

რეზერატორის ლიპიდური მეტაბოლიზმის მარეგულირებელი მოქმედების შესწავლა
ჰეპატოსტეატოზის *in vitro* მოდელზე

თინათინ ქაჩლიშვილი

*სადისერტაციო ნაშრომი წარდგენილია საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტის და
თბილისის თავისუფალი უნივერსიტეტის ერთობლივ საბუნებისმეტყველო
სადისერტაციო საბჭოზე ბიოლოგიის დოქტორის ხარისხის მოსაპოვებლად*

სამეცნიერო ხელმძღვანელები: ნინა კულიკოვა, ბიოლ. მეცნ. დოქტორი
მარინე ბეჟუაშვილი, ტექნ. მეცნ. დოქტორი

საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტი
თბილისის თავისუფალი უნივერსიტეტი
თბილისი, 2025

ავტორის დეკლარაცია

"როგორც წარმოდგენილი სადოქტორო დისერტაციის ავტორი, ვაცხადებ, რომ ჩემი დისერტაცია წარმოადგენს ორიგინალურ ნაშრომს და მასში სხვა ავტორების აქამდე გამოქვეყნებული, გამოსაქვეყნებლად მიღებული ან დასაცავად წარდგენილი მასალები გამოყენებულია ციტირების სათანადო წესების დაცვით."

თინათინ ქაჩლიშვილი

თ. ქაჩლიშვილი

თარიღი: იანვარი, 2025 წ.

აბსტრაქტი

კვლევის მთავარ მიზანს წარმოადგენდა ლიპიდურ მეტაბოლიზმზე და ანთებით პროცესებზე ტრანს-რეზვერატროლის გავლენის შესწავლა სტეატოზის *in vitro* მოდელის გამოყენებით. სამოდელო სისტემა მოიცავდა ღვიძლის შემადგენლობაში შემავალი ორი განსხვავებული ტიპის უჯრედების - ჰეპატოციტების (Hepa1-6) და მაკროფაგების (RAW264.7, J774A.1) გაცხიმოვნებულ მონომრიან უჯრედულ კულტურებს და გაცხიმოვნებული ჰეპატოსფეროიდების სამგანზომილებიან მოდელს.

მიღებული შედეგებიდან გამოვლინდა, რომ რეზვერატროლის დაბალ კონცენტრაციებთან ($10\mu\text{M}$) 24 საათიანი ინკუბაციის საპასუხოდ, ჰეპატოციტებში შეინიშნება ლიპიდების კონცენტრაციის შემცირება, ამავე დროს - უჯრედების ზედაპირზე მცირდება პრო-ანთებითი რეაქციების ინიციატიაში მონაწილე Toll-რეცეპტორების ოჯახის წევრის, TLR4-ის ზედაპირული ექსპრესია. რეზვერატროლის დაბალ კონცენტრაციებთან ($5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$) 3 საათიანი ინკუბაციის საპასუხოდ შეინიშნება ლიპიდების დეპონირების დაკლება სამივე სამოდელო სისტემაში, თუმცა ეს ცვლილება არ არის კავშირში TLR4-ის ექსპრესიის ცვლილებასთან.

მოქმედების მოკლე დროის წერტილზე, რეზვერატროლით გამოწვეული ეფექტის მოლეკულური მექანიზმის დასადგენად შევისწავლეთ ლიპიდების მეტაბოლიზმში მონაწილე ერთ-ერთი ტრანსკრიპციული ფაქტორის - peroxisome proliferator-activated receptor- γ -ს (PPAR- γ) ექსპრესიის დონე. მიღებული სურათიდან გამოჩნდა, რომ სამივე სამოდელო სისტემის შემთხვევაში ერთმანეთის მსგავსად ხდება PPAR- γ -ს დონის აწევა რეზვერატროლის მოქმედების საპასუხოდ. გარდა ამისა დადგინდა რომ ეს პროცესი დამოკიდებული არის ფერმენტ poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1)-ზე. შესაბამისად, გამოიკვეთა, რომ რეზვერატროლის მიერ სტიმულირებულ სასიგნალო გზაში, როგორც ჰეპატოციტებში, ასევე მაკროფაგებში, PARP1-ს აქტივაცია წინ უძღვის PPAR- γ -ს დონის აწევას.

ვინაიდან რეზვერატროლის სამიზნე მოლეკულას PARP1-ის გარდა ასევე წარმოადგენს სირტუინის ოჯახის წევრი - Sirt1. ჰეპატოციტების და მაკროფაგების

მონოშრიან კულტურებში, ჩვენ შევისწავლეთ Sirt1-ის და PARP1-ის გავლენა რეზერატროლის მიერ ინდუცირებულ სასიგნალო გზებზე. მიღებული შედეგებიდან გამოვლინდა, რომ ჰეპატოციტებში ლიპიდების დონის შესამცირებლად, რეზერატროლი იწვევს ორივე მოლეკულის Sirt1-ის და PARP1-ის აქტივაციას, ხოლო მაკროფაგებში ლიპიდების დეპონირების შემცირებას მხოლოდ SIRT1-ის სასიგნალო გზის სტიმულირებით ახდენს. აღსანიშნავია, რომ ანთებითი პროცესების რეგულირებისას როგორც ჰეპატოციტების, ისე მაკროფაგების მონოშრიან უჯრედებში რეზერატროლი მოიცავს ორივე მოლეკულის აქტივაციას.

საბოლოო ჯამში გამოიკვეთა სურათი, რომ რეზერატროლის მიერ სტეატოზის მდგომარეობის გაუმჯობესება, დამოკიდებულია ორ მოვლენაზე: ერთის მხრივ, ლიპიდების დეპონირების შემცირებაზე, მეორეს მხრივ კი, პრო-ანთებითი პროცესების დათრგუნვაზე, PARP1 და Sirt1 მოლეკულების სტიმულირების ხარჯზე.

საძიებო სიტყვები: სტეატოზი, ტრანს-რეზერატროლი, ანთება, PARP1, Sirt1

Study of the regulatory effect of resveratrol on lipid metabolism in an *in vitro* model of hepatosteatosis

Abstract

The primary aim of this study was to investigate the effects of *trans*-resveratrol on lipid metabolism and inflammatory processes using an *in vitro* steatosis model. The experimental system included two distinct liver cell types—hepatocytes (Hepal-6) and macrophages (RAW264.7, J774A.1)—cultured as monolayers and 3D hepatospheroids.

The results revealed that low concentrations of resveratrol (10 μ M) reduced lipid accumulation in hepatocytes following 24 hours of incubation. This reduction was accompanied by decreased surface expression of Toll-like receptor 4 (TLR4), a key mediator of pro-inflammatory responses. Short-term exposure (3 hours) to resveratrol at concentrations of 5 μ M and 10 μ M reduced lipid deposition across all three models, though this effect was independent of changes in TLR4 expression.

To elucidate the molecular mechanisms underlying these effects, we examined the expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ), a key transcription factor in lipid metabolism. Resveratrol consistently increased PPAR- γ levels in all models, mediated by the activation of poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1). This activation preceded the upregulation of PPAR- γ in both hepatocytes and macrophages.

Since, in addition to PARP1, the target molecule of resveratrol is also a member of the sirtuin family - Sirt1. We investigated the roles of these molecules in resveratrol-induced signaling pathways. The results demonstrated that in hepatocytes, resveratrol reduced lipid levels by activating both Sirt1 and PARP1. In macrophages, however, the lipid-reducing effects of resveratrol were exclusively mediated through Sirt1 activation. For the regulation of inflammatory processes, resveratrol required the activation of both molecules in hepatocytes and macrophages.

In conclusion, the beneficial effects of resveratrol in improving steatosis are attributed to two key mechanisms: reducing lipid deposition and suppressing pro-inflammatory processes, both mediated through the activation of PARP1 and Sirt1.

Keywords: steatosis, *trans*-resveratrol, inflammation, PARP1, Sirt1

მადლობა

დიდი მადლიერება მინდა გამოვხატო ჩემი ხელმძღვანელის პროფ. ნინა კულიკოვას მიმართ, ყურადღებისთვის, ცოდნის გაზიარებისთვის, მუდმივად მხარში დგომისთვის. განსაკუთრებული მადლობა უჯრედული და მოლეკულური ბიოლოგიის ინსტიტუტის ყველა თანამშრომელს (განსაკუთრებით მარიამ ქსოვრელს). ასევე მადლიერი ვარ ბაკალავრის და მაგისტრატურის სტუდენტების (განსაკუთრებით მარიამ მუსერიძის და თევდორე მთიულიშვილის), ვისთან ერთადაც მთელი ამ წლების განმავლობაში ვმუშაობდი ამ კვლევაზე.

მადლობა ჩემს მეორე ხელმძღვანელს, დოქტორ მარინე ბეჟუაშვილს და უკლებლივ ყველა ლექტორს ყოველთვის მხარში დგომისათვის.

მადლობელი ვარ, შოთა რუსთაველის საქართველოს ეროვნული სამეცნიერო ფონდის დაფინანსებისთვის, ვინაიდან მქონდა ამ კვლევის განხორციელების შესაძლებლობა.

მსურს გულწრფელი მადლობა გადავუხადო სადოქტორო სკოლის კოორდინატორს, პროფ. ნატო კობახიძეს მუდმივად გვერდში დგომისთვის და დახმარებისთვის. აგრეთვე დიდი მადლობა მინდა გადავუხადო სოციალური და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებების სამაგისტრო და სადოქტორო სკოლის კოორდინატორს ლანა გაბრიამეს დისერტაციის დაცვის ორგანიზებისთვის.

განსაკუთრებული მადლობა ჩემს ოჯახს (განსაკუთრებით მეუღლეს და დედას) და მეგობრებს, მხარში დგომისა და ზრუნვისათვის.

სარჩევი

დეკლარაცია.....	ii
აბსტრაქტი.....	iii
მადლობა.....	vii
სურათების სია.....	xi
აბრევიატურა.....	xv
1. შესავალი.....	1
2. სამეცნ. ლიტერატურის მიმოხილვა.....	5
2.1 არაალკოჰოლური ღვიძლის ცხიმოვანი დაავადება, ეპიდემიოლოგია, დაავადების სპექტრი და პათოგენეზი.....	5
2.2 ლიპიდების მეტაბოლიზმი.....	8
2.3 კავშირი ღვიძლის გაცხიმოვნებასა და ინსულინის რეზისტენტობას შორის.....	10
2.4 გენეტიკის როლი NAFLD-ს განვითარებაში.....	12
2.5 ეპიგენეტიკა და NAFLD	13
2.6 ენდოპლაზმური ბადის სტრესი და NAFLD	15
2.7 ჟანგვითი სტრესის როლი NAFLD-ს მიმდინარეობისას	19
2.8 ანთების როლი NAFLD-ს განვითარებაში.....	23
2.8.1 NAFLD და ბაქტერიული ლიპოპოლისაქარიდი.....	25
2.8.2 ჟანგბადის აქტიური ფორმების როლი ანთების განვითარებაში.....	26
2.8.3 თავისუფალი ცხიმოვანი მჟავების როლი ანთების განვითარებაში	27
2.8.4 ენდოპლაზმური ბადის სტრესის როლი ანთების ჩამოყალიბებაში.....	28
2.9 NAFLD-ს მკურნალობის გზები და რეზერატროლი როგორც პოტენციური სამკურნალო საშუალება.....	30
2.9.1 სტილბენოიდები.....	34
2.9.2 რეზერატროლის სტრუქტურა, ბიოსინთეზი და წყარო	36
2.9.3 რეზერატროლის მეტაბოლიზმი.....	38
2.9.4 რ.ეზერატროლის სამიზნე მოლეკულები და მათი როლი NAFLD-ს პათოგენეზში.....	41
3. მეთოდოლოგია	52
3.1 გამოყენებული ხელსაწყოები.....	52
3.2 უჯრედების კულტივირება	52
3.3 მონოშრიანი და სფეროიდული უჯრედული კულტურების გაცხიმოვნება	53
3.4 ელექტრონული მიკროსკოპია	54
3.5 ცხიმების შემცველობის განსაზღვრა: შეღებვა ნილის წითლით	54
3.6 ცხიმების შემცველობის განსაზღვრა: შეღებვა Oil Red O-თი	55
3.7 ციტოკინების განსაზღვრა იმუნოფერმენტული მეთოდით	56
3.8 ზედაპირული რეცეპტორების ექსპრესიის განსაზღვრა.....	57
3.9 ჯამურად, ჟანგბადოვანი რადიკალების განსაზღვრა	57
3.10 ადრეული აპოპტოზის შეფასება.....	58

3.11.1 უჯრედული ლიზატის მომზადება წეტილოვანი ბლოტისთვის	59
3.11.2 წეტილოვანი ბლოტი	59
3.12.1 უჯრედების მოხსნა, ბირთვებით გამდიდრება და ნიმუშების დამზადება ვესტერნ ბლოტინგისთვის.....	60
3.12.2 SDS-PAGE.....	61
3.12.3 მემბრანაზე გადატანა.....	62
3.12.4 ნიმუშის გამჟღავნება და საკვლევი ობიექტის დეტექცია.....	62
3.13 სტატისტიკური ანალიზი	63
4. შედეგები	64
4.1 NAFLD-ს ორგანოზომილებიანი და სამგანზომილებიანი <i>in vitro</i> მოდელის გაცხიმოვნების ხარისხის შეფასება.....	64
4.2.1 რეზვერატროლთან 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ცხიმების შემცველობის შეფასება.....	66
4.2.2 რეზვერატროლთან 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ TLR4-ის ზედაპირული ექსპრესიის შეფასება.....	68
4.2.3 რეზვერატროლთან 24 საათიანი ზემოქმედების შემდეგ ციტოკინების დონის შემოწმება ჰეპატოციტებში.....	68
4.2.4 რეზვერატროლთან 24 საათიანი ზემოქმედების შემდეგ ციტოკინების დონის შემოწმება მაკროფაგებში.....	70
4.3.1 რეზვერატროლთან 3 საათიანი ზემოქმედების შემდეგ მიტოქონდრიული აპოპტოზის დონის შემოწმება	71
4.3.2 რეზვერატროლთან 3 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ცხიმების შემცველობის შეფასება	74
4.3.3 რეზვერატროლთან 3 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ჟანგბადის აქტიური რადიკალების დონის შეფასება.....	76
4.3.4 რეზვერატროლთან 3 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ TLR4-ის ზედაპირული ექსპრესიის შეფასება	78
4.4 ცხიმების შემცველობის შეფასება საკვებ არეში გლუკოზის დამატების შემდგომ.....	80
4.5 ჰისტონ 3-ის, მეოთხე ლიზინის (H3K4) ტრიმეთილირების ზოგადი დონის შეფასება ჰეპატოციტებში.....	81
4.6.1 PPAR- γ -ს ექსპრესიის დონის შესწავლა.....	82
4.6.2 რეზვერატროლის ზეგავლენა პოლი-ადპ-რიბოზილირებაზე ვესტერნ-ბლოტინგის მეთოდით	83
4.6.3 ჰეპატოციტებში რეზვერატროლის ეფექტის შეფასება ლიპიდურ ბალანსზე, Sirt1-ს და PARP1-ს დათრგუნვისას.....	84
4.6.4 მაკროფაგებში რეზვერატროლის ეფექტის შეფასება ლიპიდურ ბალანსზე, Sirt1-ს და PARP1-ს დათრგუნვის პირობებში.....	86
4.6.5 მაკროფაგებში რეზვერატროლის გავლენა ციტოკინების ექსპრესიაზე.....	87
4.6.6 ჰეპატოციტების მონოშირიან კულტურაში რეზვერატროლის გავლენა ციტოკინების ექსპრესიაზე.....	90
5. შედეგების განხილვა.....	94

6. დასკვნა და რეკომენდაციები.....	108
ბიბლიოგრაფია.....	110

სურათების სია

სურ. 1. რეზერატროლის სავარაუდო სამოქმედო გზები	4
სურ. 2. NAFLD-ს პათოგენეზი.....	8
სურ. 3 რეზერატროლის ქიმიური სტრუქტურა.....	36
სურ. 4. რეზერატროლის ბიოსინთეზში ჩართული ფერმენტები და გამომწვევი ფაქტორები.....	37
სურ. 5. რეზერატროლის მეტაბოლიზმი ადამიანის ორგანიზმში.....	38
სურ. 6. ცხიმების შეღებვა Oil red O-თი.....	64
სურ. 7. ჰეპატოციტების სფეროიდული კულტურის მორფოლოგია.....	65
სურ. 8. ჰეპატოციტების 2D და 3D სამოდელო სისტემებში დეპონირებული ლიპიდების დონის შეფასება გამდინარე ციტომეტრიით, შეღებვა ნილის წითელით.....	66
სურ. 9. რეზერატროლის მოქმედების (24 სთ) შეფასება, ჰეპატოციტების Hepa 1-6 მონოშრიან კულტურაში, ლიპიდების შემცველობაზე გაუცხიმოვნებელ და გაცხიმოვნებულ (FFA) ნიმუშებში.....	67
სურ. 10. რეზერატროლის მოქმედების (24 სთ) შეფასება, მაკროფაგების J774A.1 მონოშრიან კულტურაში, ლიპიდების შემცველობაზე გაუცხიმოვნებელ და გაცხიმოვნებულ (FFA) ნიმუშებში.....	67
სურ. 11. გაცხიმოვნებული (+FFA) ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 მონოშრიან კულტურაში რეზერატროლის გავლენის (24 სთ) შესწავლა TLR4 რეცეპტორის ექსპრესიის ინტენსივობაზე.....	68
სურ. 12. 24 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზერატროლის გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ IL-1 β -ს დონის ცვლილებაზე.....	69
სურ. 13. 24 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზერატროლის გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ IL-10 -ს დონის ცვლილებაზე.....	70
სურ. 14. 24 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზერატროლის გავლენის შეფასება, მაკროფაგების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ IL-1 β -ს დონის ცვლილებაზე.....	70
სურ. 15. 24 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზერატროლის გავლენის შეფასება, მაკროფაგების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ IL-10 -ს დონის ცვლილებაზე.....	71
სურ. 16. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზერატროლის გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების მონოშრიან კულტურაში (Hepa1-6) აპოპტოზური პოპულაციის რაოდენობაზე, მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალის ცვლილების მიმართ მგრძნობიარე 3,3'-დიჰექსილოქსაკარბოციანიდ იოდიდის (DiOC $_6$) საღებავის გამოყენებით.....	72
სურ. 17. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზერატროლის გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების სფეროიდულ კულტურაში (Hepa1-6) აპოპტოზური პოპულაციის რაოდენობაზე, მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალის ცვლილების მიმართ მგრძნობიარე 3,3'-დიჰექსილოქსაკარბოციანიდ იოდიდის (DiOC $_6$) საღებავის გამოყენებით.....	72

სურ. 18. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის გავლენის შეფასება, მაკროფაგების მონომრიან კულტურაში (RAW264.7) აპოპტოზური პოპულაციის რაოდენობაზე, მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალის ცვლილების მიმართ მგრძნობიარე 3,3'-დიჰექსილოქსაკარბოციანიდ იოდიდის (DiOC ₆) საღებავის გამოყენებით.....	73
სურ. 19. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის გავლენის შეფასება, მაკროფაგების მონომრიან კულტურაში (J774A.1) აპოპტოზური პოპულაციის რაოდენობაზე, მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალის ცვლილების მიმართ მგრძნობიარე 3,3'-დიჰექსილოქსაკარბოციანიდ იოდიდის (DiOC ₆) საღებავის გამოყენებით.....	73
სურ. 20. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 მონომრიან კულტურაში ლიპიდების შემცველობაზე.....	74
სურ. 21. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 სამგანზომილებიან კულტურაში ლიპიდების შემცველობაზე.....	75
სურ. 22. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის გავლენის შეფასება, მაკროფაგების, RAW264.7 უჯრედულ კულტურაში ლიპიდების შემცველობაზე	75
სურ. 23. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 მონომრიან კულტურაში, ჟანგბადის აქტიური ფორმების კონცენტრაციაზე, ფლუორესცენტული ნაერთის DCFH-DA-ს გამოყენებით.....	76
სურ. 24. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 სფეროიდულ კულტურაში, ჟანგბადის აქტიური ფორმების კონცენტრაციაზე, ფლუორესცენტული ნაერთის DCFH-DA-ს გამოყენებით.....	77
სურ. 25. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის გავლენის შეფასება, მაკროფაგების, RAW264.7 უჯრედულ კულტურაში, ჟანგბადის აქტიური ფორმების კონცენტრაციაზე, ფლუორესცენტული ნაერთის DCFH-DA-ს გამოყენებით.....	77
სურ. 26. ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 მონომრიან კულტურაში რეზვერატროლის 3 საათიანი მოქმედების შესწავლა TLR4 და CD36 რეცეპტორების ექსპრესიის ინტენსივობაზე.....	78
სურ. 27. მაკროფაგების, RAW264.7 უჯრედულ კულტურაში, რეზვერატროლის 3 საათიანი მოქმედების TLR4 და CD36 რეცეპტორების ექსპრესიის ინტენსივობაზე.....	79
სურ. 28. ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 სფეროიდულ კულტურაში რეზვერატროლის 3 საათიანი მოქმედების შესწავლა TLR4 და CD36 რეცეპტორების ექსპრესიის ინტენსივობაზე.....	79
სურ. 29. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 მონომრიან კულტურაში ლიპიდების შემცველობაზე, გლუკოზის მაღალი პროცენტის შემცველობის საკვებ არეზე (5% გლუკოზით)	80
სურ. 30. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის გავლენის შეფასება, მაკროფაგების, RAW264.7 კულტურაში ლიპიდების შემცველობაზე, გლუკოზის მაღალი პროცენტის შემცველობის საკვებ არეზე (5% გლუკოზით)	81
სურ. 31. გაცხიმოვნებული ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 მონომრიან კულტურაში რეზვერატროლის (10μM) 3 საათიანი მოქმედების შეფასება H3k4me3-ის დონეზე.....	81

სურ. 32 გაცხიმოვნებული ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 მონოშრიან კულტურაში PPAR-γ-ს ექსპრესიის დონე რეზვერატროლთან 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ და poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP)-ის ინჰიბიტორის ოლაპარიბის (Olap) თანაობისას.....	82
სურ. 33. გაცხიმოვნებული RAW264.7 მონოშრიან კულტურაში PPAR-γ-ს ექსპრესიის დონე რეზვერატროლთან 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ და poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP)-ის ინჰიბიტორის ოლაპარიბის (Olap) თანაობისას.....	83
სურ. 34. გაცხიმოვნებული ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 სფეროიდულ კულტურაში PPAR-γ-ს ექსპრესიის დონე რეზვერატროლთან 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ.....	83
სურ. 35. გაცხიმოვნებულ მაკროფაგებში რეზვერატროლის გავლენის შეფასება პოლი-ადპ-რიბოზილირებაზე (ვესტერნ ბლოტინგის მეთოდით).....	84
სურ. 36. გაცხიმოვნებული ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 უჯრედულ კულტურაში რეზვერატროლის (5μM) 3 საათიანი მოქმედების ლიპიდების შემცველობაზე, ინჰიბიტორების გამოყენებისას	85
სურ. 37. გაცხიმოვნებული ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 უჯრედულ კულტურაში რეზვერატროლის (10μM) 3 საათიანი მოქმედების შეფასება ლიპიდების შემცველობაზე, ინჰიბიტორების გამოყენებისას	85
სურ. 38. მაკროფაგების, RAW264.7 უჯრედულ კულტურაში რეზვერატროლის (5μM) 3 საათიანი მოქმედების ლიპიდების შემცველობაზე, ოლაპარიბის და EX-527-ის გამოყენებისას.....	86
სურ. 39. მაკროფაგების, RAW264.7 უჯრედულ კულტურაში რეზვერატროლის (10μM) 3 საათიანი მოქმედების ლიპიდების შემცველობაზე, ოლაპარიბის და EX-527-ის გამოყენებისას.....	87
სურ. 40. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის (5μM) გავლენის შეფასება, მაკროფაგების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ TNFα -ს დონის ცვლილებაზე, ოლაპარიბის და EX-527-ის გამოყენებისას	88
სურ. 41. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის (5μM) გავლენის შეფასება, მაკროფაგების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ IL-6-ს დონის ცვლილებაზე, ოლაპარიბის გამოყენებისას	88
სურ. 42. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის (5μM) გავლენის შეფასება, მაკროფაგების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ IL-10-ს დონის ცვლილებაზე ოლაპარიბის გამოყენებისას	89
სურ. 43. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის (10μM) გავლენის შეფასება, მაკროფაგების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ TNFα -ს დონის ცვლილებაზე, ოლაპარიბის და EX-527-ის გამოყენებისას	89
სურ. 44. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის (10μM) გავლენის შეფასება, მაკროფაგების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ IL-6-ს (ა) და IL-10-ს (ბ)-ს დონის ცვლილებაზე, ოლაპარიბის გამოყენებისას	90
სურ. 45. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის (5μM) გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ TNFα -ს დონის ცვლილებაზე, ოლაპარიბის და EX-527-ის გამოყენებისას	91

სურ. 46. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის (5 μ M) გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ IL-6-ს დონის ცვლილებაზე ოლაპარიბის გამოყენებისას	91
სურ. 47. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის (5 μ M) გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ IL-10-ს დონის ცვლილებაზე ოლაპარიბის გამოყენებისას	92
სურ. 48. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის (10 μ M) გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ TNF α -ს დონის ცვლილებაზე, ოლაპარიბის და EX-527-ის გამოყენებისას	92
სურ. 49. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის (10 μ M) გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ IL-6-ს დონის ცვლილებაზე ოლაპარიბის გამოყენებისას	93
სურ. 50. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის (10 μ M) გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ IL-10-ს დონის ცვლილებაზე ოლაპარიბის გამოყენებისას	93

აბრევიატურა

NAFLD - Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, არაალკოჰოლური ღვიძლის ცხიმოვანი დაავადება

NASH - Non-Alcoholic Steatohepatitis - არაალკოჰოლური სტეატოჰეპატიტი

TLR4 - Toll-Like Receptor 4, თოლ მსგავსი რეცეპტორი 4

PPAR- γ - peroxisome proliferator-activated receptor- γ , პეროქსისომის პროლიფერატორით გააქტიურებული გამა რეცეპტორი

Sirt1 – Sirtuin 1, სირტუინ 1

PARP1 - Poly ADP-ribose polymerase 1 - პოლი-ADP-რიბოზა პოლიმერაზა 1

NAD⁺ - Nicotinamide adenine dinucleotide - ნიკოტინამიდ ადენინ დინუკლეოტიდი

NAM – nicotinamide – ნიკოტინამიდი

TyrRS -tyrosyl transfer-RNA (tRNA) synthetase - tRNA სინთეტაზა

NF- κ B - Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, გააქტიურებული B უჯრედების ბირთვული ფაქტორი კაპა-მსუბუქი ჯაჭვის გამაძლიერებელი

LKB1- Liver Kinase B1, ღვიძლის კინაზა B1

AMPK - AMP-activated protein kinase, AMP-აქტივირებული პროტეინ კინაზა

oxLDL- Oxidized Low-Density Lipoprotein, დაჟანგული დაბალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინი

TyrRS - Tyrosyl-tRNA Synthetase, თიროზილის-tRNA-სინთეტაზა

MAFLD - Metabolic Associated Fatty Liver Disease, მეტაბოლურ სინდრომთან

ასოცირებული ცხიმოვანი ღვიძლის დაავადება

DM - Diabetes Mellitus, შაქრიანი დიაბეტი

HDL-CH - High-Density Lipoprotein Cholesterol, მაღალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინის ქოლესტერინი

FFAs - Free fatty acids, თავისუფალი ცხიმოვანი მჟავები

CREBH - Cyclic AMP-Responsive Element-Binding Protein H, ციკლური AMP-ზე მოპასუხე ელემენტების დამაკავშირებელი ცილა H

ChREBP - Carbohydrate response element binding protein, ნახშირწყლების საპასუხო ელემენტის დამაკავშირებელი ცილა

S1P - Sphingosine 1-phosphate - სფინგოზინ 1-ფოსფატი

PKB/Akt - Protein kinase B / Akt, პროტეინ კინაზა B/

PDE-3B - Phosphodiesterase-3B, ფოსფოდიესტერაზა-3 B

PKC ϵ - Protein kinase C ϵ , პროტეინ კინაზა C ϵ

SREBP-1 - Sterol regulatory element-binding protein-1, სტეროლის მარეგულირებელი ელემენტის დამაკავშირებელი ცილა-1

FAS - Fatty acid synthase, ცხიმოვანი მჟავის სინთაზა

CD36 - Fatty acid transporter, ცხიმოვანი მჟავის გადამტანი

HSL - Hormone-sensitive lipase, ჰორმონ მგრძნობიარე ლიპაზა

IRE1 - Inositol-requiring enzyme type 1, ინოზიტოლ-საჭირო 1 ტიპის ფერმენტი

ATF6 - Activating transcription factor 6, ტრანსკრიპციის გამააქტივირებელი ფაქტორი 6

PNPLA3 - Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3, პატატინის მსგავსი ფოსფოლიპაზის დომენის შემცველი ცილა 3

ATGL - Adipose triglyceride lipase, ცხიმოვანი ტრიგლიცერიდების ლიპაზა
 ALT - Alanine aminotransferase, ალანინ ამინოტრანსფერაზა
 AST - Aspartate aminotransferase, ასპარტატ ამინოტრანსფერაზა
 DNMT1 - DNA Methyltransferase 1, დნმ მეთილტრანსფერაზა 1
 NADH - Nicotinamide adenine dinucleotide, ნიკოტინამიდი ადენინ დინუკლეოტიდი
 NRF2 - Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, ბირთვულ ფაქტორ ერითროიდ 2-თან დაკავშირებული ფაქტორი 2
 TNF α - Tumor necrosis factor alpha, სიმსივნის ნეკროზის ფაქტორი ალფა
 VLDL - Very low-density lipoprotein, ძალიან დაბალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინი
 JNK - c-Jun N-terminal kinase, c-Jun N-ტერმინალური კინაზა
 TRAF2 - Tumor necrosis factor- α receptor-associated factor 2, სიმსივნის ნეკროზის ფაქტორ- α რეცეპტორთან ასოცირებული ფაქტორი 2
 PPAR α - Peroxisome proliferator-activated receptor alpha, პეროქსისომის პროლიფერატორით გააქტიურებული ალფა რეცეპტორი
 PGC-1 α - Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha, პეროქსისომის პროლიფერატორით გააქტიურებული რეცეპტორ გამას კოაქტივატორი -1 ალფა
 ApoB - Apolipoprotein B, აპოლიპოპროტეინ B
 H3K4 - Histone H3 Lysine 4, ჰისტონ 3-ის, მეოთხე ლიზინი
 H3K9 - Histone H3 Lysine 9, ჰისტონ 3-ის, მეცხრე ლიზინი
 H3K4me3 - Trimethylation of Histone H3 at Lysine 4, ჰისტონ 3-ის, მეოთხე ლიზინის ტრი-მეთილირება
 IGF-I - Insulin-like growth factor I - ინსულინის მსგავსი ზრდის ფაქტორი-1
 NAMPT - Nicotinamide Phosphoribosyltransferase - ნიკოტინამიდ ფოსფორიბოზილ-ტრანსფერაზა
 PBS - Phosphate Buffered Saline - ფოსფატური ბუფერის მარილის ხსნარით
 BCL6 - B-cell lymphoma-6 protein - B-უჯრედული ლიმფომის-6-ს ცილა

1. შესავალი

ღვიძლის არაალკოჰოლური ცხიმოვანი დაავადება (NAFLD) ღვიძლის ერთ-ერთი ყველაზე გავრცელებული პათოლოგიაა. მისი პრევალენტობა მსოფლიოში შეადგენს დაახლოებით 25-30%-ს (Younossi et al., 2023). NAFLD-ის მთავარი მახასიათებელია ღვიძლში ლიპიდური წვეთების ჭარბი დაგროვება (Perumpail et al., 2017). დაავადების გამომწვევ მიზეზად მოიაზრება მაღალ ცხიმოვანი დიეტა და მჯდომარე ცხოვრების წესი, რის შედეგსაც წარმოადგენს ადამიანის ორგანიზმში დარღვეული ლიპიდების მეტაბოლიზმი. დაავადება არ არის კავშირში ალკოჰოლის მიღებასთან ან ვირუსულ ინფექციასთან (Miele et al., 2021). NAFLD მჭიდრო კავშირშია სიმსუქნესთან, ინსულინის რეზისტენტობასთან, მე-2 ტიპის დიაბეტთან და ისეთ მეტაბოლურ დარღვევებთან, როგორიცაა დისლიპიდემია და ჰიპერტენზია. მსოფლიოში NAFLD-ს პრევალენტობა ჭარბწონიან პოპულაციაში შეადგენს 70%-ს (Queck et al., 2023), ხოლო მე-2 ტიპის დიაბეტის მქონე პოპულაციაში - 55%-ს (Younossi et al., 2019). 2030 წლისთვის, მოზრდილებში NAFLD მოიზარება, როგორც ღვიძლის გადანერგვის მთავარი მიზეზი (Grander et al., 2023).

NAFLD მოიცავს დაავადებების სპექტრს, მისი განვითარება იწყება მარტივი სტეატოზით (ღვიძლის გაცხიმოვნებით) და შეიძლება პროგრესირდეს სტეატოჰეპატიტში, რომელიც ლიპიდების დეპონირებასთან ერთად ხასიათდება ანთებითი პროცესების განვითარებით. ანთებითი პროცესის განვითარებაში წამყვანი როლი აქვთ ღვიძლში მობინადრე მაკროფაგებს - კუპფერის უჯრედებს და სისხლიდან ინფილტრირებულ მონოციტებს. ღვიძლის გაცხიმოვნებისას, ლიპიდები, ენდოტოქსინები, ჟანგბადის აქტიური ფორმები (ROS), უჯრედგარე ვეზიკულები არეგულირებენ კუპფერის უჯრედების დიფერენცირებას M1 ტიპად და ანთებითი პროცესების წამოწყებას (Ma et al., 2022; Alisi et al., 2017). ანთება კი თავის მხრივ პასუხისმგებელია ინსულინის რეზისტენტობისა და ჟანგვითი სტრესის განვითარებაზე, გარდა ამისა ღვიძლის გაცხიმოვნების უფრო მეტად გაძლიერებაზე (Fernandez-Veledo et

al., 2009; Han et al., 2015), შედეგად NASH შეიძლება პროგრესირდეს ფიბროზში და ჰეპატოცელულარულ კარცინომაში (Piazzolla et al., 2020; Pouwels et al., 2022).

NAFLD-ს მკურნალობისას კრიტიკულია ჰეპატოციტებში და მაკროფაგებში დეპონირებული ლიპიდების შემცირება და ლიპოტოქსიურობით გამოწვეული ღვიძლის დაზიანების მკურნალობა. NAFLD-ს სამკურნალოდ ყველაზე ეფექტურ საშუალებად ითვლება კალორიების შეზღუდვა და აქტიური ცხოვრების წესი. ჩატარებული კვლევების მიხედვით, წონის კლება მინიმუმ 5%-ით აუმჯობესებს NAFLD-ს მდგომარეობას, ხოლო 7-10%-იანი კლება გავლენას ახდენს NASH-ზე და ფიბროზზე (Brunner et al., 2019).

NAFLD-ს მკურნალობისთვის დიდი ყურადღება ექცევა ბუნებრივ ნაერთებს. მათ შორის ყურადსაღებია ბუნებრივი პოლიფენოლი რეზვერატროლი (RSV), რომლის მოქმედება მკაცრად დამოკიდებულია კონცენტრაციაზე და უჯრედის ტიპზე. ნაჩვენებია, რომ დაბალი კონცენტრაციებით (5–20 μM) მოქმედებისას ადამიანებში ავლენს კალორიების შეზღუდვის (Timmers et al., 2011), ანთების საწინააღმდეგო (Nassir et al., 2016; Ding et al., 2017), ანტი-ოქსიდანტურ ეფექტებს (Li et al., 2017), ხოლო მაღალ კონცენტრაციებზე საპირისპირო - აპოპტოზური (Szende et al. 2000), ანტი-სიმსივნური მოქმედება (Cai et al., 2015) ახასიათებს. მიუხედავად იმისა, რომ რეზვერატროლის შესწავლა ათწლეულებია მიმდინარეობს, კვლავ უცნობია, თუ რომელი სასიგნალო გზით იწვევს რეზვერატროლი ლიპიდების დეპონირების შემცირებას.

იქიდან გამომდინარე, რომ დაავადების პრევალენტობა წლიდან წლამდე იზრდება, ამასთანავე ადამიანებისთვის რთულია კალორიების შეზღუდვა. შესაბამისად მნიშვნელოვანია NAFLD-ს სამკურნალო ისეთი საშუალების შემუშავება, რომელიც იქნება ეფექტური და ამავე დროს ხელმისაწვდომი უკვე არსებული მედიკამენტისგან განსხვავებით. აქედან გამომდინარე ჩვენი კვლევის მთავარ მიზნად დავისახეთ სწორედ რეზვერატროლის სამოქმედო გზის შესწავლა ლიპიდების მეტაბოლიზმის რეგულირებისას, რათა სამომავლოდ გამოყენებული იქნას როგორც NAFLD-ს სამკურნალო მედიკამენტი.

ექსპერიმენტალური ნაწილის დაგეგმვისას, ჩვენ ერთიმხრივ ყურადღება გავამახვილეთ იმ მოლეკულებზე, რომლებიც პასუხისმგებლები არიან დაავადების

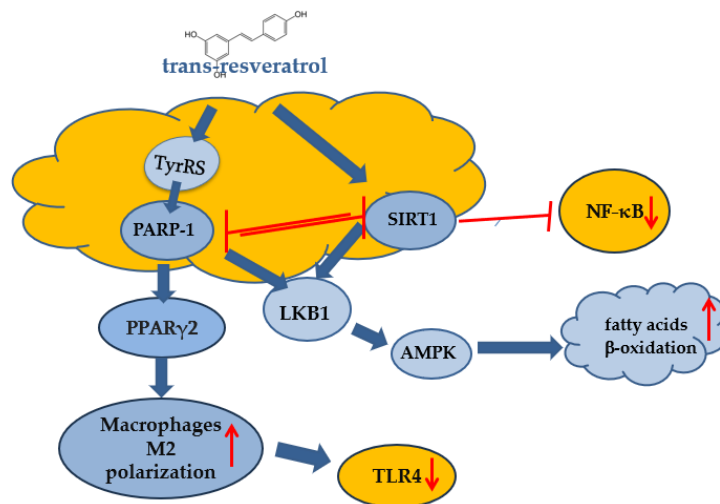
პროგრესირებაზე. მეორეს მხრივ შევარჩიეთ რეზერატოლის ის სამიზნე მოლეკულები, რომლებიც შეიძლება პოტენციურად მონაწილეობდნენ ლიპიდების მეტაბოლიზმში. მაგალითად, NAFLD-ს დროს ღვიძლში იზრდება პრო-ანთებითი რეაქციების ინიციატიაში მონაწილე Toll-რეცეპტორების ოჯახის წევრის, TLR4-ის ექსპრესია (Vespasiani-Gentilucci et al., 2015). პარალელურად იზრდება ცხიმოვანი მჟავების გადამტანი რეცეპტორის CD36-ს ექსპრესია (Bechmann et al., 2010). ასევე აღსანიშნავია, ამ ორი რეცეპტორის კავშირი, Stewart et al., 2010-ს მიხედვით CD36 უკავშირდება oxLDL-ს (Oxidized Low-Density Lipoprotein), ხოლო ამის შემდეგ CD36 ქმნის ჰეტეროტრიმერულ კომპლექსს TLR4 და TLR6 რეცეპტორებთან და იწვევს პრო-ანთებითი სასიგნალო გზის აქტივაციას (Stewart et al., 2010). შესაბამისად, გადაწყვეტით შეგვემოწმებინა რეზერატოლის დაბალი კონცენტრაციებით (5 μ M, 10 μ M) მოქმედება, რა გავლენას მოახდენდა ამ რეცეპტორების ექსპრესიაზე. გარდა ამისა, როგორც ლიტერატურიდან ცნობილია რეზერატოლის სამიზნეს წარმოადგენენ შემდეგი მოლეკულები: Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) და Sirtuin 1 (Sirt1). აღსანიშნავია, რომ მათ საერთო სუბსტრატი აქვთ (NAD⁺), ამიტომ ერთმანეთის მიმართ ანტაგონისტური ურთიერთობა ახასიათებთ. თუმცა ორივე მოლეკულა დამოუკიდებლად იწვევს LKB1-AMPK სასიგნალო გზის აქტივაციას და კატაბოლური პროცესების გააქტიურებას (Shin et al., 2009). აღსანიშნავია, რომ PARP1 შუამავლობს PAR-დამოკიდებული PPAR γ 2-ს გენის აქტივაციას (Erener et al., 2012), ეს უკანასკნელი კი პასუხისმეგებელია მაკროფაგების M2 ტიპად პოლარიზაციაზე. Sirt1 აგრეთვე გამოირჩევა ანთების საწინააღმდეგო მოქმედებით, რადგან ამცირებს ანთებით პროცესებში მონაწილე NF- κ B-ს ტრანსკრიპციულ აქტივობას (Yeung et al., 2004). ვინაიდან ორივე მოლეკულა, PARP1 და Sirt1 ჩართულია როგორც ლიპიდების, ისე ანთების რეგულირებაში, გადაწყვეტით შეგვემოწმებინა იქნებოდა თუ არა კავშირი ამ მოლეკულებსა და რეზერატოლის მიერ ლიპიდების დეპონირების შემცირებას შორის.

