-თან და ვაინკუბირებდით 37°C-ზე 90 წუთით. სპექტროფოტომეტრზე (Multiscan, Labsystems, Finland) ვსაზღვრავდით ოპტიკურ სიმკვრივეს 405ნმ ტალღის სიგრძეზე. გამოყოფილი ნიტროანილინის რაოდენობა ჰომოგენატში კასპაზების აქტიურობის პირდაპირპროპორციულია. ოპტიკური სიმკვრივის გაზომვა ხდებოდა ყოველ 5 წუთში და გამოთვლილი იქნა შესაბამისად საშუალო და სტანდარტული გადახრა.

ALT-ს განსაზღვრის სპექტრომეტრიული მეთოდი

სისხლში ალანინამინოტრანსფერაზას (ALT) აქტიურობას ვსწავლობდით სპექტროფოტომეტრიული მეთოდით. ამისათვის თავიდან ვიღებდით სისხლს, ვაცენტრიფუგირებდით (3000 გ, 15 წთ), რის შემდეგაც მიღებულ სისხლის შრატს (0.05 მლ) ვუმატებდით 0.25 მლ ALT-ს სტანდარტულ სუბსტრატს. ამის შემდეგ ვახდენდით ინკუბირებას 37°C ტემპერატურაზე 60 წთ-ის განმავლობაში, ვუმატებდით 0.25 მლ 2,4-დინიტროფენილჰიდრაზინის ხსნარს. მიღებულ სინჯს ვურევედით და ვტოვებდით 20 წთ-ის განმავლობაში 22°C ტემპერატურაზე. ამის შემდეგ ვუმატებდით 2.5 მლ NaOH-ის ხსნარს, ვტოვებდით 10 წთ-ის განმავლობაში და ოპტიკურ სიმკვრივეს ვზომავდით 530 ნმ ტალღის სიგრძეზე. ALT-ს კონცენტრაციას ვსაზღვრავდით სტანდარტული გრაფიკის საშუალებით.

მასალის სტატისტიკური დამუშავება

მასალა დამუშავდა სტატისტიკური პროგრამის Statistica 6.0 (Statsoft, Mineapolis, USA) გამოყენებით.

Primary conclusions submitted to the defence

- In the experimental model of mild hepatitis, administration of Plaferon LB accelerates regenerative processes in the affected liver.
- In the experimental model of Con-A-induced mild hepatitis, administration of Plaferon LB enhances levels of caspase-3 and -8 when liver recovers to its normal morpho-functional status.
- At various stages of the experiment, Plaferon LB has varied effects on plasma NO levels.
- In experimental mild hepatitis, administration of immunomodulators modulates levels of glutathione reductase in blood.

Approbation of the research work

The dissertation is approbated on the expanded session of Biomedicine and Biotechnologies divisions of the Institute of Medical Biotechnologies on 3 May, 2006. The dissertation is recommended for its public defence.

Key conclusions of the dissertation were reported to:

The 1st international conference on “Medical Rehabilitation and Ridetherapy”, Tbilisi, 20-24 June, 2006. The III international conference on “Modern problems in allergology, immunology and Medical Biotechnology”, Tbilisi, 24-26 September, 2006.

Publications: 6 papers have been published

Size and structure of dissertation:

The dissertation has 101 printed pages. It is divided in Introduction, Literature Review, Materials and methods, Own Research, Research Result Analysis, Conclusions, Practical Recommendations and References. It contains 1 table, 6 diagrams and 13 figures. The references section lists 185.

MATERIALS AND METHODS

The experiment involved 50 adult mice each weighing 20-25g. All of the mice were grown in similar conditions.

Experimental model of liver immune injury

Acute liver injury was induced by injecting Con A (Serva, USA) 2.5 mg/kg via the tail vein. 15 min after the injection the mice were divided into three groups: I group (15 mice) - 0.2 ml of saline solution; II group (15 mice) - 0.25 mg/kg of Plaferon LB; and III group (15 mice) - 4 mg/kg of dexamethasone. All these injections were intramuscular. After 8, 24, 48 hours following the administration of Con A, the mice were bled, euthanized with chloral hydrate anaesthesia, their abdomens opened by a midline incision, and sections from the liver were excised for histopathologic examination.

Morphological methods

To investigate under the light microscope, the experimental material (liver) was first fixed in 10% formaldehyde solution, then dehydrated in upscale concentrations of alcohol and finally embedded in parafin. 2-5 micrometre slices made on the rotation microtome were stained in H&E.

Analysis of Apoptosis in Liver by TUNEL technique

Hepatocyte apoptosis was analyzed by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) technique. All the steps were undertaken according to the instructions accompanying the kit. 5-micrometre slices fixed in parafin and cut via the rotation microtome were deparafinated and rehydrated. Then the material was incubated with protease K (100 mM of 20mg/ml and 50ml of EDTA) at 25 degrees by Celsius. All the slices were washed in distilled water and incubated again for 5 min. Next, TDT was added before the incubation in humid box with biotin-

selectively kill malignant cells in tumors, have the potential to provide a powerful tool for the treatment of liver disease.

Due to peculiarities associated with pathogenesis of acute viral hepatitis, several authors give preferences to drugs of immunotropic and antioxidant nature for the treatment of the disease (Schwarz, 1996; Zein et al., 1998; Metreveli, 1999; Pavliashvili, 1999). Considering this, we were interested to study immunomodulatory drugs such as Plaferon LB.

Plaferon LB was developed by Prof. Vladimer Bakhtashvili at the Institute of Medical Biotechnology. Together with the immunomodulatory effects, this drug exhibits anti-inflammatory, anti-ischemic and antioxidant qualities (Chikovani, 1997; Chavchanidze, 1999; Rukhadze, 1999; Gongadze, 2004). In various pathologies, it turned out to protect liver against metabolic and morphological changes (Pashalashvili, 1995; Pavliashvili, 1999; Rukhadze et al., 1998; Chikovani et al., 1999). Even more, Plaferon LB anti-apoptotic effects of has also been indicated elsewhere. The exact mechanisms of the drug hepatoprotective effects however remain to be studied.

Presently, various experimental models are employed in studies of liver immune injury mechanisms. Con-A-induced liver injury is identical to clinical liver injury (Tiegs et al., 1992), and it is widely used in studies of the disease pathogenesis and the search of new ways for treating hepatitis.

Considering all the above said, we saw it reasonable to study the role of apoptosis in the experimental model of Con-A-induced mild hepatitis, and the mechanism of influence that immunomodulatory drugs have on it.

Aim of the study

The aim of our research consisted in the study of the apoptotic changes and immunomodulatory effects on them in experimental mild hepatitis.

To achieve the goal, we set the following specific tasks:

1. Development of the Con-A induced experimental mild hepatitis model (identification of the optimal Concanavalin A dose range judging by changes in transaminase levels);
2. Investigation of effects of immunomodulators (Plaferon LB, dexamethasone) on plasma transaminase levels in Con-A induced experimental mild hepatitis;
3. Study of caspase-3 and caspase-8 activities and effects of the immunomodulators on them in Con-A induced experimental mild hepatitis;
4. Analysis of contribution of the immunomodulators to liver histological changes induced in Con-A induced experimental mild hepatitis;
5. Study of effects of the immunomodulators on oxidative processes in Con-A-induced experimental mild hepatitis (assessment of certain parameters of the oxidant/anti-oxidant system).

Novelty of the research

The present study showed first time that the mild form of hepatitis entails enhanced caspase-3 and -8-mediated apoptosis.

It has been found that the use of immunomodulators in Con-A-induced mild hepatitis prevents pathological aberrances in liver. At the same time Plaferon LB facilitates fast mitigation of alterations occurring in these tissues prior to treatment.

It has been shown first time that in mild hepatitis Plaferon LB increases levels of caspases -3 and -8 meaning that the drug augments removal of impaired cells through apoptosis. In this way, the cell disposal prevents the disease from turning chronic.

Practical significance of the research

The results of the present study indicated pro-apoptotic activities of Plaferon LB and clarified certain molecular mechanisms of its activities. The findings are expected to serve as a basis for its application in the treatment of acute viral hepatitis, as well as chronic liver infections.