რეზერატოლის მოქმედების მოლეკულური მექანიზმის შესასწავლად დავგეგმეთ შემდეგი ამოცანები:

1. *In vitro* სამოდელო სისტემის შემუშავება, რომელიც მოიცავს ღვიძლის შემადგენლობაში შემავალი ორი განსხვავებული ტიპის უჯრედის - ჰეპატოციტების და მაკროფაგების, გაცხიმოვნებულ მონოშირან უჯრედულ კულტურებს და გაცხიმოვნებული ჰეპატოსფეროიდების სამგანზომილებიან მოდელს.

2. რეზვერატროლის გავლენის შეფასება მოკლე (3 სთ) და გრძელვადიან (24 სთ) დროის წერტილებზე:

- აპოპტოზზე და ჟანგვით სტრესზე
- ლიპიდების დეპონირებაზე და ცხიმოვანი მჟავების გადამტანი მოლეკულის CD36-ს ექსპრესიაზე
- ანთებით პროცესებზე, კერძოდ TLR4-ის ექსპრესიაზე, პრო-ანთებითი და რეგულატორული ციტოკინების დონეზე
- PARP1 და Sirt1 მოლეკულების სასიგნალო გზებზე



სურ. 1. რეზვერატროლის სავარაუდო სამოქმედო გზები

2. ლიტერატურის მიმოხილვა

2.1 არაალკოჰოლური ღვიძლის ცხიმოვანი დაავადება, ეპიდემიოლოგია, დაავადების სპექტრი და პათოგენეზი

არაალკოჰოლური ღვიძლის ცხიმოვანი დაავადება (NAFLD) მსოფლიოში გავრცელებული ღვიძლის ქრონიკული დაავადებაა. NAFLD-ს მთავარი დამახასიათებელი ნიშანს წარმოადგენს ღვიძლში ცხიმების ჭარბი დაგროვება, რომელიც არ არის გამოწვეული ალკოჰოლის მიღებით (>30 გ/დღე კაცებში და >20 გ/დღე ქალებში), მედიკამენტებით ან ვირუსული ინფექციით. მის გამომწვევ მთავარ მიზეზებს გენეტიკური წინასწარ განწყობა და/ან მაღალ კალორიული საკვები და მჯდომარე ცხოვრების წესი წარმოადგენენ (Petaja et al., 2016; Hao et al., 2019).

NAFLD-ს დიაგნოსტიკა ძირითადად ხდება ულტრაბგერით, კომპიუტერული ტომოგრაფიით და მაგნეტო რეზონანსული კვლევით, თუმცა ბიოფსია კვლავ რჩება დიაგნოსტიკის ოქროს სტანდარტად (Piazzolla et al., 2020). NAFLD-ისა და მასთან დაკავშირებული დაავადებების დიაგნოსტიკისას, ღვიძლის ბიოფსიას შეუძლია განარჩიოს დაავადების სხვადასხვა ფორმები (Cusi et al., 2022).

NAFLD მოიცავს დაავადებების სპექტრს, თავდაპირველად ვითარდება ღვიძლის მარტივი სტეატოზი, რომელიც ხასიათდება ჰეპატოციტებში ტრიგლიცერიდებით მდიდარი მიკრო და მაკრო ვეზიკულარული წვეთებით. სტეატოზის დროს, ჰეპატოციტებში ტრიგლიცერიდების მასა შეადგენს ღვიძლის მასის მინიმუმ 5-10%-ს. სტეატოზის მქონე პაციენტების უმეტეს შემთხვევაში დაავადება არ პროგრესირებს, თუმცა მცირე პროცენტს მაინც უვითარდება არაალკოჰოლური სტეატოჰეპატიტი (NASH), რომელიც ცხიმების დაგროვებასთან ერთად ხასიათდება ჟანგვითი სტრესით, ანთებითი პროცესებით და სხვადასხვა ხარისხის ღვიძლის ფიბროზით. ეს უკანასკნელი შეიძლება პროგრესირდეს ღვიძლის ციროზში და ჰეპატო-ცელულარული კარცინომამდე (Piazzolla et al., 2020; Pouwels et al., 2022).

NAFLD არა მხოლოდ ფართოდ გავრცელებული ღვიძლის ქრონიკული დაავადებაა, არამედ ყველაზე სწრაფად მზარდიც. მისი პრევალენტობა განსხვავდება სხვადასხვა ეთნიკურ ჯგუფებში და ყოველწლიურად იზრდება (Zelber-Sagi et al., 2006). მსოფლიოში

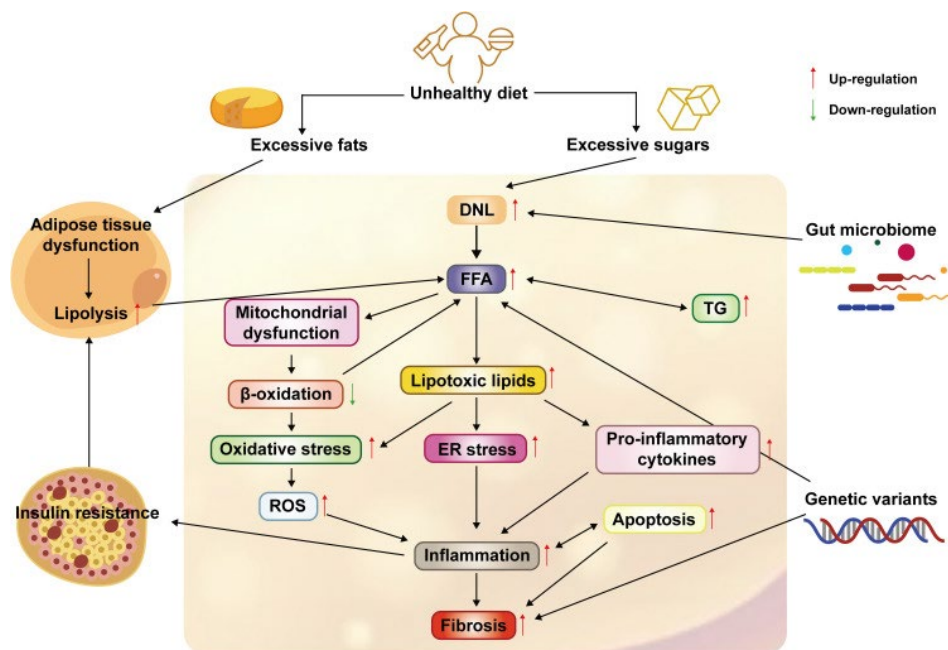
ბავშვებში დაავადების პრევალენტობა საშუალოდ მერყეობს 5-10%-მდე (Yu et al., 2021). მოზრდილებში, M. Younoss. Et al 2023-ს მიხედვით, კი 1990–2019 წლებში, საშუალოდ შეადგინა 30,1%. თუმცა აღსანიშნავია, რომ NAFLD-ს პრევალენტობა 1990-2006 წლებში 25.3%-დან გაიზარდა 38.2%-მდე 2016-2019 წლებში. ეს ზრდა შესაბამისობაშია სიმსუქნის და მეორე ტიპის დიაბეტის პრევალენტობის ეპიდემიურ ზრდასთან (Younossi et al., 2023). NAFLD მჭიდრო კავშირშია სიმსუქნესთან, ინსულინის რეზისტენტობასთან, მე-2 ტიპის დიაბეტთან და ისეთ მეტაბოლურ დარღვევებთან, როგორიცაა დისლიპიდემია და ჰიპერტენზია. მსოფლიოში NAFLD-ს პრევალენტობა ჭარბწონიან პოპულაციაში შეადგენს 70%-ს (Queck et al., 2023), ხოლო მე-2 ტიპის დიაბეტის მქონე პოპულაციაში - 55%-ს (Younossi et al., 2019). 2030 წლისთვის, მოზრდილებში NAFLD მოიზარება, როგორც ღვიძლის გადანერგვის მთავარი მიზეზი (Grander et al., 2023).

2020 წელს, ექსპერტების საერთაშორისო პანელმა, დაავადების უფრო სწორი ფორმულირებისთვის, შეიმუშავა ახალი ტერმინი, კერძოდ მეტაბოლურ სინდრომთან ასოცირებული ცხიმოვანი ღვიძლის დაავადება (MAFLD) (Eslam et al., 2020). ავტორებმა, გარდა ახალი დასახელებისა, დაავადების დიაგნოსტიკის ახალი მიდგომაც შეიმუშავეს. მათი შეთანხმებით, MAFLD-ის დიაგნოსტიკა/შეფასება უნდა განისაზღვროს შემდეგი კრიტერიუმებით: (1) ღვიძლის სტეატოზის არსებობა (რომლის დიაგნოსტიკა უნდა მოხდეს ულტრაბგერით, კომპიუტერული ტომოგრაფიით, ან მაგნეტო-რეზონანსული სპექტროსკოპიით) და ან (2a) სიმსუქნის დიაგნოზი ($BMI \geq 25$ კგ/მ²), (2b) შაქრიანი დიაბეტის დიაგნოზი (DM), ან (2c) მეტაბოლური დისფუნქციის მინიმუმ ორი კომპონენტი (მომატებული წელის გარშემოწერილობა, მომატებული C რეაქტიული ცილა, ჰიპერგლიკემია, ჰიპერტენზია, მაღალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინების (HDL-CH) შემცირებული დონე და ტრიგლიცერიდების (TG) მომატებული დონე). ამ მიდგომით, აღარ არის აუცილებლობა ალკოჰოლის მიღების ან ვირუსული ჰეპატიტის გამორიცხვა. აგრეთვე MAFLD-ს დიაგნოსტიკის კრიტერიუმები საშუალებას იძლევა გამხდარ პაციენტებშიც მოხდეს დაავადების დიაგნოზის დასმა (Eslam et al., 2020). ჯერ-ჯერობით კვლავ კვლევის საგანია, თუ რამდენად უკეთ ასახავს

დაავადებას შემოთავაზებული ტერმინი და დიაგნოსტიკის ეს გზა, ამიტომ მეცნიერების ნაწილი კვლავ ძველ ტერმინოლოგიას იყენებს.

NAFLD-ს პათოგენეზი საკმაოდ კომპლექსურია და ბოლომდე შესწავლილი არ არის, თუმცა არსებობს დაავადების განვითარების ჰიპოთეზები. თავდაპირველად მეცნიერები ეყრდნობოდნენ ე.წ. ორ-სტიმულიან ჰიპოთეზას (Day et al. 1998), რომლის მიხედვით „პირველ სტიმულს“ წარმოადგენს ღვიძლში ტრიგლიცერიდების დაგროვება, რომელიც ღვიძლს უფრო მგრძნობიარეს ხდის „მეორე სტიმულის“ მიმართ. მეორე სტიმული კი აერთიანებს ისეთ პროცესებს როგორიცაა ჟაგვითი და ენდოპლაზმური ბადის სტრესი, მიტოქონდრიის დისფუნქცია, ანთება, რაც თავის მხრივ იწვევს სტეატოჰეპატიტის ან/და ფიბროზის განვითარებას. თუმცა მოგვიანებით ჩატარებულმა კვლევებმა აჩვენეს, რომ თავისუფალ ცხიმოვან მჟავებს (FFA) თავად შეუძლიათ ჟანგვითი სტრესის და ანთებითი გზების აქტივაცია. უფრო მეტიც, ტრიგლიცერიდები არ არიან ტოქსიურები, შეიძლება პირიქით იცავენ კიდევ ღვიძლს FFA-ს დაგროვებით გამოწვეული ლიპოტოქსიურობისგან (Svegliati-Baroni et al., 2019). თავებში ნაჩვენები იქნა, რომ ტრიგლიცერიდების სინთეზის ფარმაკოლოგიური ინჰიბირება ამცირებს სტეატოზის დონეს, თუმცა იწვევს ღვიძლის დაზიანების ზრდას, კერძოდ იზრდება ჟანგვითი სტრესი, FFA-ს დონე და ლიპიდების პეროქსიდაცია (Yamaguchi et al., 2007). შესაბამისად მოხდა არსებული „ორ-სტიმულიანი“ ჰიპოთეზის მოდიფიცირება, სადაც პირველ სტიმულს ტრიგლიცერიდების ნაცვლად FFA-ს დაგროვება წარმოადგენს, რომელსაც თავად შეუძლია ღვიძლის დაზიანების გამოწვევა (Downman et al., 2010). ასევე აღსანიშნავია, რომ სხვადასხვა FFA-ს ტოქსიურობა განსხვავდება ერთმანეთისგან, მაგალითად ადამიანის ან თავის ჰეპატოციტებში მონოუჯერი ცხიმოვანი მჟავებით მოქმედება იწვევს ლიპიდური წვეთების ფორმირებას, სიცოცხლიუნარიანობის ცვლილების გარეშე. ხოლო ნაჯერი ცხიმოვანი მჟავებით მოქმედება ამცირებს უჯრედების სიცოცხლიუნარიანობას, ზრდის კასპაზების აქტივაციას და აპოპტოზის დონეს, მაშინ როდესაც ლიპიდური წვეთების ფორმირება მხოლოდ უმნიშვნელოა (Li et al., 2009). მეცნიერებმა მიიჩნიეს, რომ ორ-სტიმულიანი ჰიპოთეზა მაინც მეტისმეტად ამარტივებს NAFLD-ს კომპლექსურობას და შეიმუშავეს „მრავალ-სტიმულიანი“

ჰიპოთეზა, რომლის მიხედვითაც დაავადება ვითარდება სხვადასხვა ფაქტორების პარალელური მოქმედების შედეგად. კერძოდ გენეტიკურად წინასწარ განწყობილ ადამიანებში ნაჯერი ცხიმებით და ფრუქტოზით მდიდარი საკვები, მჯდომარე ცხოვრების წესი, ინსულინის რეზისტენტობა, ლიპოტოქსიურობა, ჟაგვითი სტრესი, თანდაყოლილი იმუნური სისტემის აქტივაცია, ნაწლავის მიკრობიომი მოქმედებენ სინერგისტულად და პასუხისმგებლები არიან დაავადების განვითარებასა და პროგრესირებაზე (Tilg et al., 2010).



სურ.2. NAFLD-ს პათოგენეზი (Meng D, et al 2023, Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity 2023 16 4043-4064' Originally published by and used with permission from Dove Medical Press Ltd.)

2.2 ლიპიდების მეტაბოლიზმი

ღვიძლი წარმოადგენს მთავარ მეტაბოლურ ორგანოს და არეგულირებს ლიპიდებისა და ნახშირწყლების ჰომეოსტაზს. ფიზიოლოგიურ პირობებში, ღვიძლის ფუნქცია ცხიმოვანი მჟავების გადამუშავებაა და არა შენახვა. როდესაც ენერგიის ათვისება/ხარჯვის ბალანსი ირღვევა, ცხიმები იწყებენ ისეთ ორგანოებში და ქსოვილებში დაგროვებას, სადაც ფიზიოლოგიურად მათი ადგილი არ არის. ამ ფენომენს ექტოპიური

ლიპიდების დაგროვება ეწოდება და არაალკოჰოლური, ღვიძლის ცხიმოვანი დაავადება (NAFLD) სწორედ ამის ნათელი მაგალითია (Byrne et al., 2014).

ღვიძლში ტრიგლიცერიდების სამი ძირითადი წყარო არსებობს: საკვები, *de novo* სინთეზი და ცხიმოვანი ქსოვილი. მაღალ ცხიმოვანი კვების დროს, ნაწლავიდან ათვისებული საკვები ცხიმები ტრიგლიცერიდებით მდიდარი ქილომიკრონების და თავისუფალი ცხიმოვანი მჟავების ფორმით ერთვებიან სისხლის მიმოქცევის სისტემაში, მათი 15%-ს ათვისება ხდება ღვიძლის ჰეპატოციტების მიერ (Cohen et al., 2011). ღვიძლში ათვისებულ თავისუფალ ცხიმოვან მჟავებს სამი შესაძლო გზა აქვთ: შეიძლება მიტოქონდრიაში მეტაბოლიზდეს PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor alpha) -ს და PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 alpha) დამოკიდებული β -დაჟანგვის გზით, რომ გამოიმუშაოს ენერგია და კეტონის სხეულები, ან ესთერიფიცირდეს ტრიგლიცერიდებად და დაგროვდეს ლიპიდური წვეთის ფორმით, ან შეიფუტოს აპოლიპოპროტეინ B(ApoB)-სთან და გამოიყოს სისხლის მიმოქცევის სისტემაში VLDL (very low density lipoproteins)-ს ფორმით (Ohira et al., 2016).

Hao et al., 2023-ს მიხედვით, ცხიმოვანი ღვიძლის დაავადებისას, ღვიძლის ტრიგლიცერიდების 60%-ს შეადგენს ცხიმოვანი ქსოვილიდან მიღებული თავისუფალი ცხიმოვანი მჟავები, 25%-ს *de novo* ლიპოგენეზის გზით მიღებული ცხიმოვანი მჟავები და 15%-ს საკვებიდან მიღებული ლიპიდები (Hao et al., 2023). ღვიძლის გაცხიმოვნება ვითარდება, როდესაც მასში ცხიმოვანი ქსოვილიდან შემოდინებული FFA-ს ნაკადი და *de novo* ლიპოგენეზი მკვეთრად აჭარბებს ლიპიდების β -დაჟანგვას და ძალიან დაბალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინების(VLDL) ფორმით ტრიგლიცერიდების გამოყოფას (Esler et al., 2019). ღვიძლში დარღვეული მეტაბოლიზმის პარალელურად, NAFLD ასოცირდება სისტემურ დისლიპიდემიასთან, რაც გამოიხატება მაღალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინების (HDL) დონის შემცირებასთან და ტრიგლიცერიდების, ქოლესტერინის და დაბალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინების (LDL) დონეების გაზრდასთან (Ho et al., 2019). გარდა ამისა, ლიტერატურაში არსებული მონაცემებით, ნაჯერი ცხიმოვანი მჟავები (FA) გაცილებით ტოქსიურია ღვიძლისთვის, ვიდრე უჯერი FA (როგორც MUFA, ასევე PUFA)(Wei et al., 2006). NAFLD-ს მიმდინარეობისას პალმიტატი

(16-C) და სტერატი (18-C) არის ძირითადი ნაჯერი ცხიმოვანი მჟავები, რომელთა კონცენტრაცია იმატებს და ასოცირდება დაავადების პროგრესირებასთან (Akazava et al., 2010).

2.3 კავშირი ღვიძლის გაცხიმოვნებასა და ინსულინის რეზისტენტობას შორის

ზოგადად ადამიანის ორგანიზმში, ცხიმოვანი მჟავებისთვის ყველაზე უსაფრთხო ადგილი არის ცხიმოვანი ქსოვილი. მაღალ კალორიული საკვების მიღებისას, ფიზიოლოგიურ პირობებში ცხიმოვანი ქსოვილი ფართოვდება, ადგილი აქვს გარე-უჯრედული მატრიქსის რემოდელირებას, ღეროვანი უჯრედებისგან ახალი ცხიმოვანი უჯრედების დიფერენცირებას, ანგიოგენეზის პროცესს და დიდი რაოდენობით ჭარბი ტრიგლიცერიდების შენახვას (Saporano et al., 2015). ადიპოციტების ნორმალური ფუნქციონირებისთვის დიდი მნიშვნელობა აქვს ჰორმონ ინსულინის მგრძნობელობას და მის სასიგნალო გზას. ინსულინი ჩართულია ტრიგლიცერიდების შენახვის პროცესებში შემდეგი გზებით: ხელს უწყობს პრე-ადიპოციტების ადიპოციტებად დიფერენცირებას, აძლიერებს მოცირკულირე გლუკოზისა და ცხიმოვანი მჟავების ათვისებას სისხლის მიმოქცევის სისტემიდან, ხელს უწყობს გლუკოზის ნეიტრალურ ლიპიდებად გარდაქმნას (de novo lipogenesis) და თრგუნავს ცხიმოვანი ქსოვილის ლიპოლიზის (Peterson et al., 2018).

ინსულინის რეზისტენტობა მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ღვიძლის გაცხიმოვნების პროცესში (Marusic et al., 2021), თუმცა უცნობია სტეატოზი იწვევს ინსულინის რეზისტენტობას თუ პირიქით. რადგან ერთის მხრივ მაღალ კალორიული საკვების მიღებას შეუძლია გამოიწვიოს სიმსუქნე და ინსულინის რეზისტენტობა, ხოლო ინსულინის რეზისტენტობა თავის მხრივ პასუხისმგებელია ღვიძლის ცხიმოვანი დაავადების განვითარებაზე. საკვებით გამოწვეული NAFLD-ს მქონე პაციენტებში ნაჩვენებია, რომ არსებობს კორელაცია ღვიძლში ტრიგლიცერიდების შემცველობასა და ინსულინის რეზისტენტობას შორის (Bril et al., 2014; Lyu et al., 2020). ერთი-ერთი მექანიზმი, რომელიც აკავშირებს NAFLD-ს ღვიძლის ინსულინის რეზისტენტობასთან,

მოიცავს დიაცილგლიცეროლის (DAG) შუამავლობით პროტეინ კინაზა C-ε (PKCε)-ს აქტივაციას და ინსულინის რეცეპტორის (INSR) კინაზური აქტივობის ინჰიბირებას. მკვლევარებმა აჩვენეს, რომ ღვიძლში ლიპიდების დაგროვებისას, იზრდება დიაცილგლიცეროლების ნაკადი, რომლებიც იწვევენ PKCε (პროტეინ კინაზა Cε)-ს მემბრანაზე გადაადგილებას და აქტივაციას. PKCε-ს მიერ ინსულინის რეცეპტორის β ჯაჭვის ფოსფორილირება (Thr¹¹⁶⁰) კი აინჰიბირებს რეცეპტორის კინაზურ აქტივობას (Peterson et al., 2016).

რაც შეეხება ინსულინის გავლენას ლიპიდების მეტაბოლიზმზე, ფიზიოლოგიურ პირობებში, ის ხელს უშლის ლიპოლიზის პროცესს, ჰორმონ-მგრძნობიარე ლიპაზას (HSL) ინჰიბირებით. HSL არის უჯრედშიდა ლიპაზა, რომელიც პასუხისმგებელია ცხიმოვანი ქსოვილიდან სისხლის მიმოქცევის სისტემაში თავისუფალი ცხიმოვანი მჟავების გამონათავისუფლებაზე (Nogueira-de-Almeida et al., 2020). ადიპოციტებში, HSL-ს ფოსფორილირება/აქტივაცია ხდება cAMP-დამოკიდებული პროტეინ კინაზა A-ს (PKA) მიერ, კატაბოლური ჰორმონების ეპინეფრინი, ნორეპინეფრინი და გლუკაგონის საპასუხოდ. HSL-ს აქტივაცია იწვევს მისი ჰიდროლიზური აქტივობის ზრდას, ციტოზოლიდან ლიპიდური წვეთის ზედაპირზე გადანაცვლებას და ტრიგლიცერიდების ჰიდროლიზის პროცესში ჩართვას (Yeaman et al., 2004). ინსულინი თავის მხრივ ხელს უშლის ამ პროცესს, რადგან მისი სასიგნალო გზის მიმდინარეობისას, PKB/Akt დამოკიდებული PDE-3B-ს (phosphodiesterase-3B) ფოსფორილირება, თავის მხრივ აკატალიზებს cAMP-ს დაშლას მის არააქტიურ ფორმამდე. შესაბამისად, შემცირებული cAMP-ს დონე იწვევს PKA-ს აქტივაციის შემცირებას და HSL-ს სტიმულაციის ინჰიბირებას (Althaher et al., 2022). აქედან გამომდინარე ინსულინის რეზისტენტობა იწვევს თავისუფალი ცხიმოვანი მჟავების ჭარბად გამონათავისუფლებას, რადგან ცხიმოვანი ქსოვილი ინსულინის ლიპოლიზური მოქმედების მიმართ ხდება რეზისტენტული.

ინსულინი აგრეთვე არეგულირებს ღვიძლში *de novo* ლიპოგენეზს. ის Akt/mTORC1 დამოკიდებული სასიგნალო გზით იწვევს ტრანსკრიპციის ფაქტორის SREBP1-c (Sterol regulatory element-binding protein-1c)-ს აქტივაციას (Porstmann et al., 2008).

რომელიც თავის მხრივ პასუხისმგებელია ისეთი ლიპოგენური გენების ექსპრესიაზე, როგორიცაა ACC (acetyl-CoA carboxylase), ცხიმოვანი მჟავების გადამტანი - CD36 და FAS (fatty acid synthase) (Xu et al., 2013). ჩვეულებრივ, SREBP-1 სინთეზირდება, როგორც 125-kDa წინამორბედი ცილა და მდებარეობს ენდოპლაზმურ ბადეზე. ინსულინის სიგნალის საპასუხოდ გადაინაცვლებს გოლჯის კომპლექსში, სადაც პროტეაზებით გახლეჩვის შედეგად, მომწიფებული ფორმით (68-kDa SREBP-1) გამონთავისუფლდება და გადაინაცვლებს ბირთვში სამიზნე გენების ექსპრესიისთვის. აღსანიშნავია, რომ თუ ცხიმოვან ქსოვილში ინსულინის რეზისტენტობა ხელს უშლის ინსულინს ლიპოლიზის დათრგუნვის პროცესში, ღვიძლში ინსულინის რეზისტენტობა კიდევ უფრო აძლიერებს SREBP1-c-ს მოქმედებას (Han et al., 2015).

2.4 გენეტიკის როლი NAFLD-ს განვითარებაში

ლიტერატურაში არსებული მონაცემებით, ღვიძლის გაცხიმოვნების მიზეზი შეიძლება იყოს გენეტიკური წინასწარ განწყობა. NAFLD-ს მემკვიდრეობით გაცემის გვხვდება შემთხვევების 20-70%-ში. რაც დამოკიდებულია ეთნიკურობაზე, კვლევის დიზაინზე და მეთოდოლოგიაზე (Sookoian et al., 2017). ლიტერატურაში არსებული მონაცემების მიხედვით, ერთ-ერთ მთავარ გენეტიკურ რისკ ფაქტორს წარმოადგენს პატაინის მსგავსი ფოსფოლიპაზის დომენის შემცველ პროტეინ 3 (PNPLA3) -ის მუტაცია. ეს ცილა ასევე ცნობილია, როგორც ადიპონუტრინი (ADPN). ჰეპატოციტებში PNPLA3 ცილა ექსპრესირდება ლიპიდურ წვეთებში, სადაც ფიზიოლოგიურ პირობებში ახდენს ტრიგლიცერიდების ჰიდროლიზს და ახდენს პოლიუჯერი ცხიმოვანი მჟავების (PUFA) გადატანას დი- და ტრი-აცილგლიცეროლებიდან ფოსფოქოლინებამდე, შემდგომში ფოსფატიდილქოლინის სინთეზისთვის (Luukkonen et al., 2019).

PNPLA3-ს ვარიანტი წარმოადგენს ციტოზინისა და გუანინის ნუკლეოტიდების ტრანსვერსიის მუტაციას კოდონ 148-ში, რომელიც იწვევს იზოლეიცინის მეთიონინით ჩანაცვლებას (rs738409 C > G, p.I148M). ნაჩვენებია, რომ I148M ვარიანტი მჭიდროდ არის დაკავშირებული ღვიძლში ტრიგლიცერიდების ჭარბ სინთეზთან და შემცირებულ

ლიპოლიზისთან, აგრეთვე სისხლში ALT(ალანინ ამინოტრანსფერაზა) და AST (ასპარტატ ამინოტრანსფერაზა) ფერმენტების მატებასთან (Romeo et al., 2008). უნდა აღვნიშნოთ, განსხვავებით სიმსუქნესთან ასოცირებული NAFLD-ისგან, I148M ვარიანტის მატარებელ ადამიანებს არ უვითარდებათ სიმსუქნე, ინსულინის რეზისტენტობა და გულსისხლძარღვთა დაავადებები (Sookoian et al., 2011). რაც შეიძლება აიხსნას იმ ფაქტით, რომ ღვიძლის გაცხიმოვნება ძირითადად პოლიუჯერი ცხიმოვანი მჟავებით მდიდარი ტრიგლიცერიდების (PUFA) ხარჯზე ხდება, ხოლო სიმსუქნესთან ასოცირებული NAFLD კი ძირითადად ნაჯერი და მონოუჯერი ტრიგლიცერიდებით ხასიათდება. ნაჩვენებია, რომ პოლიუჯერი ცხიმოვანი მჟავები არ იწვევენ ინსულინის რეზისტენტობას და პირიქით აუმჯობესებენ ინსულინის მგრძნობელობას (Valenzuela et al., 2012). *In vitro* კვლევების მიხედვით, PNPLA3 (I148M)-ს მიერ ტრიგლიცერიდების ჰიდროლიზური აქტივობა 80%-ით მცირდება (Huang et al., 2011). რაც შესაბამისად იწვევს PUFA-თი გამდიდრებული ლიპიდური წვეთების შეკავებას და ღვიძლში ტრიგლიცერიდების ჭარბად დაგროვებას (Luukkonen et al., 2019).

გარდა ამისა, ცნობილია რომ PNPLA3 (I148M) რეზისტენტულია აუტოფაგიით ან უბიქვიტინ დამოკიდებული დეგრადაციის მიმართ და შესაბამისად გროვდება ლიპიდურ წვეთებზე (Basuray et al., 2017). ჭარბად ექსპრესირებული PNPLA3 (I148M) ასევე ხელს უშლის PNPLA2 (Patatin Like Phospholipase Domain Containing 2) ფერმენტის მოქმედებას. ეს უკანასკნელი აგრეთვე ცნობილია, როგორც ATGL (Adipose triglyceride lipase) და გადამწყვეტი როლი აქვს ლიპიდური წვეთების ლიპოლიზისის ინიცირებაში. PNPLA3(I148M) მოქმედებს როგორც კონკურენტი ATGL-ს მიმართ და ხელს უშლის მის კო-აქტივატორთან - CGI-58 (comparative gene identification 58) დაკავშირებაში (Wang et al., 2019).

2.5 ეპიგენეტიკა და NAFLD

NAFLD-ს პათოგენეზის შესწავლისას, გენეტიკურ ფაქტორებთან ერთად, არანაკლებ მნიშვნელოვანია ეპიგენეტიკური ცვლილებების გათვალისწინება. NAFLD

ხასიათდება ცვლილებებით ტრანსკრიპციულ დონეზე, რაც გავლენას ახდენს გენების ექსპრესიასა და ფენოტიპზე (Lee et al., 2014). რიგი ეპიგენეტიკური აბერაციები დაკავშირებულია NAFLD-ს პათოგენეზთან, რაც იწვევს ლიპიდურ მეტაბოლიზმში ცვლილებებს, ინსულინის რეზისტენტობას (IR), ენდოპლაზმური ბადის (ER) და მიტოქონდრიის დისფუნქციას, ჟანგვით სტრესს და ანთებას. ყველა ეს პროცესი კი მონაწილეობს NAFLD-ის განვითარებასა და პროგრესირებაში (Del Campo et al., 2018).

აბერენტული დნმ-ს მეთილირება წარმოადგენს მთავარ ეპიგენეტიკურ პროცესს, რომელიც პასუხისმგებელია NAFLD-ს პროგრესირებაზე NASH-ის სტადიაზე. მეთილტრანსფერაზები ახდენენ ციტოზინის მეთილირებას 5-მეთილციტოზინად, რაც როგორც წესი, თრგუნავს ტრანსკრიპციას და იწვევს გენების „გაჩუმებას“ (Shi et al., 2023). როდესაც გარე ან შინაგანი სტიმული იწვევს უჯრედშიდა ჟანგბადის აქტიური ფორმები (ROS) მაღალ გამომუშავებას, ჟანგვითი სტრესი იწვევს არა მხოლოდ დნმ-ის სტრუქტურის დაზიანებას, არამედ შეუძლია გამოიწვიოს დნმ მეთილტრანსფერაზას აქტივობის მოდულირება და გლობალური ან სპეციფიკური გენის ცვლილებები დნმ-ის მეთილირების გაძლიერებით (Vachher et al., 2022; Podrini et al., 2013). მაგალითად, DNMT1 (DNA Methyltransferase 1) პასუხისმგებელია მიტოქონდრიულ დნმ-ში (mtDNA) ციტოზინის მეთილირებაზე მე-5 ნახშირბადის პოზიციაზე (5mC) და NASH-ს მქონე პაციენტები გამოირჩევიან მისი მაღალი დონით. სტეატოზის მქონე პაციენტებთან შედარებით, NASH-ს მქონე პაციენტებში მნიშველოვნად იზრდება მიტოქონდრიული დნმ-ში NADH დეჰიდროგენაზა 6 (mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 6_MIT-ND6)-ს გენის მეთილირების დონე. პარალელურად კი მცირდება MT-ND6-ის ტრანსკრიპციული აქტივობა და ცილის ექსპრესია (Pirola et al., 2013).

დნმ-ს მეთილირებასთან ერთად, ჰისტონების მეთილირების პროცესი ასოცირდება ღვიძლში ცხიმების დაგროვებასთან. ჰისტონების მეთილირებას არეგულირებენ სხვადასხვა ფერმენტები, როგორცაა ჰისტონების მეთილტრანსფერაზები და ჰისტონების დემეთილაზები. ისინი გავლენას ახდენენ ადიპოგენეზთან დაკავშირებული გენების ექსპრესიაზე (Xu et al., 2024). მაგალითად, მეთილტრანსფერაზები MLL3/KMT2C და MLL4/KMT2D იწვევენ H3K4me3-ის ზრდას

ლიპოგენური გენების პრომოტორულ რეგიონში (LPL, SREBF2, SCD1 და ა.შ.) და ხელს უწყობენ ლიპიდების სინთეზს (Castellano-Castillo et al., 2019).

Jun et al, 2012 -ს მიხედვით თავის პირველად ჰეპატოციტებში ლიპიდების დაგროვება იწვევს ჰისტონების H3K4 და H3K9 ტრიმეთილირებას PPAR α -ს და ლიპოლიზისთან დაკავშირებულ გენებთან, რაც ამცირებს მათ mRNA-ს დონეს საკონტროლო ნიმუშებთან შედარებით (Jun et al., 2012). He et al., 2012-ს მიხედვით, ჰეპატოცელულარული კარცინომის მქონე პაციენტებში და HepG2, Huh7 უჯრედულ ხაზებში H3K4me3-ს მაღალი დონე კორელაციაშია გადარჩენის ცუდ პროგნოზთან (He et al., 2012).

2.6 ენდოპლაზმური ბადის სტრესი და NAFLD

ენდოპლაზმური ბადის(ER) სტრესის მნიშვნელობა კარგად არის შესწავლილი NAFLD-ის პათოგენეზში და მოიაზრება როგორც დაავადების აღმოცენების და პროგრესირების ერთ-ერთ განმსაზღვრელ ფაქტორად (Kammoun et al., 2009).

როგორც ცნობილია, ღვიძლი ასრულებს მეტაბოლურ, სეკრეტორულ და ექსკრეტორულ ფუნქციებს მთელი სხეულის ჰომეოსტაზის შესანარჩუნებლად. ჰეპატოციტები, პასუხისმგებლები არიან დიდი რაოდენობით სეკრეტორული ცილების (ალბუმინი, α -1 ანტიტრიფსინი, ლიპოპროტეინები და კოაგულაციის ფაქტორები) გამომუშავებაზე და ჩართულები არიან ლიპიდური მეტაბოლიზმის ყველა ძირითად გზაში, მათ შორის ლიპოგენეზში, ტრიგლიცერიდების სინთეზსა და შენახვაში, აპოლიპოპროტეინების შეკრებასა და სეკრეციაში და ცხიმოვანი მჟავების დაჟანგვაში. ჰეპატოციტები მათი ფუნქციიდან გამომდინარე, გამდიდრებულია როგორც გლუვი, ასევე ხორკლიანი ენდოპლაზმური ბადით და მეტად მგრძნობიარეა ენდოპლაზმური ბადის სტრესის განვითარების მიმართ (Kammoun et al., 2009).

ჰეპატოციტებში, ლიპიდების მეტაბოლიზმის მთავარ ადგილს წარმოადგენს ენდოპლაზმური ბადე. ენდოპლაზმურ ბადეზე განლაგებული არიან ტრანსკრიპციის ფაქტორები, SREBP1c და SREBP2, რომლებიც არეგულირებენ ცხიმოვანი მჟავების და

სტეროლის სინთეზს და აგრეთვე ენდოპლაზმურ ბადეზე მდებარეობენ აცილტრანსფერაზას ფერმენტები, მათ შორის დიგლიცერიდის აცილტრანსფერაზა (DGAT), რომლებიც ცხიმოვანი მჟავებიდან და გლიცეროლიდან ასინთეზირებენ ტრიგლიცერიდებს. დაბალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინების(VLDL) აწყობა/შეკრება აგრეთვე მიმდინარეობს ენდოპლაზმურ ბადეში, სანამ გადაინაცვლებს გოლჯის აპარატში. შესაბამისად ER-ს ჰომესტაზი მჭიდროდ არის დაკავშირებული ლიპიდების ჰომეოსტაზთან.

ენდოპლაზმური ბადის დისფუნქცია მჭიდრო კავშირშია NAFLD-ს პათოგენეზთან. ვინაიდან ენდოპლაზმური ბადის სტრესის ქრონიკული განვითარება იწვევს *de novo* ლიპოგენეზის გაძლიერებას, მიტოქონდრიების დისფუნქციას, ჟანგვით სტრესს, ანთებას და აპოპტოზს. ყველა ეს პროცესი, კი თავისმხრივ ჩართულია NAFLD-ს პათოგენეზში და მის პროგრესირებაში.