მიღებული შედეგები და მათი განხილვა

ვირუსული ჰეპატიტები ჰეპატოლოგიის უმნიშვნელოვანეს პრობლემას წარმოადგენს. ფართო გავრცელების, მიმედ გართულებების, მაღალი ლეტალობისა და ქრონიზაციის გამო B და C ჰეპატიტებს განსაკუთრებული მნიშვნელობა ენიჭებათ. ყოველწლიურად B ჰეპატიტისგან 2 მლნ ადამიანი იღუპება. ჯანდაცვის მსოფლიო ორგანიზაციის მონაცემებით, 10-20 წელიწადში ქრონიკული C ჰეპატიტით გამოწვეული ღვიძლის ციროზითა და ჰეპატოცელულარული კიბოთი დაავადებულთა რიცხვი დაახლოებით 60-68%-ით მოიმატებს.

ცნობილია, რომ ორივე – ჰეპატიტი B და C - ვირუსი ჰეპატოტროპულია, თუმცა ისინი პირდაპირი ციტოპათოლოგიით არ გამოირჩევა (Lok et al., 2001; Liang et al., 2000). ეპიდემიოლოგიური კვლევების მიხედვით, HCV ვირუსით ინფიცირებულების 80-85%-ში ვერ ხერხდება ვირუსის სრული ელიმინაცია, რაც შემდგომში ქრონიკული ჰეპატიტის განვითარებას უწყობს ხელს (Liang et al., 2000; Lauer et al., 2001). ჰეპატოციტების ლიზის ორგანიზმის იმუნური პასუხის სიძლიერეზე დაამოკიდებული. ამ მხრივ წამყვანი როლი ჰეპატოციტების აპოპტოზს ენიჭება. ღვიძლის მწვავე დაზიანებისას ჰეპატოციტების აპოპტოზის სიჭარბე ღვიძლის ფუნქციური უკმარისობისა და კომის საფუძველი ხდება (Gremion et al., 2004; Kountouras et al., 2003), მისი დეფიციტი კი ავთვისებიანი ტრანსფორმაციის, ვირუსული ლატენტური მიმდინარეობისა და აუტომუნური დაავადებების განვითარებას განაპირობებს (Solary et al., 1996). ინფიცირებული ჰეპატოციტების აპოპტოზის საშუალებით ორგანიზმი ვირუსული ინფექციის ბლოკირებასა და მისგან თავდაცვას ახერხებს. ვირუსული გენომი აკოდირებს ცილებს, რომლებიც აპოპტოზური პროცესის დათრგუნვას იწვევს და ამით თავს ადწვევს იმუნური პასუხისგან. ასე მაგალითად, HCV ვირუსის core პროტეინი აპოპტოზური პროცესის რეგულაციას ახდენს მისი გაძლიერების ან ინჰიბირების გზით.

ისეთი ფარმაკოლოგიური ნივთიერებების გამოვლენა, რომლებიც აპოპტოზის დათრგუნვას ან სტიმულაციას, აგრეთვე I ტიპის ციტოკინების პროდუქცია/აქტიურობას არეგულირებენ და/ან II ტიპის ციტოკინების მოქმედებას ასტიმულირებენ, ღვიძლის იმუნური დაზიანების პროფილაქტიკისა და მკურნალობისათვის პოტენციურ კანდიდატებს წარმოადგენენ (Okamoto et al., 1998; Hershkovitz et al., 1999; Okamoto, Kanda, 1999; Okamoto et al., 2000).

პლაფერონი ლბ ადამიანის პლაცენტიდან მიღებული პეპტიდების ნარევი. მისი ეფექტი HBV ინფექციის მქონე პაციენტების HBs ანტიგენით სტიმულირებელი ლიმფოციტების პროლიფერაციულ აქტიურობაზე დაავადების ფაზაზე დაამოკიდებული. დაავადების მწვავე ფაზაში იგი აღნიშნულ მანევრებელს თრგუნავს, ხოლო ქრონიკულ ფაზაში კი ზრდის. პლაფერონი ლბ გავლენას ახდენს ციტოკინების: ინტერლეიკინ-1-ის, ინტერფერონ გამას, სიმსივნის ნეკროზის ფაქტორი-ალფასა და ინტერლეიკინ-4-ის სინთეზზე (Chikovani et al., 1999). ყოველივე ზემოთთქმულმა გვაფიქრებინა, რომ პლაფერონი ლბ ღვიძლის მსუბუქი იმუნური დაზიანების შემთხვევაში ეფექტური უნდა ყოფილიყო.

კონკანავალინ A-თი (Con A) გამოწვეული ღვიძლის დაზიანება აუტომუნური ჰეპატიტის ფართოდ გავრცელებულ ექსპერიმენტულ მოდელს წარმოადგენს (Tiegs et al., 1992; Louis et al., 1997; Kato et al., 2001). კონკანავალინ A-ს ზემოქმედებით ღვიძლში CD4⁺ T ლიმფოციტები გროვდება და CD95L-ის ექსპრესია იზრდება, რომელიც, თავის მხრივ, ციტოტოქსიურობის განვითარებას განაპირობებს. გარდა ამისა, Con A-ინდუცირებული ჰეპატიტის განვითარებაში გადამწყვეტ როლს ასრულებენ TH1/TH2 ტიპის ციტოკინები (Ksontini et al., 1998; Tiegs et al., 1997; Trautwein et al., 1998; Kimura et al., 1999).

ღვიძლის მსუბუქი დაზიანების დროს აპოპტოზის როლის შესასწავლად Con A-ინდუცირებული მსუბუქი ჰეპატიტის ექსპერიმენტული მოდელი გამოვიყენეთ. ამავდროულად შევისწავლეთ აპოპტოზის მიმდინარეობაზე პრეპარატების – პლაფერონი ლბ-ს და დექსამეტაზონის – გავლენა.

Con A-ს შეყვანიდან 1 სთ-ის შემდეგ თავგების კუნთში შეგვყავდა პლაფერონი ლბ, ფიზიოლოგიური ხსნარი ან დექსამეტაზონი. დაკვირვებას ვახდენდით ექსპერიმენტის 3 ვადაზე: ჰეპატიტის ინდუცირებიდან 8, 24 და 48 საათის შემდეგ. აღნიშნულ ვადებზე აღებულ მასალას (ღვიძლი, სისხლი) ბიოქიმიური, იმუნოჰისტოქიმიური და იმუნოლოგიური მეთოდებით ვიკვლევდით.

როგორც გამოკვლევის შედეგების ანალიზმა ცხადყო, დაკვირვების I ვადაზე (8 სთ) ALT-ს დონე საკონტროლო თავგების სისხლში მატულობს. რაც შეეხება დექსამეტაზონით და პლაფერონით ნამკურნალებ თავგებს, მათ სისხლში ALT-ს დონე ორივე შემთხვევაში ერთნაირია და იგი საკონტროლო ჯგუფის ცხოველების ანალოგიურ მონაცემთან შედარებით სტატისტიკურად სარწმუნოდ არ განსხვავდება.

დაკვირვების II ვადაზე (24 სთ) საკონტროლო და ნამკურნალები თავგების სისხლში ALT-ს დონე მატულობს I ვადის შესაბამის მონაცემებთან შედარებით და ამასთან ერთმანეთისგან სტატისტიკურად სარწმუნოდ არ განსხვავდება. დაკვირვების III ვადაზე (48 სთ) საკონტროლო თავგების სისხლში ALT-ს დონის მატების ტენდენცია შენარჩუნებულია, დექსამეტაზონით ნამკურნალებ თავგებში აღინიშნება კლების ტენდენცია, ხოლო პლაფერონი ლბ-ს ზემოქმედებით აღნიშნული მაჩვენებელი სტატისტიკურად სარწმუნოდ კლებულობს ($p < 0,01$).

აღნიშნულიდან გამომდინარე, პლაფერონი ლბ-ს სამკურნალო ეფექტი დექსამეტაზონთან შედარებით უფრო ძლიერადაა გამოხატული. აღნიშნული მონაცემები იმის სასარგებლოდ მეტყველებს, რომ დაკვირვების ბოლო ვადისათვის პლაფერონი ლბ ღვიძლის სტრუქტურის აღდგენით პროცესებს უნდა აჩქარებდეს.