ლიტერატურაში არსებული მონაცემების მიხედვით, ლიპიდების დეპონირებით გამოწვეული ER სტრესის ინდუქციაში მონაწილეობს რამდენიმე მექანიზმი. პირველი გზა მოიცავს მემბრანის დენადობის ცვლილებას და Ca^{2+} ჰომეოსტაზის დარღვევას. ნაჩვენებია რომ ჭარბწონიან თაგვებში, ენდოპლაზმური ბადის მემბრანის ფოსფოლიპიდებში ნაჯერი ცხიმოვანი მჟავების ჩართვა, გავლენას ახდენს მემბრანის შემადგენლობაზე, კერძოდ იზრდება ფოსფატიდილ-ქოლინის/ფოსფატიდილეთანოლამინთან თანაფარდობა, რის გამოც იცვლება ER მემბრანის დენადობა და სუსტდება სარკო-ენდოპლაზმურ რეტიკულუმში Ca^{2+} -ATP-აზას აქტივობა (Hyslop et al., 1982). რაც გავლენას ახდენს Ca^{2+} ჰომეოსტაზზე და ER-ში ქვეითდება Ca^{2+} დონე (Arruda et al., 2015; Fu et al., 2011). ER-ში Ca^{2+} შემცველობის დაქვეითება წარმოადგენს ER-ს სტრესის მთავარ მიზეზს, რადგან ER-ს ინტრალუმინალური ჩაპერონების უმეტესობა Ca^{2+} -ზეა დამოკიდებული (Fu et al., 2011). გარდა ამისა, ფოსფატიდილქოლინი ჩართულია ლიპიდური წვეთების და VLDL-ს ფორმირებაში (Kim et al., 2011). სტეატოზის დროს კი ეს ორივე პროცესი გაძლიერებულია. აგრეთვე ცნობილია, რომ ER სტრესის ინიცირებაში მონაწილე ცილები IRE1 და PERK, პირდაპირ აღიქვამენ ER მემბრანის ლიპიდურ გაჯერებას და ააქტიურებენ UPR გზებს (Promlek et al., 2011; Volmer et al., 2013). გარდა

ამისა, ღვიძლის გაცხიმოვნებისას ER-ზე ძლიერდება VLDL სეკრეციისთვის და ლიპიდური წვეთების ფორმირებისთვის საჭირო ცილების სინთეზი, აპოლიპოპროტეინი B100 (Shelness et al., 1999) და პერილიპინ-2 (Lee et al., 2012). ამ ორი ცილის გაზრდილი სინთეზი, ხელს უწყობს ER სტრესს, მაგრამ შედარებით სუსტად ვიდრე Ca^{2+} -ს ჰომეოსტაზის დარღვევებით გამოწვეული სტრესი.

ER-ს სტრესის საპასუხოდ უჯრედებში ირთება UPR (unfolded protein response) რომელიც აერთიანებს რამდენიმე სასიგნალო გზას, რომელთა ინიცირებაში მონაწილეობს სამი ER-ს ტრანსმემბრანული ცილა: PERK (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase), IRE-1 (inositol-requiring 1) და ATF6 (activating transcription factor 6) (Walter et al., 2011). UPR-ს მთავარი მიზანი უჯრედის ჰომეოსტაზის აღდგენაა, ამისათვის მისი სასიგნალო მოლეკულები ამცირებენ სეკრეტორული ცილების ტრანსლაციას და აძლიერებენ ჩაპერონების გენების ექსპრესიას რომ ხელი შეუწყონ ცილების აწყობას. აგრეთვე UPR აძლიერებს ERAD (ER-associated degradation)-ში ჩართული ფერმენტების ექსპრესიას (Wang et al., 2016). ER-ს სტრესის ქრონიკულად განვითარება პირიქით აუარესებებს უჯრედების მდგომარეობას და ხელს უწყობს დაავადების პროგრესირებას. ღვიძლში ER სტრესის განვითარება იწვევს ROS-ების გამომუშავებას, მემბრანის ფოსფოლიპიდების გაჯერებას, VLDLR-ს ექსპრესიის მატებას, PPAR α და FXR-ს ექსპრესიის შემცირებას ღვიძლში (Han et al., 2016; Zhang et al., 2014).

როგორც ცნობილია, ინსულინი არეგულირებს ღვიძლში *de novo* ლიპოგენეზს ტრანსკრიპციის ფაქტორის SREBP1-c (Sterol regulatory element-binding protein-1c)-ს აქტივაციით. რომელიც თავის მხრივ პასუხისმეგებელია ლიპოგენური გენების ექსპრესიაზე (Ferre et al., 2010; Wang et al., 2015). სტეატოზთან ასოცირებული ინსულინის რეზისტენტობისას, *de novo* ლიპოგენეზი რჩება კვლავ პარადოქსულად აქტიური, რაც სავარაუდოდ აიხსნება ენდოპლაზმური ბადის ქრონიკული სტრესით (Brown et al., 2008). Kammoun et al. 2009-ს მიხედვით, თავის ჰეპატოციტებში ER-ს სტრესის განვითარება, ინსულინისგან დამოუკიდებლად, იწვევს SREBP-1c-ს პროტეოლიზისურ გახლეჩვას და შედეგად ლიპოგენური გენების ექსპრესიას (Kammoun et al. 2009). რაც აიხსნება INSIG1 ცილის მოქმედებით. INSIG1 წარმოადგენს ER-ს მემბრანულ ცილას და როდესაც

უჯრედებში ქოლესტერინის კონცენტრაცია იზრდება, ეს უკანასკნელი უკავშირდება SREBP-SCAP კომპლექსს და ხელს უშლის მათ გოლჯის კოპლექსში გადანაცვლებას. CHO-7 უჯრედებზე ჩატარებული ექსპერიმენტებით აჩვენეს, რომ ER-ს სტრესის გამოწვევისას, უჯრედში INSIG1-ს სინთეზი მცირდება და სტეროლის დონის მიუხედავად SREBP-1c პროტეოლიზისი იზრდება (Lee et al., 2004).

აღსანიშნავია, რომ ER-ს სტრესი ჰეპატოციტებში *de novo* ლიპოგენეზის გაძლიერებასთან ერთად (SREBP-1c-ს აქტივაციის გზით), არეგულირებს VLDL-ს რეცეპტორის (Very low-density lipoprotein receptor) ექსპრესიას. ზოგადად, VLDL-ს რეცეპტორი წარმოადგენს დაბალი-სიმკვრივის ლიპოპროტეინების ოჯახის წევრს, მის ექსპრესიას არეგულირებს ბირთვული რეცეპტორი PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) და ხელს უწყობს ცხიმოვან ქსოვილში ლიპიდების დაგროვებას (Tao et al., 2011). VLDLR-დეფიციტურ თაგვებში, სისხლში ტრიგლიცერიდების კონცენტრაცია იმატებს და ლიპიდების ათვისება ცხიმოვან ქსოვილში მცირდება, ასევე კლებულობს ცხიმოვანი ქსოვილის მასა. ზოგადად ღვიძლში VLDL-ს რეცეპტორის ექსპრესია დაბალია, თუმცა Jo H. et al 2013-ს მიხედვით თაგვებში ER სტრესის საპასუხოდ UPR-ს წევრი PERK-ATF4-ს სასიგნალო გზის აქტივაციით VLDL-ს რეცეპტორის გენის ექსპრესია იზრდება, ტრანსკრიპციის ფაქტორი ATF4 პირდაპირ უკავშირდება VLDL-ს რეცეპტორის პრომოტორის უბანს, რაც განაპირობებს ER სტრესით გამოწვეულ სტეატოზს (Jo et al., 2013). აღსანიშნავია, რომ ER-ს სტრესით ინდუცირებული ღვიძლის სტეატოზი მნიშვნელოვნად სუსტდება როგორც VLDLR- და APOE-დეფიციტურ პირველად ჰეპატოციტებში, ისე თაგვებში (Jo et al., 2013). რაც მიუთითებს იმაზე, რომ NAFLD-ს პათოგენეზში VLDL-ს რეცეპტორს მნიშვნელოვანი ფუნქცია აკისრია.

ER-ს სტრესი, გავლენას ახდენს ჰეპატოციტებიდან VLDL-ს გამოყოფაზე. როგორც *in vitro* ისე *in vivo* ექსპერიმენტებში აჩვენეს, რომ ჰეპატოციტებში ლიპიდების ჭარბად დეპონირებით გამოწვეული ქრონიკული ER სტრესი იწვევს ER-ში apoB-ს გამოყოფის შემცირებას (Ota et al., 2008). ეს ცილა კი მონაწილეობს VLDL-ს ფორმირებასა და უჯრედიდან გამოყოფაში. Qiu et al., 2011-ს მიხედვით HepG2 უჯრედებში ER-ს სტრესის ინდუქცია იწვევს ახლად სინთეზირებული apoB-ს არასწორ ფოლდინგს (Qiu et al., 2011),

რასაც მოყვება მისი დეგრადაცია როგორც (ERAD) სასიგნალო გზით გამოწვეული პროტეოლიზის გზით, ისე აუტოფაგიის მეშვეობით PERK- ATF4 დამოკიდებული სასიგნალო გზით (Qiu et al., 2011).

ER-ს სტრესის ქრონიკულად მიმდინარეობა აგრეთვე მოქმედებს გლუკოზის ჰომეოსტაზზე. Ozcan et al., 2004-ს მიხედვით UPR-ს ერთ-ერთი მთავარი ცილა IRE1 α ააქტიურებს JNK(c-Jun N-terminal kinase)-ს, და შესაბამისად აინჰიბირებს ინსულინის სასიგნალო გზას (Ozcan et al., 2004). ვინაიდან JNK იწვევს IRS1 (ინსულინის რეცეპტორის სუბსტრატ 1)-ს ფოსფორილირებას და/ან დეგრადაციას. როდესაც არ ხდება ER სტრესის აღმოფხვრა, ეს უკანასკნელი იწვევს ინსულინის რეზისტენტობასა და ღვიძლში გაძლიერებულ გლუკონეოგენეზს (Ozcan et al., 2006). გარდა ამისა ჰიპერ აქტივირებული JNK ხელს უწყობს ლიპიდების დაგროვებას, ვინაიდან ამცირებს ბირთვული რეცეპტორის, PPAR α -ს სამიზნე გენების ექსპრესიას, ეს გენები პასუხისმგებლები არიან ცხიმოვანი მჟავების დაჟანგვაზე და კეტოგენეზზე (Pal et al., 2016). Vernia et al. 2014-ს მიხედვით JNK-ს ეს ეფექტი, გამოწვეულია არა PPAR α -ს ექსპრესიის ცვლილებით, არამედ მისი კო-რეპრესორების NCoR1 და NRIP1 ექსპრესიის შემცირებით (Vernia et al. 2014).

2.7 ჟანგვითი სტრესის როლი NAFLD-ს მიმდინარეობისას

ჟანგვითი სტრესი ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი ფაქტორია NAFLD-ს განვითარებაში, განსაკუთრებით სტეატოზიდან სტეატოჰეპატიტში პროგრესირებისას (Chen et al., 2020, Garcia-Ruiz et al., 2018). ზოგადად, ჟანგბადის აქტიური ფორმები (ROS) მონაწილეობენ იმუნურ პასუხში, მეტაბოლიზმში, უჯრედების პროლიფერაციასა და დიფერენცირებაში (Chen et al., 2020). უჯრედების ნორმალური ფუნქციონირებისათვის საჭიროა არსებობდეს ბალანსი ROS-ებსა და ანტიოქსიდანტურ სისტემებს შორის. NAFLD-ს დროს, ჰეპატოციტებში FFA-ს ნაკადის ზრდა იწვევს ROS-ების დონის მატებას და ანტიოქსიდანტური სისტემების შესუსტებას, რის გამოც ვითარდება ჟანგვითი სტრესი (Sunny et al., 2017; Mantena et al., 2009).

ჰეპატოციტებში, ROS-ების ყველაზე მნიშვნელოვან წყაროს წარმოადგენს მიტოქონდრია. ღვიძლში ცხიმოვანი მჟავების ჭარბი დაგროვებისას, ჰეპატოციტებში ირთვება კომპენსატორული მექანიზმები. გაძლიერებული ცხიმოვანი მჟავების დაჟანგვისა და ტრიკარბოქსილის მჟავას ციკლის მეშვეობით იზრდება NADH-ისა და FADH₂-ის წარმოქმნა (Santhosh et al., 2012). ეს მოლეკულები, ATP-ს გამომუშავებისთვის, ელექტრონებით უზრუნველყოფენ ელექტრონების სატრანსპორტო ჯაჭვს (ETC). თუმცა, მიტოქონდრიების ქრონიკული დატვირთვისას, ელექტრონები ტოვებენ ელექტრონების სატრანსპორტო ჯაჭვს (ETC), რის შემდეგაც ურთიერთქმედებენ ჟანგბადთან და წარმოიქმნება სუპეროქსიდის რადიკალები (O₂^{•-}) (Sunny et al., 2017). O₂^{•-} წარმოადგენს ROS-ების მთავარ წყაროს მიტოქონდრიაში. წარმოქმნილი სუპეროქსიდის რადიკალები ფერმენტულად ან სპონტანურად გარდაიქმნება წყალბადის ზეჟანგად. წყალბადის ზეჟანგი თავის მხრივ სუპეროქსიდის რადიკალებთან ურთიერთქმედებით ან ფენტონის რეაქციით გარდაიქმნება ჰიდროქსილის რადიკალებად. გარდა ამისა, სუპეროქსიდის რადიკალებს შეუძლიათ აზოტის ოქსიდთან ურთიერთქმედება და პეროქსინიტრიტის რადიკალების წარმოქმნა (Kanaan et al., 2017).

პეროქსინიტრიტი და ჰიდროქსილის რადიკალები მაღალი რეაქტიულობით ხასიათდებიან და აზიანებენ ცილებს, ლიპიდებს და დნმ-ს. ჰისტონური ცილების დაცვის ნაკლებობის გამო, მიტოქონდრიულ დნმ (mtDNA) მეტად მგრძნობიარეა ROS-ების მიმართ. ჟანგვითი სტრესის დროს, mtDNA-ს მუტაციები იწვევენ სუნთქვითი ჯაჭვის დეფექტებს და მიტოქონდრიული ბიოგენეზის დაქვეითებას (Li et al., 2020). მიტოქონდრიაში ROS-ების ერთ-ერთ სამიზნეს ასევე წარმოადგენს მიტოქონდრიის შიდა მემბრანის ფოსფოლიპიდი, კარდიოლიპინი (Karkucinska-Wieckowska et al., 2022). კარდიოლიპინი მნიშვნელოვან როლს ასრულებს მიტოქონდრიული ცილების, მათ შორის ელექტრონის სატრანსპორტო კომპლექსების, რეგულირებაში. შესაბამისად მისი დაჟანგვა იწვევს ETC-ის აქტივობის შემცირებას, ATP-ს წარმოქმნის დაქვეითებას და ელექტრონების გაძლიერებულ გაჟონვას ETC-დან, რაც იწვევს ROS წარმოების შემდგომ ზრდას, შესაბამისად იქმნება მანკიერი წრე, რასაც მოყვება მიტოქონდრიული

მემბრანული პოტენციალის კოლაფსი, ROS-ების და ციტოქრომ C-ს ციტოზოლში გამონთავისუფლება და კასპაზ- დამოკიდებული აპოპტოზი.

აღსანიშნავია, რომ ენდოპლაზმური ბადის სტრესი თავის მხრივ აგრეთვე ხელს უწყობს მიტოქონდრიაში ROS-ების გამომუშავებას. ნაჩვენებია, რომ ჭარბწონიანი თავის ჰეპატოციტებში იზრდება მიტოქონდრებთან ასოცირებული მემბრანების რიცხვი და შესაბამისად იზრდება Ca^{2+} -ის ნაკადი ენდოპლაზმური ბადიდან მიტოქონდრიაში (Arruda et al., 2014; Fu et al., 2011). Ca^{2+} იწვევს ციტოქრომ c-ს მიტოქონდრიის მატრიქსიდან გამოყოფას (leading to opening of the permeability transition pore). ციტოქრომ c-ს დაკარგვა კი თავის მხრივ ელექტრონების სატრანსპორტო ჯაჭვში (ETC) აინჰიბირებს კომპლექს III-დან კომპლექს IV-ში ელექტრონების გადატანას და აძლიერებს ROS-ების გამომუშავებას. აგრეთვე Ca^{2+} -ს მაღალი კონცენტრაცია ასტიმულირებს კრების ციკლის დეჰიდროგენაზებს, შესაბამისად აძლიერებს ჟანგბადის შთანთქმასა და ROS-ის გამომუშავებას (Denton et al., 2009; Cao et al., 2014). გრძელ-ვადიანი Ca^{2+} -ით გადატვირთვა უარყოფითად მოქმედებს მიტოქონდრიის ფუნქციონირებაზე, რადგან პროგრესულად იწვევს ჟანგვითი ფოსფორილირების უნარის შესუსტებას და ჟანგბადის აქტიური ფორმების ჭარბად გამომუშავებას (Egnatchik et al., 2014). ეს მოცემულობა შესაბამისობაშია ლიტერატურაში არსებულ მონაცემებთან, რომ ადრეული სტეატოზისას ATP-ის დონე პროგრესულად მცირდება, მიუხედავად იმისა, რომ ელექტრონების სატრანსპორტო ჯაჭვის აქტივობა იზრდება (Peng et al., 2010).

ER-ს სტრესის დროს, Ca^{2+} -ს გამონთავისუფლება მიტოქონდრიაში და შემდგომში ROS-ების გამომუშავება მანკიერ წრეს ქმნის, ვინაიდან ROS-ები თავის მხრივ ხელს უწყობენ ER-დან კიდევ უფრო მეტი Ca^{2+} -ს გამოყოფას, IP3Rs და ryanodine რეცეპტორებზე მოქმედებით. რაც ER-ში კიდევ უფრო აფერხებს ცილების ფოლდინგს (Bravo et al., 2011).

მიტოქონდრიების გარდა, ROS-ების მნიშვნელოვან წყაროს წარმოადგენენ პეროქსისომები და მიკროსომები. გრძელჯაჭვიანი ცხიმოვანი მჟავების (LCFAs) სიჭარბისას პეროქსისომები და მიკროსომები ეფექტურად ჟანგავენ გრძელ ჯაჭვიან და ძალიან გრძელ ჯაჭვიან თავისუფალ ცხიმოვან მჟავებს, ვიდრე მიტოქონდრიები. თუმცა, პეროქსისომული β დაჟანგვის საწყის ეტაპზე, აცილ-CoA ოქსიდაზა (ACOX)-ს

სუპეროქსიდის ფერმენტები გამოიმუშავენ H_2O_2 -ს, რომელიც სწრაფად გარდაიქმნება რეაქტიულ ჰიდროქსილის რადიკალად ($HO\cdot$) (Koek et al., 2011). მსგავსად, ძალიან გრძელ ჯაჭვიანი ცხიმოვანი მჟავების (VLCFAs) დაჟანგვისას, მიკროსომული ციტოქრომები-P4502E1 და -P4504A გამოიმუშავენ თავისუფალ რადიკალებს (Lin et al., 2019).

ჟანგვითი სტრესის ერთ-ერთი მთავარი გამოვლინება არის ლიპიდების დაზიანება. ROS-ების მიერ პოლიუჯერი ცხიმოვანი მჟავების პეროქსიდაციის შედეგად ფორმირდება მაღალ-რეაქტიული ალდეჰიდის პროდუქტები, როგორიცაა 4-ჰიდროქსი-2-ნონენალი (4-hydroxy-2-nonenal, 4-HNE) და მალონდიალდეჰიდი (MDA) (Sutti et al., 2020; Chen et al., 2020). მნიშვნელოვანია, რომ მათ ახასიათებთ უფრო ხანგრძლივი ნახევარდაშლის პერიოდი, ვიდრე ROS-ებს და შეუძლიათ უჯრედგარე სივრცეში დიფუზია და ქსოვილის დაზიანება (Smirne et al., 2022). მაგალითად HNE-ს და MDA-ს აძლიერებენ აპოლიპოპროტეინ B-ს პროტეოლიზს, რაც იწვევს VLDL-ის სეკრეციის შემცირებას და, შესაბამისად, უკვე არსებული ღვიძლის სტეატოზის გამწვავებას (Smirne et al., 2022).

ფიზიოლოგიურ პირობებში, ROS-ების ჭარბად წარმოქმნისას, ფერმენტული და არაფერმენტული ანტიოქსიდანტები ანეიტრალენ მათ დონეს. პირველადი ანტიოქსიდანტური სისტემა მოიცავს სხვადასხვა ფერმენტებს, როგორიცაა კატალაზა (CAT), სუპეროქსიდის დისმუტაზა (SODs) და გლუტათიონ პეროქსიდაზა (GPx) (Jena et al., 2023). ანტიოქსიდანტური სისტემის არაფერმენტულ კომპონენტებს მიეკუთვნებიან: ვიტამინი C/A/E და გლუტათიონი. ისინი მოქმედებენ, როგორც ელექტრონის ტრანსპორტერები და უჯრედის კომპონენტებს იცავენ ROS-ების დამაზიანებელი ეფექტისგან (Arroyave – Ospina et al., 2021). სუპეროქსიდის დისმუტაზას ფერმენტები (SODs) წარმოადგენენ ჟანგვითი სტრესისგან თავდაცვის პირველ ხაზს და აკატალიზებენ სუპეროქსიდის ანიონის გარდაქმნას H_2O_2 -მდე და მოლეკულურ ჟანგბადამდე. კატალაზა და გლუტათიონ პეროქსიდაზა კი გარდაქმნიან წყალბადის ზეჟანგს წყლად და მოლეკულურ ჟანგბადად (Jena et al., 2023).

In vitro და *in vivo* ექსპერიმენტების მიხედვით, ROS-ების ზრდასთან ერთად მცირდება ანტიოქსიდანტური სისტემების ექსპრესია (Li et al., 2015; Karkucinska-Wieckowska et al., 2021; Simoes et al., 2018). Yu et al., 2018-ს მიხედვით, თავგებში 12

კვირიანი მაღალ ცხიმოვანი დიეტის შემდეგ, საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით ღვიძლში იზრდება სუპეროქსიდის და მალონდიალდეჰიდის (MDA) დონე, პარალელურად კი მცირდება ანტიოქსიდანტური ფერმენტების სუპეროქსიდის დისმუტაზას და კატალაზას mRNA დონე (Yu et al., 2018). აღსანიშნავია, რომ NAFLD-ს დროს პეროქსისომული ანტიოქსიდანტური ფერმენტი კატალაზა საკვანძო როლს ასრულებს ჟანგვითი სტრესისგან უჯრედების დაცვაში. Shin et al-ს მიხედვით, თავვებში 4 კვირიანი მაღალ ცხიმოვანი დიეტის შემდეგ, კატალაზა-დეფიციტურ თავვებში კონტროლთან შედარებით მნიშვნელოვნად ძლიერდება ლიპიდების დაგროვება და ჟანგვითი სტრესი (Shin et al., 2018).

2.8 ანთების როლი NAFLD-ს განვითარებაში

NAFLD-ს განვითარებასა და პროგრესირებაში, მნიშვნელოვანი დატვირთვა აქვს ანთებას (Friedman et al., 2018). სტეატოზის-ს მქონე პაციენტების დაახლოებით 10%-20%-ს უვითარდება ანთება და ფიბროზი, რის შედეგად დაავადება პროგრესირებს სტეატოჰეპატიტში. ანთებითი პროცესის განვითარებაში წამყვანი როლი აქვთ ღვიძლში მობინადრე მაკროფაგებს - კუპფერის უჯრედებს და სისხლიდან ინფილტრირებულ მონოციტებს. ჯანმრთელი ღვიძლის უჯრედების დაახლოებით 15% კუპფერის უჯრედებია, რომლებიც ქსოვილში მობინადრე მაკროფაგების ყველაზე დიდ პოპულაციას წარმოადგენენ. ისინი განლაგებულნი არიან ღვიძლის სინუსოიდებში და ჰომეოსტაზის შესანარჩუნებლად ურთიერთქმედებენ ჰეპატოციტებთან, ღვიძლის ვარსკვლავურ უჯრედებთან და ღვიძლის სინუსოიდალურ ენდოთელურ უჯრედებთან, თუმცა ისინი ასევე არიან დაავადების პროგრესირების ძირითადი ხელშემწყობები. კუპფერის უჯრედებს ახასიათებთ ყველა ტიპის Toll-მსგავსი რეცეპტორის (TLR) ექსპრესია, მათ შორის TLR2, 3, 4, და 9, გარდა TLR5-სა (Wu et al., 2010) ღვიძლში კუპფერის უჯრედების ძირითადი იმუნური ფუნქცია პორტალური ვენიდან და არტერიიდან მოსული პათოგენების ფაგოციტოზი და ანტიგენის პრეზენტაციაა (Sica et al., 2014).

ზოგადად, მაკროფაგებს ახასიათებთ პლასტიურობა და ჰეტეროგენულობა. მათი ფენოტიპი და ფუნქციონირება დამოკიდებულია, გარემოდან მიღებულ სიგნალებზე. სხვადასხვა პირობებში, მაკროფაგები შეიძლება პოლარიზდნენ M1 ან M2 სუბ-ტიპებად (Sica et al., 2014). ცნობილია, რომ ინტერფერონ- γ (IFN- γ) და LPS-ით *in vitro* მოქმედება იწვევს მაკროფაგების პოლარიზაციას M1 ტიპად. M1 ტიპის მაკროფაგები განიხილება, როგორც პრო-ანთებითი ან კლასიკურად აქტივირებული, რადგან ისინი წარმოქმნიან პრო-ანთებით ციტოკინებს (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α), ტოქსიურ ეფექტორულ მოლეკულებს (ROS და NO) და შუამავლობენ TLR/NF- κ B სასიგნალო გზას. M1 მაკროფაგები გადამწყვეტ როლს ასრულებენ ქსოვილის დაზიანების გამოწვევაში. მათ ახასიათებთ CD80, CD86, CD68 და მთავარი ჰისტოშეთავსებადობის კომპლექსის მე-II (MHCII) კლასის მაღალი ექსპრესია (Sica et al., 2012). M2 მაკროფაგები დიფერენცირდებიან IL-4, IL-13 და IL-10-ს საპასუხოდ და მონაწილეობენ ქსოვილის აღდგენასა და უჯრედების ნარჩენების ფაგოციტოზში. M2 მაკროფაგები გამოირჩევიან ანთების საწინააღმდეგო ფენოტიპით (IL-10, TGF- β , IL-4). მათ ახასიათებთ CD206, CD163, Arg-1 (არგინაზა-1), CCR2 (C-C motif chemokine receptor-2)-ს მაღალი ექსპრესია. M2 მაკროფაგებს უწოდებენ ქსოვილის აღმდგენ ან „არაკლასიკურად გააქტიურებულ“ მაკროფაგებს (Sica et al., 2014). აღსანიშნავია, რომ *in vitro* და *in vivo* სპეციფიკური სიგნალების საპასუხოდ მაკროფაგებს, მათი პლასტიურობიდან გამომდინარე, შეუძლიათ გადაერთონ M1 მდგომარეობიდან M2-ზე და პირიქით. მაკროფაგის ფენოტიპის გადართვა M1 და M2 შორის არის მნიშვნელოვანი მექანიზმი ანთებითი პროცესების რეგულირებისთვის (Luo et al., 2017).

NAFLD-ს ახასიათებენ, როგორც პრო-ანთებითი მდგომარეობა. მაკროფაგების პოლარიზაციას და ანთების განვითარებას საკვანძო ფუნქცია აქვს დაავადების სტეატოზიდან სტეატოჰეპატიტში პროგრესირებისთვის. ღვიძლის გაცხიმოვნებისას, ლიპიდები, ენდოტოქსინები, ჟანგბადის აქტიური ფორმები (ROS), უჯრედგარე ვეზიკულები (extracellular vesicles) არეგულირებენ კუპფერის უჯრედების დიფერენცირებას M1 ტიპად (Alisi et al., 2017). NAFLD-ის პათოგენეზში მნიშვნელოვანი ადგილი აქვთ Toll მსგავსი რეცეპტორების (TLR)-ების (TLR4, TLR9) გადაჭარბებულ აქტივაციას, რაც იწვევს მაკროფაგების პოლარიზაციას M1 ტიპად. აქტივირებული

უჯრედები თავის მხრივ, NF- κ B და/ან c-Jun N-terminal kinase (JNK)-ს სასიგნალო გზებით გამოყოფენ ციტოკინებს და ქემოკინებს და ახდენენ ისეთი იმუნური უჯრედების მოზიდვას, როგორიცაა ნეიტროფილები, მონოციტები, ბუნებრივი კილერები (NK) და NKT უჯრედები, რის შედეგადაც ღვიძლის გაცხიმოვნებასთან ერთად იწყება ანთებითი პროცესები (Pierantonelli et al., 2019).

2.8.1 NAFLD და ბაქტერიული ლიპოპოლისაქარიდი

ანთების განვითარებაში მნიშველოვან როლს ასრულებს ნაწლავიდან მიღებული გრამუარყოფითი ბაქტერიების გარე მემბრანის ძირითადი კომპონენტი - ლიპოპოლისაქარიდი (LPS) (Shrarifina et al., 2015). ნაწლავი ითვლება ბაქტერიების წინააღმდეგ პირველ ბარიერად, ღვიძლი კი მის შემდგომ ბარიერად. ფიზიოლოგიურ პირობებში LPS-ს მხოლოდ მცირე ნაწილი აღწევს ღვიძლამდე, თუმცა მაღალ ცხიმოვანი და მაღალ ფრუქტოზიანი კვებისას იცვლება ნაწლავის მიკრობიომის ბალანსი და მისი გამტარიანობა (Frasinariu et al., 2013). LPS არ რჩება შემოფარგლული ნაწლავის სანათურში და აღწევს ღვიძლში. LPS წარმოადგენს კლასიკურ PAMP(pathogen-associated molecular pattern)-ს და წარმოადგენს - Toll მსგავსი რეცეპტორი 4 (TLR-4)-ს ლიგანდს. ლიგნადთან დაკავშირების შემდეგ TLR4-დან სიგნალი მიმდინარეობს MyD88-დამოკიდებული და MyD88-დამოუკიდებელი გზებით, საბოლოოდ კი სრულდება ტრანსკრიპციული ფაქტორის NF- κ B-ს აქტივაციით, პრო-ანთებითი ციტოკინების, TNF- α , IL-1 β და IL-6 გამომუშავებით. MyD88-დამოკიდებული გზის აქტივაცია ხდება პლაზმურ მემბრანაზე, ხოლო TRIF-დამოკიდებული (MyD88-დამოუკიდებელი) გზის აქტივაციისთვის საჭიროა TLR4-ს ენდოციტოზი დინამინ-დამოკიდებული გზით. TLR4 ჩვეულებრივ ექსპრესირდება სხვადასხვა ტიპის უჯრედებზე, მათ შორის ჰეპატოციტებზე, მონოციტებზე, კუჭფერის უჯრედებზე, ვარსკვლავურ უჯრედებში და წარმოადგენს კავშირს ნაწლავის მიკრობიომს, ენდოტოქსემიასა და ღვიძლის დაზიანებას შორის (Tang et al., 2023). ლიტერატურაში არსებული მონაცემების მიხედვით, პლაზმაში LPS-ის დონის მატება აღინიშნება როგორც დიეტით გამოწვეულ (De La Serre et al., 2010), ისე

გენეტიკურად ჭარბწონიან თაგვებში (Brun et al., 2007), ასევე ადამიანებში, რომლებსაც აქვთ მე-2 ტიპის შაქრიანი დიაბეტი (Dasu et al., 2010). ანალოგიურად, ნაწლავის ფლორის ცვლილებები გამოვლენილია ჭარბწონიანობისა და NAFLD-ის მქონე ადამიანებში (Szabo et al., 2010; Zhang et al.).

რიგმა კვლევებმა დაადასტურა, რომ LPS-TLR4 სასიგნალო გზას ცენტრალური როლი აქვს NAFLD-ს პათოგენეზში (Frasinariu et al., 2013). TLR4+ მაკროფაგების რიცხვი მნიშვნელოვნად იზრდება NASH-ს მქონე პაციენტებში (Vespasiani-Gentilucci et al., 2015). მეთიონინ-ქოლინ დეფიციტურ (MCD) დიეტაზე მყოფ თაგვების ღვიძლში TLR4-ს ექსპრესია 5-ჯერ იზრდება, ხოლო კუპფერის უჯრედების შერჩევითად დაზიანებით ეს ეფექტი ითრგუნება. რაც მიუთითებს იმაზე, რომ რეცეპტორის ყველაზე დიდი ფრაქცია კუპფერის უჯრედებზე მოდის. აღსანიშნავია, რომ კუპფერის უჯრედების დაზიანება, პორტალური ენდოტოქსინის დიდი რაოდენობის მიუხედავად, პარალელურად ანელებს სტეატოზს და ანთებას, ღვიძლში ამცირებს TNF- α -ს, TGF- β 1 და კოლაგენ α 1-ს ექსპრესიას (Rivera et al., 2007).

2.8.2 ჟანგბადის აქტიური ფორმების როლი ანთების განვითარებაში

ჟანგვითი სტრესი წარმოადგენს ანთების ერთ-ერთ მნიშვნელოვან მაპროვოცირებელ ფაქტორს. ROS-ები იწვევენ კუპფერის უჯრედების M1 ტიპად პოლარიზაციას, სხვადასხვა მექანიზმით (Ma et al., 2022; Liu et al., 2017). მაგალითად, მაღალ ცხიმოვანი კვებისას პლაზმაში LPS-ის დონის მატება, კუპფერის უჯრედების M1 ტიპად პოლარიზაციასთან ერთად იწვევს ჟანგვით სტრესს (De La Serre et al., 2010). ვინაიდან, TLR4-ს აქტივაციით, LPS ხელს უწყობს NOX2-ს მიერ ROS-ების გამომუშავებას. ROS-ების სიჭარბე კი თავის მხრივ კიდევ უფრო აძლიერებს აძლიერებს NF- κ B-ს ტრანსკრიპციას და ხელს უწყობს პრო-ანთებითი ციტოკინების გამომუშავებას (IL-1 β , TNF- α და IL-6) (Kim et al., 2017).

აღსანიშნავია, რომ მიტოქონდრიები არა მხოლოდ ROS-ების მთავარი წყაროა, არამედ მათი მთავარი სამიზნეც. ფიზიოლოგიურ პირობებში დაზიანებული

მიტოქონდრიები მიტოფაგიის გზით იშლება, თუმცა ჟანგვითი სტრესი და ლიპოტოქსიურობა აფერხებს მიტოფაგიის პროცესს, რაც იწვევს დაზიანებული მიტოქონდრიების დაგროვებას, მიტოქონდრიების დისფუნქციას და სტეატოზის პროგნოზირებას. ჟანგვითი სტრესისგან დაზიანებული სტეატოზური ჰეპატოციტები გამოყოფენ მიტოქონდრიულ დნმ(mtDNA) -ს, რომელიც ბაქტერიების მსგავსად შეიცავს ბევრ არამეთილირებულ CpG დინუკლეოტიდის გამეორებებს და მოქმედებს როგორც DAMP (damage associated molecular pattern). MtDNA უკავშირდება კუპფერის უჯრედებში ექსპრესირებულ თოლ მსგავს რეცეპტორ 9 (TLR9)-ს და იწვევს პრო-ანთებითი cGAS-STING სასიგნალო გზის აქტივაციას. ეს გზა თავის მხრივ იწვევს ტრანსკრიპციის ფაქტორ NF- κ B-ს და პრო-ანთებითი ციტოკინების TNF- α და IL-6 ექსპრესიას და შესაბამისად ღვიძლში ანთების განვითარებას (Yu et al., 2019).

2.8.3 თავისუფალი ცხიმოვანი მჟავების როლი ანთების განვითარებაში

NAFLD-ს ერთ-ერთი მთავარი დამახასიათებელი ნიშანი არის FFA-ს დონის მატება. ორ-სტიმულიანი ჰიპოთეზის მიხედვით, სწორედ ისინი არიან ძირითადი ხელშემწყობი ფაქტორები ანთებითი რეაქციისთვის. FFA და ქოლესტეროლი პასუხისმგებლები არიან ე.წ. ქაფისბერი(foamy) კუპფერის უჯრედების ფორმირებაზე და შემდგომში NASH-ს სტადიაზე პროგრესირებაში (Zhang et al., 2014). თუმცა, აღსანიშნავია, რომ სხვადასხვა ტიპის ცხიმოვანი მჟავები ავლენენ განსხვავებულ ან თუნდაც საპირისპირო ეფექტს კუპფერის უჯრედების გააქტიურებაზე და ადგილობრივ ანთებით რეაქციებზე. მაგალითად, THP-1 მაკროფაგების უჯრედულ ხაზზე, ნაჯერი ცხიმოვანი მჟავის პალმიტოლით მოქმედება, ამცირებს აუტოფაგიას HIF-1 α -ს აქტივაციის გზით და იწვევს უჯრედების M1 ტიპად პოლარიზაციას, ტრანსკრიპციის ფაქტორის NF- κ B აქტივაციით და პრო-ანთებითი ციტოკინების (TNF- α და IL-6) გამომუშავებით (Wang et al., 2019). ნაჯერი ცხიმოვანი მჟავები იწვევენ TLR4-ს აქტივაციას, ამისათვის უკავშირდებიან ცხიმოვანი მჟავების გადამტან გლიკოპროტეინ, ფეტუინ-A-ს და იყენებენ როგორც TLR4-თან დამაკავშირებელ ლიგანდს, ეს გლიკოპროტეინი უჯრედების M1 ტიპად

პოლარიზაციასთან ერთად აინჰიბირებს ინსულინის რეცეპტორს და იწვევს ინსულინის რეზისტენტობას (Pal et al., 2012; Erridge et al., 2009). რაც შეეხება უჯერი ცხიმოვანი მჟავების გავლენას, ოლეინის მჟავა (OA) ხელს უწყობს M2 ტიპის მაკროფაგების დიფერენცირებას, რომელიც ხასიათდება არგინაზა-1-ის, მე-2 ტიპის მანოზის რეცეპტორის და IL-10-ის გაზრდილი ექსპრესიით (Luo et al., 2017).

აღსანიშნავია, რომ ჟანგვითი სტრესის შედეგად წარმოქმნილი oxLDL (დაჟანგული დაბალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინები) mtDNA-ს მსგავსად მოქმედებს როგორც DAMP (damage associated molecular pattern)-ები (Stewart et al., 2010). მაკროფაგების უჯრედულ ხაზზე THP-1, აჩვენებს რომ ცხიმოვანი მჟავების გადამტანი რეცეპტორი, CD36 უკვაშირდება oxLDL-ს, ხოლო ამის შემდეგ CD36 აინდუცირებს CD36/TLR4/TLR6 ჰეტეროტრიმერული კომპლექსის ჩამოყალიბებას და MyD88/TRIF სასიგნალო გზების აქტივაციას, რაც მთავრდება ტრანსკრიპციული ფაქტორის NF-κB-ს და ROS-ების მიერ NLRP3-ს აქტივაციით და IL18-ისა და IL-1β-ს წარმოქმნით ღვიძლში. CD36/TLR4/TLR6 ჰეტეროტრიმერის ენდოციტოზი მიმდინარეობს დინამინ დამოკიდებული გზით. დინამინის ინჰიბიტორი დაინაზოროი თრგუნავს oxLDL-ს ათვისებას და ციტოკინების გამომუშავებას. ხოლო, CD36-დეფიციტურ თაგვებს ახასიათებთ შემცირებული NF-κB-ს დონე და ჟანგვითი სტრესი (Janabi et al., 2000).

2.8.4 ენდოპლაზმური ზადის სტრესის როლი ანთების ჩამოყალიბებაში

როგორც ცნობილია, ლიპიდების დაგროვებით გამოწვეული ER სტრესი მონაწილეობს NASH-ს პროგრესირებაში. ER სტრესს და ანთებას სხვადასხვა პროცესები აერთიანებს: 1) ჰეპატოციტებიდან უჯრედგარე ვეზიკულების გამოყოფის სტიმულაციით მაკროფაგების ქემოტაქსისი 2) ROS-ების გამომუშავება 3) ტრანსკრიპციის ფაქტორების NF-κB და JNK-ს აქტივაცია. 4) მწვავე ფაზის პასუხის გამოწვევა.

ცნობილია, რომ ღვიძლში კუპფერის უჯრედები არეგულირებენ სხვა უჯრედების ფუნქციონირებას, თუმცა NAFLD-ს მიმდინარეობისას ჰეპატოციტები და სხვა უჯრედები მათზეც ახდენენ გავლენას. გაცხმოვნებული ჰეპატოციტებიდან გამოყოფილი

ვეზიკულები ხელს უწყობენ ანთების განვითარებას მაკროფაგებთან ურთიერთქმედების გზით. Kakazu-მ და მისმა კოლეგებმა აჩვენეს, რომ პალმიტოლის მჟავით გამოწვეული ER-ს სტრესი სტიმულაციას უკეთებს C16:0 კერამიდებით გამდიდრებული, უჯრედგარე ვეზიკულების გამოყოფას IRE1 α დამოკიდებული გზით. ვეზიკულები ხელს უწყობენ მაკროფაგების ქემოტაქსისს, ვინაიდან შეიცავენ S1P-სფინგოზინ 1 ფოსფატს (sphingosine 1-phosphate), კერამიდის მეტაბოლიტს, რომელიც ცნობილია როგორც ანთების მედიატორი და მაკროფაგების აქტივატორი (Kakazu et al. 2016).

კუპფერის უჯრედებში ER-ს სტრესი ხელს უწყობს JNK/NF- κ B გზების აქტივაციას. ER სტრესის საპასუხოდ, IRE1 α უკავშირდება ადაპტორულ ცილას TRAF2 (tumor-necrosis factor- α (TNF α) receptor-associated factor 2)-ს (Urano et al., 2000). IRE1 α -TRAF2 კომპლექსი ააქტიურებს NF- κ B და JNK-ს, რომლებიც თავის მხრივ იწვევენ პრო-ანთებითი ციტოკინების სინთეზს. ქრონიკული ER-ს სტრესის განვითარებისას PERK და ATF6 გზები აგრეთვე იწვევენ NF- κ B-ს აქტივაციას (Yamazaki et al., 2009; jiang et al., 2003).

CREBH (Cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-responsive element-binding protein H) არის კიდევ ერთი დამაკავშირებელი ცილა ER-ს სტრესსა და ანთებით პროცესებს შორის. CREBH წარმოადგენს მემბრანასთან ასოცირებულ ტრანსკრიპციის ფაქტორს და ძირითადად ლოკალიზებულია ღვიძლში და მცირე ნაწლავში. ER-ს სტრესის დროს CREBH გადაინაცვლებს გოლჯის აპარატში, სადაც S1P (Site-1 protease) და S2P (Site-2 protease) ჭრიან მის ამინო-ტერმინალურ მონაკვეთს. CREBH-ს ეს მონაკვეთი გადაინაცვლებს ბირთვში და ააქტიურებს ისეთ გენებს, რომლებიც პასუხიძებლები არიან სისტემურ ანთებით პასუხზე (C-რეაქტიული ცილის(CRP) და შრატის ამიოლოიდური P-კომპონენტის(SAP))(SAP). CREBH-ს ექსპრესიას თავისმხრივ აძლიერებენ ანთებითი ციტოკინები, როგორიცაა TNF α და IL-6, რაც ასევე ხელს უწყობს ER-ს სტრესის დროს ანთებითი პროცესის შენარჩუნებას (Zhang et al., 2006).

ლიპიდების ჭარბი დეპონირებით გამოწვეული ER-ს სტრესისას, ძლიერდება ცილების ჟანგვითი ფოლდინგი, რასაც მოყვება ROS-ების დაგროვება, რაც იწვევს ანთებით პასუხს (Oliviera-Marques et al., 2009). თუმცა ER-ს სტრესის პასუხის, UPR-ს მონაწილე ერთ-ერთი ცილა, PERK ააქტიურებს ანტიოქსიდანტურ სისტემებს, რათა

განეიტრალოს ER-სტრესის საპასუხოდ დაგროვილი ROS-ები. კერძოდ PERK ცილა ახდენს Nrf2 (nuclear factor-erythroid-derived 2-related factor 2)-ს ფოსფორილირებას. ფოსფორილირებული Nrf2 გადაინაცვლებს ბირთვში და ააქტიურებს ანტიოქსიდანტური ფერმენტების ტრანსკრიპციას (Cullinan et al., 2006).

ტრანსკრიპციის ფაქტორ - NRF2 აგრეთვე გამოირჩევა ანთების საწინააღმდეგო მოქმედებით, კერძოდ მაკროფაგებში აინჰიბირებს პრო-ანთებითი ციტოკინების ტრანსკრიპციას (Kobayashi et al., 2016). აღსანიშნავია, რომ MCD ან მაღალ ცხიმოვანი საკვების მქონე თაგვებში Nrf2-ს დელეცია იწვევს სტეატოჰეპატიტის დაჩქარებულად განვითარებას (Okada et al., 2013; Chowdhry et al., 2010). Nrf2-ს აქტივაცია კი კვებით გამოწვეულ NASH-ს მოდელში ხელს უშლის ღვიძლის დაზიანების პროგრესირებას (Shimozono et al., 2013). ჰეპატოციტებში NRF2 ცილას კრიტიკული როლი აქვს ბირთვული რეცეპტორის PPAR γ -ს აქტივაციაში (Li et al., 2020). ეს უკანასკნელი კი ცნობილია, როგორც NF- κ B-დამოკიდებული ანთების უარყოფითი რეგულატორი და იწვევს მაკროფაგების M2 ტიპად პოლარიზაციას (Scirpo et al., 2015; Yu et al., 2023). Nrf2 ცილა თავის მხრივ ასევე არეგულირებს NF- κ B -ს მოქმედებას რამდენიმე მექანიზმით, მათ შორის ბირთვში გადაადგილების ინჰიბირებით (Saha et al., 2020), თუმცა ეს მოქმედება ცალ მხრივი არ არის და NF- κ B ხელს უშლის Nrf2/ARE სისტემას ტრანსკრიპციულ დონეზე (Liu et al., 2008).

2.9 NAFLD-ს მკურნალობის გზები და რეზერატროლი როგორც პოტენციური სამკურნალო საშუალება

NAFLD-ს მკურნალობის მთავარ მიზნებს წარმოადგენს: ჰეპატოციტებში დეპონირებული ლიპიდების შემცირება და ლიპოტოქსიურობით გამოწვეული ღვიძლის დაზიანების გამოსწორება. თერაპიული მიდგომები მოიცავს ცხოვრების სტილის ცვლილებას (სწორ კვებას, ვარჯიშს, წონაში კლებას) და ისეთი პრეპარატების გამოყენებას, რომელთა სამიზნეს წარმოადგენენ ის პოტენციური სასიგნალო გზები, რომლებიც განაპირობებენ NAFLD-ს განვითარებას. NAFLD-ს სამკურნალოდ ყველაზე ეფექტურ გზად ითვლება კალორიების შეზღუდვა და აქტიური ცხოვრების წესი.

ჩატარებული კვლევების მიხედვით, წონის კლება მინიმუმ 5%-ით აუმჯობესებს NAFLD-ს მდგომარეობას, ხოლო 7-10%-იანი კლება კი გავლენას ახდენს NASH-ზე და ფიბროზზე (Brunner et al., 2019). ამჟამად NAFLD-ს სამკურნალოდ გამოიყენება შემდეგი პრეპარატები: ვიტამინი E, პიოგლიტაზონი, და რეზმეტირომი, ეს უკანასკნელი წარმოადგენს ერთადერთ FDA-ს მიერ აღიარებულ წამალს, რომელიც დაჩქარებული წესით დაამტკიცეს 2024 წლის მარტში (Chalasani et al., 2012; Mazhar et al., 2023).

როგორც ცნობილია, ვიტამინი E-ს აქვს ანტი-ოქსიდანტური, ანთების საწინააღმდეგო და ანთ-აპოპტოზური ეფექტი. ნაჩვენებია, რომ პაციენტებში ეს ვიტამინი აუმჯობესებს NASH-ის ჰისტოლოგიურ მახასიათებლებს პლაცებოსთან შედარებით (Sanyal et al., 2010), თუმცა ფიბროზზე გავლენას ვერ ახდენს (Said et al., 2017). ვიტამინ E-ს რეკომენდაციას უწევს ისეთ პაციენტებს, რომელთაც აქვთ ბიოფსიით დადასტურებული NASH, დიაბეტის ან ციროზის გარეშე (Chaiasani et al., 2017). თუმცა, აღსანიშნავია რომ მისი მაღალი დოზებით გამოყენება (≥ 400 IU/დღეში) იწვევს სიკვდილიანობის (Miller et al., 2005) და პროსტატის სიმსივნის რისკის ზრდას ამ ყველაფრის გათვალისწინებით, ვიტამინი E-ს გამოყენება დაშვებულია მხოლოდ პაციენტებთან დისკუსიის შემდეგ და ოჯახური სამედიცინო ისტორიის გათვალისწინებით, პროსტატის სიმსივნის თავიდან ასაცილებლად (Miller et al., 2005).

პიოგლიტაზონი არის PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)-ს აგონისტი და აუმჯობესებს NAFLD-ს მქონე პაციენტების მდგომარეობას შემდეგი მოქმედებებით: ჰიპერტროფული ადიპოციტების ზომის შემცირებით, ინსულინის მგრძნობელობის გაზრდით, ადიპონექტინის ექსპრესიის ზრდით, ანთების საწინააღმდეგო მოქმედებით და ასევე სისხლის ლიპიდური პროფილის გაუმჯობესებით (Francque et al., 2021; Gastaldelli et al., 2021). გარდა ამისა პრეპარატი გავლენას ახდენს ადამიანის სხეულში ცხიმების განაწილების მნიშვნელოვან ცვლილებებს. კერძოდ, პიოგლიტაზონით მკურნალობა იწვევს ვისცერალური და კანქვეშა ცხიმების თანაფარდობის შემცირებას (Gastaldelli et al., 2021). თუმცა პიოგლიტაზონი გამოირჩევა ისეთი საყურადღებო გვერდითი ეფექტებით, როგორიცაა წონაში მატება, სხეულში სითხის შეკავება და მყიფე მოტეხილობები (Viscoli et al., 2017).

რეზმეტირომი (ბრენდის სახელი Rezdiffra™) არის პერორალური ფარისებრი ჯირკვლის ჰორმონის რეცეპტორ-β (THR-β)-ს აგონისტი, რომელიც NASH-ს სამკურანლოდ შეიმუშავა Madrigal Pharmaceuticals, Inc.-მა. THR-β ღვიძლში მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ქოლესტერინის და ტრიგლიცერიდების დონის შემცირებაში, აძლიერებს ნაღვლის მჟავის სინთეზს და ცხიმოვანი მჟავების დაჟანგვას (Sinha et al., Krause et al., 2018). NASH-ს მქონე პაციენტებში THR-β-ს ფუნქცია დარღვეულია, რაც იწვევს მიტოქონდრების ფუნქციონირების და β-დაჟანგვის დაქვეითებას, პარალელურად ფიბროზის განვითარებას (Harrison et al., 2023). 2024 წლის მარტში, აშშ-ს სურსათისა და წამლების ადმინისტრაციამ (FDA) პრეპარატი დაჩქარებული წესით დაამტკიცა მოზრდილებში, დიეტასთან და ვარჯიშთან ერთად გამოსაყენებლად. პრეპარატი განკუთვნილია NASH-ს მქონე პაციენტებისთვის, რომელთაც გამოხატული აქვთ ღვიძლის ზომიერი და შორსწასული ფიბროზი (შესაბამისად F2-დან F3 ფიბროზის სტადიები). წამლის დამტკიცება ეფუძნებოდა ბიოფსიის შედეგებს, წამლის ყოველ დღიური მიღებიდან 12 თვის შემდეგ. მისი ყველაზე გავრცელებული გვერდითი ეფექტებია გულისრევა და დიარეა (Kokkorakis et al., 2024). ასევე უარყოფით მხარეებში აღსანიშნავია პრეპარატის მაღალი ღირებულება (Leo et al., 2024).

აღსანიშნავია, რომ ახალი სამკურნალო პრეპარატების შემუშავებისთვის დიდი ყურადღება ექცევა ბუნებრივ ნაერთებს. მათ შორის ყურადსაღებია ბუნებრივი პოლიფენოლი რეზვერატროლი (RSV), რომელიც ადამიანებში გამოირჩევა კალორიების შეზღუდვის ეფექტით. დაბალი დოზის ტრანს-რეზვერატროლი უფრო დამაიდებელ შედეგებს იძლევა, მაშინ როდესაც მაღალი დოზის პირიქით ამწვავებს დაავადებას. მაგ: დაბალი დოზის ტრანს-რეზვერატროლი ჭარბ-წონიან მამაკაცებში გამოირჩევა კალორიების შეზღუდვის ეფექტით (Timmers et al., 2011), ალცჰაიმერის მქონე პაციენტებში კოგნიტური ფუნქციების გაუმჯობესებით (Zhu et al., 2018), გულის ფუნქციის გაუმჯობესებით (Gal et al., 2020) და ანტი-სიმსივნური მოქმედებით (Cai et al., 2015). თუმცა მაღალი დოზის ტრანს-რეზვერატროლი (≥ 200 მგ/დღე) ალცჰაიმერის მქონე პაციენტებში იწვევს ტვინის მოცულობის შემცირებას (Turner et al., 2015), აუარესებს მეხსიერებას შიზოფრენიის მქონე პაციენტებში (Zortea et al., 2016), დიაბეტის მქონე

პაციენტებში აუარესებს მეტაბოლურ პროფილს (Bo et al., 2018) და ასაკოვან პაციენტებში ზრდის გულ-სისხლძარღვთა დაავადებების რისკს (Mankowski et al., 2020).

რეზერატროლზე აქტიურად სამეცნიერო კვლევები დაიწყო 1992 წლიდან. მეცნიერებმა ეპიდემიოლოგიურ კვლევაზე დაყრდნობით ივარაუდეს, რომ „ფრანგული პარადოქსის“ უკან სწორად ღვინის ზომიერი მოხმარება იდგა. ამ ტერმინის მიხედვით, მიუხედავად იმისა რომ ფრანგების საკვები რაციონი მდიდარია ნაჯერი ცხიმოვანი მჟავებით, გულ-სისხლძარღვთა დაავადებების სიხშირე პარადოქსულად დაბალია (Renaud et al., 1992), რაც შეიძლება აიხსნას წითელი ღვინის და მასში შემავალი რეზერატროლის ზომიერი მოხმარებით (Catalgoi et al., 2012). მას შემდეგ, რეზერატროლი ფართოდ იქნა შესწავლილი და მეცნიერებმა აჩვენეს, რომ მას აქვს ანტიოქსიდანტური, ანთების საწინააღმდეგო, ანტიმიკრობული, სიმსივნის საწინააღმდეგო და ანტი-ოქსიდანტური ეფექტები (Baur et al., 2006; Novelle et al., 2015). 1997 წელს, თავგებზე ჩატარებული ექსპრემინტებით გამოვლინდა რეზერატროლის ანტისიმსივნური მოქმედება, მისი ანტიოქსიდანტური, ანტიმუტაგენური და ანთების საწინააღმდეგო ეფექტების გამო (Jang et al., 1997).

2003 წელს Howitz et al.-მა პირველად აჩვენა, რომ რეზერატროლი არის სირტუინ დეაცეტილაზების აქტივატორი და ახანგრძლივებს *Saccharomyces cerevisiae*-ის სიცოცხლის ხანგრძლივობას (Howitz et al., 2003). შემდეგ, 2006 წელს, თანმიმდევრულად გამოქვეყნდა თავგებზე ჩატარებული ორი მნიშვნელოვანი კვლევა და აღმოჩნდა, რომ რეზერატროლით გამოწვეული ცვლილებები, დაკავშირებულია სიცოცხლის გახანგრძლივებასთან, მათ შორის ინსულინის მგრძნობელობის გაუმჯობესებასთან, PGC-1 α (პეროქსისომის პროლიფერატორებით გააქტიურებული რეცეპტორის გამა კოაქტივატორი-1 ალფა)-ს და AMPK (AMP-activated protein kinase)-ს აქტივობის, მიტოქონდრიულ ფუნქციონირების და მოტორულ ფუნქციის გაუმჯობესებასთან (Lagouge et al., 2006; Baur et al., 2006). ამ აღმოჩენებმა კიდევ უფრო მიიპყრო მკვლევარების ყურადღება მთელ მსოფლიოში. ამ დრომდე რეზერატროლის შესახებ 11000-ზე მეტი ნაშრომია ინდექსირებული Web of Science Core Collection.-ის მიერ (Meng et al., 2023). თუმცა ამ დრომდე რეზერატროლის მოქმედების ზუსტი მექანიზმი ბოლომდე

გამოვლენილი არ არის, რაც შეიძლება აიხსნას იმ ფაქტით, რომ აღნიშნულ კვლევებში გამოყენებულია რეზვერატროლის სხვადასხვა კონცენტრაციები და განსხვავებული სამოდულო სისტემები, რეზვერატროლის მოქმედება კი დამოკიდებულია უჯრედის ტიპსა და კონცენტრაციაზე (Ratajczak et al., 2021).

2.9.1 სტილბენოიდები

ბუნებრივი ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთები წარმოდგენილია სხვადასხვა კლასის ნივთიერებების ფართო სპექტრით, რომელთა შორის მნიშვნელოვანია ფენოლურ ნაერთთა ერთ-ერთი ჯგუფი-სტილბენოიდები. სტილბენოიდები გავრცელებულია მათი მონომერული ნაერთის-რეზვერატროლის და მისი პოლიმერული (დიმერები, ტრიმერები, ტეტრამერები) და გლიკოზიდური წარმოებულების სახით. მცენარეებში იდენტიფიცირებულია სტილბენოიდების *ცის-* და *ტრანს-* იზომერული ფორმები (Niesen et al., 2013). სტილბენოიდების მრავალმხრივი ბიოლოგიური აქტივობა დადასტურებულია სხვადასხვა ქვეყნის მკვლევართა მრავალრიცხოვანი გამოკვლევებით. ანტიოქსიდანტური, ანტირადიკალური, ბაქტერიოციდული და სხვ. აქტივობები. დადებითი ეფექტები გულ-სისხლ-ძარღვთა იშემიური, სიმსივნური და სხვ. დაავადებების მიმართ, განაპირობებს ბუნებრივი სტილბენოიდების შემცველი პროდუქტების ფუნქციონალურ დანიშნულებას ადამიანთა სამკურნალო-პროფილაქტიკური თვალსაზრისით (Klatsky et al., 1997; Kondo et al., 1994; Middleton, 2000; Pace-Asciak et al., 1995; Voloshyna et al., 2013; Waffo-Teguo et al., 2008; Gomez-Zorita et al., 2013; კოხტაშვილი et al., 1999; მესხი, 2006).

საქართველოში ვაზის სტილბენოიდების კვლევა დაიწყო 1991 წელს - პირველად რქაწითელის ჯიშის ვაზიდან *ტრანს-*რეზვერატროლის, რეზვერატროლის დიმერის-*ტრანს-*ე-ვინიფერინის და 2 ტეტრამერული წარმოებულის იდენტიფიცირებით (ბეჟუაშვილი, 1994). შემდგომი კვლევებით *ტრანს-*რეზვერატროლი და *ტრანს-*ე-ვინიფერინი განსაზღვრულია საქართველოს წითელყურძნიან საღვინე ვაზის ჯიშებში და სხვადასხვა ტიპის ღვინოებში (ვეფხიშვილი, 2012; სურგულაძე, 2019). ვაზიდან

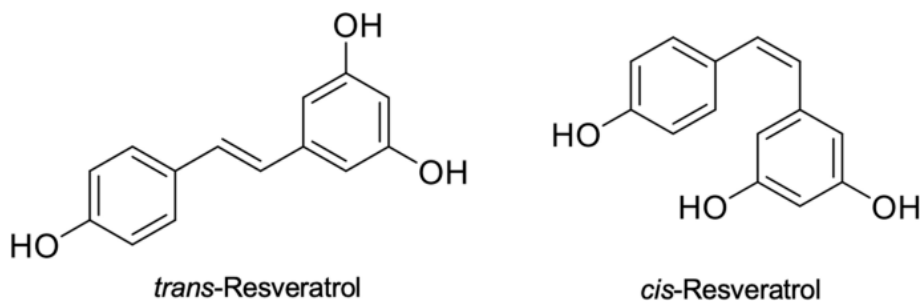
გამოყოფილი ინდივიდუალური ტრანს-რეზერატროლის და მისი წარმოებულების ანტიოქსიდანტური აქტივობა შესწავლილია ადამიანის სისხლის შრატში მალონდიალდეჰიდის წარმოქმნის ინჰიბირების საფუძველზე: ტრანს-რეზერატროლი(105%)<ტრანს- ϵ -ვინიფერინი(118%)<სტილბენოიდური ტეტრამერი-I(169%) < სტილბენოიდური ტეტრამერი-II (178%); დადგენილია ტრანს-რეზერატროლის მასტიმულირებელი ეფექტი ღვინის საფუარებზე ყურძნის წველის ალკოჰოლური დუდილის პროცესში; სტილბენოიდები უარყოფით გავლენას არ ახდენენ ახლადდადუღებულ ღვინომასალაში მიმდინარე ვაშლმჟავა-რძემჟავურ დუდილის პროცესზე (კობტაშვილი, 2006; სურგულაძე, 2019; Бежуашвили et al., 2005).

ვაზის სტილბენოიდების მრავალმხრივ ბიოლოგიურ აქტივობებს შორის მნიშვნელოვანია მათი ფიტოალექსინური თვისება, რაც ვაზს ეხმარება სხვადასხვა დაავადებებთან ბრძოლაში (Langcake et al., 1976; Langcake et al., 1979; Waterhouse et al., 1994; Langcake, 1981; Adrian et al., 1996; Adrian et al., 2000; Bavaresco et al., 1997; Pezet et al., 1988; Adrian et al., 1997; Adrian et al., 1998).

დადგენილია საქართველოს საღვინე ვაზის ჯიშების იმუნიტეტის კორელაცია ფიტოალექსინ სტილბენოიდებთან. გამოკვლეულია ბაქტერიული და სოკოვანი დაავადებებით ბუნებრივად დაავადებული ვაზის შტამბები(ბაქტერიული კიბო-Crown gall, გამომწვევი - *Agrobacterium tumefaciens*) (Bezhuashvili et al., 2019; Bezhuashvili et al 2021), ყურძნის კანი (ნაცრისფერი სიდამპლე - Gray mildew, გამომწვევი- *Botrytis cinerea* (Bezhuashvili et al., 2023); ნაცარი -Powdery mildew, გამომწვევი -*Uncinula necator*) (Bezhuashvili et al., 2024); ვაზის , ფოთლები (ჭრაქი- Downy mildew, გამომწვევი-*Plasmopara viticola*) (Bezhuashvili et al., 2020). გამოვლენილია თითოეული დაავადების პირობებში სტრეს-მეტაბოლიტი სტილბენოიდები. დადგენილია მათი ინჰიბიტორული გავლენა დაავადებების გამომწვევი მიკროორგანიზმების ცხოველმყოფელობაზე *in vitro* პირობებში. საქართველოს ენდემური საღვინე ვაზის ჯიშების - რქაწითელის და საფერავის სტილბენოიდების გავლენა ბაქტერიული და სოკოვანი დაავადებების გამომწვევ მიკროორგანიზმების ცხოველმყოფელობაზე ლაბორატორიულ- *in vitro* და ბუნებრივ პირობებში-ვენახში (Bezhuashvili et al., 2023; Bezhuashvili et al., 2024).

2.9.2 რეზვერატროლის სტრუქტურა, ბიოსინთეზი და წყარო

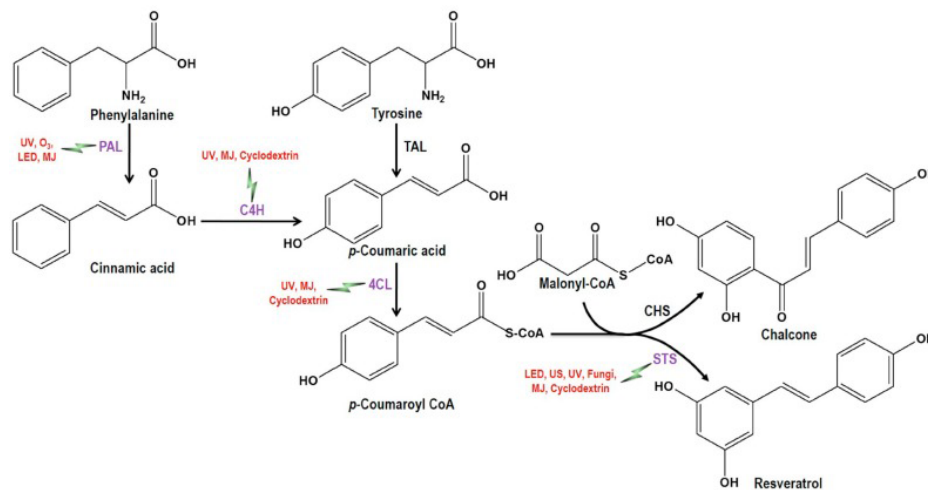
ლიპოფილური, სტილბენის სტრუქტურის მქონე ბუნებრივი პოლიფენოლი, რეზვერატროლი (3,5,4'-Trihydroxystilbene) იაპონელმა მეცნიერმა, ტაკაკამ 1940 წელს *Veratrum grandiflorum*-ს ფესვებიდან გამოყო რეზვერატროლი და პირველად აღწერა მისი ქიმიური სტრუქტურა (Takaoka et al., 1940). თუმცა მას ინდურ ხალხურ მედიცინაში 2000 წელზე მეტია რაც იყენებენ (Paul et al., 1999). რეზვერატროლის სტრუქტურა შედგება C₆-C₂-C₆ ნახშირიბადის ჩონჩხისგან, ორი ფენოლური რგოლი ერთმანეთს უკავშირდება სტირენის ორმაგი ბმით და ქმნის 3,5,4'-ტრი-ჰიდროქსისტილბენს/Trihydroxystilbene (მოლეკულური წონით 228.25 g/mol). სტირენის ორმაგი ბმა პასუხიმგებელია რეზვერატროლის *ცის*- და *ტრანს*- ფორმებზე (სურ. 3). უნდა ავღნიშნოთ, რომ *ტრანს*-იზომერი გამოირჩევა უფრო მაღალი სტაბილურობით, თუმცა მაღალი-pH-ს ან/და ულტრაიისფერი სინათლის მოქმედების შედეგად გარდაიქმნება *ცის*-იზომერად (Trela et al., 1996; Deimas et al., 2011). რეზვერატროლი წარმოადგენს ბუნებრივ ფიტოალექსინს და მცენარეებში გროვდება, სხვადასხვა ბიოტიკური და აბიოტური აგენტების ზემოქმედების საპასუხოდ, მაგ. პარაზიტების, სოკოვანი ინფექციის, ულტრაიისფერი გამოსხივების, ქიმიური ნივთიერებების და ზოგადად, მცენარისთვის სტრესული ფაქტორების საპასუხოდ (Jeandet et al., 2002).



სურ. 3. რეზვერატროლის ქიმიური სტრუქტურა (Meng et al., 2023)

რეზვერატროლის სინთეზში მთავარ როლებს ასრულებენ ფენილალანინი, თიროზინი და მალონილ-CoA. მისი ბიოსინთეზი იწყება ფენილალანინის ან თიროზინის სასიგნალო გზებით. ორივე ამინომჟავის სასიგნალო გზების პროდუქტი არის p-

კუმაროილ-CoA, ეს უკანასკნელი უზვად არის მცენარეებში და წარმოადგენს რეზვერატროლისა და ქალკონის (chalcone) წინამორბედს. ტერმინალური ფერმენტი, სტილბენის სინთეზა(STS) მალონილ-CoA-ს p-კუმაროილ-CoA-სთან კონდენსირებით ასინთეზირებს რეზვერატროლს. STS აქტიურდება ეგზოგენური სტრესის ფაქტორებით, ულტრაიისფერი სინათლით და ქიმიური სიგნალებით პათოგენური სოკოებიდან და კონკურენციას უწევს ქალკონის სინთაზას (CHS) (Lanz et al., 1991). რეზვერატროლი სინთეზირდება როგორც ტრანს- ფორმა, რომელიც შეიძლება იზომერიზდეს ცის-ფორმაში ან თუნდაც ტრანსფორმირდეს ტრანს- და ცის-პიციედად რეზვერატროლის 3-O-ბეტა-გლიკოზილტრანსფერაზას (O-3-GT) მეშვეობით (Donnez et al., 2009; Hasan et al., 2017).

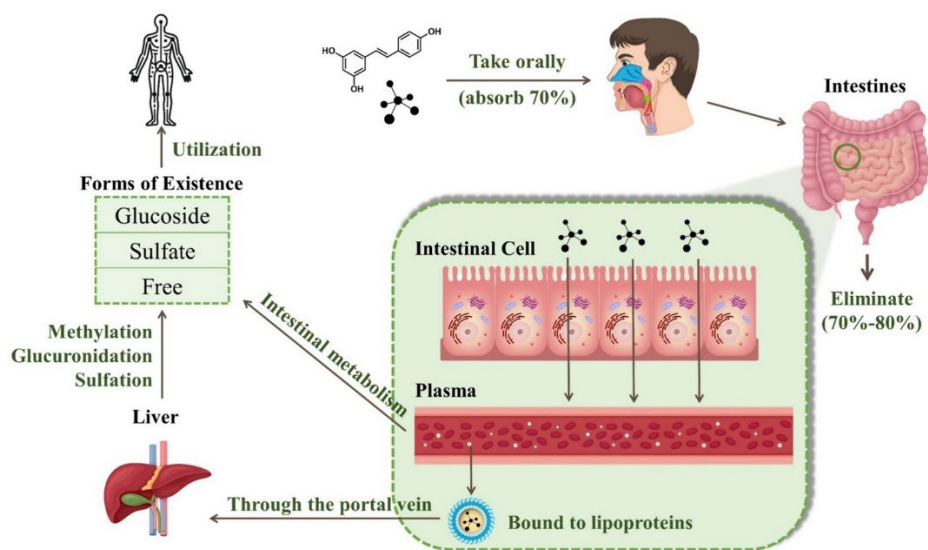


სურ. 4. რეზვერატროლის ბიოსინთეზში ჩართული ფერმენტები და გამომწვევი ფაქტორები. PAL, ფენილალანინის ამიაკის ლიაზა; C4H, დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზა; 4CL, კუმაროილ-CoA ლიგაზა; TAL, თიროზინ ამიაკის-ლიაზა; CHS, ქალკონის სინთაზა; STS, სტილბენის სინთაზა; UV, ულტრაიისფერი სინათლე; US, სონიკაცია; LED, სინათლის დიოდი; O3, ოზონი; MJ = მეთილის ჟასმონატი (Hasan et al., 2017)

რეზვერატროლის ბიოსინთეზი მცენარეების 70-ზე მეტ სახეობაში (Adrian et al., 1997) ხდება, მნიშვნელოვანი რაოდენობით გვხვდება ისეთ საკვებ პროდუქტებში, როგორიცაა ყურძენი (*Vitis vinifera*), მიწისთხილი (*Arachis hypogaea*), მოცვი (*Vaccinium spp.*) და მაყვალი (*Morus spp.*) (Burns et al., 2002). თუმცა, ხმელთაშუა ზღვის დიეტაში რეზვერატროლის მთავარი წყარო არის წითელი ღვინო. რეზვერატროლის კონცენტრაცია

მცენარეებში დამოკიდებულია სხვადასხვა ფაქტორზე. მაგალითად, ვაზის შემთხვევაში მნიშვნელოვანი ფაქტორებია ამინდი და სოკოს არსებობა (Gambini et al., 2015). ყურძენში ორივე იზომერი სინთეზირდება უმეტესად კანში, კონცენტრაციის ყველაზე მაღალი მაჩვენებელი ვლინდება სანამ ყურძენი სიმწიფეს მიაღწევს (Strevbo et al., 2007). რეზვერატროლის კონცენტრაცია წითელ ღვინოში საშუალოდ შეადგენს 1.9 ± 1.7 მგ ტრანს-რეზვერატროლი/ლ (Strevbo et al., 2007).

2.9.3 რეზვერატროლის მეტაბოლიზმი



სურ. 5. რეზვერატროლის მეტაბოლიზმი ადამიანის ორგანიზმში (Yu et al., 2024)

საკვებიდან მიღებული რეზვერატროლის პერორალური შთანთქმის მაჩვენებელი შეადგენს დაახლოებით 70-75%-ს, მაგრამ ღვიძლში და ნაწლავებში სწრაფი მეტაბოლიზმის გამო ხასიათდება დაბალი ბიოშელწევადობით (დაახლოებით 1-8%) და სწრაფად გამოიდევენება ცირკულაციიდან (Versely et al., 2021; Wenzel et al., 2005). ეს ფენომენი ცნობილია, როგორც „რეზვერატროლის პარადოქსი“, რადგან ნაერთი დაბალი ბიოშელწევადობის მიუხედავად, გამოირჩევა მაღალი ბიოლოგიური აქტივობით (Luca et al., 2020). ადამიანებში ტრანს-რეზვერატროლის (25 მგ) პერორალური მიღების შემდეგ მისი პლაზმური კონცენტრაცია 5 ნგ/მლ-ზე დაბალია, თუმცა რეზვერატროლის

მეტაბოლიტების საერთო კონცენტრაცია შეადგენს 491 ± 90 ნგ/მლ (Wenzel et al., 2005; Walle et al., 2004). ის არის ლიპოფილური ბუნების, გამოირჩევა წყალში დაბალი ხსნადობით ($<0,05$ მგ/მლ), რაც გავლენას ახდენს მის ათვისებაზე. მისი ხსნადობის გასაზრდელად *in vitro* ექსპერიმენტებში იყენებენ ეთანოლს (50 მგ/მლ) და დიმეთილ-სულფოქსიდს (DMSO) (300 მგ/მლ) (Gambini et al., 2015).

რეზვერატროლის მიღება შეიძლება როგორც ბუნებრივი წყაროებიდან, ისე კრისტალური ფორმით (მაგ. ფხვნილები, კაფსულები და ტაბლეტები), როგორც დანამატი ან საკვები პროდუქტებში ჩართული (Chavarri et al., 2017; Davidov-Pardo et al., 2014). რეზვერატროლის უსაფრთხო დოზად მიჩნეულია 1გრ-მდე დღეში (Brown et al., 2024) და კვლევების მიხედვით, რეზვერატროლის მაღალი დოზები 2.5 გრ და უფრო მაღალი იწვევს გვერდით ეფექტებს, მათ შორის კუჭ-ნაწლავის გაღიზიანებას, ამიტომ საკვებ დანამატად მიღებამდე მნიშვნელოვანია ექიმთან კონსულტაცია (Jawad et al., 2022).

საკვებიდან მიღებული რეზვერატროლი, პასიური დიფუზიის გზით და მემბრანულ გადამტანებთან კომპლექსების წარმოქმნით, შეიწოვება ენტეროციტების მიერ (Walle T., 2012). საიდანაც რეზვერატროლის მცირე წილი პირდაპირ კარის ვენაში გადაინაცვლებს, თუმცა უმეტესი ნაწილი განიცდის მე-2 ფაზის მეტაბოლიზმს, წარმოქმნის პოლარულ მეტაბოლიტებს. რეზვერატროლი კონიუგირდება გლუკურონატთან და სულფატთან UDP-გლუკურონოზილტრანსფერაზების (UGT) და სულფოტრანსფერაზების (SULT) მიერ, რის შედეგადაც წარმოიქმნება გლუკურონიდი და დისულფატი (Wang et al., 2018). ეს მეტაბოლიტები ენტეროციტების აპიკალური მემბრანის ABC ტრანსპორტერებით/გადამტანებით (BCRP, MRP2) შეიძლება დაბრუნდნენ უკან ნაწლავის სანათურში და მსხვილ ნაწლავში გადაინაცვლების შემდეგ მოხდება მათი ჯერ აღდგენა ჰიდროლიზის გზით და შემდეგ ნაწლავის მიკრობიომის ბაქტერიები, *Slackia equolifaciens* და *Adlercreutzia equolifaciens* ჰიდროგენიზაციის გზით გარდაქმნიან რეზვერატროლს დიჰიდრორეზვერატროლად (DHR) (Luca et al., 2020). ნაწლავის ბაქტერიების მიერ რეზვერატროლი შეიძლება მეტაბოლიზდეს აგრეთვე სხვა მეტაბოლიტებად, 3,4-დიჰიდროქსი-ტრანს-სტილბენად და 3,4-დიჰიდროქსიბიბენზილში (ლუნულარინი). თუმცა, ზუსტად რომელი ბაქტერიები

წარმოქმნიან ამ ორ მეტაბოლიტს, ჯერ კიდევ უცნობია (Bode et al., 2013). რაც ეხება ენტეროციტებიდან ბაზოლატერალური მემბრანის ABC ტრანსპორტერებით (MRP3) გამოსული რეზვერატროლი და მისი მეტაბოლიტები კარის ვენით გადაინაცვლებენ ღვიძლში (Planas et al., 2012; Amei et al., 2012). სადაც აგრეთვე განიცდიან მე-2 ფაზის მეტაბოლიზმს (Gambini et al., 2015). ეს მეტაბოლიტები შემდეგ გადადის სისტემურ მიმოქცევაში და აღწევს სამიზნე ქსოვილებსა და უჯრედებს. რეზვერატროლი და მისი გამოუყენებელი მეტაბოლიტები შეიძლება გადამისამართდეს წვრილ ნაწლავში ნაღვლის საშუალებით ან გამოიყოს შარდით (Gowd et al., 2019).