ბიოქიმიური კვლევის შედეგები ღვიძლის მორფოლოგიურმა გამოკვლევამაც დაადასტურა. Con-A-ს ინექციიდან 8 სთ-ის შემდეგ თავგების ღვიძლში მწვავე ანთებისათვის დამახასიათებელი მორფოლოგიური ცვლილებები აღინიშნება. ჰეპატოციტების დიდი ნაწილი ვაკუოლურ დისტროფიას განიცდის. ამასთან ერთად, ფოკალური ნეკროზის კერებიც გვხვდება. ნეკროზული ჰეპატოციტების ციტოპლაზმა მკვეთრად ეოზინოფილურია. ღვიძლის პარენქიმაში ლიმფოციტური რიგის უჯრედების ინფილტრატები გვხვდება. ინფილტრაცია განსაკუთრებით ინტენსიურია პორტულ სივრცეებში.

GENERAL CHARACTERISTICS OF THE STUDY

Importance of the subject

At the beginning of XXI century, despite remarkable advancements in medicine human viral hepatitis remains as a severe global problem. According to the World Health Organization (WHO), the number of people suffering from viral hepatitis is on the continuous rise and tops 1 billion. Furthermore, almost one third of the world population has been or is infected with various types of hepatitis. Every year up to 2 mln people die from this disease or complications associated with it.

In Georgia, in 2004 one thousand new cases of viral hepatitis B and C have been registered. 64% and 35% of the Hepatitis B cases fall on respectively acute and chronic forms. In case of Hepatitis C though, over a half of cases (app. 55%) present a chronic form. Even more, 5-7% of the population carries various hepatitis viruses.

Infection with hepatitis B and C poses two major threats for the human organism: first, in case of fulminant state (liver coma, fulminant liver), the disease has a high lethal outcome (90%); second, the process turns chronic and eventually ends in liver cirrhosis or hepatocellular carcinoma. In 80% of cases of infection with both Hepatitis B and D hepatitis becomes fulminant.

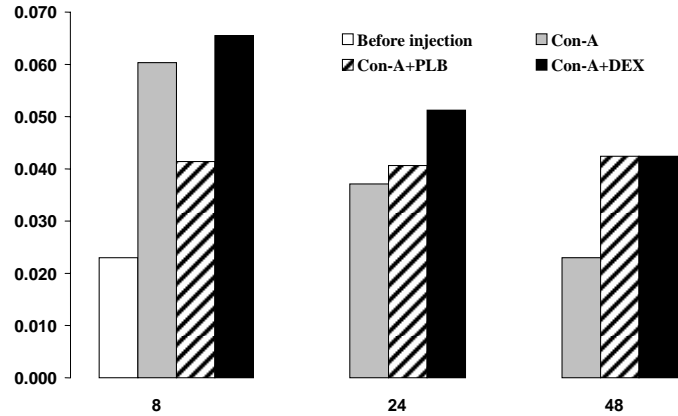
According to international leading hepatology centres, the risk of HBV infection becoming fulminant is seen in 80% of infection cases (Grob et al., 1998). As the data by the WHO indicate, potential of the disease chronization is fairly high. Around 2 mln people are estimated to have suffered from and another 350 mln is infected with B Hepatitis. Among those with chronic form, 25% turns into hepatocellular carcinoma (Alter et al., 1995). Today more than 1mln persons in the world die from hepatocellular carcinoma. One of the reasons for the chronic HBV infection persistence is the fact that 100% of hepatocytes become infected, and infected cells are not cleared off the liver.

Recovery from acute viral hepatitis is a very long tedious process. This is especially true for Hepatitis C with its most complicated course of development. Currently more than 300 mln worldwide suffer from Hepatitis C (Alter, 1995). Chronic HCV infection develops in up to 80% of cases and, of these, it progresses to cirrhosis in 50% of cases. What is more, some times chronic hepatitis escapes diagnosis and the disease shows up only in the cirrhosis stage. Hepatitis C patients quite often “enjoy” a false recovery evidenced by negative results of blood biochemical analyses (Scheuer et al., 1990). This phenomenon may last from few months to a number of years. This is why it is often compared to AIDS in terms of severity. Thus, effective treatment of viral hepatitis is of crucial importance.

Mechanisms of liver injury in autoimmune hepatitis and those caused by non-cytopathic viruses (HBV, HCV) are not fully studied. However, the role of T-cell mediated immune responses has been revealed recently (Ando et al., 1997). Massive elimination of infected hepatocytes by protective mechanisms of the body is what makes the illness so severe. Hence, an adequate immune response precludes virtually any chance of chronic hepatitis development. In contrast, weakness of an immune response allows mild, often asymptomatic acute phase of the disease, the state which in turn may lead to further chronization and even hepatocellular carcinoma or cirrhosis.

Quick and timely removal of the virus-infected cells via apoptosis is the key to maintenance of liver functionality. In a healthy organism, dead cells are swiftly replaced with mitotically derived new cells. This way cellular homeostasis is constantly maintained in organs. In the pathologies however, proliferation versus elimination balance is often altered and causes the onset of the liver disease. In acute injury, excessive and/or constant apoptosis can lead to liver function and reperfusion disorders. Excessive apoptosis may cause acute and chronic viral hepatitis, alcoholic and non-alcoholic hepatitis, cholestatic liver disease, Wilson’s disease, and graft versus host disease (GVHD). In contrast, insufficient apoptosis, with failure of removal of cells carrying mutated genes, and unregulated proliferation within the context of a persistent inflammatory milieu, can promote the development of liver and biliary cancer. Therefore, therapeutic strategies to inhibit apoptosis in liver injury, or

დიაგრამა 5 შრატში გლუტათიონ რედუქტაზას აქტიურობა ექსპ. მსუბუქი ჰეპატიტის დროს
Diagram 5 Activity of glutathione reductase in serum at experimental mild hepatitis



დექსამეტაზონის ზემოქმედების შედეგად ექსპერიმენტის დაწყებიდან მე-8 საათზე ჰეპატოციტების დიდი ნაწილი ვაკუოლურ დისტროფიას განიცდის, თუმცა წილაკების ძირითადი ტრაბეკულური სტრუქტურა შენარჩუნებულია. პორტული სივრცეების ლიმფოიდური ინფილტრაცია უმნიშვნელოა. თუმცა, უმეტეს შემთხვევაში ერთორციტების კონტურები შენახულია. ექსპერიმენტის ამ ვადაზე Con-A-სთან ერთად პლაფერონი ლბ-ს შეყვანის შემთხვევაშიც ჰეპატოციტების დიდი უმრავლესობა ვაკუოლურ დისტროფიას განიცდის. ამასთანავე, აღსანიშნავია, რომ წილაკის ტრაბეკულური შენება შენარჩუნებულია. ასევე იშვიათი და უმნიშვნელოა ლიმფოიდური ინფილტრაციის უბნები.

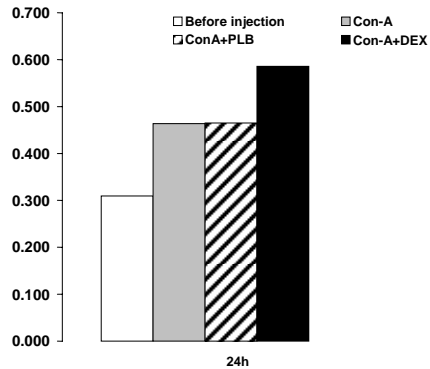
Con-A-ს შეყვანიდან 24 სთ-ის შემდეგ საკონტროლო ჯგუფის ცხოველთა ღვიძლში ცვლილებები კვლავ ინტენსიურადაა გამოხატული. ჰეპატოციტების უმეტესობა ვაკუოლურ დისტროფიასა და ნეკროზულ ცვლილებებს განიცდის. დექსამეტაზონის ფონზე მნიშვნელოვნად მატულობს ორბირთვიანი ჰეპატოციტების რაოდენობა. ამავე დროს, აღინიშნება დესტრუქციული ცვლილებების გადრმავება. პლაფერონი ლბ-ს გავლენით ჰეპატოციტების უმრავლესობა კვლავ დისტროფიულ ცვლილებებს განიცდის, მაგრამ ნეკროზული უბნები არ არის.