ღვიძლში, ცხიმოვან ქსოვილში ან გულში, რეზვერატროლი ძირითადად ცირკულირებს გლუკურონიდის და დისულფატის ფორმით, (Andres-Lacueva et al., 2012; Bresciani et al., 2014). ლიპოფილური ბუნებიდან გამომდინარე რეზვერატროლის 90%-ზე მეტი უკავშირდება ადამიანის პლაზმის ალბუმინს და ლიპოპროტეინებს, როგორცაა LDL (დაბალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინი (Amri et al., 2012). რეზვერატროლის ალბუმინთან აფინურობა გვაფიქრებინებს, რომ ის შეიძლება იყოს ბუნებრივი პოლიფენოლის რეზერვუარი, რომელიც მნიშვნელოვან როლს თამაშობს მის სხვადასხვა ქსოვილებში გავრცელებასა და ბიოშელწევადობაში (Delmas et al., 2011). მართალია რეზვერატროლის ათვისება ჰეპატოციტებში ძირითადად ხდება პასიური დიფუზიით, თუმცა აგრეთვე შეიძლება მოხდეს მემბრანულ რეცეპტორებთან დაკავშირებით (Delmas et al., 2011; Lancon et al., 2004). MCF7- მკერდის სიმსივნის უჯრედულ ხაზზე აჩვენეს, რომ რეზვერატროლი ურთიერთქმედებს ინტეგრინ $\alpha V\beta 3$ -თან, ძირითადად $\beta 3$ მონომერთან, რაც აუცილებელია რეზვერატროლის სასიგნალო გზის მიმდინარეობისას p53-დამოკიდებული აპოპტოზის გამოსაწვევად (Lin et al., 2006). გარდა ამისა, რეზვერატროლი უკავშირდება ესტროგენის რეცეპტორ α და β -ს, თუმცა მისი დაკავშირების აფინურობა 7000-ჯერ დაბალია, ვიდრე ესტრადიოლის (Bowers et al., 2000). აღსანიშნავია, რომ მნიშვნელობა აქვს მის იზომერს, ტრანს-რეზვერატროლი უფრო ძლიერად უკავშირდება ვიდრე ცის-იზომერი (Abou-Zeid et al., 2004).

2.9.4 რეზერატოლის სამიზნე მოლეკულები და მათი როლი NAFLD-ს პათოგენეზში

რეზერატოლის ერთ-ერთ პოტენციურ სამიზნედ მიჩნეულია SIRT1, ჯერ კიდევ 2003 წელს აღმოაჩინეს რომ საფუარებში რეზერატოლი იწვევდა მის აქტივაციას (Howitz et al., 2003). ზოგადად, სირტუინები არიან ძლიერ კონსერვირებული NAD^+ დამოკიდებული ჰისტონების და ცილების დეაცეტილაზები და/ან ADP-რიბოზილ ტრანსფერაზები, რომლებიც მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ სხვადასხვა ბიოლოგიურ პროცესებში. სახელი სირტუინი მოდის საფუარის სოკოს ერთ-ერთი სახეობის *Saccharomyces cerevisiae*-ს გენთან *silent information regulation-2* (Sir2) მაღალი ჰომოლოგიის გამო და მიეკუთვნებიან მესამე კლასის ჰისტონის დეაცეტილაზებს (HDACs). დღემდე ძუძუმწოვრებში ცნობილია სირტუინის შვიდი ჰომოლოგი, რომელთაც უჯრედის შიგნით განსხვავებული მდებარეობა აქვთ (SIRT1-7) ბირთვში ექსპრესირდება SIRT1, 2, 6 და 7, ციტოპლამაში SIRT1 და 2, მიტოქონდრიაში SIRT3, 4 და 5. SIRT1 არის ყველაზე კარგად შესწავლილი სირტუინების ოჯახის წევრი (Nassir et al., 2016). ის ახდენს ჰისტონების დეაცეტილირებას (Toiber et al., 2011) და აქვს 50-ზე მეტი არაჰისტონური სამიზნე, მათ შორის დნმ-ს რეპარაციაში მონაწილე ცილები და ტრანსკრიპციის ფაქტორები (p53, NF- κ B, p65, და PGC-1 α) (Bonkowski et al., 2016). SIRT1 დადებით როლს თამაშობს ღვიძლის ლიპიდური მეტაბოლიზმის რეგულაციაში, კერძოდ აქვს ანტი-ოქსიდანტური და ანთების საწინააღმდეგო მოქმედება, შესაბამისად ხელს უშლის ღვიძლის ცხიმოვანი დაავადების პროგრესირებას (Nassir et al., 2016; Ding et al., 2017).

Sirt1-ს მოქმედება რეგულირდება სამი სხვადასხვა გზით: 1. როგორც NAD^+ -დამოკიდებული დეაცეტილაზა, მისი მოქმედება ძირითადად დამოკიდებულია უჯრედში NAD^+ / $NADH$ -ს თანაფარდობაზე. რაც უფრო იზრდება NAD^+ / $NADH$ -ს შეფარდება მით უფრო მაღალია SIRT1-ს აქტივობა (Ma et al., 2015). ბევრ პათოფიზიოლოგიურ პროცესში, NAD^+ / $NADH$ თანაფარდობა კორელაციაშია SIRT1-ს აქტივობასთან (Fulco et al., 2003). მათ შორის, მაღალ ცხიმოვანი კვების დროს მცირდება როგორც NAD^+ -ს დონე, ისე SIRT1-ს აქტივობა (Deng et al., 2007; Baur et al., 2006), ხოლო კალორიების შეზღუდვა იწვევს NAD^+ -ს დონის ზრდას და შესაბამისად SIRT1 აქტივაციას (Michan et al., 2007; Wang et al., 2014). მაგალითად AMPK (AMP-აქტივირებული

პროტეინკინაზა) აძლიერებს SIRT1-ს აქტივობას უჯრედებში NAD⁺-ს დონის გაზრდით activity (Cant et al., 2009). 2. Sirt1-ს მოქმედება ასევე რეგულირდება სხვა ცილებთან ფიზიკური ურთიერთქმედებით, მაგალითად ცილა DBC1 (Deleted in Breast Cancer 1) მოქმედებს როგორც მისი უარყოფითი რეგულატორი. DBC1 ურთიერთქმედებს Sirt1-ს კატალიზურ დომენთან და აინჰიბირებს მის დეაცეტილაზურ მოქმედებას როგორც *in vivo*, ისე *in vitro* (Kim et al., 2008). Sirt1/DBC1 წარმოადგენს დინამიურ კომპლექსს, რომელიც რეგულირდება ორგანიზმის ენერგეტიკული მდგომარეობით (Nin et al., 2012). Sirt1-ს მოქმედების მნიშვნელოვანი რეგულატორი არის პოსტ-ტრანსლაციური მოდიფიკაცია, როგორიცაა მაგალითად ფოსფორილირება. Lau et al.-ს მიხედვით AMPK პირდაპირ აფოსფორილირებს Sirt1-ს(თრეონინზე), რის შედეგად იწვევს მისი უარყოფითი რეგულატორისგან, DBC1-სგან გამონთავისუფლებას და მის აქტივაციას (Lau et al., 2014; Nin et al., 2012). ამგვარად AMPK არის SIRT1-ს მოქმედების მნიშვნელოვანი რეგულატორი.

თაგვებზე და *in vitro* სისტემებზე ჩატარებული კვლევების მიხედვით, ღვიძლში SIRT1 დადებითად მოქმედებს, როგორც ლიპიდების ისე ნახშირწყლების მეტაბოლიზმში, აგრეთვე NAFLD-ს განვითარებაში (Tian et al., 2016; Zhang et al., 2015). Tian Y et al., 2016 -ს მიხედვით რეზვერატროლის (30 მგ/კგ/დღიურად, 60 დღის განმავლობაში) მიწოდება პერორალურად მაღალ-ცხიმიან კვებაზე მყოფ თაგვებში აძლიერებს SIRT1 და AMPK-ს ექსპრესიას, ამავედროს აინჰიბირებს NF-κB ტრანსკრიპციის ფაქტორით ინიცირებულ პრო-ანთებით სასიგნალო გზებს (Tian et al., 2016). Andrade et al., 2014-ს ჯგუფმა მსგავსი კვლევის დიზაინით აჩვენეს, რომ მაღალ ცხიმიან თაგვებში, რეზვერატროლი (30 მგ/კგ/დღიურად, 60 დღის განმავლობაში) იწვევს SIRT1-ს ექსპრესიის მატებას, ანთების შემცირებას და ლიპიდების მეტაბოლიზმის გაუმჯობესებას (Andrade et al., 2014). Hajighasem et al., 2018-ს მიხედვით, მაღალ-ცხიმიან კვებაზე მყოფ ვირთაგვებში რეზვერატროლის (25 მგ/კგ 8 კვირის განმავლობაშო) მიწოდებამ კენაში შეყვანის გზით აგრეთვე გამოწვია Sirt1-ს ექსპრესიის ზრდა, თუმცა ვარჯიშთან ერთდ კომბინაციაში რეზვერატროლის ეფექტი NAFLD ლიპიდების მეტაბოლიზმზე გაუმჯობესდა (Hajighasem et al., 2018).

რაც შეეხება კლინიკურ კვლევებს, ლიტერატურაში არსებული მონაცემებით, სიმსუქნისას არსებობს კორელაცია პლაზმაში SIRT1-ს დონესა და NAFLD-ს შორის. სიმსუქნის მქონე პაციენტებში, მაღალი ხარისხის სტეატოზის დროს, საშუალო სიმძიმის სტეატოზთან შედარებით, SIRT1-ს დონე მნიშვნელოვნად მცირდება, ხოლო ორივე ჯგუფს აქვს SIRT1-ს მნიშვნელოვნად დაბალი ექსპრესია საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით (Mariani et al., 2015). თუმცა, რანდომიზებულ კონტროლირებად კლინიკურ კვლევაში რეზვერატროლის ეფექტი SIRT1-ზე არ გამოვლინდა. კვლევის მონაწილეები რომელთა სხეულის მასის ინდექსი (BMI) შეადგენდა 25 to 35 კგ/მ²-მდე, ყოველდღიურად იღებდნენ 600 მგ რეზვერატროლს 12 კვირის განმავლობაში. რეზვერატროლით მკურნალობის შემდეგ მონაწილეებმა 1.1 %-ით დაიკლეს წონაში და შესაბამისად შემცირდა მათი BMI-ს მაჩვენებელი პლაცებოს ჯგუფთან შედარებით. აღსანიშნავია, რომ ჯგუფში რომელიც მკურნალობდა კალორიების შეზღუდვით, გამოვლინდა 4.5 %-იანი წონაში კლება. თუმცა SIRT1-ის დონის ცვლილება არცერთ ჯგუფში არ გამოვლინდა (Asghari et al., 2018). აქედან გამომდინარე შესაძლებელია რეზვერატროლის გრძელვადიანი და დოზადადმოკიდებული ეფექტები SIRT1 ტრანსკრიპციაზე და ფიზიოლოგიურ დონეზე კლინიკურ კვლევებში.

ლიტერატურაში არსებული მონაცემების მიხედვით, SIRT1 აფერხებს ლიპოგენური გენების (მაგ: ACC1-Acetyl-CoA carboxylase 1 და FAS - fatty acid synthase) ექსპრესიას, ვინაიდან ამცირებს ლიპოგენეზში მონაწილე ტრანსკრიპციული ფაქტორის SREBP-1c-ს ტრანსკრიპციულ აქტივობას, კერძოდ ახდენს დნმ-თან დამაკავშირებელ დომენში Lys-289 და Lys-309-ს დეაცეტილირებას და შესაბამისად ამცირებს მის აქტივობას, მაშინ როდესაც იგივე უბანზე p300/CBP-ს მიერ აცეტილირება იწვევს SREBP-1c-ს ტრანსაქტივაციას. SIRT1-ს მიერ SREBP-1c-ს დეაცეტილირება ხელს უწყობს ამ უკანასკნელის უბიქვითინირებას და პროტეოსომულ დეგრადაციას და ამცირებს მის სტაბილურობას (Ponugoti et al., 2010; Walker et al., 2012). როგორც ცნობილია, SREBP-1c-ს აცეტილირების დონე მნიშვნელოვნად იზრდება თაგვებში, მაღალ ცხიმოვანი კვებისას გამოწვეული სიმსუქნის დროს, ხოლო ადენოვირუსით ინდუცირებული SIRT1-ს მაღალი ექსპრესია ასუსტებს სტეატოზს და მასთან დაკავშირებულ SREBP-1c-ს ლიპოგენურ სიგნალს

(Ponugoti et al., 2010). SREBP-1c-ს გარდა, ChREBP არის მეორე მნიშვნელოვანი ტრანსკრიპციის ფაქტორი, რომელიც მონაწილეობს ლიპოგენეზში (Filhoulaud et al., 2013) და რომელთანაც დაკავშირებულია SIRT1-ს მოქმედება, თავგებში SIRT1-ს დეფიციტისას მნიშვნელოვნად იზრდება სისხლში გლუკოზისა და ცხიმოვანი მჟავების დონე (Wang et al., 2011). გლუკოზა და ცხიმოვანი მჟავები კი იწვევენ ChREBP-ს აქტივაციას, ფოსფორილირებით და აცეტილირებით (Filhoulaud et al., 2013). ChREBP-ს აცეტილირება ასოცირდება მაღალ-ცხიმოვანი საკვებით ინდუცირებულ სტეატოზთან, ასევე მის გაზრდილ ტრანსკრიპციულ აქტივობასთან და მისი სამიზნე გენების ექსპრესიასთან (Bricambert et al., 2010). აღსანიშნავია, რომ SIRT1-ის ნოკაუტირებულ თავგებში, ChREBP-ს მაღალი ექსპრესია ასოცირდება ჰისტონ H3K9 და ჰისტონ H4K16-ს გაზრდილ აცეტილირებასთან ChREBP-ს პრომოტორთან და მისი სამიზნე გენების მაღალ ექსპრესიასთან FAS, ACC1 და ELOVL6 9 (elongase of long chain fatty acids family 6), რის გამოც ნორმალური საკვები რაციონის მიუხედავად თავგებს უვითარდებათ სტეატოზი (Wang et al., 2010).

De novo ლიპოგენეზთან ერთად SIRT1 გავლენას ახდენს ცხიმოვანი მჟავების β -დაჟანგვაზე და ახასიათებს ანტიოქსიდანტური მოქმედება. ზოგადად, ცხიმოვანი მჟავების β -დაჟანგვაში მნიშვნელოვან როლს ასრულებს PPAR α /PGC-1 α -ს სასიგნალო გზა. PPAR α არის ლიგანდით აქტივირებული ტრანსკრიპციული ფაქტორი და მისი მთავარი ენდოგენური ლიგანდები არიან თავისუფალი ცხიმოვანი მჟავები. PPAR α იწვევს იმ გენების ექსპრესიას, რომლებიც დაკავშირებულნი არიან მიტოქონდრიის მატრიქსში ცხიმოვანი მჟავების კატაბოლიზმთან. PGC-1 α , როგორც მიტოქონდრიის ფუნქციონირების მნიშვნელოვანი რეგულატორი, ჩართულია ჟანგვით ფოსფორილირების, ლიპიდების მეტაბოლიზმის და ROS-ების მოდულაციაში (Villena et al., 2015). PGC-1 α არის PPAR α -ს ტრანსკრიპციული კო-აქტივატორი და ხელს უწყობს ამ უკანასკნელის ტრანსკრიპციას. იმ მდგომარეობაში, როცა ენერგიის დონე დაბალია უჯრედებში, NAD⁺/NADH-ს თანაფარდობის ზრდა იწვევს SIRT1-ს აქტივაციას (Tang et al., 2016). SIRT1 ახდენს PGC-1 α -ს დეაქეტილირებას და ამ გზით ხელს უწყობს PPAR α -ს აქტივაციას (Rodgers et al., 2005). ნაჩვენებია, რომ, მაღალ ცხიმოვანი კვებისას, SIRT1

ნოკაუტირებული თაგვების ღვიძლში იზრდება PGC-1 α -ს აცეტილირების დონე, მცირდება ბირთვული რეცეპტორის PPAR α -ს ტრანსკრიპციული აქტივობა და ცხიმოვანი მჟავების β -დაჟანგვა, შესაბამისად თაგვებში ვითარდება სტეატოზი (Purushotham et al., 2009).

SIRT1-ს ანტიოქსიდანტურ მოქმედება გამოიხატება ტრანსკრიპციის ფაქტორების PGC-1 α -ს, FOXO (forkhead box O), Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) დეაცეტილირებით, ვინაიდან აინდუცირებს ისეთი ანტი-ოქსიდანტური ფერმენტების ექსპრესიას (Khader et al., 2014), როგორიცაა სუპეროქსიდის დისმუტაზა (SOD), კატალაზა (CAT) და გლუტათიონ პეროქსიდაზა (GPX) და სხვ (Chanas et al., 2002; Valle et al 2005; Klotz et al., 2015). შესაბამისად იცავს უჯრედებს მიტოქონდრიული დისფუნქციისგან. ვირთაგვებში, ნახშირწყლებით გამოწვეული ღვიძლის ცხიმოვანი დაავადების შესწავლისას გამოვლინდა, რომ რეზვერატროლით მკურნალობა ღვიძლში მნიშვნელოვნად ზრდის ანტიოქსიდანტურ ფერმენტებს, მათ შორის სუპეროქსიდის დისმუტაზას, გლუტათიონ პეროქსიდაზას და კატალაზას, ამავე დროს იწვევს აზოტის ოქსიდის სინთაზას და ლიპიდური პეროქსიდაციის პროდუქტის - მალონდიალდეჰიდის (MDA) დაქვეითებას (Bujanda et al., 2008).

ასევე შესწავლილია SIRT1-ს როლზე ანთების განვითარების პროცესებში. ნაჩვენებია რომ SIRT1 ახდენს ტრანსკრიპციული ფაქტორის NF- κ B-ს სუბერთეულის-RelA/p65 დეაცეტილირებას ლიზინ-310-ზე და შესაბამისად ამცირებს NF- κ B-ს ტრანსკრიპციულ აქტივობას (Yeung et al., 2004). ლიტერატურაში არსებული მონაცემებით სპეციფიურად ღვიძლში ან მთელ სხეულში SIRT1-ს გენის დათრგუნვისას მნიშვნელოვნად იზრდება ღვიძლში მაკროფაგების ინფილტრაცია, ასევე მნიშვნელოვნად იზრდება პრო-ანთებითი ციტოკინების IL-1, IL-6 და TNF- α დონე. ასევე ნანახია, რომ მაკროფაგებში SIRT1-ს დეფიციტი იწვევს ანთებით პროცესებზე პასუხისმეგებელი ტრანსკრიპციული ფაქტორის NF- κ B-ს ჰიპერ-აქტივირებას და ღვიძლში ზრდის მის ტრანსკრიპციულ აქტივობას, შესაბამისად ღვიძლში ვითარდება ანთება და მაღალ ცხიმოვანი კვების შემთხვევაში სტეატოზი. ტრანსგენულ თაგვებში SIRT1-ს ჭარბად

ექსპრესიისას კი მცირდება NF-κB-ს აქტივობა და შესაბამისად პრო-ანთებითი ციტოკინების IL-6 და TNF-α დონე (Pfuger et al., 2008).

აღსანიშნავია, რომ ნორმალურ პირობებში SIRT1-ის მსგავსად მისი სამიზნე მოლეკულა PGC-1α, ასევე უარყოფითად არეგულირებს NF-κB-ს, ვინაიდან NF-κB სუბერთეულთან - p65 თან დაკავშირებით თრგუნავს მის ტრანსკრიპციულ მოქმედებას (Barroso et al., 2017). თუმცა ეს მოქმედება ცალმხრივი არ არის, ადამიანის და თაგვის გულის უჯრედებში NF-κB-ს სუბერთეული p65 უკავშირდება PGC-1α და შესაბამისად იწვევს მის ინაქტივაციას (Alvarez-guardia et al., 2010). ანთების მიმდინარეობისას, როდესაც პრო-ანთებითი ციტოკინების დონე მაღალია ამ კავშირს უფრო სტაბილურს ხდის TNFα-დამოკიდებული NF-κB აქტივაცია, შესაბამისად PGC-1α-ს ექსპრესია და აქტივობა მცირდება (Alvarez-guardia et al., 2010). PGC-1α-ს დაბალი აქტივობა იწვევს მისი სამიზნე ანტიოქსიდანტური გენების ექსპრესიის შემცირებას და ჟანგვითი სტრესის განვითარებას (Chen et al., 2011). დაბალი PGC-1α-ს ექსპრესია და ჟანგვითი სტრესი კი თავის მხრივ ხელს უწყობენ NF-κB-ს აქტივობას და ამწვავებენ ანთების პროცესებს (Eisele et al., 2014).

რეზერვატროლის სასიგნალო გზაში SIRT1-თან ერთად გასათვალისწინებელია ასევე პროტეინ კინაზა - AMPK. SIRT1-ს აქტივაციით განპირობებული ჯანმრთელობის სასარგებლო თვისებები, მრავალი თვალსაზრისით ემთხვევა იმ თვისებებს, რომლებიც მოყვება AMP-გააქტიურებული პროტეინ კინაზას (AMPK) გააქტიურებას. 2005-2007 წლებში რამდენიმე ლაბორატორიამ აჩვენა, რომ კალორიების შეზღუდვის და ვარჯიშის მსგავსად რეზერვატროლი იწვევს SIRT1-ს გარდა აგრეთვე აინდუცირებს AMPK-ს აქტივაციას (Zang et al., 2006; Dasgupta et al., 2007). ზოგადად, AMPK არის ენერგიის სენსორული ცილა და მისი მთავარი ფუნქცია უჯრედებში ენერგიის შენარჩუნებაა. AMPK-ს აქტივაციას იწვევს AMP: ATP ან ADP: ATP-ის ციტოზოლური თანაფარდობის ზრდა, რაც არის უჯრედში ენერგიის სტატუსის დარღვევის შედეგი. AMPK-ს აქტივაციას იწვევენ ისეთი პროცესები, რომლებიც აფერხებენ ATP-ის გამომუშავებას (მაგ. ჰიპოქსია, ჟანგვითი სტრესი, ენდოპლაზმური ბადის სტრესი) ან აჩქარებენ ATP-ის მოხმარებას (მაგ., კუნთების სწრაფი შეკუმშვა). უჯრედული ენერგიის მარაგების შესანარჩუნებლად, AMPK

რთავს ისეთ კატაბოლურ გზებს, რომლებიც წარმოქმნიან ATP-ს, ძირითადად ჟანგვითი მეტაბოლიზმისა და მიტოქონდრიული ბიოგენეზის გაძლიერებით, პარალელურად კი იწვევს ანაბოლური გზების გამორთვას, რომლებიც მოიხმარენ ATP-ს (მაგ. ლიპიდების სინთეზი)(Carling et al., 2017).

საინტერესოა, რომ როგორც AMPK იწვევს SIRT1-ს აქტივაციას, ასევე SIRT1-ს შეუძლია მისი არაპირდაპირი აქტივაცია. კონკრეტულად, ის ახდენს AMPK-ს ძირითადი კინაზას LKB1 (liver kinase B1) -ს დეაქტივირებას, LKB1 კი ენერგიის ნაკლებობის საპასუხოდ, როგორიცაა კალორიების შეზღუდვა ან ენერგიის მომატებული ხარჯვა ფოსფორილირების გზით იწვევს (თრეონინ 172-ზე) AMPK-ს აქტივაციას (Lan et al., 2005). სხვადასხვა ექსპერმენტული მონაცემების მიხედვით, რეზვერატროლის მეტაბოლური ეფექტები დამოკიდებულია AMPK-ის აქტივაციაზე (Hou et al., 2008). თუმცა გასათვალისწინებელია, რომ რეზვერატროლის მიერ AMPK-ს აქტივაცია დამოკიდებულია უჯრედის ტიპზე, ხოლო AMPK-ს მიერ ინდუცირებული NAD^+ -ს დონის ზრდა დამოკიდებულია ციტოზოლში ATP-ს დონეზე (Lan et al., 2017). ასევე რეზვერატროლით გამოწვეული AMPK-ის გააქტიურებისთვის საჭირო წინაპირობაა LKB1-ის აქტივაცია (Lan et al., 2017).

აღსანიშნავია, რომ AMPK-ს სასიგნალო გზაში PGC-1 α -ს მნიშვნელოვანი როლი აქვს. ჩონჩხის კუნთის უჯრედებში, AMPK პირდაპირ უკავშირდება და ახდენს PGC-1 α -ს ფოსფორილირებას თრეონინ 177 და სერინ 538-ზე. ეს ფოსფორილირება კი ზრდის PGC-1 α -ს ტრანსკრიპციულ აქტივობას (Jager et al., 2007). AMPK-ს მოქმედება მიტოქონდრიული გენების, გლუკოზის ტრანსპორტერ 4 (GLUT4)-ის და თავად PGC-1 α -ს გენების ექსპრესიაზე თითქმის მთლიანად დამოკიდებულია PGC-1 α ცილის ფუნქციაზე (Jager et al., 2007).

Li et al. 2017-ს მიხედვით, მაღალი კონცენტრაციის გლუკოზით ნამოქმედარ, ბადურის კაპილარული ენდოთელიუმის უჯრედებში, რეზვერატროლი (1-20 μM), AMPK/Sirt1/PGC-1 α სასიგნალო გზის სტიმულირებით, აფერხებს ROS-ით გამოწვეული უჯრედების სიკვდილს (Li et al., 2017). Baur et al-2016-ს მიხედვით, 6 თვის განმავლობაში მაღალ ცხიმოვან საკვებზე მყოფ საშუალო ასაკის თაგვებში, რეზვერატროლის (22.4 მგ/კგ/

დღიურად) დამატებამ საკვებში, მნიშვნელოვნად შეცვალა ცხოველების ფიზიოლოგია და გაზარდა მათი გადარჩენის ალბათობა. რეზვერატროლმა გამოიწვია ინსულინის მგრძნობელობის ზრდა, IGF-I (Insulin-like growth factor I) -ს დონის შემცირება, AMPK-ს და PGC-1 α -ს აქტივობა, მიტოქონდრიების რიცხვის ზრდა და მოტორული ფუნქციის გაუმჯობესება (Baur et al-2016).

მართალია SIRT1-ს და AMPK-ს როლი ლიპიდების მეტაბოლიზმში კარგად არის შესწავლილი და მათი თვისებებიდან გამომდინარე შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ რეზვერატროლის მიერ გამოწვეული კალორიების შეზღუდვის ეფექტი SIRT1/AMPK-ს სასიგნალო გზაზე უნდა იყოს დამოკიდებული. თუმცა 2015 წელს გამოქვეყნდა კვლევა Sajish და Schimmel-ს ჯგუფის ავტორობით, სადაც აღწერეს რეზვერატროლის ალტერნატიული სამიზნე მოლეკულა, PARP1(Poly ADP-ribose polymerase)-ს (Sajish et al., 2015).

ზოგადად PARP-ები შეადგენენ ფერმენტების ჯგუფს, რომლებიც ადამიანებში შედგება 17 წევრისგან. ისინი არეგულირებენ ისეთ უჯრედულ პროცესებს, როგორიცაა დნმ-ის დაზიანება, ქრომატინის რემოდელირება, უჯრედის მეტაბოლიზმი და ტრანსკრიპციის რეგულაცია (Bai and Canto, 2012; Schiewer et al., 2012). PARP-ებს აერთიანებთ კონსერვირებული კატალიზური დომენი და ახდენენ NAD⁺-დან სამიზნე ცილებზე მონო- ან პოლი ADP-რიბოზის ერთეულების გადატანას. სამიზნე ცილებს მოიცავს თავად PARP-ები, ჰისტონები, დნმ-ის რეპარაციაში მონაწილე ცილები, ტრანსკრიპციის ფაქტორები და ქრომატინის რეგულატორები (Krishnakumar et al., 2010).

PARP1 (116 kDa) არის მეტად კონსერვირებული, მრავალფუნქციური, ქრომატინთან ასოცირებული ბირთვული ცილა, რომელიც გვხვდება ეუკარიოტებში. იგი შედგება სამი ძირითადი დომენისაგან: ამინოტერმინალური დნმ-თან დამაკავშირებელი დომენი (DBD), რომელიც შედგება zing finger motifs-ებისგან, BRCT დომენის შემცველი ცენტრალური აუტო-მოდიფიკაციის დომენი და ძლიერ კონსერვირებული კარბოქსი-ტერმინალური კატალიზური დომენი 12 (Kraus et al., 2003). ეს დომენები ერთად შეამავლობენ PARP1-ის მოქმედებას. დნმ-ის ყოველ 1000 ფუძე წყვილზე, მოდის PARP1-ს ერთი მოლეკულა, რათა აღმოაჩინოს დნმ-ის ჯაჭვის დაზიანება. ის ჩართულია გენომის

სტაბილიზაციაში და დნმ-ს რეპარაციის ისეთ გზებში, როგორიცაა base excision repair (BER), არაჰომოლოგიური ბოლოების შეერთება (NHEJ), ჰომოლოგიურ რეკომბინაცია (HR) და ოკაზაკის ფრაგმენტის პროცესინგი. როდესაც დნმ-ის დაზიანება ხდება, PARP1 ამოიცნობს და უკავშირდება დნმ-ს ნახლეჩებს ქრომატინში, რაც ასტიმულირებს PARP1-ის კატალიზურ აქტივობას და კოვალენტურად ამაგრებს პოლი-ADP რიბოზას სამიზნე ცილების არგინინის, გლუტამატის, ასპარტატის, ცისტეინის, ლიზინის და სერინის ნაშთებზე. რის შედეგადაც დნმ-ის რეპარაციაში მონაწილე ცილების რეკრუტირება/მოზიდვა ხდება დნმ-ის დაზიანების ადგილზე (Spiegel et al., 2021).

PARP-1 იყენებს NAD^+ -ს, როგორც კო-ფაქტორს კატალიზურ აქტივობისას. PARP-ის უწყვეტ აქტივაციას შეუძლია NAD^+ -ის უჯრედშიდა დონის შემცირება 80%-ით და NAM(nicotinamide)-ს დონის მომატება (Bai et al., 2012). როგორც უკვე აღწერილი იყო, SIRT1-ს დეაცეტილაზური მოქმედება აგრეთვე დამოკიდებულია NAD^+ -ზე (Houtkooper et al., 2012). ვინაიდან PARP1-ს და Sirt1-ს საერთო სუბსტრატი აქვთ (NAD^+), ამიტომ ერთმანეთის მიმართ ანტაგონისტური ურთიერთობა ახასიათებთ. ცნობილია, რომ PARP-ის გაძლიერებული აქტივობით გამოწვეული NAD^+ -ის დაქვეითება და NAM-ის მატება კორელაციაშია SIRT1-ის აქტივობის დაქვეითებასთან (Pillai et al., 2005). ანალოგიურად, SIRT1-ის აქტივაცია ამცირებს PARP-ის აქტივობას (Kolthur-Seetharam et al., 2006). აგრეთვე ნაჩვენებია, რომ SIRT1-ს შეუძლია PARP1-ს დეაციტილირება და შესაბამისად მისი მოქმედების დათრგუნვა (Rajamohan et al., 2009).

Sajish et al-ს მიხედვით რეზვერატროლს აქვს პირდაპირი კავშირი PARP-1-თან. როგორც ცნობილია, TyrRS (tyrosyl transfer-RNA (tRNA) synthetase) ააქტიურებს L-თიროზინს ცილის სინთეზისთვის და აგრეთვე მონაწილეობს დნმ-ს რეპარაციაში. სხვადასხვა სტრესულ პირობებში (სითბური შოკი, ჟანგვითი სტრესი, ER-ს სტრესი), TyrRS ციტოპლაზმიდან გადაინაცვლებს ბირთვში და ააქტიურებს PARP1-ს (Fu et al., 2012). რეზვერატროლი სტრუქტურულად გავს ამინომჟავა თიროზინს, ორივეს აქვთ ფენოლური რგოლი. Sajish et al-ს მიხედვით, Hela უჯრედებში, რეზვერატროლი დაბალ კონცენტრაციებზე ($\leq 10 \mu M$) უკავშირდება TyrRS-ს აქტიურ ცენტრს და მიმართავს მას

ბირთვისკენ, სადაც იწვევს PARP1-ს აქტივაციას და NAD⁺-დამოკიდებულ აუტო-პოლი-ADP-რიბოზილირებას (Sajish et al., 2015).

რაც შეეხება PARP1-ს როლს NAFLD-ს პათოგენეზში, ჯერ-ჯერობით გაურკვეველია ზუსტად მისი ფუნქცია. თუ ლიტერატურაში, Sirt1-ის შემთხვევაში უფრო ერთგავროვანი მონაცემებია, PARP1-ს შემთხვევაში სტატიები იყოფა ორად, მკვლევარების ერთი მხარე აჩვენებს, რომ PARP1-ს დადებითი როლი აქვს NAFLD-ს მკურნალობისას (Erener et al. 2012b), ხოლო მეორე მხარე პირიქით აჩვენებს, რომ დაავადების მკურნალობისთვის საჭიროა მისი ინჰიბირება (Bai et al. 2011b; Gariani et al. 2017; Mukhopadhyay et al. 2017; Huang et al. 2018).

PARP1-ს დადებითი როლზე NAFLD-ს მკურნალობისას, ლიტერატურაში არსებობს რიგი მონაცემები. Shin et al-ს ჯგუფმა აჩვენა, რომ ადამიანის ჰეპატოციტების, HepG2 უჯრედულ ხაზზე რეზერატროლის დაბალი კონცენტრაციებით გამოწვეული AMPK-ს აქტივაციას და ანტიოქსიდანტურ მოქმედებას, წინ უძღვის PARP1/LKB1 გზის აქტივაცია (Shin et al., 2009). Yanez et al-ს მიხედვით კი LPS-ით აქტივირებულ ადამიანის მონოციტების THP-1 ხაზზე რეზერატროლის 10μM კონცენტრაციებით მოქმედება (2- 5 დღე) იწვევს პრო-ანთებითი ციტოკინების (TNF-α და IL-6) ექსპრესიის შემცირებას და ანთების საწინააღმდეგო მედიატორების(IL-10 და MRC-1) ექსპრესიის ზრდას (Yanez et al., 2019). რეზერატროლთან ერთად ნიკოტინამიდით მოქმედება, კი კიდევ უფრო აძლიერებს რეზერატროლის დამცველოვით ეფექტს. Yanez et al-ს მიხედვით მათი მოქმედების მექანიზმი კი მოიცავს PARP1-დამოკიდებულ AMPK-ს აქტივაციას, ანთების რეპრესორ BCL6(B-cell lymphoma-6 protein)-ს ინდუცირებას/გენის აქტივაციას და ანთების მედიატორ COX-2-ის ინჰიბირებას (Yanez et al., 2019). PARP1 ზოგადად ცნობილია, როგორც Bcl-6-ს ტრანსკრიპციული რეპრესორი, ვინაიდან სპეციფიურად უკავშირდება მისი გენის პირველ ინტრონს. AMPK-ს მიერ PARP-1-ს ფოსფორილირება (Ser-177) კი ასუსტებს ამ კავშირს და ხელს უწყობს Bcl-6-ს ექსპრესიას. Bcl-6-ს მოქმედებს, როგორც კო-რეპრესორი, რომ შეასუსტოს პრო-ანთებითი მოლეკულების ექსპრესია (VCAM-1, MCP-1, და MCP-3) ენდოთელურ უჯრედებში (Gongol et al., 2013).

აღსანიშნავია, აგრეთვე PARP1-ს ფუნქცია ადიპოგენეზში. ის არეგულირებს ადიპოგენური გენების ექსპრესიას და ადიპოციტების ფუნქციონირებას. ნაჩვენებია, რომ ადიპოციტების დიფერენცირებისას PARP1 შუამავლობს PAR-დამოკიდებული PPAR γ 2-ს გენის აქტივაციას, მის პრომოტორთან H3K4 ტრიმეთილირების მომატებით (Erener et al., 2012). PPAR γ 2 ადიპოციტების დიფერენცირებისა და გლუკოზის მეტაბოლიზმის გარდა, გამოირჩევა ანტიოქსიდანტური მოქმედებით და მონაწილეობს იმუნური სისტემის რეგულაციაში (Okuno et al., 2010; Schmidt et al., 2010). ადამიანის პირველად ადიპოციტებში PPAR γ -ს აგონისტი, პიოგლიტაზონით მოქმედება იწვევს კატალაზას და ადიპონექტინის mRNA-ს ექსპრესიის მნიშვნელოვან ზრდას (Okuno et al., 2010). რაც შეეხება მის ფუნქციას იმუნური სისტემის კომპოსტაზში, PPAR γ იწვევს მაკროფაგების პოლარიზაციას M2-ტიპად, თრგუნავს ისეთი პრო-ანთებითი ციტოკინების ექსპრესიას როგორიცაა TNF- α , IL-1 β და IL-6. PPAR γ -ს მთავარი სამოქმედო მექანიზმი გულისხმობს პირდაპირ ურთიერთქმედებას პრო-ანთებით ტრანსკრიპციულ ფაქტორებთან (NF-kB, STAT, AP-1) და ამ გზით პრო-ანთებითი გენების ექსპრესიის ხელის შეშლას (Chen et al., 2003; Wang et al., 2001).

3 მეთოდოლოგია

3.1 გამოყენებული ხელსაწყოები

ფაზოკონტრასტული მიკროსკოპი, Nikon TMS, Nikon Instruments, იაპონია; ლამინარული კარადა, Bio48, Faster, იტალია; გამდინარე ციტომეტრი, Accuri C6, Becton Dickinson, აშშ; ელექტრონული მიკროსკოპი, Tesla BS-500, აშშ; სპექტროფოტომეტრი, MR-96A, MINDRAY, ჩინეთი; სინათლის მიკროსკოპი, AmScope, აშშ; წყლის აბაზანა, Clifton Range, დიდი ბრიტანეთი; პოლიაკრილამიდ გელ ელექტროფორეზის კასეტა, Amersham biosciences, დიდი ბრიტანეთი; ვესტერნ ბლოტის კასეტა, VWR, აშშ; ცენტრიფუგა, 3-16PK, Sigma, აშშ; თერმობლოკი, BSH5001-E, Benchmark Biotech, აშშ; სანჯრდეველა, Bio Vortex V1, Biosan, ლატვია; პლანშეტის სანჯრდეველა/თერმოსტატი, PST-60HL, Biosan, ლატვია; ცენტრიფუგა, D20-12, SCILOGEX, აშშ; თერმოსტატი, Wagatech International, დიდი ბრიტანეთი.

3.2 უჯრედების კულტივირება

სტეატოზის *in vitro* მოდელის შესაქმნელად გამოვიყენეთ თავის ჰეპატომის უჯრედული ხაზი - Hepa1-6 და თავის მონოციტ/მაკროფაგების უჯრედული ხაზები: RAW264.7 და J774A.1. უჯრედული ხაზების კულტივირებას ვახდენდით 37°C-ზე, 5%CO₂ ატმოსფეროში, ხბოს ემბრიონალური შრატის 10%-ს შემცველ, Dulbecco's Modified Essential Medium საკვებ არეში, ანტიბიოტიკების სტანდარტული შემცველობით (10,000 ერთეული/მლ პენიცილინი და 10,000 მკგ/მლ სტეპტომიცინი). 80%-ანი კონფლუენტობის მიღების შემდგომ, ჰეპატოციტების მოხსნა საკულტივაციო სინჯარის ზედაპირიდან ხდებოდა ტრიპსინ (0.25%) – EDTA (0.02%)-თი დამუშავების შედეგად, ხოლო მაკროფაგების მოხსნა ხდებოდა მექანიკურად.

2D კულტურის მისაღებად, უჯრედების სუსპენზიას ვთესავდით 96 ფოსოიან პლანშეტში. ჰეპატოციტებს ვთესავდით კონცენტრაციით 1.5×10^5 უჯრედი/მლ, ხოლო მაკროფაგებს 2×10^5 უჯრედი/მლ. პლანშეტებს ვათავსებდით 37° -ზე, $5\% \text{CO}_2$ ატმოსფეროში. უჯრედების დასათვლელად ვიყენებდით ჰემოციტომეტრის კამერას, სადაც გადაგვქონდა ტრიპანის ლურჯით შეღებილი უჯრედები, თანაფარდობით 1:1-თან.

ჰეპატოციტებისგან 3D მოდელის შესაქმნელად, ჯერ ვამუშავებდით 96-ფოსოიან პლანშეტებს, რათა მიგვეღო არაადჰეზიური ზედაპირი. ამისათვის აგაროზის 1% - იან ხსნარს ვხსნიდით Dulbecco's Modified Essential Medium არეში. თითოეულ ფოსოში შეგვქონდა 40მკლ აგაროზის ხსნარი და ვაყოვნებდით გასამყარებლად 30 წთ-ით. მომდევნო ეტაპზე, უჯრედების სუსპენზია გადაგვქონდა 96 ფოსოიანი პლანშეტის ფოსოებში კონცენტრაციით 1×10^6 უჯრედი/მლ, პლანშეტს ვათავსებდით ინკუბატორში, სანჯღრეველაზე და ვტოვებდით 48 საათი, სფეროიდის ჩამოყალიბებამდე. სფეროიდის სრულად ჩამოყალიბებისთვის საჭირო იყო 6-7 დღე. მე-3 დღეს სფეროიდებს ვუმატებდით საკვებ არეს (50მკლ), ხოლო მე-5 დღეს მთლიანად ვუცვლიდით.

3.3 მონოშრიანი და სფეროიდული უჯრედული კულტურების გაცხიმოვნება

პლანშეტებში, როგორც მონოშრიანი, ისე სფეროიდული კულტურების ჩამოყალიბების შემდეგ, ტრიგლიცერიდების ჭარბად დაგროვების მიზნით, უჯრედებზე ვმოქმედებდით ოლეინის და პალმიტოლის მჟავების ნარევით (თანაფარდობით 1.32mM:0.66mM). საკვებ არედ ვიყენებდით 1% ხარის შრატის ალბუმინის შემცველ Dulbecco's Modified Essential არეს. ცხიმოვანი მჟავების კონტროლად ვიყენებდით მეთანოლს, როგორც მათ გამხსნელს. თავისუფალ ცხიმოვან მჟავებთან უჯრედებს ვაინკუბირებდით 24 საათის განმავლობაში.

უჯრედების გაცხიმოვნების შემდეგ, მათზე ვმოქმედებდით სამიზნე მოლეკულების შესაბამისი ინჰიბიტორებით. ინჰიბიტორების კონცენტრაცია შევარჩიეთ ლიტერატურაში არსებული მონაცემებით. SIRT1-ს ინჰიბირებისთვის ვიყენებდით EX527-ს კონცენტრაციით 25μM – 30წთ-ით. PARP1-ს ინჰიბირებისთვის - ოლაპარიბს 5μM -

30წთ-ით. ინჰიბიტორებით მოქმედების შემდგომ, კულტურებზე სტიმულაციისთვის ვიყენებდით ტრანს-რეზვერატროლის შემდეგ სამუშაო კონცენტრაციებს: 5 μ M და 10 μ M. კონტროლად ვიყენებდით რეზვერატროლის გამხსნელს 11%-იან ეთანოლს. მოქმედების ხანგრძლივობა გვქონდა 3 საათი და 24 საათი. ინკუბაციის გაცივების შემდეგ პლანშეტებიდან ნალექზედა სითხე გადაგვქონდა 1,5მლ სინჯარებში, ვაცენტრიფუგირებდით 100 g, 5 წთ და ნალექზედა სითხე გადაგვქონდა ახალ სინჯარებში, ვინახავდით 80⁰-ზე. მოგვიანებით მათი საშუალებით ვსაზღვრავდით ხსნად ფაქტორებს. პლანშეტებში დარჩენილ უჯრედებზე კი სხვადასხვა მეთოდებით ვამოწმებდით რეზვერატროლის გავლენას.

3.4 ელექტრონული მიკროსკოპია

ღვიძლის სფეროიდების ელექტრონული მიკროსკოპირება განხორცილდა საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტის ელექტრონული მიკროსკოპიის ლაბორატორიაში. ელექტრონული მიკროსკოპირებისთვის სფეროიდების პრეპარატის მომზადება მოიცავდა: ფიქსაციას 1-დან 12- საათამდე გლუტარალდეჰიდ: ფოსფატური ბუფერის ხსნარში, დეჰიდრატაციას და ჩაყალიბებას ეპონ-არალდიტში. მომზადებული თხელი ანათლის შესწავლა მოხდა Tesla BS-500 ელექტრონულ მიკროსკოპზე.

3.5 ცხიმების შემცველობის განსაზღვრა: შეღებვა ნილის წითლით

უჯრედშიდა ცხიმების შემცველობის განსაზღვრისთვის ვიყენებდით ლიპოფილურ საღებავს ნილის წითელს (Nile Red-NR). პირველადი განზავება მზადდება 2 მგ/მლ კონცენტრაციით და ინახება ოთახის ტემპერატურაზე სიბნელეში. სამუშაო ხსნარის კონცენტრაცია შეადგენს 100 მკგ/მლ და მისი მომზადება პირველადი ხსნარიდან უშუალოდ ექსპერიმენტის წინ ხდება. შეღებვის წინ, უჯრედებს ვხსნიდით ფოსოებიდან და თავის არესთან ერთად გადაგვქონდა 1.5 მლ სინჯარებში. ვაცენტრიფუგირებდით 100g, 5წთ-ის განმავლობაში. ნალექზედა სითხეს ვამორებდით და ვათავსებდით

სანჯღეველაზე. შემდგომ ვუმატებდით 200 მკლ PBS-ს. ვაცენტრიფუგირებდით 5 წთ, 100 გ-ზე. სუპერნატანტს ვაშორებდით და ვათავსებდით სანჯღეველაზე. ვუმატებდით 200 მკლ PBS და 2 მკლ ნილის წითელს, ვაინკუბირებდით ოთახის ტემპერატურაზე, სიბნელეში, 5 წთ. ნიმუშების ანალიზი ხდებოდა გამდინარე ციტომეტრიით, Accuri C6 (BD) ციტომეტრის გამოყენებით. ნარინჯისფერი ფლუორესცენციის საშუალო ინტენსივობის მაჩვენებლის მიხედვით (FL2) ვმსჯელობდით უჯრედებში ნეიტრალური ლიპიდების შემცველობაზე.

3.6 ცხიმების შემცველობის განსაზღვრა: შეღებვა Oil Red O-ით

ლიპიდური ბალანსის შესაფასებლად, გარდა ნილის წითელისა, აგრეთვე ვიყენებდით სუდანის ლიზოქრომული ტიპის საღებავს, Oil Red O-ს. ის შერჩევითად ღებავს ნეიტრალურ ტრიგლიცერიდებს და ლიპიდებს. საღებავს მაქსიმალური შთანთქმა აქვს 518 ნმ-ზე. შესაღებად ვიყენებდით 0.3%-იანი Oil red O საღებავს, რომელსაც ვხსნიდით 100%-იან იზოპროპანოლში და ვინახავდით სიბნელეში, ოთახის ტემპერატურაზე. შეღებვის წინ საღებავს ვანზავებდით გამოხდილი წყლით, თანაფარდობით 3:2. ვაყოვნებდით 10 წთ და ვფილტრავდით 0.40 მკმ მემბრანული ფილტრით.

ლიპიდური წვეთების შესაღებად საჭირო იყო უჯრედების ფიქსაცია, ამიტომ საწყის ეტაპზე 96 ფოსოიან პლანშეტებში უჯრედებს ვაფიქსირებდით 4%-იანი პარაფორმალდეჰიდით (PFA). თითოეულ ფოსოში ვამატებდით 100-100მკლ-ს 4%PFA-ს. ფიქსაციისთვის უჯრედებს ვაყოვნებდით 40 წთ-ით. შემდგომ 2-ჯერ ვრეცხავდით 300-300 მკლ გამოხდილი წყლით და დეჰიდრატაციისთვის ვმოქმედებდით 100-100 მკლ 60%-იანი იზოპროპანოლით 5 წთ-ით. შემდგომ ვამატებდით 100-100 მკლ საღებავს 15 წთ-ით. შეღებვის შემდეგ სამჯერ ვრეცხავდით 300-300 მკლ გამოხდილი წყლით, ბოლო რეცხვის ეტაპზე ლიპიდური წვეთების შესაფასებლად უჯრედებს ვაკვირებდით ინვერტირებულ მიკროსკოპში. დაკვირვების შემდეგ გამოხდილ წყალს ვაშორებდით და უჯრედებში აკუმულირებულ საღებავს ვხსნიდით 100-100 მკლ 100%-იანი

იზოპროპანოლით, პლანშეტებს ვათავსებდით სანჯღრეველაზე, 10 წთ-ით და საღებავის შთანთქმას ვზომავდით 490 ნმ-ზე.

3.7 ციტოკინების განსაზღვრა იმუნოფერმენტული მეთოდით

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) წარმოადგენს მყარ ფაზაზე დაფუძნებულ მეთოდს რომლის საშუალებითაც შესაძლებელია რაოდენობრივად განისაზღვროს ცილები, პეპტიდები, ჰორმონები. ELISA-ს მეთოდის ძირითად პრინციპს წარმოადგენს ანტიგენ ანტისხეულის ურთიერთდაკავშირება და ამ ურთიერთდაკავშირების დადგენა ფერმენტ სუბსტრატული ურთიერთქმედების საშუალებით.

Elisa მეთოდის გამოყენებით, RAW264.7, J774A1 და Hepa1-6 უჯრედული კულტურების სუპერნატანტებში ვადგენდით შემდეგი ციტოკინების TNF- α , IL-1 β , IL-6-ისა და IL-10-ს კონცენტრაციას (Peprotech. Murine TNF- α , IL-6, IL10, Standard ABTS ELISA development kit).

პოლისტირენის 96-ფოსოიან პლანშეტის თითოეულ ფოსოში ვამატებდით 100მკლ TNF- α , IL-6-სა ან IL-10-ს პირველად ანტისხეულს, კონცენტრაციით 1მკგ/მლ და მთელი ღამის განმავლობაში ვაინკუბირებდით 25⁰-ზე. მეორე დღეს პლანშეტს ორჯერ ვრეცხავდით 300 მკლ გამრეცხი ბუფერით (PBS_0.05%/Tween 20) და შემდგომ ვამატებდით 300 მკლ დამბლოკავ სითხეს (1% ხარის შრატის ალბუმინი_PBS), პლანშეტს ვათავსებდით ოთახის ტემპერატურაზე 1 სთ-ის განმავლობაში. ინკუბაციის გასვლის შემდგომ პლანშეტს ვრეცხავდით ორჯერ გამრეცხი ბუფერით და შესაბამის ფოსოებში ვამატებდით 100-100 მკლ 0, 250 პგ/მლ, 500 პგ/მლ, 1000პგ/მლ კონცენტრაციის სტანდარტულ ხსნარებსა და საკვლევ სუპერნატანს. თითოეულ ნიმუშს ვამატებდით ტრიპლიკატებში. ინკუბაცია მიმდინარეობდა 2 საათის განმავლობაში, ოთახის ტემპერატურაზე. ინკუბაციის გასვლის შემდეგ ისევ ვახდენდით ფოსოების ორჯერ გარეცხვას და ვამატებდით ბიოტინით მონიშნულ 100 მკლ მეორად ანტისხეულს, კონცენტრაციით 0.5 მკგ/მლ, ვაინკუბირებდით 2 საათის განმავლობაში, 25⁰-ზე.

ინკუბაციის გასვლის შემდეგ ისევ ვრეცხავდით ორჯერ და ვამატებდით 100 მკლ კონიუგატს (Avidin-HRP), ვაყოვნებდით 30 წთ-ის განმავლობაში. შემდეგ პლანშეტს ვრეცხავდით ორჯერ. გარეცხვის შემდეგ ვამატებდით 100 მკლ სუბსტრატულ ხსნარს (ABTS), ინკუბირებას ვახდენდით სიბნელეში და ვზომავდით 5 წთ-ში ერთხელ 30 წთ-ის განმავლობაში. ოპტიკურ მაჩვენებელს ვამოწმებდით სპექტროფოტომეტრის საშუალებით 405 ნმ-ზე, ტალღის სიგრძის კორექციას ვახდენდით 650 ნმ-ზე.

3.8 ზედაპირული რეცეპტორების ექსპრესიის განსაზღვრა

TLR4 და CD36 რეცეპტორების ზედაპირული ექსპრესიის განსაზღვრისთვის გამოვიყენეთ იმუნოფენოტიპირების მეთოდი, პირველადი მონოკლონური და მეორადი ფლუოროქრომ-კონიუგირებულ ანტისხეულების გამოყენებით. იმუნოლოგიური პლანშეტიდან ვხსნიდით უჯრედებს. უჯრედების მიღებულ სუსპენზიას 2-ჯერ ვრეცხავდით ცენტრიფუგირების გზით 1% PBS/BSA-ის გამოყენებით, 100 გ, 5 წთ-ით. რის შემდეგაც მათ ვამატებდით 1 მკლ პირველად ანტისხეულს (anti-CD36, anti-TLR4, Santa Cruz Biotechnology). ნიმუშებს ვაინკუბირებდით 4°C-ზე, 30 წთ. შემდეგ უჯრედებს ისევ ვრეცხავდით 1% PBS/BSA-ით და ვამატებდით მეორად ანტისხეულს (Rabbit anti-mouse F(ab)2-FITC conj., Santa Cruz Biotechnology). ნიმუშებს ისევ ვაინკუბირებდით 4°C-ზე, 30 წთ, რის შემდეგაც ისევ ვრეცხავდით 1% PBS/BSA-ით და ვაფიქსირებდით 1%-იან პარაფორმალდეჰიდში.

ნიმუშებს ვაანალიზებდით გამდინარე ციტომეტრიით, Accuri C6 (BD) ციტომეტრის გამოყენებით.

3.9 ჯამურად, ჟანგბადის აქტიური ფორმების განსაზღვრა

ჯამურად ჟანგბადის აქტიური ფორმების (ჰიდროქსილის, პეროქსილის და სხვ.) განსაზღვრისთვის, გამოვიყენეთ ფლუორესცენტული საღებავი, 2',7'-დიქლოროფლუორესცეინ დიაცეტატი (DCFDA / H2DCFDA / DCFH-DA / DCFH). ის

დიფუზიის გზით შედის უჯრედებში. უჯრედული ესთერაზების მიერ ხდება მისი დეაციტილირება არაფლოროესცენტულ შენაერთად DCFH-ად. DCFH უჯრედში ჟანგბადის აქტიური ფორმების მიერ იჟანგება 2', 7' –დიქლოროფლოროესცენინად (DCF). DCF-ს აქვს მაღალი მწვანე ფლოროესცენცია და გამდინარე ციტომეტრიით ხდება მისი აღრიცხვა (Ex/Em=485 nm/535nm).

უჯრედებს ვხსნიდით ფოსოებიდან და თავის არესთან ერთად გადაგვქონდა 1.5 მლ-იან სინჯარაში. DMEM-ით ვავსებდით სინჯარას 1მლ-მდე. უჯრედების სუსპენზიას ვუმატებდით 1 მკლ DCFH-DA-ს (Santa Cruz Biotechnology), კონცენტრაციით 1mM, რომელიც ინახებოდა 20°C-ზე. ინკუბაცია მიმდინარეობდა 30 წთ ოთახის ტემპურატურაზე. ამის შემდეგ უჯრედებს ვაცენტრიფუგირებდით 5 წთ, 100 გ-ზე, ვაშორებდით ნალექზედა სითხეს, ვათავსებდით სანჯრეველაზე, ვავსებდით 1მლ-მდე 1x PBS-ით და ვაანალიზებდით გამდინარე ციტომეტრის საშუალებით.

3.10 ადრეული აპოპტოზის შეფასება

უჯრედებში აპოპტოზის გასაზომად შევაფასეთ მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალი, რადგან აპოპტოზის ადრეულ სტადიებზე სწორედ მიტოქონდრიაში იწყება ცვლილებები. ერთ-ერთი ასეთი ცვლილებაა შიდა მემბრანის ტრანსმემბრანული პოტენციალის დარღვევა ($\Delta\Psi_m$). მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალის დადგენა ჩვეულებრივ ხდება ფლოროესცენტული კათიონური საღებავებით, რომლებიც აკუმულირდება უარყოფითად დამუხტულ მიტოქონდრიის მატრიქსში. რაც უფრო უარყოფითია ტრანსმემბრანული პოტენციალი, მით მეტი საღებავი აკუმულირდება.

უჯრედებს ვხსნიდით 96-ფოსოიანი ფლეითიდან და თავის არესთან ერთად გადაგვქონდა 1.5 მლ-იან სინჯარებში. ვაცენტრიფუგირებდით 100 გ, 5წთ-ის განმავლობაში. სუპერნატანტს ვღვრიდით და უჯრედების ნალექს ვათავსებდით სანჯრეველაზე. შემდგომ ვუმატებდით 200მკლ PBS-ს. ვაცენტრიფუგირებდით 5 წთ, 100 გ-ზე. სუპერნატანტს ვაშორებდით და ვანჯღრევდით სინჯარებს, ვუმატებდით 200 მკლ PBS და 20 მკლ DIOC₆-ს სამუშაო ხსნარს (Santa Cruz Biotechnology). ვაიკუბირებდით 15 წთ

37°C-ზე და ნიმუშების ანალიზს ვახდენდით გამდინარე ციტომეტრიით, Accuri C6 (BD) ციტომეტრის გამოყენებით. სამუშაო ხსნარის მისაღებად 1 მკლ (200 μ M) DIOCs-ს ვუმატებდით 499 მკლ PBS-ს, სანჯღრეველაზე მუდმივი შენჯღრევის პირობებში.

3.11.1 უჯრედული ლიზატის მომზადება წერტილოვანი ბლოტისთვის

წერტილოვანი ბლოტი ვესტერნ ბლოტის მეთოდის გამარტივებულ ვარიანტს წარმოადგენს და ცილების დეტექციისთვის გამოიყენება. წერტილოვანი ბლოტის შედეგად დანახული ცილები, ვესტერნ ბლოტისგან განსხვავებით, არ არიან ელექტროფორეზის მეშვეობით დაშორებულნი, და იმ მემბრანაზე, სადაც ნიმუშები იქნება დატანილი, ლაქის სახით ჩნდებიან. წერტილოვანი ბლოტისთვის პირველ რიგში ვამზადებდით უჯრედულ ლიზატს, ამისათვის მექანიკური მოხსნის გზით ჯერ ვიღებდით უჯრედულ სუსპენზიას. უჯრედებს ვაცენტრიფუგირებდით 800 გ-ზე 5 წთ-ის განმავლობაში, ვაშორებდით ნალექზედა სითხეს და ნალექს ვათავსებდით სანჯღრეველაზე. შემდგომ ვამატებდით 300მკლ ცივ (4°C) PBS-ს და ვაცენტრიფუგირებდით 800 გ-ზე. ნალექზედა სითხეს ვაშორებდით, ნალექს ვხსნიდით კონცენტრაციების გათანაბრებისათვის საჭირო რაოდენობა ლიზის ბუფერში (5x ლიზის ბუფერი: SDS 0.1%, 2-mercaptoethanol 5%, Tris-HCl 8pH, 50mM). სინჯარებს ვათავსებდით სანჯღრეველაზე და 5 წთ-ით ვათავსებდით 95°C-ზე. შემდგომ ისევ ვათავსებდით სანჯღრეველაზე და ვაცენტრიფუგირებდით 15000 გ-ზე 20 წთ-ის განმავლობაში. ნალექზედა სითხე გადაგვქონდა ცალკე სინჯარაში, ნალექს ვაგდებდით. მიღებული ლიზატი მოკლე დროით ინახება 4°C-ზე, ხოლო ხანგრძლივი დროით - -20°C-ზე.

3.11.2 წერტილოვანი ბლოტი

ნიტროცელულოზის ქაღალდზე ვაწვეთებდით უჯრედულ ლიზატს. ვაშრობდით ჰაერზე და შემდგომ ვათავსებდით მახლოკირებელ ხსნარში (3% albumin, 0.2% Tween in TBS buffer). ამ ხსნარში ვტოვებდით ღამე 4°C-ზე. დილით გადაგვქონდა ოთახის

ტემპერატურამდე, სანამ გათბებოდა ვამზადდებით გამრეცხ ბუფერს (TBS, 0.2% Tween). ნიტროცელულოზას ვაშორებდით მაბლოკირებელ ხსნარს და ვრეცხავდით გამრეცხ ბუფერში 3 წთ-ის განმავლობაში, რის შემდეგაც ვამატებდით პირველად ანტისხეულს (anti-PPAR γ 2, Santa Cruz Biotechnology) 5 საათით. მემბრანას ვრეცხავდით გამრეცხი ბუფერით 3-ჯერ: 5, 5 და 10 წთ-ით. მომდევნო ეტაპზე ვამატებდით მეორად ანტისხეულს (mouse IgG kappa binding protein (m-IgG κ BP) conjugated to Horseradish Peroxidase (HRP), Santa Cruz Biotechnology) 1 საათით. ინკუბაციის შემდგომ, მემბრანას ვრეცხავდით გამრეცხი ბუფერით სამჯერ: 15, 5 და 5 წთ-ით. შედეგების გამჟღავნებისთვის ვიყენებდით ლუმინოლის ხსნარს. წერტილოვანი -ბლოტის შედეგების რაოდენობრივი შეფასებისთვის მიღებული სურათის სკანს ვამუშავებდით პროგრამულად ImageJ-ს გამოყენებით.

3.12.1 უჯრედების მოხსნა, ბირთვებით გამდიდრება და ნიმუშების მომზადება ვესტერნ ბლოტინგისთვის

რეზერატოროლის დამატებიდან 24 საათში ვღვრიდით საკვებ არეს და ვანაცვლებდით მას ცივი PBS-ით. საყურადღებოა, რომ ყოველი ეტაპი ნიმუშების დამზადებისას უნდა მოხდეს ცივ პირობებში, 4°C-ზე. PBS-ის დამატების შემდგომ ვხსნიდით უჯრედებს პიპეტისა ან მარყუჟის გამოყენებით და შემდგომ ვითვლიდით უჯრედთა რაოდენობას. ამის შემდგომ უჯრედების სუსპენზიები გადაგვქონდა ცივ სინჯარებში და ვაცენტრიფუგირებდით 600 გ-ზე 5 წთ-ით. ნალექზედა სითხეს ვაცილებდით და ნალექს ვხსნიდით ისევ ცივ PBS-ში და ხელმეორედ ვდგამდით ცენტრიფუგაში 600 გ-ზე 5 წთ-ით. შემდგომ ვუმატებდით თითო ნიმუშს 2 მლ ბირთვების ექსტრაქციის ბუფერს, რომლის შემადგენლობა იყო 3mM MgCl₂, 0.32 M საქაროზა, 10mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1% NP-40. ბუფერში ხელახლა ვასუსპენზირებდით ნალექს და გადაგვქონდა ცივ ჰომოგენიზატორში, რომელშიც 3-ჯერ ფრთხილად ვაჰომოგენიზირებდით ნიმუშებს. ამის შემდეგ ვდგამდით ნიმუშებს ისევ ცენტრიფუგაში 5000გ-ზე 20 წთ-ით, ვაცილიდით ნალექზედა სითხეს, ვუმატებდით ცივ PBS-ს და

ხელმეორედ ვდგამდით ცენტრიფუგაში იმავე პარამეტრებით. ბოლოს ვაცლიდით სუპერნატანტს და ნალექს ვხსნიდით ცივ PBS-ში. Bradford Assay-ს მეშვეობით ვზომავდით ცილის რაოდენობას ნიმუშში და შემდეგ ვუტამდებდით ხუთჯერად SDS-loading buffer-ს, იგივე Laemmli buffer-ს. ბუფერის დამატების მერე 5 წთ-ით ვაცხელებდით ნიმუშებს 95°C-ზე, ბოლოს კი ვინახავდით ნიმუშებს -20°C-ზე.

3.12.2 SDS-PAGE

პოლიაკრილამიდის გელ ელექტროფორეზისათვის ვამზადებდით 8%-იან separating და 3%-იან stacking გელებს. 8% separating გელის კომპოზიცია: 8% აკრილამიდი/ბის-აკრილამიდი, Tris-HCl pH 8.9 0.5M, SDS 0.1%, APS 0.05, TEMED 0.005%. 3% separating გელის კომპოზიცია: 3% აკრილამიდი/ბის-აკრილამიდი, Tris-HCl pH 6.8 0.125M, SDS 0.1%, APS 0.05%, TEMED 0.1%. 8% separating გელის ხსნარს ვასხამდით ელექტროფორეზის კასეტაში ნიშნულამდე, რის შემდეგაც ფრთხილად ვამატებდით დეიონიზირებულ წყალს, რათა გელის ზედაპირი ერთგვაროვანი ყოფილიყო. პოლიმერიზაციის შემდგომ ვღვრიდით წყალს და ვუმატებდით კასეტას stacking გელის ხსნარს და ვათავსებდით კასეტაში სავარცხელს. პოლიმერიზაციის შემდგომ ვათავსებდით კასეტას თავის ჭურჭელში და ვხსნიდით სავარცხელს, რის მერეც ვუმატებდით მინიმუმ 1ლ SDS Running Buffer-ს, რომლის შემადგენლობა იყო 25mM Tris, 192mM გლიცინი და 0.1% SDS. -20°C-დან გამოგვქონდა ნიმუშები და მარკერი და დროულად ვათავსებდით გელის ჯიბეებში, რათა დიდხანს არ ყოფილიყვნენ ოთახის ტემპერატურაზე და არ მომხდარიყო მათი დაშლა. მოთავსების შემდგომ ვუშვებდით ელექტროფორეზს 10 მილიამპერზე. როდესაც ნიმუშები გადავიდოდნენ separating გელში მუხტს ვზრდიდით 15 მილიამპერზე.

3.12.3 მემბრანაზე გადატანა

ნიმუშებისა და მარკერის ბოლომდე გაშლის შემდგომ ვრთავდით ფორებს და გადაქვეყონდა გელი ბლოტინგის სენდივჩში. სენდივიჩის თანმიმდევრობა იყო შემდგომი: ფილტრის ღრუბელი, ფილტრის ქაღალდი, გელი, ნიტროცელულოზა 0.45 მკმ, ფილტრის ქაღალდი, ფილტრის ღრუბელი. სენდივიჩს ვათავსებდით კასეტაში და ვასველებდით Towbin ბუფერში, რომელიც შეიცავდა 20% ეთანოლს. კასეტას ვათავსებდით მის ჭურჭელში და ვავსებდით დაახლოებით 1.5ლ 20% ეთანოლის შემცველობის Towbin ბუფერით. აპარატურას ვათავსებდით ცივ პირობებში და შემდგომ ვრთავდით ელექტროფორეზს 200 მილიამპერზე 3 სთ-ით. შემდგომ ვღებავდით ნიტროცელულოზას Ponceau S-ით, რათა გვეჩვენებოდა ცილის რაოდენობა. შედეგის შემდეგ ვრეცხავდით ნიმუშს დეიონიზირებულ წყალში და ვინახავდით ბლოკინგის ხსნარში, რომლის შემადგენლობა იყო 3% Blotto, non-fat dry milk, 4°C-ზე მთელი დამით.

3.12.4 ნიმუშის გამჟღავნება და საკვლევი ობიექტის დეტექცია

მომდევნო დღეს გამოგვეყონდა ნიმუში და ვღვრიდით ბლოკინგის ხსნარს და ვანაცვლებდით მას TBST-ით. ნიმუშს ვათავსებდით სანჯღრეველაზე და ვაყოვნებდით 10 წთ-ით. შემდგომ ვღვრიდით TBST-ს და ვანაცვლებდით მას ზემოხსენებული ბლოკინგის ხსნარით, რომელშიც გახსნილი იყო 1:400 განზავებით პირველადი ანტისხეული, pADPr Antibody (10H) (sc-56198, Santa Cruz Biotechnology). ნიმუშს ისევ ვათავსებდით სანჯღრეველაზე და ვაინკუბირებდით 2 სთ-ით ოთახის ტემპერატურაზე. 2 სთ-ის შემდეგ ვღვრიდით ანტისხეულის ხსნარს და ვანაცვლებდით TBST-ით, რომლითაც ვრეცხავდით ნიმუშს 3-ჯერ 10 წთ-ით. ყოველი რეცხვის ბოლოს ვცვლიდით TBST-ის ხსნარს ახლით. ბოლო რეცხვის შემდეგ ვღვრიდით TBST-ს და ვანაცვლებდით ისევ ბლოკინგის ხსნარით, სადაც გახსნილი იყო 1:4000 განზავებით მეორადი ანტისხეული m-IgGκ BP-HRP (sc-516102, Santa Cruz Biotechnology). მეორად ანტისხეულთან ვაინკუბირებდით ნიმუშს 1.5 სთ-ით, რის მერეც ისევ ვრეცხავდით 10 წთ-ით TBST-ით 3-ჯერ. ბოლო რეცხვის შემდეგ

ვამშრალეზდით ნიტროცელულოზას და ვაწვეთეზდით მასზე დეტექციის ხსნარს, რომელშიც 1:1-თან იყო შერეული ლუმინოლი და წყალბადის ზეჟანგი. დაწვეთეზიდან მალევე მიგვექონდა ნიმუში ბნელ ოთახში, სადაც ვათავსეზდით მასზე Autoradiography Film – UltraCruz®-ს დაახლოეზით 1 წთ-ით. შემდგომ ვილეზდით ფირს და ვათავსეზდით მას Developer ხსნარში დაახლოეზით 30 წმ-ით, რის შემდეგაც ვილეზდით ფირს და ვათავსეზდით Fixer ხსნარში იგივე დროით. ბოლოს ფირს ვრეცხავდით დეიონიზირებული წყლით, რათა ჩამოგვერეცხა მორჩენილი რეაგენტეზი.

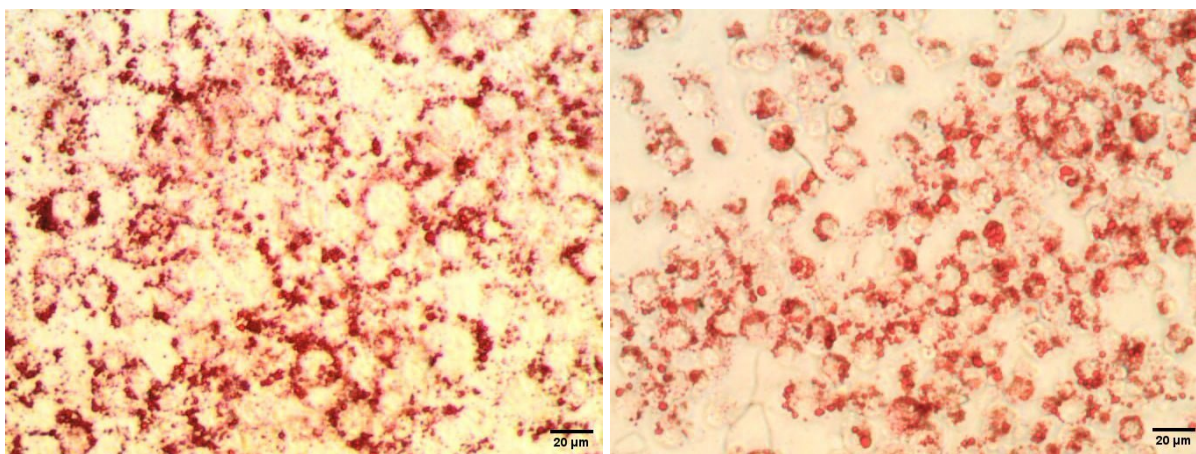
3.13 სტატისტიკური ანალიზი

თითოეული ექსპერიმენტი ჩატარდა მინიმუმ სამჯერ. შედეგეზი წარმოდგენილია, როგორც საშუალო მნიშვნელოეზი $\pm$ სტანდარტული შეცდომეზი (SEM). მიღებული შედეგეზის ანალიზი მოხდა სტატისტიკური მეთოდის, ორმხრივი სტიუდენტის t-ტესტის გამოყენეზით. p-ს მნიშვნელოეზა <0.05 მიჩნეულ იქნა სტატისტიკურად მნიშვნელოვან და ღირებულ მაჩვენებლად. ყველა სტატისტიკური ანალიზი ჩატარდა Microsoft Excel 2019-ის გამოყენეზით.

4. შედეგები

4.1 NAFLD-ს ორგანოზომილებიანი და სამგანზომილებიანი *in vitro* მოდელის გაცხიმოვნების ხარისხის შეფასება

კვლევის დასაწყებად ჩვენი მთავარი ამოცანა იყო ჯერ შეგვექმნა დაავადების *in vitro* სამოდელო სისტემა და შემდეგ უკვე შეგვესწავლა ტრანს-რეზვერატროლის სამოქმედო გზა. ამიტომ დავიწყეთ ჰეპატოციტების და მაკროფაგების მონოშრიანი (2D) მოდელის შემუშავება. უჯრედების მონოშრიან კულტურას ვამატებდით თავისუფალი ცხიმოვანი მჟავების ნაზავს (FFA 1mM (ოლეინის/პალმიტოლის მჟავები)), დამატების შემდგომ (24სთ-ში) ფაზოკონტრასტული მიკროსკოპით ვაკვირდებოდით ლიპიდური წვეთების მომატებულ რაოდენობას საკონტროლო ნიმუშებთან შედარებით, რაც სტეატოზის მთავარი მახასიათებელია. უჯრედების გაცხიმოვნების შემდეგ, საღებავი Oil red O-თი ლიპიდების შეღებვისას, როგორც ჰეპატოციტების ისე მაკროფაგების მონოშრიან კულტურაში, შეიმჩნეოდა ლიპიდური წვეთების დაგროვება [სურ.6].



ა)

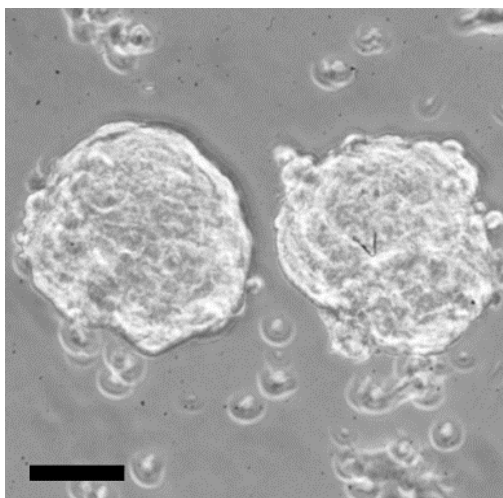
ბ)

სურ. 6 ცხიმების შეღებვა Oil red O-თი ა) გაცხიმოვნებული ჰეპატოციტების უჯრედული კულტურა, Hepa 1-6, ბ) გაცხიმოვნებული მაკროფაგების უჯრედული კულტურა, J774A.1 Red O, Nikon TMS, x100, scale bar = 20µm

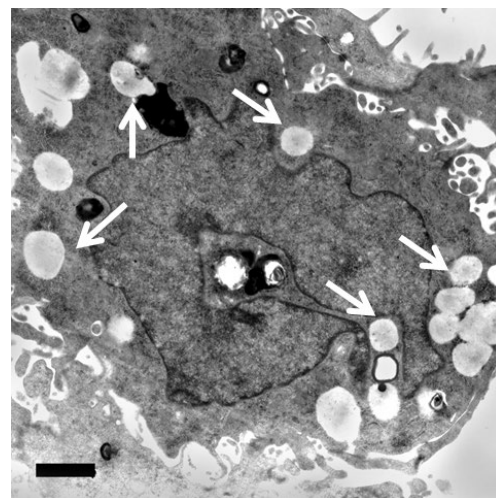
NAFLD-ს სამოდელო სისტემის შექმნისას, გარდა მონოშრიანი უჯრედული კულტურისა, ასევე შევიმუშავეთ ჰეპატოციტების სამგანზომილებიანი (3D), სფეროიდული კულტურა. აღნიშნული 3D კულტურის მოდელი მეტად მიახლოებულია

ქსოვილთან, ვინაიდან უჯრედებს შორის ყალიბდება უფრო ძლიერი და სივრცობრივად მრავალმხრივი ადჰეზიური კონტაქტები. შესაბამისად, უფრო კორექტულ მოდელს წარმოადგენს.

ჰეპატოციტების სამგანზომილებიანი უჯრედული კულტურის შექმნისათვის ჯერ ვიღებდით სფეროიდულ კულტურას, სფეროიდების ფორმირების შემდეგ ცხიმის დაგროვების სტიმულირებისთვის ვამატებდით ცხიმოვანი მჟავების ნარევეს. ელექტრონული მიკროსკოპით მიღებულ სურათებზე, სფეროიდების მორფოლოგიის შესწავლით დადგინდა, რომ აღნიშნულ მოდელში, მართლაც ხდება სტეატოზის განვითარება, რადგანაც მკვეთრად ჩანს ლიპიდური წვეთები [სურ. 7]. ამგვარად, დადასტურდა, რომ შემუშავებული ექსპერიმენტალური სამგანზომილებიანი მოდელი კორექტულია და შეიძლება ჩაითვალოს არაალკოჰოლური ცხიმოვანი ღვიძლის დაავადების *in vitro* მოდელად.



(ა)

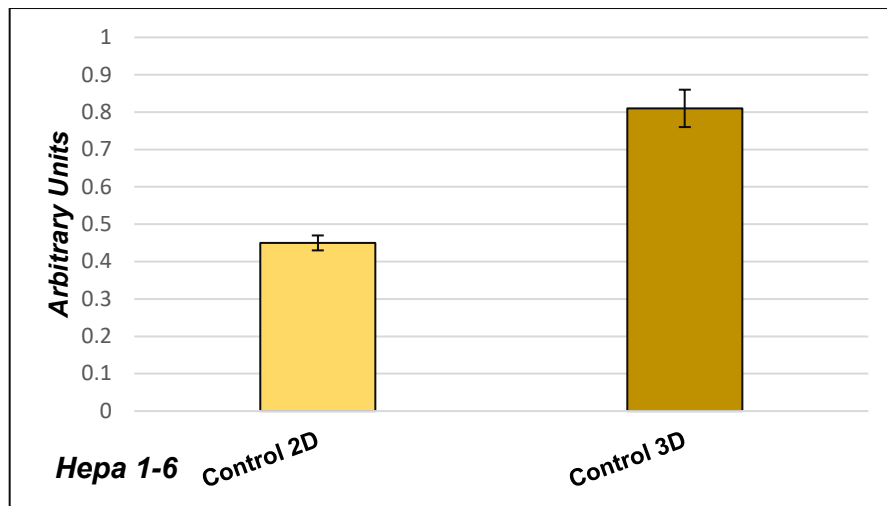


(ბ)

სურ. 7. ჰეპატოციტების სფეროიდული კულტურის მორფოლოგია. (a) Hepa 1-6 უჯრედების 7-დღის სფეროიდები, scale bar = 30მკმ, ფაზო-კონტრასტული მიკროსკოპი; (b) TEM image, ჰეპატოციტების სფეროიდების ულტრა თხელი ანათომები, მონიშნული ლიპიდური წვეთებით (თეთრი ისრებით), scale bar = 1მკმ.