ექსპერიმენტის დაწყებიდან 48 სთ-ის შემდეგ საკონტროლო ჯგუფში ზოგიერთ არეში ღვიძლის ნორმალური ტრაბეკულური სტრუქტურა ვლინდება, რაც რეგენერაციული პროცესების გააქტიურებაზე მიუთითებს. ამავე ვადაზე ზოგიერთი ნორმალური ჰეპატოციტიც ჩნდება. დექსამეტაზონით მკურნალობის შემთხვევაში აღნიშნული სურათიდან მნიშვნელოვანი განსხვავება არ აღინიშნება. პლაფერონის გავლენით წილაკის ნორმული შენება ძირითადად აღდგენილია. ნეკროზული უბნები და ლიმფოიდური ინფილტრატები საერთოდ აღარ შეინიშნება.

ამგვარად, Con-A ინდუცირებული ჰეპატიტის დროს პლაფერონი ლბ და დექსამეტაზონი ღვიძლის ქსოვილს ღრმა დესტრუქციული ცვლილებების განვითარებისაგან იცავს. აღსანიშნავია ასევე, რომ პლაფერონი ლბ ქსოვილის სტრუქტურის აღდგენას აჩქარებს, რაც დექსამეტაზონის გამოყენების შემთხვევაში არ შეინიშნება.

როგორც უკვე აღვნიშნეთ, ორივე მედიკამენტი - პლაფერონი ლბ და დექსამეტაზონი - ღვიძლის ქსოვილს იმუნური დაზიანებისაგან იცავს. ცნობილია, რომ კორტიკოსტეროიდები აღნიშნულ ეფექტს ციტოკინების (ილ-1, ილ-2, ილ-6, გამა ინტერფერონისა და სიმსივნის ნეკროზის ფაქტორი ალფას) გენების ექსპრესიის დათრგუნვის გზით ახორციელებენ. სავარაუდოა, რომ პლაფერონი ლბ-ს ეფექტიც მის მიერ ციტოკინების ბალანსის შეცვლით უნდა იყოს გამოწვეული (ჩიქოვანი, 1997; Khesturiani et al., 1997), აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ იმუნომამოღულირებელი მოქმედების გარდა, პლაფერონი ლბ-ს გამოხატული ანტიოქსიდაციური და ანტიაპოპტოზური თვისებებიც აქვს. წინა კვლევებში ნაჩვენებია იქნა პლაფერონი ლბ-ს ძლიერი ანტიაპოპტოზური თვისება მწვავე მძიმე ფორმის ჰეპატიტის მოდელში და კლინიკურ გამოცდებში. კერძოდ პლაფერონი ლბ აინჰიბირებს ჰეპატოციტების აპოპტოზს LPS-ით ინდუცირებულ მძიმე ჰეპატიტის ექსპერიმენტულ მოდელში. მეტრეველის მიერ ნაჩვენებია იქნა, რომ მსუბუქი და საშუალო სიმძიმის მქონე პაციენტებში პლაფერონი ლბ-ს გამოყენება სრულ გამოჯანმრთელებას ახდენდა 96,9%-ში. უფრო მეტიც იგი მნიშვნელოვნად ამცირებდა დაავადების ქრონიზაციის შესაძლებლობას და ხელს უწყობდა პროტექტორული იმუნიტეტის ჩამოყალიბებას (მეტრეველი, 1999). ამ და სხვა კვლევების საფუძველზე, ჩვენს მიერ შემოთავაზებული იქნა ჰიპოთეზა, რომ მსუბუქი ჰეპატიტების დროს პლაფერონის დამცველობითი თვისება მის პროაპოპტოზურ უნართან არის დაკავშირებული.

დიაგრამა 6 ჰეპატოციტების სონტანური სტიმულაციის ინდექსი MTT ტესტის საშუალებით
Diagram 6 Mitochondrial activity in experimental mild hepatitis by MTT assay



ცნობილია, რომ კასპაზების გააქტიურება აპოპტოზური პროცესის დამახასიათებელი ნიშანია. აპოკალური კასპაზების რეგულაცია შეიძლება გადაწყვეტი ფაქტორი იყოს ამ პროცესში. კასპაზა 8-ის თვითგააქტიურება იწვევს კასპაზა-3-ის პირდაპირ გააქტიურებასა და Bid-ის გახლეჩვას (Li et al., 1998).

ლიტერატურული მონაცემების მიხედვით, ღვიძლის იმუნოპათოლოგიის დროს ტრანსკრიფციული მექანიზმის ფუნქციური მდგომარეობა განსაზღვრავს იმას, თუ რომელი – კასპაზა-3-ის თუ ალტერნატიული – გზით წარიმართება აპოპტოზური პროცესები. Con-A-ინდუცირებული ჰეპატიტის დროს კასპაზა-3-ის აქტიურობის შესახებ მონაცემები წინააღმდეგობრივია. კერძოდ, ერთ-ერთი კვლევის მიხედვით, კასპაზა-3-ის აქტიურობა მნიშვნელოვნად იზრდება (Ding et al, 2004). ხოლო სხვა გამოკვლევის მიხედვით, ის არ ვლინდება (Kunstle et al, 1999).

აქედან გამომდინარე, კვლევის შემდეგ ეტაპზე ჩვენს მიერ შესწავლილი იქნა კასპაზა 3 და 8-ის აქტიურობა *in vivo* Con-A-ს შეყვანის შემდეგ და მასზე იმუნომოდულატორების, კერძოდ, პლაფერონი ლბ-სა და დექსამეტაზონის გავლენა. მიღებული შედეგების თანახმად, ექსპერიმენტის I ვადაზე საკონტროლო ჯგუფის თავებში Con-A-ს შეყვანა კასპაზა-3-ის აქტიურობის მკვეთრ მატებას განაპირობებს და ფაქტიურად ექსპერიმენტის მაქსიმუმს აღწევს. ამის შემდეგ იგი თანდათან კლებულობს, თუმცა 48 სთ-ისთვის ნორმას მაინც ვერ უბრუნდება (დიაგ. 2).

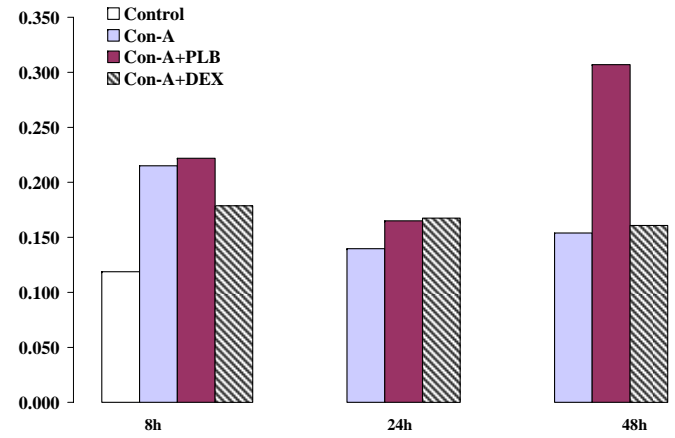
პლაფერონი ლბ-ს შეყვანა ექსპერიმენტის I და II ვადაზე კასპაზა 3-ის აქტიურობაზე არ მოქმედებს და აღნიშნული მაჩვენებელი სარწმუნოდ არ განსხვავდება საკონტროლო ჯგუფისგან. საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით 48 სთ-ზე კასპაზა 3-ის აქტიურობა მნიშვნელოვნად მატულობს ($p<0,01$). მაშინ როცა, დექსამეტაზონის გამოყენება ექსპერიმენტის I ვადაზე თრგუნავს კასპაზა-3-ის აქტიურობას საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით, ხოლო ექსპერიმენტის შემდეგ ვადაზე აღნიშნული მაჩვენებელი საკონტროლო ჯგუფის ანალოგიური მაჩვენებლებისაგან ადარ განსხვავდება.

კასპაზა 3-ის გარდა, შესწავლილი იქნა კასპაზა 8-ის აქტიურობაც. კასპაზა 8-ის აქტიურობის ცვლილებები კასპაზა 3-ის მსგავსი აღმოჩნდა. კერძოდ, Con-A-ს შეყვანიდან 8 საათის შემდეგ მისი აქტიურობის მკვეთრი მატება შეიმჩნევა. 24 და 48 სთ-ისთვის კი კასპაზა 8-ის მაჩვენებელი კლებულობს, თუმცა ნორმას მაინც ვერ უბრუნდება (დიაგ. 3).