აღსანიშნავია, რომ ჩვენ ნილის წითელის შედეგების მეთოდით დავაკვირდით ლიპიდების დეპონირების ხარისხს. შედეგების დეტექცია მოხდა წითელი ფლუორესცენციის (FL2)

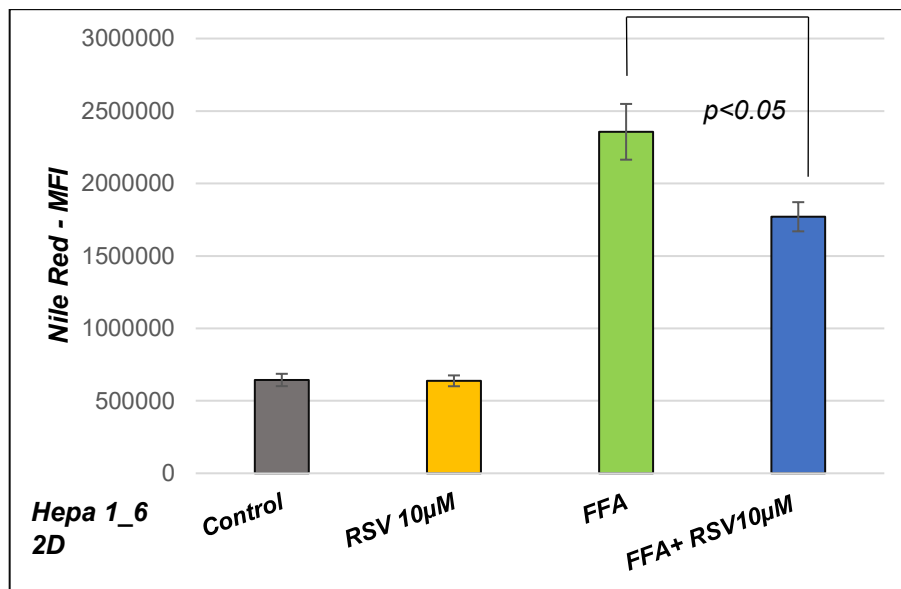
ინტენსივობის გაზომვის გზით, Accuri C6 (Becton Dickinson) გამდინარე ციტომეტრზე. შევადარეთ 2D და 3D სამოდელო სისტემებში დეპონირებული ლიპიდების დონე და დავადგინეთ, რომ სამგანზომილებიან სისტემაში ლიპიდების დონე კონტროლში ორჯერ აღემატება ლიპიდების დონეს ორგანზომილებიან კულტურებში [სურ. 8].



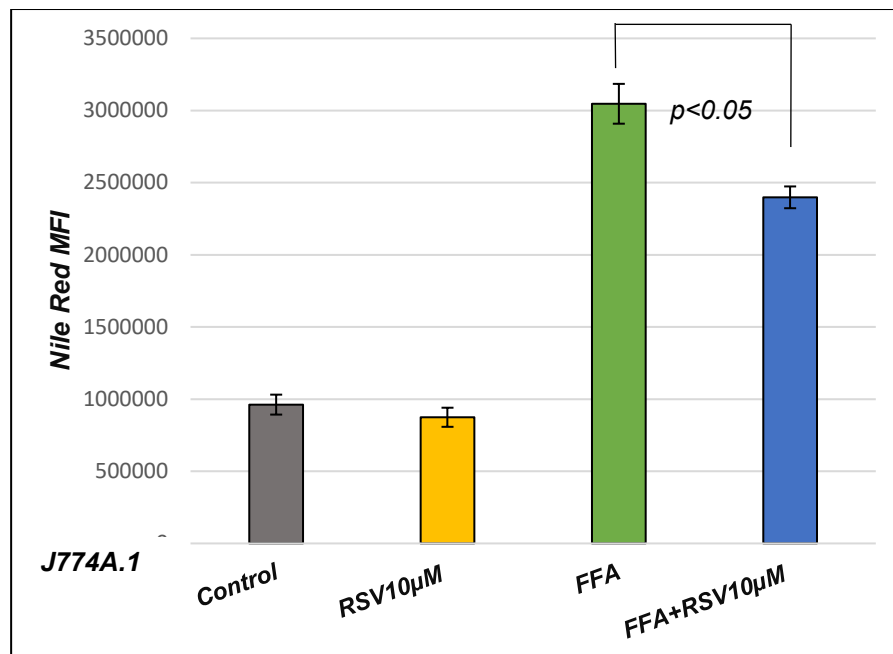
სურ. 8. ჰეპატოციტების 2D და 3D სამოდელო სისტემებში დეპონირებული ლიპიდების დონის შეფასება გამდინარე ციტომეტრით, შედეგა ნილის წითელით.

4.2.1 რეზერატროლთან 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ცხიმების შემცველობის შეფასება

ლიპიდების დეპონირების პროცესზე რეზერატროლის ეფექტის შესასწავლად, ჰეპატოციტების გაცხიმოვნებულ ორგანზომილებიან უჯრედულ კულტურაში და ასევე მაკროფაგების გაცხიმოვნებულ კულტურაში, რეზერატროლთან 24 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ ნილის წითელით შედეგის გზით დავაკვირდით ლიპიდების დეპონირების ხარისხს, გამდინარე ციტომეტრის საშუალებით. სურ.9-ზე მოყვანილია რეზერატროლთან კულტივირების შემდგომ ფლოუორესცენციის ინტენსივობის ცვლილება ჰეპატოციტების ორგანზომილებიან კულტურაში. როგორც ჩანს სურათიდან, რეზერატროლის 10 μ M-მა კონცენტრაციამ გამოიწვია ლიპიდების დეპონირების შემცირება [სურ. 9]. მსგავსი შედეგები მივიღეთ მაკროფაგების სამოდელო სისტემაში [სურ. 10].



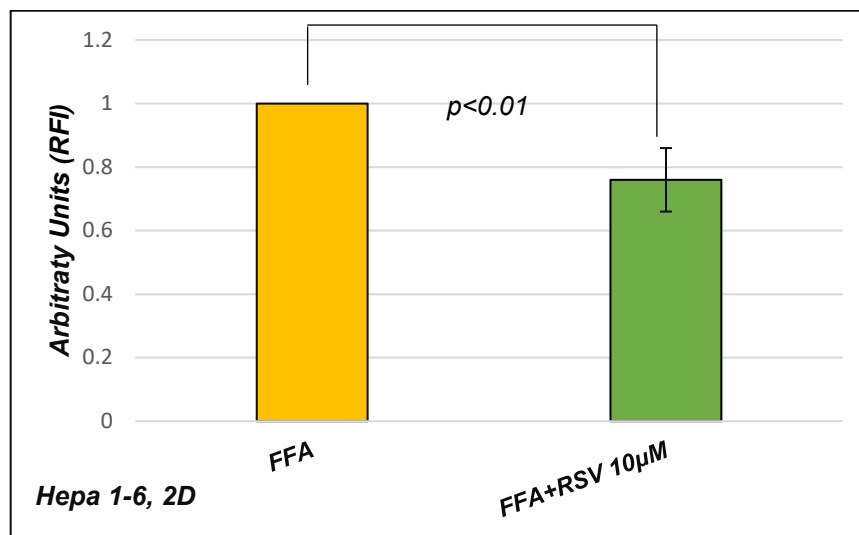
სურ. 9. რეზერატროლის მოქმედების (24 სთ) შეფასება, ჰეპატოციტების Hepa 1-6 მონოშრიან კულტურაში, ლიპიდების შემცველობაზე გაუცხიმოვნებელ და გაცხიმოვნებულ (FFA) ნიმუშებში, (გრაფიკზე ნაჩვენებია ნილის წითელის საშუალო ფლუორესცენციის ინტენსივობა)



სურ. 10. რეზერატროლის მოქმედების (24 სთ) შეფასება, მაკროფაგების J774A.1 მონოშრიან კულტურაში, ლიპიდების შემცველობაზე გაუცხიმოვნებელ და გაცხიმოვნებულ (FFA) ნიმუშებში, (გრაფიკზე ნაჩვენებია ნილის წითელის საშუალო ფლუორესცენციის ინტენსივობა)

4.2.2 რეზვერატროლთან 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ TLR4-ის ზედაპირული ექსპრესიის შეფასება

ლიპიდურ მეტაბოლიზმზე სტილბენოიდების გავლენის შესწავლის პარალელურად, ჰეპატოციტების ორგანოზომილებიან სამოდელო სისტემაში რეზვერატროლით ($10\mu\text{M}$) მოქმედების შემდეგ დავაკვირდით ანთებით პროცესში მონაწილე რეცეპტორის - TLR4-ის ზედაპირული ექსპრესიის დონეს. რეცეპტორის ექსპრესიას ვამოწმებდით ფენოტიპირების მეთოდით შესაბამისი ანტი-TLR4 მონოკლონური ანტისხეულების გამოყენებით და შემდგომი შეღებვით მეორადი, ფლუორესცინ-კონიუგირებული ანტისხეულებით. შედეგების დეტექცია მოხდა გამდინარე ციტომეტრიის მეთოდით Accuri C6 (Becton Dickinson) გამდინარე ციტომეტრზე. როგორც ჩანს სურათიდან, რეზვერატროლის გავლენით მოხდა TLR4-ის ექსპრესიის დონის დაწევა [სურ. 11].

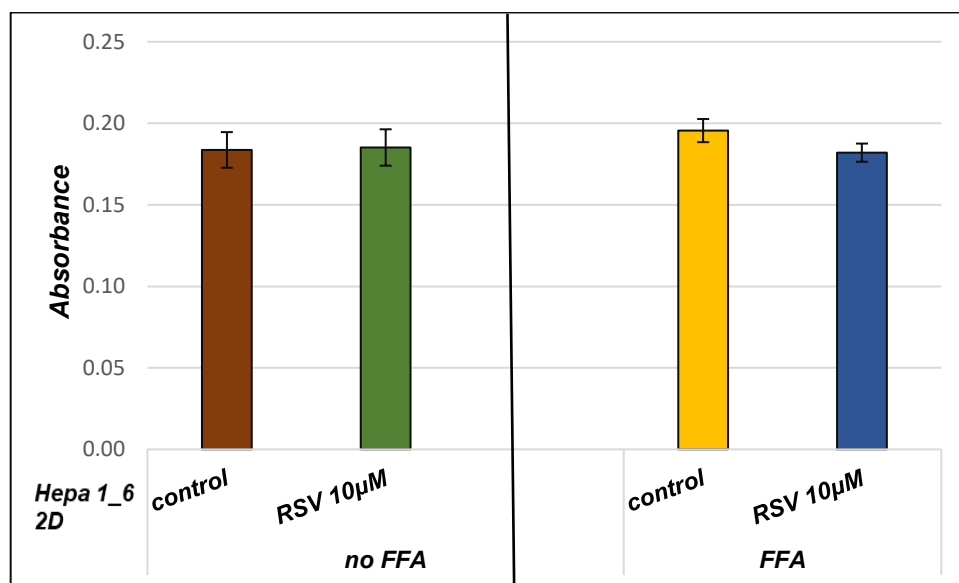


სურ. 11. გაცხიმოვნებული (+FFA) ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 მონოშრიან კულტურაში რეზვერატროლის გავლენის (24 სთ) შესწავლა TLR4 რეცეპტორის ექსპრესიის ინტენსივობაზე, Y ღერძი - TLR4 რეცეპტორის ექსპრესიის ინტენსივობა გამოსახულია პირობით ერთეულებში კოტროლთან შედარებით (სადაც კონტროლი უდრის 1)

4.2.3 რეზვერატროლთან 24 საათიანი ზემოქმედების შემდეგ ციტოკინების დონის შემოწმება ჰეპატოციტებში

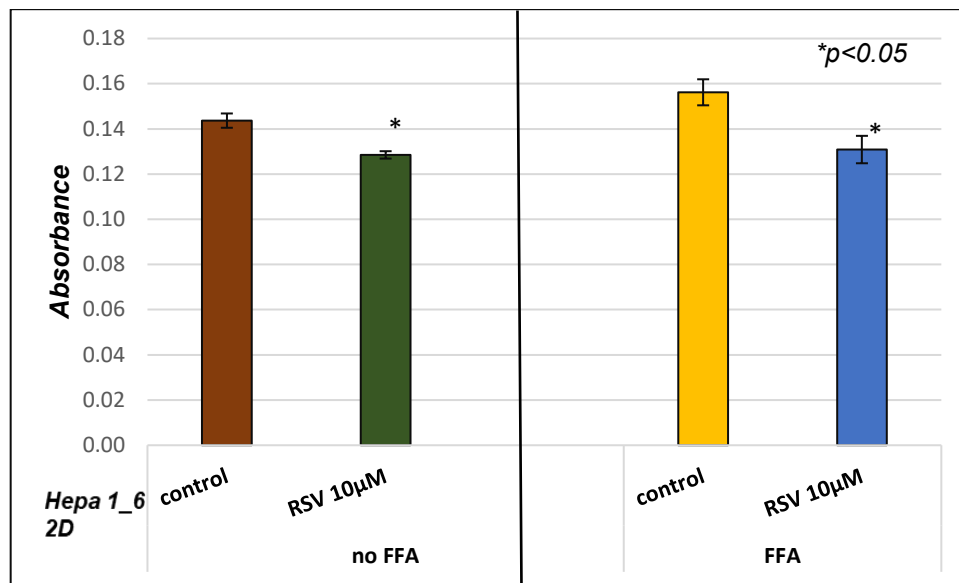
რეზვერატროლის გავლენის შესაფასებლად ანთებით პროცესებზე, განვსაზღვრეთ პრო-ანთებითი ($\text{IL-1}\beta$) და რეგულატორული (IL-10) ციტოკინების დონე როგორც

მაკროფაგების, ისე ჰეპატოციტების ნაღეჭედა სითხეში. ციტოკინების დონის განსაზღვრისთვის გამოვიყენეთ იმუნოფერმენტული ანალიზი (ELISA ტესტი), მიღებული შედეგების აღრიცხვა ხდებოდა სპექტროფოტომეტრის, BiotTek Elx800-ს გამოყენებით. რეზერატროლით მოქმედებისას, როგორც გაცხიმივებულ ისე გაუცხიმივებელ ჰეპატოციტებში, არ გამოვლინდა ცვლილება პრო-ანთებითი ციტოკინის IL-1 β -ს ექსპრესიაზე [სურ.12].



სურ.12. 24 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზერატროლის გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების ნაღეჭედა სითხეში, ციტოკინ IL-1 β -ს დონის ცვლილებაზე

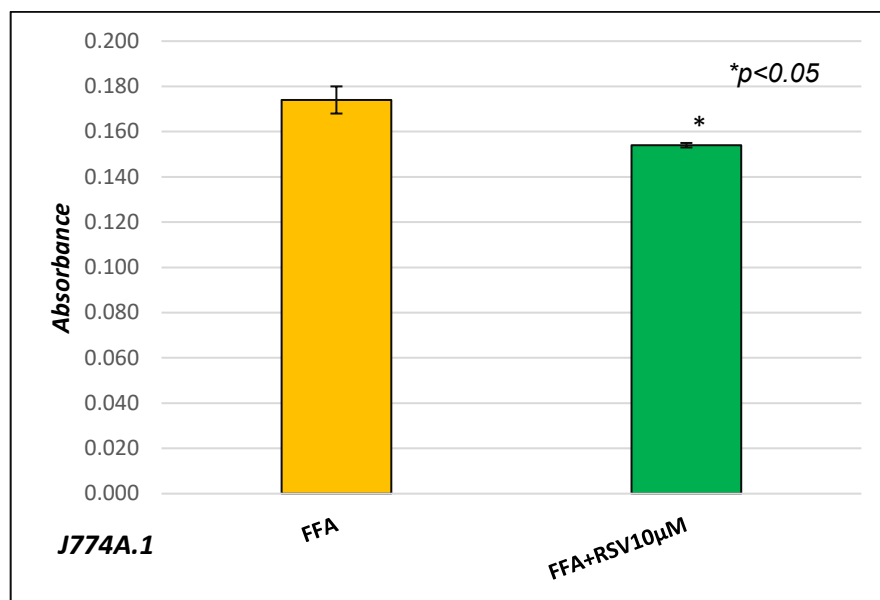
თუმცა პარალელურად რეგულატორული ციტოკინის IL-10-ს დონის შეფასებისას, გამოვლინდა, რომ რეზერატროლის გავლენით ჰეპატოციტებში შემცირდა IL-10-ს ექსპრესია, როგორც გაუცხიმივებელი ისე გაცხიმივებული უჯრედების შემთხვევაში [სურ.13].



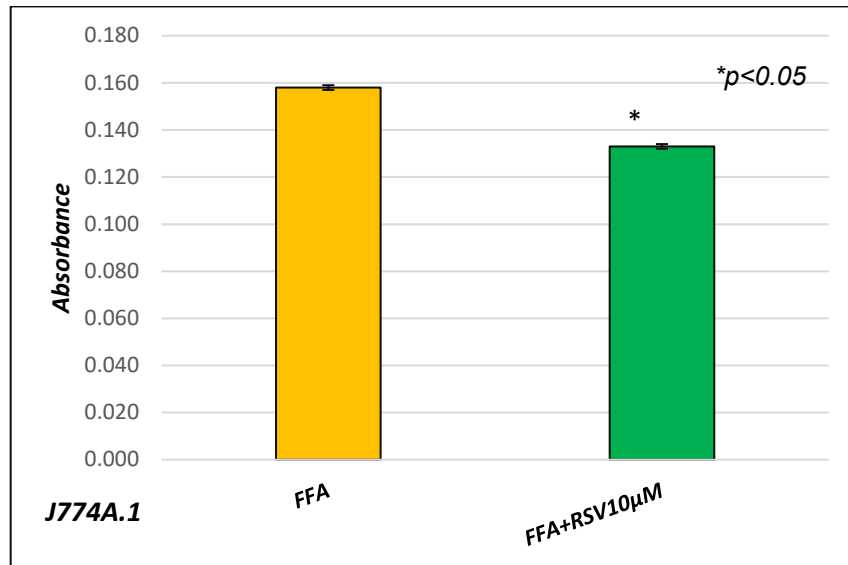
სურ. 13. 24 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ IL-10 -ს დონის ცვლილებაზე

4.2.4 რეზვერატროლთან 24 საათიანი ზემოქმედების შემდეგ ციტოკინების დონის შემოწმება მაკროფაგებში

მაკროფაგების ნალექზედა სითხეში, ჰეპატოციტების მსგავსად ELISA ტესტით გაზომვის შედეგად, გამოვლინდა IL-10-ის დონის შემცირება, გარდა ამისა რეზვერატროლის მოქმედებით აგრეთვე შემცირდა IL-1β -ის დონეც [სურ.14 და სურ.15].



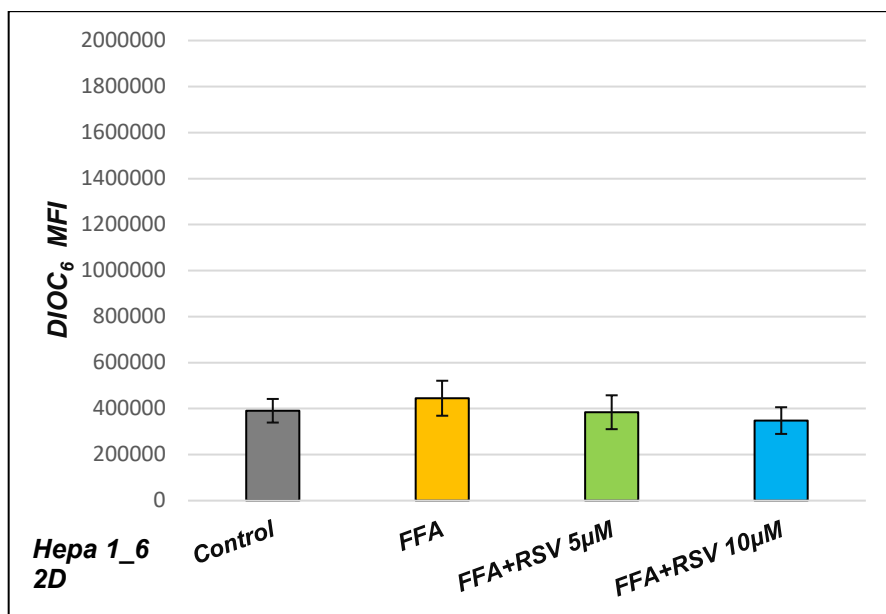
სურ. 14. 24 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის გავლენის შეფასება, მაკროფაგების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ IL-1β -ს დონის ცვლილებაზე



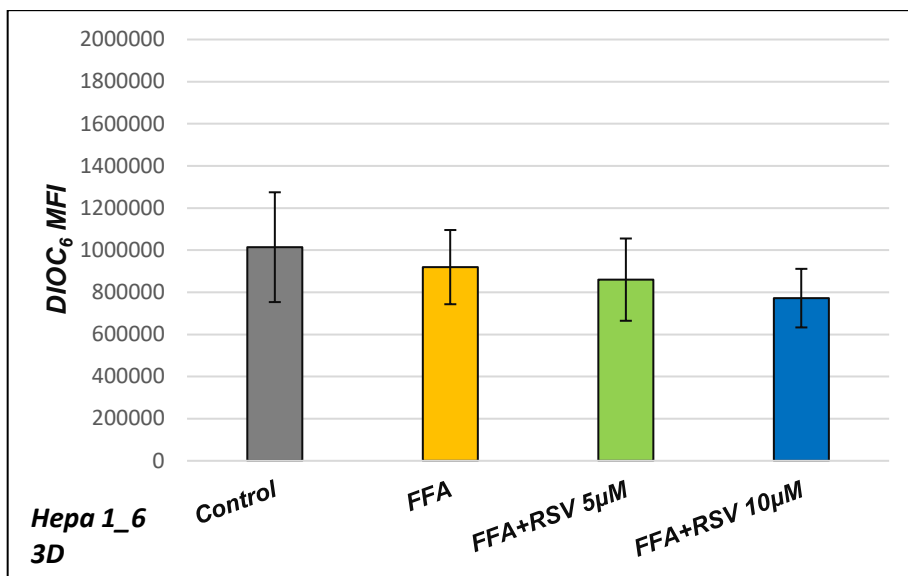
სურ. 15. 24 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის გავლენის შეფასება, მაკროფაგების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ IL-10 -ს დონის ცვლილებაზე

4.3.1 რეზვერატროლთან 3 საათიანი ზემოქმედების შემდეგ მიტოქონდრიული აპოპტოზის დონის შემოწმება

ლიტერატურაში არსებული მონაცემებზე დაყრდნობით, სადაც ნაჩვენებია იყო რეზვერატროლის ეფექტის დაფიქსირება ინკუბაციის მოკლე ვადებზე ხდება (Zhang et al., 2022), გადაწყვეტიტ შემგვემოწმებინა რეზვერატროლის ეფექტი 3 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ 5µM და 10µM კონცენტრაციის გამოყენების შემთხვევაში. უპირველეს ყოვლისა შევაფასეთ ადრეული აპოპტოზის დონე გამდინარე ციტომეტრიის მეთოდით, მიტოქონდრიული პოტენციალის მიმართ მგრძნობიარე ფლუორესცენტული საღებავის - DiOC₆-ის გამოყენებით. როგორც სურათებიდან ჩანს, ჰეპატოციტებში, როგორც მონოშრიან ისე სფეროიდულ კულტურაში, მოქმედების მოკლე ვადაზე რეზვერატროლის არცერთმა კონცენტრაციამ არ გამოავლინა პრო-აპოპტოზური მოქმედება [სურ.16, სურ.17].

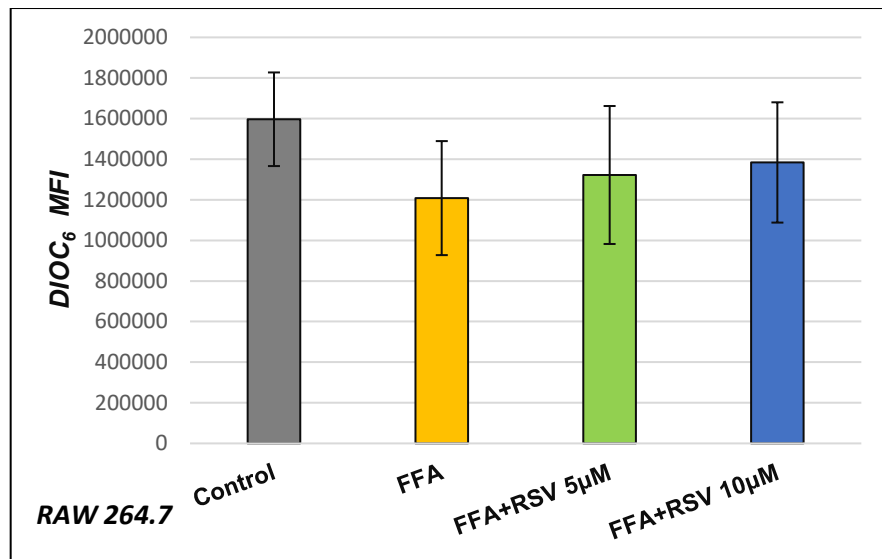


სურ. 16. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების მონოშრიან კულტურაში (Hepa1-6) აპოპტოზური პოპულაციის რაოდენობაზე, მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალის ცვლილების მიმართ მგრძნობიარე 3,3'-დიჰექსილოქსაკარბოციანიდ იოდიდის (DiOC₆) საღებავის გამოყენებით

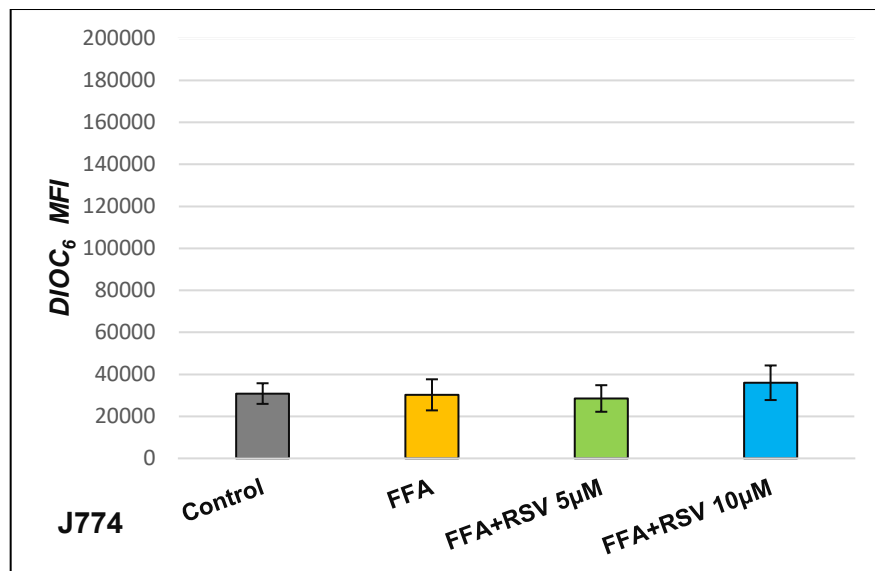


სურ. 17. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების სფეროიდულ კულტურაში (Hepa1-6) აპოპტოზური პოპულაციის რაოდენობაზე, მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალის ცვლილების მიმართ მგრძნობიარე 3,3'-დიჰექსილოქსაკარბოციანიდ იოდიდის (DiOC₆) საღებავის გამოყენებით

მაკროფაგების J774A.1 და RAW264.7 სამოდელო სისტემებში, რეზვერატროლის მოქმედების საპასუხოდ კვლავ განმეორდა მსგავსი ეფექტი და რეზვერატროლმა არ გამოავლინა პრო-აპოპტოზური მოქმედება [სურ. 18, სურ. 19].



სურ. 18. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის გავლენის შეფასება, მაკროფაგების მონოშრიან კულტურაში (RAW264.7) აპოპტოზური პოპულაციის რაოდენობაზე, მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალის ცვლილების მიმართ მგრძნობიარე 3,3'-დიჰექსილოქსაკარბოციანიდ იოდიდის (DiOC₆) საღებავის გამოყენებით

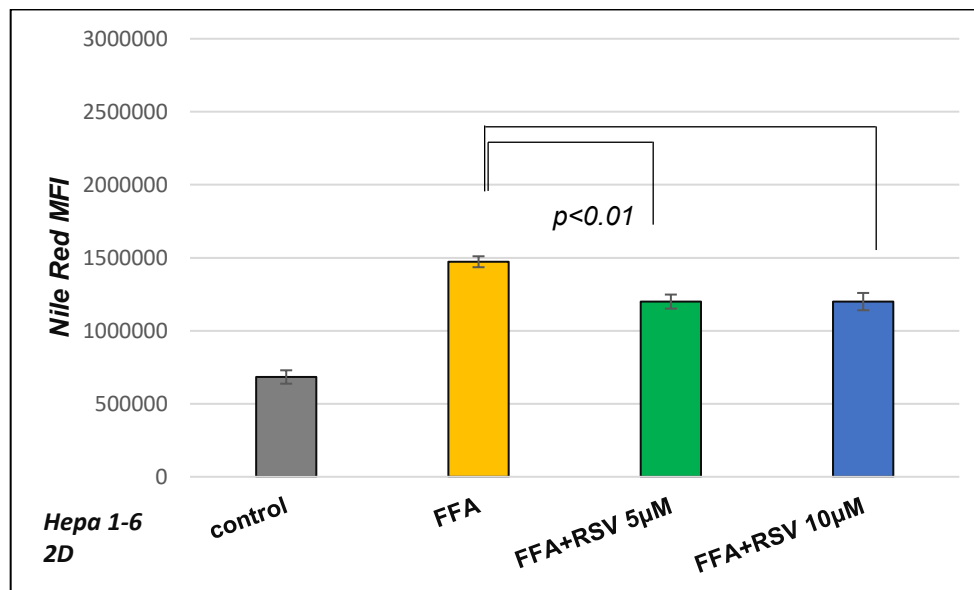


სურ. 19. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის გავლენის შეფასება, მაკროფაგების მონოშრიან კულტურაში (J774A.1) აპოპტოზური პოპულაციის

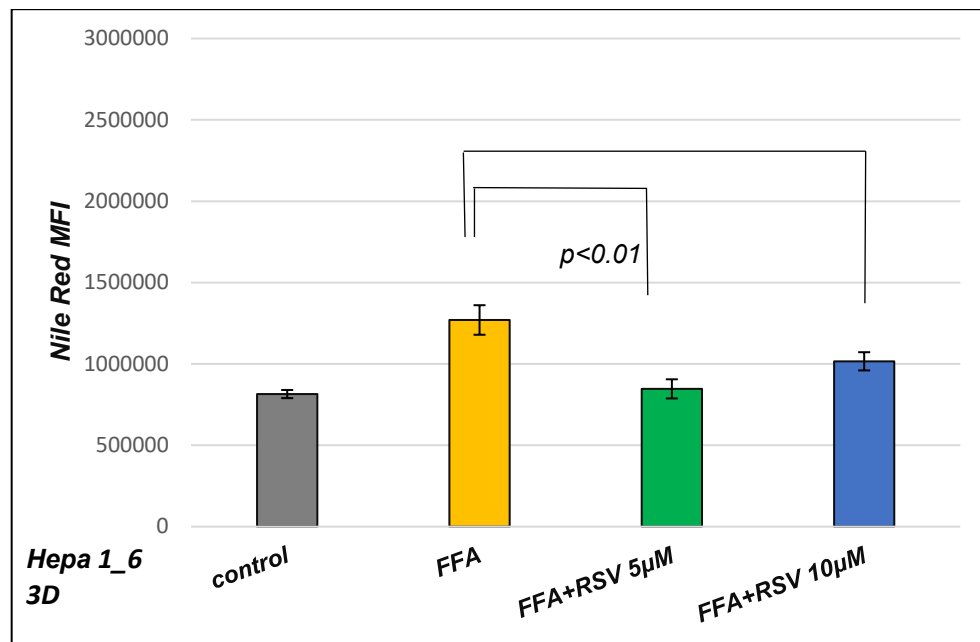
რაოდენობაზე, მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალის ცვლილების მიმართ მგრძნობიარე 3,3'-დიჰექსილოქსაკარბოციანიდ იოდიდის (DiOC₆) საღებავის გამოყენებით

4.3.2 რეზერატროლთან 3 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ცხიმების შემცველობის შეფასება

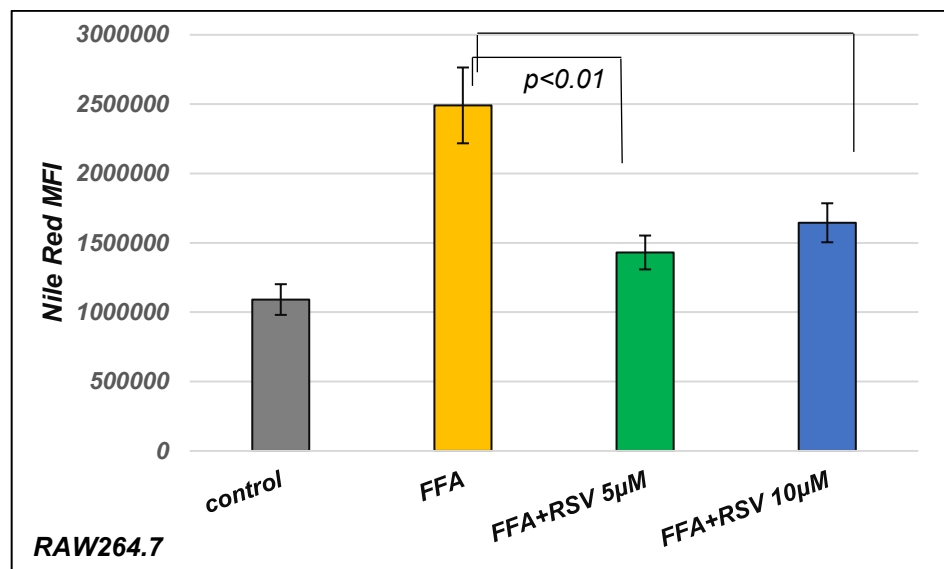
შემდეგ ეტაპზე გადავწყვიტეთ, ნილის წითელით შეღებვის მეთოდით, გამდინარე ციტომეტრიაზე შეგვემოწმებინა რეზერატროლის ეფექტი ცხიმების შემცველობაზე 3 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ. მიღებული შედეგებით გამოვლინდა, რომ უკვე 3 საათში სამივე სამოდელო სისტემაში რეზერატროლის ორივე კონცენტრაციის გავლენით შეიმჩნევა შიდა უჯრედული ლიპიდების კონცენტრაციის დაკლება [სურ.20, სურ. 21, სურ.22].



სურ. 20. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზერატროლის გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 მონოშრიან კულტურაში ლიპიდების შემცველობაზე (გრაფიკზე ნაჩვენებია ნილის წითელის საშუალო ფლუორესცენციის ინტენსივობა)



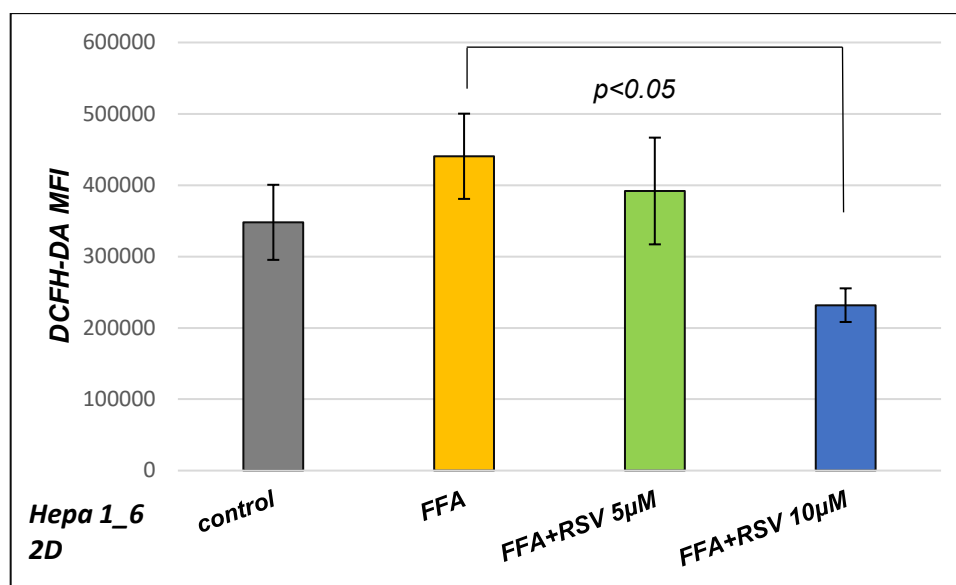
სურ. 21. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 სამგანზომილებიან კულტურაში ლიპიდების შემცველობაზე (გრაფიკზე ნაჩვენებია ნილის წითელის საშუალო ფლუორესცენციის ინტენსივობა)



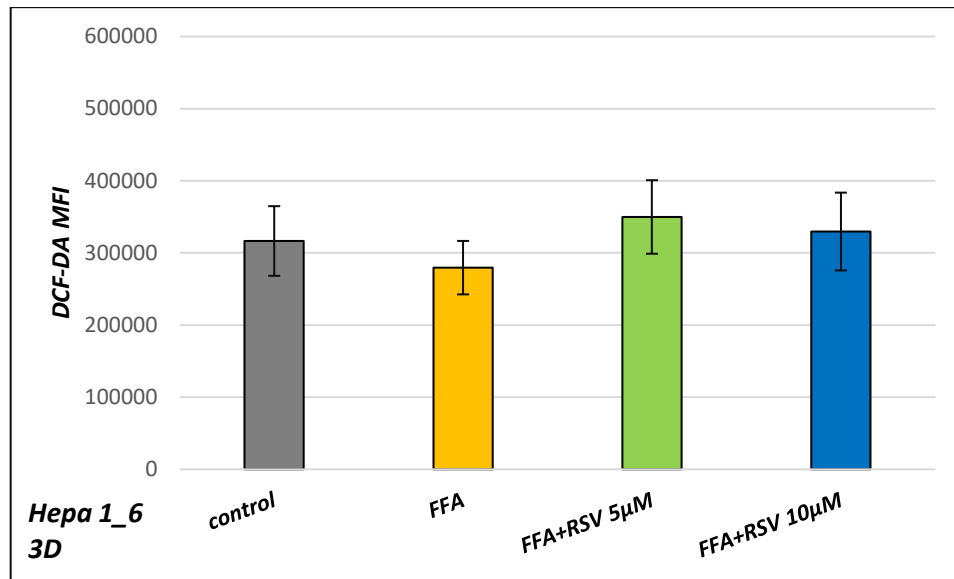
სურ. 22. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის გავლენის შეფასება, მაკროფაგების, RAW264.7 უჯრედულ კულტურაში ლიპიდების შემცველობაზე (გრაფიკზე ნაჩვენებია ნილის წითელის საშუალო ფლუორესცენციის ინტენსივობა)

4.3.3 რეზვერატროლთან 3 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ჟანგბადის აქტიური ფორმების დონის შეფასება

ჟანგბადის აქტიური ფორმების (ჰიდროქსილის, პეროქსილის და სხვ.) ჯამურად განსაზღვრისთვის, გამოვიყენეთ ფლუორესცენტული საღებავი, 2',7'-დიქლოროფლუორესცინ დიაცეტატი (DCFH-DA). რომელიც უჯრედში ჟანგბადის აქტიური ფორმების მიერ იჟანგება და ავლენს მაღალ მწვანე ფლუორესცენციას. შედეგების აღრიცხვა მოხდა გამდინარე ციტომეტრიის საშუალებით. მიღებული შედეგების მიხედვით ჰეპატოციტების მონოშრიან კულტურაზე რეზვერატროლის 10 μ M კონცენტრაციით მოქმედებისას, გამოვლინდა მისი ანტიოქსიდანტური ეფექტი, კერძოდ ჟანგბადის აქტიური ფორმების მკვეთრი შემცირება [სურ. 23]. რაც შეეხება ჰეპატოციტების სფეროიდულ კულტურას, ამ სამოდელო სისტემაში პირიქით მივიღეთ ჟანგბადის აქტიური ფორმების მატების ტენდენცია, ორივე კონცენტრაციაზე, განსაკუთრებით 5 μ M-ს შემთხვევაში [სურ. 24].