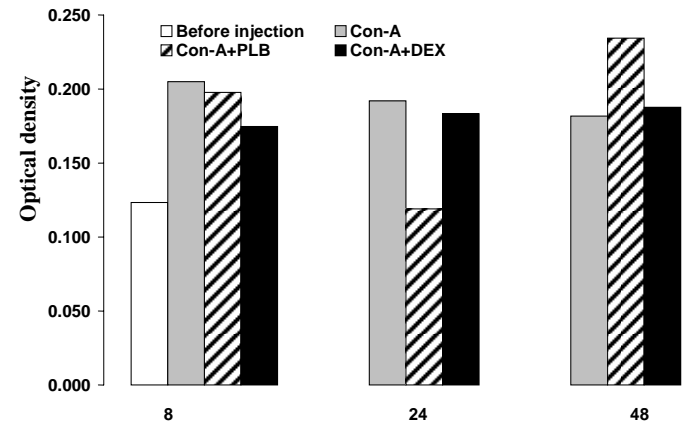
პლაფერონი ლბ-ს გამოყენების შემთხვევაში ექსპერიმენტის I და II ვადაზე კასპაზა 8-ის აქტიურობა კიდევ უფრო იზრდება, თუმცა იგი სარწმუნოდ არ განსხვავდება საკონტროლო ჯგუფის მაჩვენებლისგან. 48 სთ-ზე კი საკვლევ ჯგუფთან შედარებით კასპაზა 8-ის აქტიურობა სტატისტიკურად სარწმუნოდ მატულობს ($p<0,01$). ჩვენს მიერ მიღებული შედეგების ანალიზი ცხადყოფს, რომ იმუნოსუპრესანტი დექსამეტაზონი კასპაზა 8-ის აქტიურობაზე გავლენას არ ახდენს. დექსამეტაზონის გავლენით კასპაზების ინჰიბირების ტენდენცია ვლინდება ექსპერიმენტის პირველ ვადაზე, თუმცა ის სტატისტიკურად სარწმუნოდ არ განსხვავდება ჯანმრთელი თავების ანალოგიური მაჩვენებლებისაგან (დიაგ. 3).

პლაფერონი ლბ კი პროაპოპტოზურ თვისებას ავლენს, რაც მსუბუქი ჰეპატიტის რეგენერაციის ფაზაში კასპაზა 3-ისა და კასპაზა 8-ის აქტიურობის მნიშვნელოვან მატებაში გამოიხატება.

დიაგრამა 3 კასპაზა-8-ის აქტიურობა Con-A-ინდუცირებული ჰეპატიტის დროს
Diagram 3 Changes of caspase-8 activity in Con-A-induced mild hepatitis

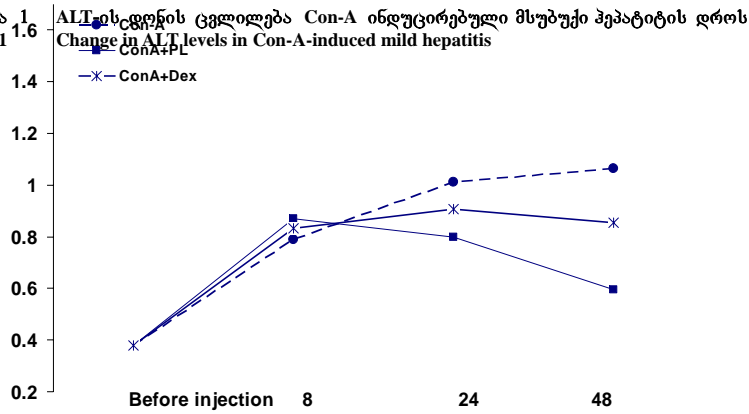


დიაგრამა 4 შრატში ნიტრიტ/ნიტრატის დონეების ცვლილებები Con-A-ინდუცირებულ ექსპ. მსუბუქ ჰეპატიტში
Diagram 4 Changes of serum nitrite/nitrate levels in Con-A induced experimental mild hepatitis

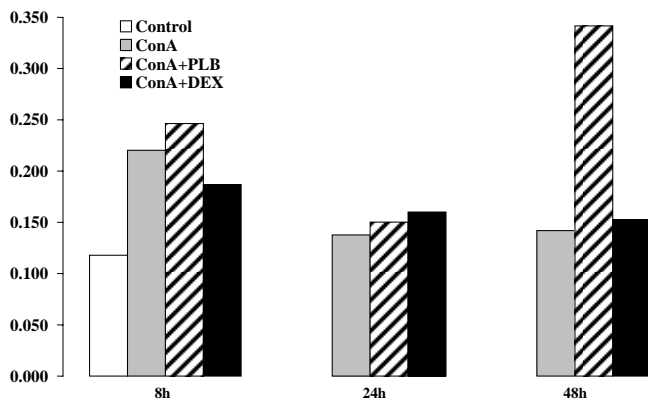


დიაგრამები / DIAGRAMS

დიაგრამა 1 ALT-ის ცვლილების ცვლილება Con-A ინდუცირებული მსუბუქი ჰეპატიტის დროს
Diagram 1 Change in ALT levels in Con-A-induced mild hepatitis



დიაგრამა 2 კასპაზა-3-ის აქტიურობა Con-A-ინდუცირებული ჰეპატიტის დროს
Diagram 2 Changes of caspase-3 activity in Con-A-induced mild hepatitis



დვიდში მიმდინარე აპოპტოზური პროცესების შესასწავლად დამატებით გამოყენებულ იქნა TUNEL-ის მეთოდი. მიღებული შედეგების საფუძველზე დადგინდა, რომ ექსპერიმენტული მსუბუქი ჰეპატიტის მოდელში პლაფერონი ლბ-ს გამოყენება 48 სთ-ზე სარწმუნოდ ზრდის აპოპტოზური ჰეპატოციტების რაოდენობას, თუმცა იგი არ მოქმედებს ექსპერიმენტის სხვა ვადებზე. აღსანიშნავია ის ფაქტი, რომ იმუნომოდულატორი დექსამეტაზონი ასეთ ეფექტს არ ავლენს (ცხრილი 1).

უახლესი მონაცემებით Con-A-ს მცირე დოზების გამოყენებისას 48 საათზე ხდება ბუნებრივი T კილელების რაოდენობის აღდგენა, რომელიც აუცილებელია დვიდის ნორმალური რეგენერაციისთვის. შესაძლებელია ვივარაუდოთ, რომ პლაფერონი ლბ ხელს უწყობს დაზიანებული უჯრედების აპოპტოზური გზით მოცილებას და რთავს ისეთ მექანიზმებს, რომლებიც იმავდროულად ჰეპატოციტების პროლიფერაციას აძლიერებენ.

ცნობილია, რომ ჭარბ აპოპტოზს ადგილი აქვს მწვავე და ქრონიკული ვირუსული ჰეპატიტის, ალკოჰოლური და არაალკოჰოლური ჰეპატიტის, დვიდის ქოლესტატური დაავადების, ვილსონის დაავადებისა და “ტრანსპლანტანტი მასპინძლის წინააღმდეგ დაავადების” (GVHD) დროს. მეორე მხრივ, აპოპტოზის დევიციტი ასოცირებულია დვიდში და სანადვლე სისტემაში სიმსივნის განვითარებასა და პროგრესირებასთან. უფრო მეტიც, ინტერფერონის ანტივირუსული ეფექტი განპირობებულია აპოპტოზის გამოწვევით (Castelli et al, 1997).

ჩვენი კვლევის შედეგები გვაფიქრებინებს, რომ პლაფერონი ლბ-ს გამოყენება შესაძლებელია დვიდის სხვადასხვა ურთიერთსაწინააღმდეგო მექანიზმით მიმდინარე დაზიანების დროს. როგორცაა მწვავე ვირუსული ჰეპატიტი და სიმსივნეები. როგორც ჩანს, პლაფერონი ლბ აპოპტოზური პროცესის მოდულირებას დაავადების ფორმისა და სიმძიმის მიხედვით ახდენს. დვიდის მიმდინარე დაზიანების პირობებში ის ანტიაპოპტოზურ ეფექტს ავლენს (სჭოჭუა და თანაავტ., 2006), ხოლო სუსტი იმუნური პასუხით განპირობებული დვიდის დაზიანების შემთხვევაში კი – პროაპოპტოზურს.

ამდენად, შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ პლაფერონი ლბ აპოპტოზის პროცესის მოდულირებელია.

ვინაიდან იმუნური სისტემის ფუნქციონირება უჯრედთაშორისი კომუნიკაციებით განისაზღვრება, იგი ოქსიდაციური სტრესისადმი განსაკუთრებით მგრძობიარეა. უჯრედული კომპონენტების, უპირატესად, ცილების, ლიპიდებისა და დნმ-ის ენდოგენური ოქსიდაციური დაზიანება მრავალი ქრონიკული დაავადების პათოგენეზში მონაწილეობს. ზოგიერთი პათოლოგიური პროცესის, მათ შორის, ჰეპატიტების დროს, კავშირი დაქვეითებულ ანტიოქსიდაციურ სტატუსს, ოქსიდაციურ სტრესსა და ავადმყოფთა კლინიკურ მდგომარეობას შორის დადასტურებულია. თუმცა, რა როლს ასრულებს ოქსიდაციური სტრესი დაავადების განვითარებასა და მის პროგრესში, დღემდე უცნობია.

ცხრილი №1 აპოპტოზური ბირთვების რაოდენობრივი მაჩვენებლები თავების ჰეპატოციტებში Con-A-თი გამოწვეული ექსპერიმენტული მსუბუქი ჰეპატიტის დროს

საკვლევი ჯგუფები	ჯანმრთელი	კონკანაპალინ- A	კონკანაპალინ- A + პლბ	კონკანაპალინ- A + დექსამეტაზონი

8 საათი	54,23 ± 9,09	154,39±15,22	180,39±17,2	164,39±15,02
24 საათი	“ – “	76,41±12,12	82,34±11,15	86,14±9,11
48 საათი	“ – “	75,41±10,11	280,23± 15,21	84,12±9,10

სადისერტაციო თემის გარშემო ბაგოქმეხმეხეულ
სამეცნიერო შრომათა სია

1. N. Kikodze, M. Iobadze, T. Chikovani, G. Sirbiladze, N. Kukuladze, M. Jgenti. Protective effect of Plaferon Ib on Liver in case of some Pathologies. Proc.Georgian Acad.Sci. Biol. 2006, vol. 32, No2, 325-329.
2. G. Sirbiladze, N. Kikodze, M. Iobadze, M. Jgenti., I. Pantsulaia, T. Chikovani. Activities of Caspases in Experimental Mild Hepatitis and their Regulation by Immunomodulators. Bulletin of the Georgian Academy of Sciences 2006, vol.173, No2, 377-380.
3. G. Sirbiladze, N. Kikodze, T. Chikovani. Modulation of NO Synthesis by Plaferon Ib in Liver. Georgian Medical News 2006, Apr, (133):102-104.
3. S. Chochua, G. Sirbiladze, N. Kikodze, M. Iobadze, I. Pantsulaia, L. Sujashvili, T. Chikovani. Caspase-3 and Caspase-8 Activities in Experimental Endotoxemia and their Regulation by Immunomodulatory Drugs. Experimental and Clinical Medicine 2006, 4(29), 85-87.
5. G. Sirbiladze, S. Chochua, M. Iobadze, I. Pantsulaia, M. Jgenti, N. Kikodze, T. Chikovani. Regulation Activities of Caspases in Experimental Liver Injury by Immunomodulatory Drugs. Allergol & Immunol, 2006.
6. G. Sirbiladze, I. Pantsulaia, N. Kikodze, M. Iobadze, L. Sujashvili, T. Chikovani. Influence of Immunomodulatory Drugs on the Oxidative Stress Indicators in Experimental Mild Hepatitis. Proc. Georgian Acad. Sci. Biol., 2006, vol. 32, No. 4, 835-841.

ცნობილია, რომ ოქსიდაციური სტრესის მიმართ განსაკუთრებით მგრძობიარეა აპოპტოზის გამწევი ფერმენტები კასპაზები. ზოგადად მიღებულია, რომ მრავალ უჯრედში რეაქტიული ჟანგბადის სახეობების (ROS) მცირე კონცენტრაციები აპოპტოზის ინიციირებას იწვევს, მათი ზეჯარბი რაოდენობა კი - ნეკროზულ ცვლილებებს განაპირობებს. კომტიკული ცისტინები სხვადასხვა რედოქს პოტენციალით ხასიათდებიან, ამიტომ ოქსიდანტების მცირე დოზა ზოგიერთ ცილაში თოლის დაჟანგვას იწვევს, სხვა ცილებზე კი არ მოქმედებს.

ამრიგად, ოქსიდანტების მცირე კონცენტრაცია აპოპტოზის განვითარებას იმ რედოქს სტატუსის ცვლილებებით განაპირობებს, რომლებიც ხორციელდება ისეთი პროაპოპტოზური ფაქტორების გააქტივებით, როგორცაა JNK. იმავდროულად ხდება NF-kB-ის ინიზირება, ისე რომ არ იცვლება პროაპოპტოზური კასპაზების რედოქს სტატუსი. ოქსიდანტების მაღალი დონე უფრო მეტად ნეკროზის განვითარებას განაპირობებს. ისინი აინიზირებენ კასპაზებს, რომლებიც საჭიროა აპოპტოზის განსახორციელებლად, და განაპირობებენ უჯრედების ნეკროზულ დაღუპვას (Halliwell et al., 1990; Dypbukt et al., 1994). რედოქს სტატუსის ძლიერი ცვლილებები, რაც განპირობებულია H₂O₂-ის რაოდენობის მატებით და გლუტათიონის (GSH) შემცირებით პირველად კულტურაში ჰეპატოციტების ნეკროზს იწვევს. მაშინ, როცა ზომიერი რედოქს ცვლილებები არ ახდენს გავლენას აპოპტოზზე, მიუხედავად ამისა, ოქსიდანტებისა და GSH-ის ცვლილებები არეგულირებს TNF-ისა და Fas-ით განპირობებულ აპოპტოზს. უფრო მეტიც, ნახვენებია, რომ ხანგრძლივი ან ჭარბი ოქსიდაციური სტრესი კასპაზების აქტიურობის დათრგუნვასა და შესაბამისად აპოპტოზის ბლოკირებას ახდენს (Hampton et al., 1998).

იმის გასარკვევად, თუ რა კავშირია მსუბუქი ჰეპატიტის დროს ჰეპატოციტების აპოპტოზსა და რედოქს-პოტენციალის ცვლილებებს შორის, ამასთანავე, იმის დასადგენად, თუ რამდენადაა განპირობებული პლაფერონი ლბ-ს პროკასპაზური აქტიურობა მისი ანტიოქსიდაციური უნარით, ექსპერიმენტულ ცხოველთა სისხლში შევისწავლეთ აზოტის ოქსიდისა და გლუტათიონ რედუქტაზას დონეების ცვლილება, აგრეთვე ჰეპატოციტების მიტოქონდრიული აქტიურობა.

სხვადასხვა ორგანოში მიმდინარე მეტაბოლური დარღვევები საბოლოო ჯამში სისხლში განვითარებული ცვლილებებით აისახება, რის გამოც ცოცხალ ორგანიზმში მიმდინარე მეტაბოლური პროცესების შესასწავლად სისხლი ყველაზე ხელსაყრელ ობიექტს წარმოადგენს. Con-A ინდუცირებული ჰეპატიტის დროს ჩვენს მიერ ჩატარებულმა გამოკვლევამ ცხოველთა სისხლში ოქსიდაციური სტრესისათვის დამახასიათებელი სურათი გამოავლინა.

ჩვენს მიერ მიღებული მონაცემების ანალიზმა ცხადყო, რომ Con-A-ს ინექციიდან 8 საათის შემდეგ ცხოველთა შრატში აზოტის ოქსიდის შემცველობა სტატისტიკურად სარწმუნოდ იმატებს და ექსპერიმენტის ბოლომდე ამავე დონეზე რჩება.

Con-A ინდუცირებული ჰეპატიტის დროს დექსამეტაზონის გამოყენება სისხლში აზოტის ოქსიდის რაოდენობაზე არ მოქმედებს. აქედან გამომდინარე, იგი ანტიოქსიდაციური უნარის შენარჩუნებას და ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის პროცესების შესუსტებას ვერ უზრუნველყოფს.

დასკვნები

1. სუსტი იმუნური პასუხით განპირობებული ჰეპატიტის დროს კასპაზებით გაშუალებული აპოპტოზის ინტენსივობა იზრდება.
2. Con-A ინდუცირებული მსუბუქი ჰეპატიტის დროს პლაფერონი ლბ-ს გამოყენება ღვიძლის ქსოვილის რეგენერაციის ფაზაში ჰეპატოციტებში კასპაზების (3 და 8) აქტიურობას აძლიერებს.
3. სუსტი იმუნური პასუხით განპირობებული ჰეპატიტის ექსპერიმენტულ მოდელში იმუნომოდულატორი პლაფერონი ლბ აძლიერებს ჰეპატოციტების აპოპტოზს და შესაბამისად იმუნური პასუხის ეფექტს, რითაც მცირდება პროცესის ქრონიზაციის შესაძლებლობა.
4. Con-A ინდუცირებული მსუბუქი ჰეპატიტის დროს პლაფერონი ლბ ღვიძლის ქსოვილის ნორმალური სტრუქტურის აღდგენას აჩქარებს.
5. Con-A ინდუცირებული მსუბუქი ჰეპატიტის დროს პლაფერონი ლბ სისხლში აზოტის ოქსიდის შემცველობას არეგულირებს: ღვიძლის მაქსიმალური დესტრუქციის ფაზაში მას სტატისტიკურად სარწმუნოდ აქვეითებს, ხოლო რეგენერაციის ფაზაში – ზრდის.
6. ღვიძლის მსუბუქი იმუნური დაზიანების ექსპერიმენტულ მოდელში პლაფერონი ლბ ოქსიდაციური სტრესის განვითარებას აფერხებს.
7. პლაფერონი ლბ-ს გავლენით ჰეპატოციტების აპოპტოზის გაძლიერება და ამავდროულად მათი პროლიფერაციული აქტიურობის მატება ღვიძლში რეგენერაციული პროცესების სტიმულაციას განაპირობებს.

პრაქტიკული რეკომენდაციები:

1. სუსტი იმუნური პასუხით მიმდინარე ინფექციების დროს (B და C ჰეპატიტის მსუბუქი ფორმები) სამკურნალოდ რეკომენდებულია პლაფერონი ლბ-ს ან პროაპოპტოზური თვისების მქონე სხვა იმუნომოდულატორის გამოყენება.
2. პლაფერონი ლბ-ს მოქმედების მექანიზმის უფრო ღრმად შესასწავლად მიზანშეწონილია პროანთებითი და ანთებისსაწინააღმდეგო ციტოკინების ბალანსზე მისი ზემოქმედების კვლევა Con-A ინდუცირებული ჰეპატიტისა და აუტოიმუნურ დაავადებათა სხვა ექსპერიმენტულ მოდელებში.
3. პლაფერონი ლბ-ში შემავალი იმუნომამოდიულირებელი პოტენციის მქონე ფრაქციის იდენტიფიკაცია მიზანშეწონილია Con-A ინდუცირებული ჰეპატიტის მოდელზე.

აღსანიშნავია, რომ პლაფერონი ლბ ექსპერიმენტის II ვადაზე აზოტის ოქსიდის კონცენტრაციას სტატისტიკურად სარწმუნოდ თრგუნავს ($p < 0,01$). ექსპერიმენტის მესამე ვადაზე კი პლაფერონი ლბ საპირისპირო ეფექტს ავლენს - სარწმუნოდ ზრდის აზოტის ოქსიდის რაოდენობას (დიაგრამა 4). ექსპერიმენტის ეს ვადა ღვიძლის ქსოვილის რეგენერაციის ფაზას ემთხვევა.

ცნობილია, რომ აზოტის ოქსიდი აპოპტოზური პროცესის რეგულაციაში მონაწილეობს. იგი ავლენს როგორც ანტი-, ასევე პროაპოპტოზურ მოქმედებას. მისი ანტიაპოპტოზური მოქმედება ხორციელდება ორი ძირითადი მექანიზმით: cGMP-დამოკიდებული და cGMP-დამოუკიდებელი. cGMP პროდუცირების სტიმულირებით NO იწვევს ხსნადი გუანილილციკლაზას აქტივაციას, რაც უჯრედებს შემდგომი აპოპტოზისაგან იცავს (Kim et al., 1997). ეს მექანიზმი ნაკლებადაა შესწავლილი. მეორე, cGMP-დამოუკიდებელი მექანიზმი, მოიცავს ლიპიდების ზეგანგვის ინჰიბირებას, პეროქსიდ რადიკალის ჩაჭურას, Bcl-2-ის გახლეჩვისა და ციტოქრომ C-ს გამოთავისუფლების შემცირებას (Kim et al., 1998) და ისეთი ცილების ინდუქციას, როგორებიცაა Hsp70 და Bcl-2 (Mosser et al., 1997; Genaro et al., 1995). გარდა ამისა, NO დამცველობით ეფექტს ავლენს ცილების S-ნიტროზილირებით. p50-ისა და p65-ის 62-ე ცისტეინის S-ნიტროზილირებით NO-ს ძალუძს NF-κB-ს აქტივაციის ინჰიბირება. NO-ს დონორები აინჰიბირებენ TNFα-ს მიერ NF-κB-ს აქტივაციას, რაც IκB-α-ს სტაბილიზაციითა და მისი გენის ექსპრესიის მატებით არის გამოწვეული. კასპაზები ცისტეინის მაღალი შემცველობის გამო S-ნიტროზილირებისათვის იდეალურ სამიზნეებს წარმოადგენენ.

საინტერესოა NO-ს ზემოქმედება NF-κB-ს რეგულაციაზე და ანთებაზე. მართალია, მისი მოქმედების მექანიზმი ბოლომდე არ არის გარკვეული, თუმცა დადასტურებულია მისი როგორც პოზიტიური, ასევე ნეგატიური გავლენა აღნიშნული ტრანსკრიფციული ფაქტორის რეგულაციაზე. ეს მოქმედება დამოკიდებულია აზოტის ოქსიდის კონცენტრაციაზე, რედოქს სტატუსზე, სტიმულსა და უჯრედის ტიპზე (Kim et al., 1997).

eNOS-ისა და/ან nNOS-ის მიერ მცირე რაოდენობით ენდოგენურად წარმოებულ NO-ს შეუძლია გადამწყვეტი როლი ითამაშოს სხვადასხვა სტიმულის დროს NF-κB-ის აქტივაციის მოდულაციაში.

in vitro და *in vivo* პირობებში ნაჩვენებია იქნა, რომ iNOS აფერხებს TNF ან Fas-ით ინდუცირებულ აპოპტოზს (Bogdan et al., 2001). უფრო მეტიც, *in vivo* iNOS დეფიციტურ თაგვებში ინჰიბირდებოდა ღვიძლის რეგენერაცია. გარდა ამისა, ნაჩვენებია იქნა (Sass et al., 2001), რომ Con-A-ინდუცირებული ღვიძლის დაზიანების დროს ღვიძლის ქსოვილში არ წარმოიქმნება 3-ნიტროთიროზინი, აზოტის ოქსიდის მიერ ქსოვილის დაზიანების მარკერი. Sass და კოლეგებმა (2001) დაადგინეს, რომ ჰეპატოციტებში ინდუცირებული აზოტის ოქსიდის ექსპრესია განაპირობებს უჯრედების ნაწილობრივ დაცვას.

ჩვენს მიერ მიღებული შედეგების თანახმად პლაფერონი ლბ ახდენს აზოტის ოქსიდის რაოდენობის მოდულირებას. კერძოდ, 24 საათზე პრეპარატი ამცირებს მის რაოდენობას ($p < 0,01$) და ამით ხელს უშლის მისი დამანგრეველი მოქმედების გავრცელებას. შედგომში კი, 48 საათისთვის იგი ახდენს ინდუცირებულ აზოტის ოქსიდის რაოდენობის მატებას ზღვრულ დონემდე ($p < 0,01$), რითაც აჩქარებს პროლიფერაციულ პროცესებს.

რეაქტიული უანგბადის სახეობების (ROS) უჯრედშიდა კონცენტრაცია მკაცრად კონტროლდება დაცვის მრავალრიცხოვანი მექანიზმებით, მათ შორის, ROS-ის სკავენჯერი ფერმენტებისა და პატარა ანტიოქსიდანტი მოლეკულების მიერ. ამ ანტიოქსიდაციური სისტემებიდან აღსანიშნავია გლუტათიონი და ფერმენტები, რომლებიც ოქსიდაციური დაზიანებისაგან დამცავ ფაქტორებს წარმოადგენენ როგორც ცირკულაციაში, ისე სხვადასხვა ქსოვილში, მათ შორის, ღვიძლში (Schwabe et al., 2006).

გლუტათიონის საერთო უჯრედშიდა კონცენტრაცია მნიშვნელოვნად ცვალებადობს, განსაკუთრებით, ღვიძლში. ღვიძლის GSH შეიძლება დრამატულად შემცირდეს წამლის მეტაბოლიზმის შედეგად, ოქსიდაციური სტრესის შემდეგ ან GSH-ის სინთეზში თანდაყოლილი დეფექტების გამო; GSH-ის დაბალი კონცენტრაციები გამოვლენილია სეფსისის, აცეტამინოფენური ინტოქსიკაციის, ალკოჰოლის ქრონიკული მოხმარებისა და ვილსონის მწვავე დაავადების დროს. უფრო მეტიც, ღვიძლის GSH ცირკადულ ცვალებადობას განიცდის. ღვიძლის GSH-ის რაოდენობის ფარმაკოლოგიური გაზრდა ღვიძლს ნაკლებმგრძობიარეს ხდის და იცავს მრავალი პირდაპირი ჰეპატოტოქსინის ზემოქმედებისგან (Prescott, 1982). კვლევების მზარდი რაოდენობა მიუთითებს იმაზე, რომ GSH-ს უჯრედის დაზიანებაში ორმაგი როლი გააჩნია.

ნაჩვენებია, რომ უჯრედის სიკვდილის ზოგიერთ მოდელში, სადაც აპოპტოზი ძირითად მოვლენას წარმოადგენს, გლუტათიონის შემცირება დამცავ (ე.ი. ანტი-აპოპტოზურ) - და არა დამამძიმებელ – ეფექტს ქმნის. დღეისათვის ცნობილია, რომ მკაროფაგების NO-ინდუცირებული აპოპტოზი, T უჯრედების CD95-ით განპირობებული აპოპტოზი და ჰეპატოციტების ციტოკინ-გამოწვეული აპოპტოზი *in vivo* დამოკიდებულია შესაბამისი უჯრედების უჯრედშიდა გლუტათიონის კონცენტრაციების ცვლილებებზე (Hentze et al., 2000). წამოყენებული იყო ჰიპოთეზა, რომ აპოპტოზის განმასხვრციელებელი კასპაზების რედოქს მგრძობიარობა პასუხისმგებელია გამოვლენილ დამცველობით ეფექტზე, რადგან GSH-ის კონცენტრაციები შემცირებული იყო. თუმცა, GSH-ის გაზრდილ უჯრედშიდა კონცენტრაციებს სხვადასხვა უჯრედულ ხაზში აპოპტოზის გაძლიერებაც შეუძლიათ (Uhlir et al., 1992). რაც შეეხება *in vivo* კვლევებს, გლუტათიონის (GSH) შემცირებით გამოწვეული დამცველობითი ეფექტი ნაჩვენებია ღვიძლის აპოპტოზური კასპაზ-დამოკიდებული დაზიანების მოდელში (Hentze et al., 1999).

კვლევის შემდეგ ეტაპზე მსუბუქი ჰეპატიტის ექსპერიმენტულ მოდელში შევისწავლეთ გლუტათიონ რედუქტაზას ცვლილება ცხოველთა შრატში. როგორც მიღებული შედეგების ანალიზმა ცხადყო, Con-A-ს ინექციიდან 8 სთ-ის შემდეგ გლუტათიონ რედუქტაზას აქტიურობა სტატისტიკურად სარწმუნოდ იმატებს ($p<0,01$), 24 სთ-სთვის იგი მცირდება, თუმცა საკონტროლო მანქნებელთან შედარებით ისევ მომატებულია. 48სთ-სთვის გლუტათიონ რედუქტაზას აქტიურობა ნორმას უბრუნდება.

პლაფერონი ლბ-ს შეყვანა სტატისტიკურად სარწმუნოდ ამცირებს საკვლევი ჯგუფთან შედარებით გლუტათიონ რედუქტაზას რაოდენობას ($p<0,01$). პლაფერონი ლბ მთელი ექსპერიმენტის განმავლობაში გლუტათიონ რედუქტაზას კონცენტრაციას გარკვეულ დონეზე ინარჩუნებს, მაგრამ ნორმულ მანქნებელამდე მის დაყვანას არ ახორციელებს (დიაგრამა 5), რაც მომატებული პროლიფერაციის პერიოდში საჭიროა მიტოქონდრიული ფუნქციის შესასრულებლად.

პლაფერონი ლბ-ს მსგავსად, დექსამეტაზონიც გლუტათიონ რედუქტაზას მაღალი აქტიურობის შენარჩუნებას უზრუნველყოფს. აღსანიშნავია, რომ Con-A-ს ინექციიდან 8 სთ-ის შემდეგ პლაფერონი ლბ-ს გავლენით გლუტათიონ რედუქტაზას აქტიურობა მნიშვნელოვნად მცირეა ვიდრე დექსამეტაზონის გამოყენების შემთხვევაში ($p<0,01$).

ჩვენ მიერ გამოვლენილი მონაცემები შეესაბამება სხვა კვლევის შედეგებს, რომლის მიხედვითაც, ციტოზსა და ჰეპატოციტულ კარცინომაში საკონტროლო ქსოვილთან შედარებით GR-ის აქტიურობა გაზრდილია (Czeczot et al., 2006). უჯრედის დონეზე GSH-ის ჰომეოსტაზი უზრუნველყოფილია ბიოსინთეზს, მოხმარებას, ოქსიდაციასა და ექსპორტს შორის ბალანსით. ჰომეოსტაზის დარღვევამ კი შეიძლება იმოქმედოს ღვიძლის უნარზე უზრუნველყოს ოქსიდაციური დაზიანებისგან დაცვა (Fernandez-Checa et al., 1997).

კვლევის ბოლო ეტაპზე მსუბუქი ჰეპატიტის ექსპერიმენტულ მოდელში შევისწავლეთ ჰეპატოციტების მიტოქონდრიული აქტიურობა MTT ტესტის საშუალებით. ინტაქტური თაგვების ჰეპატოციტების სონტანური სტიმულაციის ინდექსი (სი) $1,14\pm 0,2$ უდრიდა. Con A-თი გამოწვეული მსუბუქი ჰეპატიტის დროს 24 საათისათვის ეს მანქნებელი $1,5\pm 0,3$ -ის (საკონტროლო მანქნებელთან შედარებით $p<0,05$), ხოლო 48 საათისათვის კი – $1,16\pm 0,11$ -ის ტოლი იყო.

პლაფერონი ლბ-ს გავლენით Con A-ინდუცირებიდან 24 საათის შემდეგ მიღებული სიდიდე არ განსხვავდება საკვლევი ჯგუფის მანქნებლისგან, თუმცა 48 საათზე ის მატულობს ($2,06\pm 0,12$) და სტატისტიკურად სარწმუნოდ აღემატება ინტაქტური თაგვების ანალოგიურ მანქნებელს ($p<0,01$). აღსანიშნავია ის ფაქტი, რომ დექსამეტაზონის შემთხვევაში მიტოქონდრიული სუნთქვა დათრგუნულია 48 საათზე (დიაგრამა 6).

ამრიგად, მიღებული შედეგები იმის სასარგებლოდ მეტყველებს, რომ პლაფერონი ლბ მიტოქონდრიულ ფუნქციას აძლიერებს და ჰეპატოციტების პროლიფერაციას აჩქარებს, რითაც ღვიძლში რეგენერაციული პროცესების სტიმულირებას ახდენს.