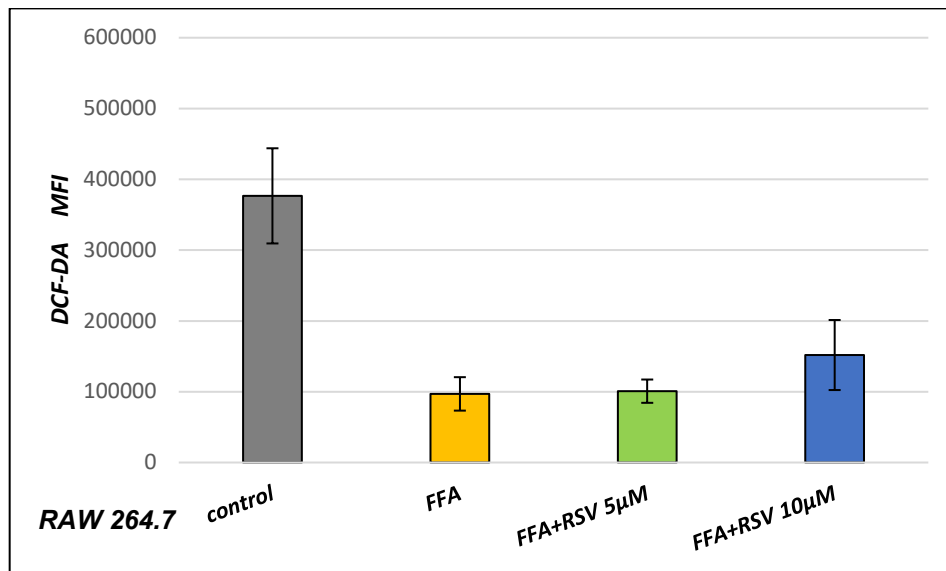


სურ. 23. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 მონოშრიან კულტურაში, ჟანგბადის აქტიური ფორმების კონცენტრაციაზე, ფლუორესცენტული ნაერთის DCFH-DA-ს გამოყენებით, (Y ღერძზე ასახულია ფლუორესცენციის ინტენსივობის საშუალო მაჩვენებელი)



სურ. 24. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 სფეროიდულ კულტურაში, ჟანგბადის აქტიური ფორმების კონცენტრაციაზე, ფლუორესცენტული ნაერთის DCFH-DA-ს გამოყენებით, (Y ღერძზე ასახულია ფლუორესცენციის ინტენსივობის საშუალო მაჩვენებელი)

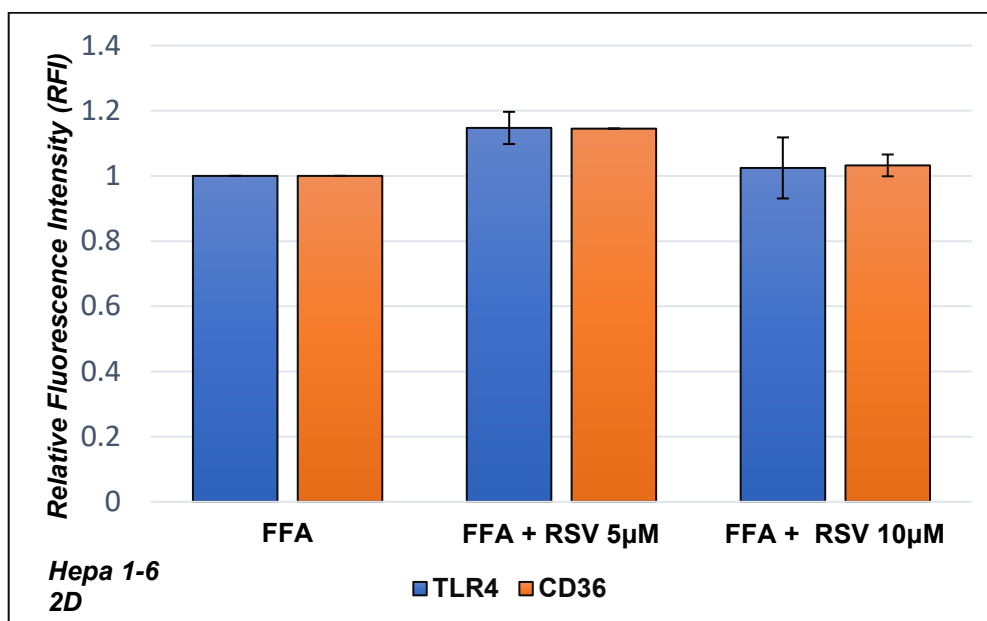
მაკროფაგების, RAW264.7 უჯრედულ ხაზში ჟანგბადის აქტიური ფორმების მატების ტენდენცია გამოვლინდა რეზვერატროლის 10μM კონცენტრაციაზე [სურ. 25].



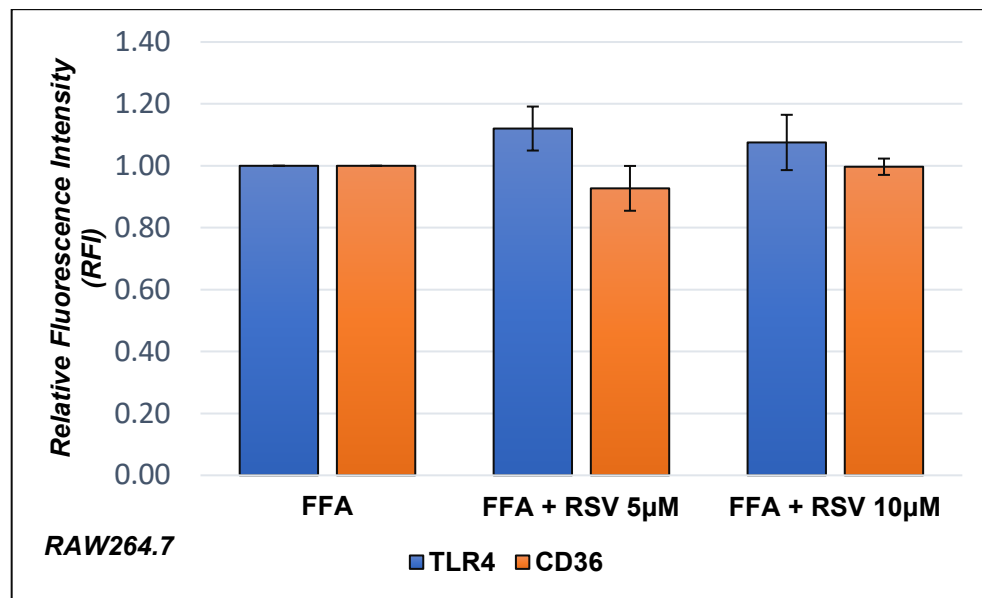
სურ. 25. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის გავლენის შეფასება, მაკროფაგების, RAW264.7 უჯრედულ კულტურაში, ჟანგბადის აქტიური ფორმების კონცენტრაციაზე, ფლუორესცენტული ნაერთის DCFH-DA-ს გამოყენებით, (Y ღერძზე ასახულია ფლუორესცენციის ინტენსივობის საშუალო მაჩვენებელი)

4.3.4 რეზერატროლთან 3 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ TLR4-ის ზედაპირული ექსპრესიის შეფასება

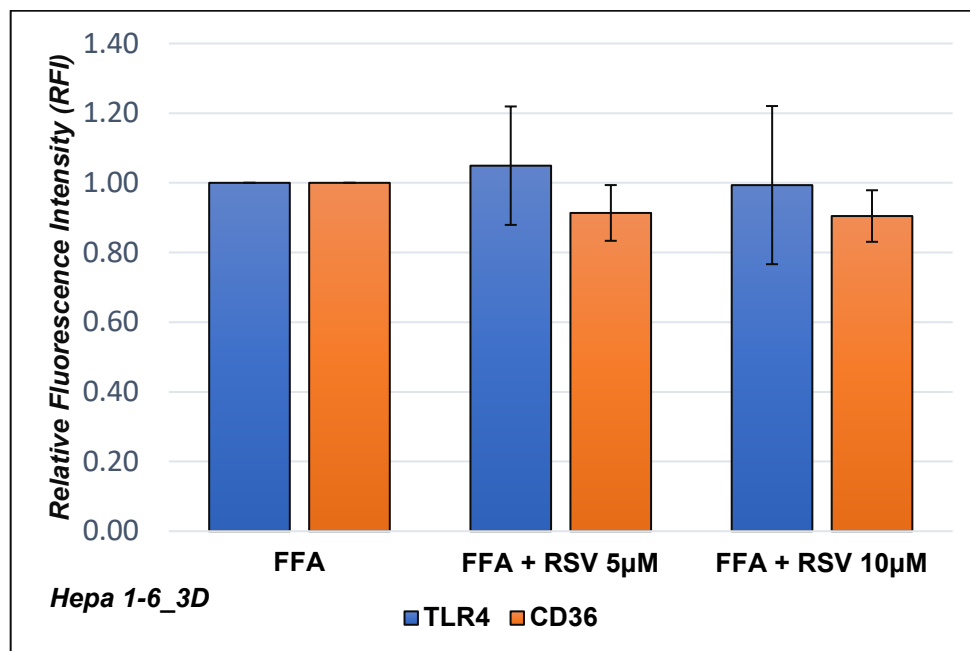
რეზერატროლთან 3 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ, ცხიმების შემცველობის შესწავლის პარალელურად გადაწყვიტეთ შეგვემოწმებინა როგორც TLR4-ის ზედაპირული ექსპრესია (რომლის მოდულაციას რეზერატროლი იწვევდა 24 სთ ინკუბაციის პირობებში), ასევე ლიპიდური ტრანსპორტერის - CD36-ის ზედაპირული ექსპრესია, მითუმეტეს რომ არსებული მონაცემებით მაკროფაგებში ნანახი იყო, რომ TLR4 და CD36 ერთიან კომპლექსს ქმნიან (Stewart et al., 2010). მიღებული შედეგების თანახმად გამოვლინდა, რომ 3 საათიანი ინკუბაციის შედეგად რეზერატროლი არ ახდენს ზედაპირული რეცეპტორების ექსპრესიის მოდულაციას [სურ. 26, სურ.27, სურ.28].



სურ 26. ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 მონოშრიან კულტურაში რეზერატროლის 3 საათიანი მოქმედების შესწავლა TLR4 და CD36 რეცეპტორების ექსპრესიის ინტენსივობაზე



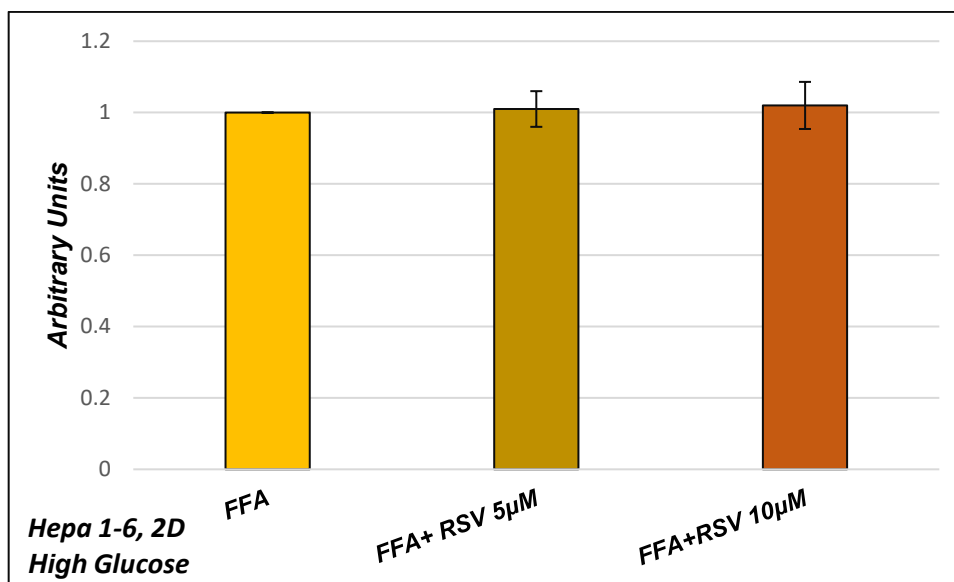
სურ 27. მაკროფაგების, RAW264.7 უჯრედულ კულტურაში, რეზვერატროლის 3 საათიანი მოქმედების TLR4 და CD36 რეცეპტორების ექსპრესიის ინტენსივობაზე



სურ 28. ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 სფეროიდულ კულტურაში რეზვერატროლის 3 საათიანი მოქმედების შესწავლა TLR4 და CD36 რეცეპტორების ექსპრესიის ინტენსივობაზე

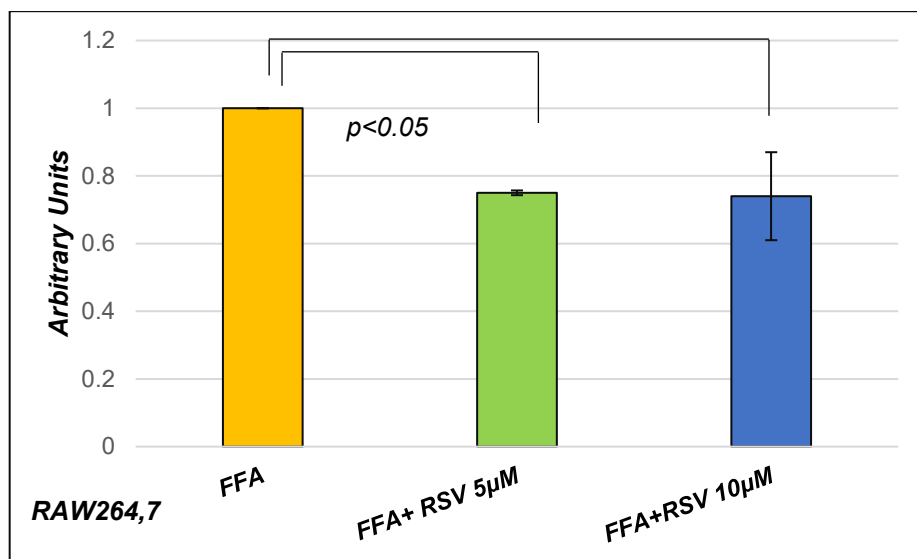
4.4 ცხიმების შემცველობის შეფასება საკვებ არეში გლუკოზის დამატების შემდგომ

სტეატოზის მოდელის გაუმჯობესების მიზნით, გადაწყვიტეთ ცხიმოვანი მჟავების დამატების პარალელურად უჯრედები გაგვეზარდა გლუკოზის მაღალი პროცენტის შემცველობის საკვებ არეზე (5% გლუკოზით 1%-ის მაგივრად). აღსანიშნავია, რომ არეში გლუკოზის შემცველობის გაზრდის შედეგად, მონოშრიანი ჰეპატოციტების უჯრედული კულტურის შემთხვევაში, რეზერატროლით სტიმულაციის საპასუხოდ, ლიპიდების შემცველობის დაწევა აღარ მოხდა [სურ.29].



სურ 29. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზერატროლის გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 მონოშრიან კულტურაში ლიპიდების შემცველობაზე, გლუკოზის მაღალი პროცენტის შემცველობის საკვებ არეზე (5% გლუკოზით) (გრადიკზე ნაჩვენებია ნილის წითელით შეღებვა), Y ღერძი - ლიპიდების დონე გამოსახულია პირობით ერთეულებში კოტროლთან შედარებით (სადაც კონტროლი უდრის 1)

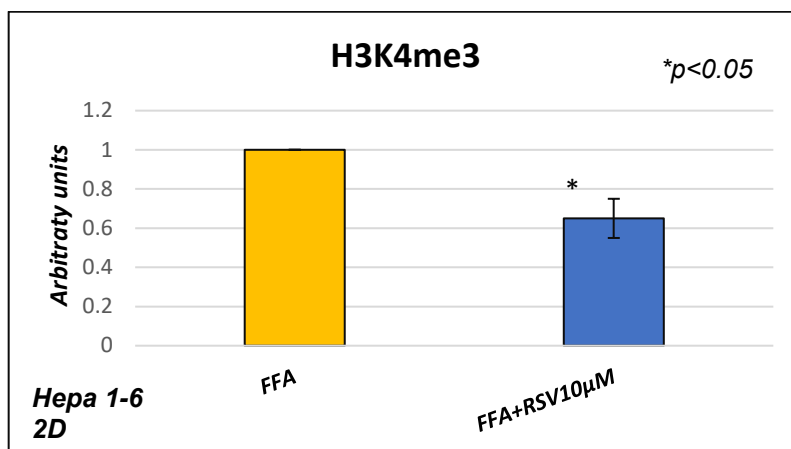
ჰეპატოციტების პარალელურად მაკროფაგების უჯრედული კულტურა ასევე გადავიყვანეთ გლუკოზის მაღალი პროცენტის (5%) შემცველობის საკვებ არეზე. ჰეპატოციტებისგან განსხვავებით, გლუკოზის დამატებამ მაკროფაგების შემთხვევაში რეზერატროლით სტიმულაციის ეფექტის მოდულირება არ მოახდინა და რეზერატროლის ორივე კონცენტრაციის საპასუხოდ მოხდა ლიპიდების დონის დაწევა [სურ. 30].



სურ. 30. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის გავლენის შეფასება, მაკროფაგების, RAW264.7 კულტურაში ლიპიდების შემცველობაზე, გლუკოზის მაღალი პროცენტის შემცველობის საკვებ არეზე (5% გლუკოზით) (გრაფიკზე ნაჩვენებია ნილის წითელით შეღებვა), Y დერძი - ლიპიდების დონე გამოსახულია პირობით ერთეულებში კონტროლთან შედარებით (სადაც კონტროლი უდრის 1)

4.5 ჰისტონ 3-ის, მეოთხე ლიზინის (H3K4) ტრიმეთილირების ზოგადი დონის შეფასება ჰეპატოციტებში

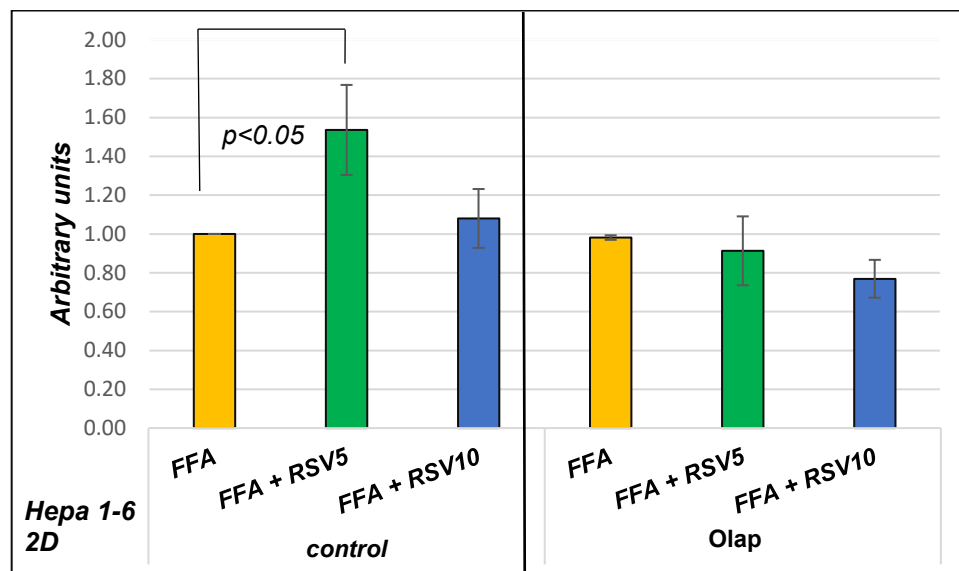
კვლევის შემდეგ ეტაპზე ჰეპატოციტების მონოშრიან კულტურაში შევამოწმეთ რეზვერატროლის 10µM გავლენა ჰისტონ 3-ის, მეოთხე ლიზინის (H3K4) ტრიმეთილირების (H3k4me3) ზოგად დონეზე. რეზვერატროლის მოქმედებით გამოვლინდა ტრიმეთილირების დონის კლება, საკონტროლო გაცხიმოვნებულ ნიმუშთან შედარებით [სურ. 31].



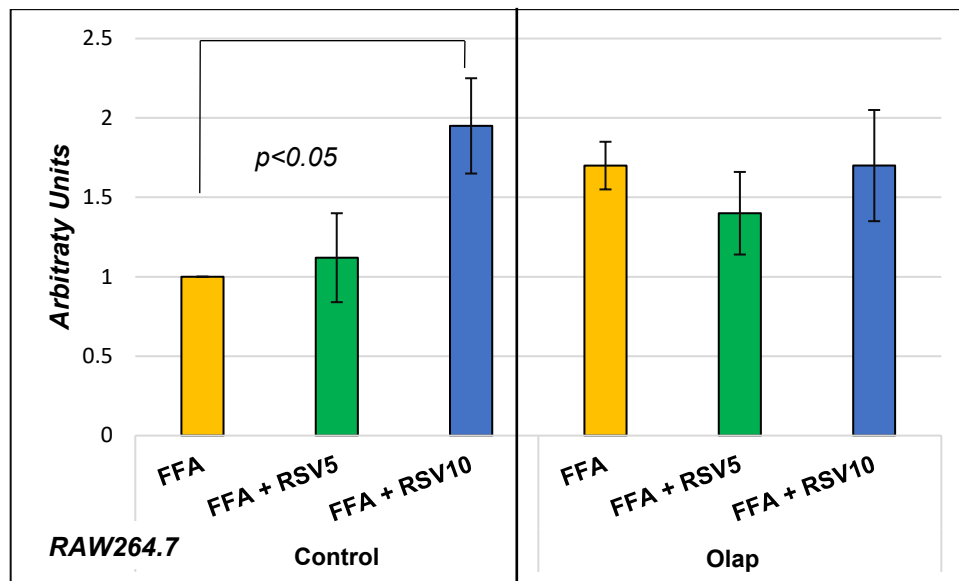
სურ. 31 გაცხიმივებული ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 მონოშრიან კულტურაში რეზვერატოლის (10 μ M) 3 საათიანი მოქმედების შეფასება H3k4me3-ის დონეზე, Y ღერძი - H3k4me3-ის დონე გამოსახულია პირობით ერთეულში კოტროლთან შედარებით (სადაც კონტროლი უდრის 1)

4.6.1 PPAR- γ -ს ექსპრესიის დონის შესწავლა

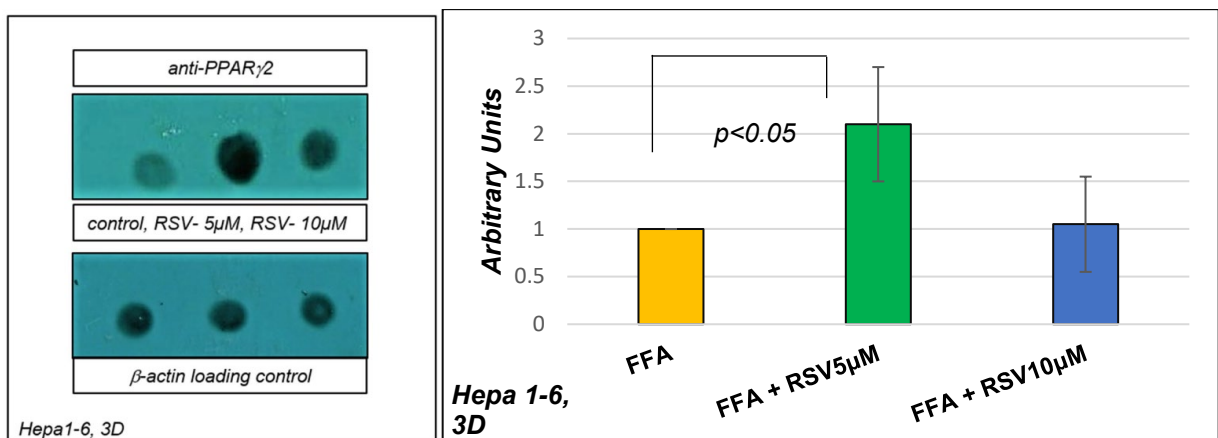
რეზვერატოლის სასიგნალო გზაში ერთ-ერთი სავარაუდო მონაწილე ტრანსკრიპციული ფაქტორის - PPAR- γ ექსპრესიის დონე შევამოწმეთ წერტილოვანი ბლოტინგის მეთოდით. მიღებული შედეგებიდან გამოჩნდა, რომ რეზვერატოლის დაბალი კონცენტრაციით - 5 μ M მოქმედების საპასუხოდ, ჰეპატოციტების ორივე სამოდულო სისტემის შემთხვევაში, ერთმანეთის მსგავსად ხდება PPAR- γ -ს დონის აწევა [სურ. 32 სურ. 34]. გარდა ამისა გამოვლინდა რომ ეს პროცესი დამოკიდებულია ფერმენტ PARP1-ზე, რადგანაც PARP1-ის ინჰიბიტორმა - ოლაპარიბმა გამოიწვია PPAR- γ -ს დონის აწევის ბლოკირება. მაკროფაგების უჯრედული ხაზის შემთხვევაში კი რეზვერატოლის 10 μ M კონცენტრაცია აღმოჩნდა ეფექტური PPAR- γ -ს დონის მომატებისთვის [სურ. 33].



სურ. 32. გაცხიმივებული ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 მონოშრიან კულტურაში PPAR- γ -ს ექსპრესიის დონე რეზვერატოლთან 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ და poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP)-ის ინჰიბიტორის ოლაპარიბის (Olap) თანაობისას, Y ღერძი - PPAR- γ -ს ექსპრესიის დონე გამოსახულია პირობით ერთეულებში კოტროლთან შედარებით (სადაც კონტროლი უდრის 1)



სურ. 33. გაცხიმოვნებული RAW264.7 მონოშრიან კულტურაში PPAR- γ -ს ექსპრესიის დონე რეზერატროლთან 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ და poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP)-ის ინჰიბიტორის ოლაპარიბის (Olap) თანაობისას, Y ღერძი - PPAR- γ -ს ექსპრესიის დონე გამოსახულია პირობით ერთეულებში კონტროლთან შედარებით (სადაც კონტროლი უდრის 1)

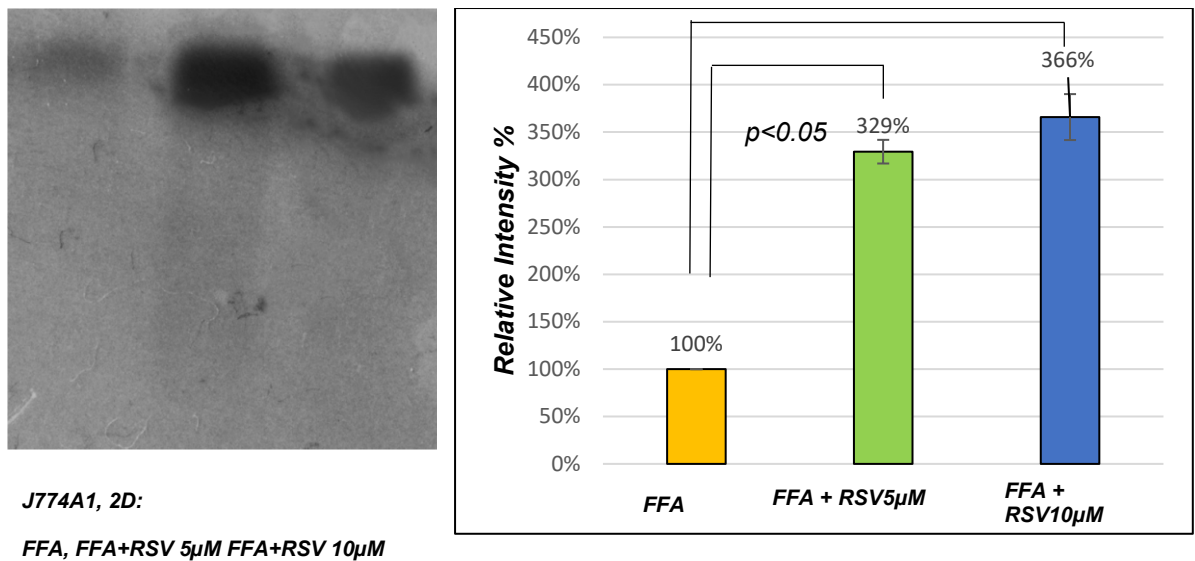


სურ. 34. გაცხიმოვნებული ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 სფეროიდულ კულტურაში PPAR- γ -ს ექსპრესიის დონე რეზერატროლთან 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ

4.6.2 რეზერატროლის ზეგავლენა პოლი-ადპ-რიბოზილირებაზე ვესტერნ-ბლოტინგის მეთოდით

რეზერატროლის გავლენის შესასწავლად PARP-ის აქტივაციაზე, დავაკვირდით არა უშუალოდ გააქტივირებული PARP-ის კონცენტრაციას, არამედ მის მიერ გამოწვეულ PAR-ლაციას. მაკროფაგების ორგანოზომილებიან კულტურაში საერთო პოლი-ადპ-

რიბოზილირების დონე განვსაზღვრეთ ვესტერნ-ბლოტის მეთოდით. მიღებული შედეგებიდან გამოვლინდა, რომ რეზვერატროლის ორივე კონცენტრაციით ზემოქმედებისას (24 სთ-ით) ადგილი აქვს PAR-ლაციის გაძლიერებას [სურ. 35].

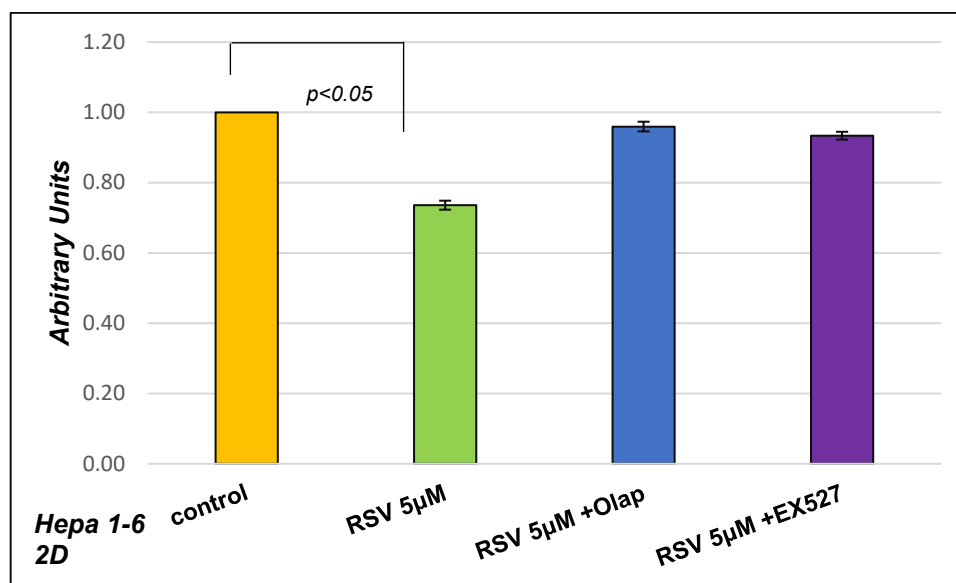


სურ 35. გაცხიმოვნებულ მაკროფაგებში რეზვერატროლის გავლენის შეფასება პოლი-ადპ-რიბოზილირებაზე (ვესტერნ ბლოტინგის მეთოდით)

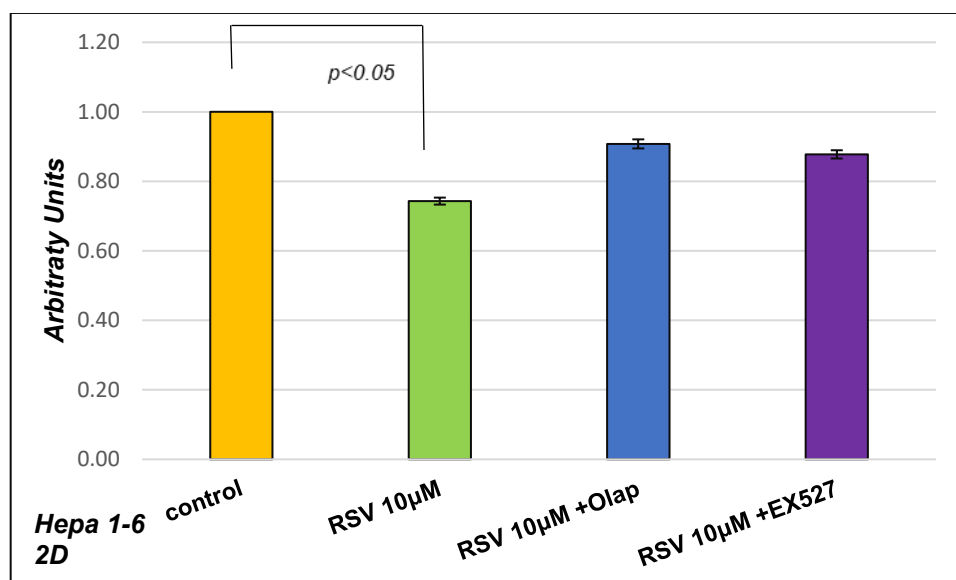
4.6.3 ჰეპატოციტებში რეზვერატროლის ეფექტის შეფასება ლიპიდურ ბალანსზე, Sirt1-ს და PARP1-ს დათრგუნვისას

შემდეგ ეტაპზე გადავწყვიტეთ ჰეპატოციტების მონოშრეში შეგვემოწმებინა ექნებოდა თუ არა გავლენა რეზვერატროლის სამიზნე მოლეკულების Sirt1 და PARP1-ს დათრგუნვას რეზვერატროლით გამოწვეულ ცხიმების დეპონირების შემცირებაზე. ამისათვის, გაცხიმოვნებულ ჰეპატოციტებზე რეზვერატროლით მოქმედებამდე გამოვიყენეთ Sirt1-ის და PARP1-ის ინჰიბიტორები - EX527 და ოლაპარიბი, რათა შეგვედარებინა რა ცვლილებას დავინახავდით მხოლოდ რეზვერატროლთან მოქმედებასთან შედარებით. როგორც 5µM, ისე 10µM რეზვერატროლით მოქმედებისას კვლავ მივიღეთ კონტროლთან შედარებით ლიპიდების დეპონირების შემცირება, თუმცა როგორც EX527-ის(Sirt1-ს ინჰიბიტორი), ისე ოლაპარიბის (PARP1-ს ინჰიბიტორი)

დამატებისას რეზერატროლის ეფექტი აღარ შენარჩუნდა, რაც გვაფიქრებინებს, რომ ორივე მოლეკულა ჩართულია რეზერატროლის სასიგნალო გზაში [სურ. 36, 37].



სურ. 36. გაცხიმოვნებული ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 უჯრედულ კულტურაში რეზერატროლის (5µM) 3 საათიანი მოქმედების ლიპიდების შემცველობაზე, ინჰიბიტორების გამოყენებისას (გრაფიკზე ნაჩვენებია Oil Red O-ს შეღებვის სურათი), Y ღერძი - ლიპიდების დონე გამოსახულია პირობით ერთეულებში კონტროლთან შედარებით (სადაც კონტროლი უდრის 1)

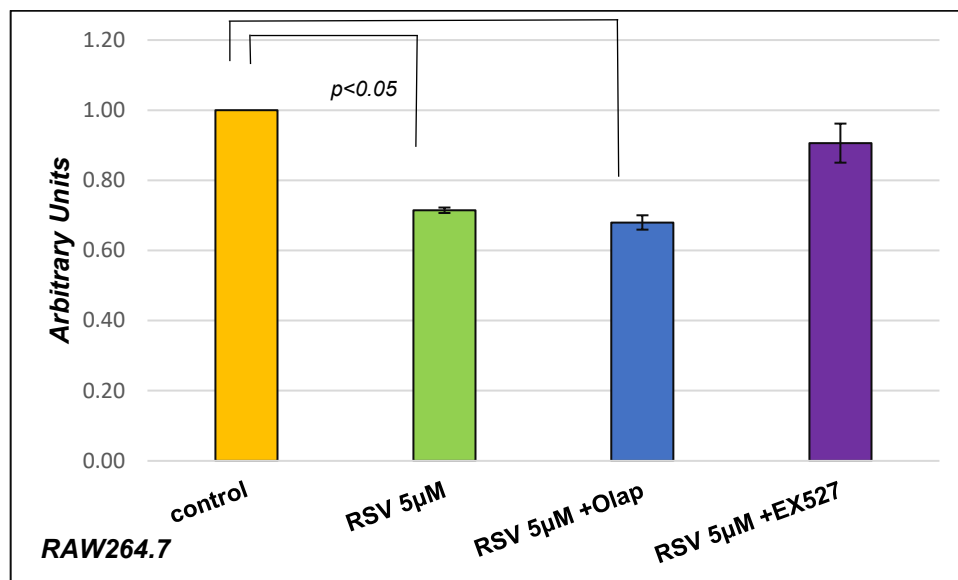


სურ. 37. გაცხიმოვნებული ჰეპატოციტების, Hepa 1-6 უჯრედულ კულტურაში რეზერატროლის (10µM) 3 საათიანი მოქმედების შეფასება ლიპიდების შემცველობაზე,

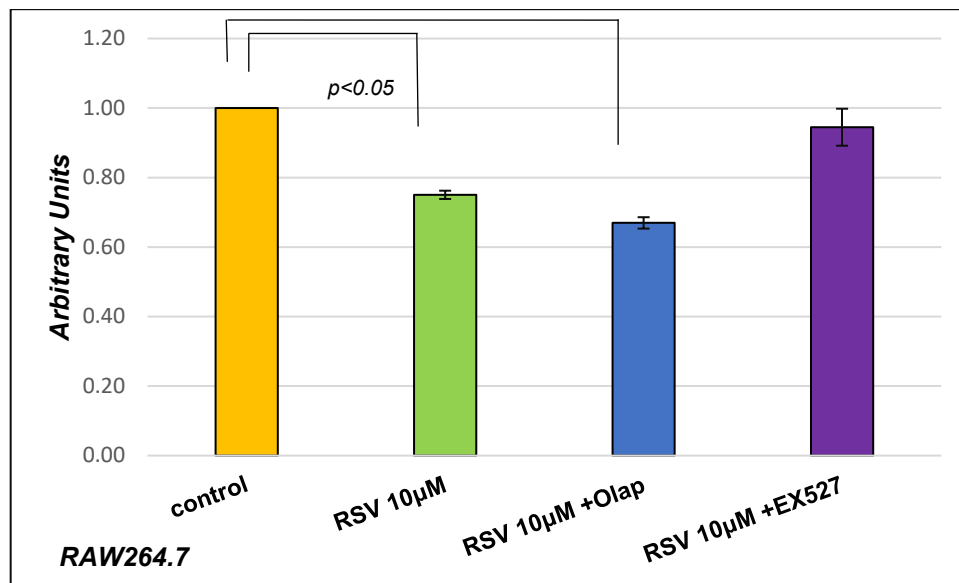
ინჰიბიტორების გამოყენებისას (გრაფიკზე ნაჩვენებია Oil Red O-ს შეღებვის სურათი), Y ღერძი - ლიპიდების დონე გამოსახულია პირობით ერთეულებში კონტროლთან შედარებით (სადაც კონტროლი უდრის 1)

4.6.4 მაკროფაგებში რეზერატროლის ეფექტის შეფასება ლიპიდურ ბალანსზე, Sirt1-ს და PARP1-ს დათრგუნვის პირობებში

ჰეპატოციტების მსგავსად, მაკროფაგების სამოდულო სისტემაშიც გამოვიყენეთ ინჰიბიტორები და რეზერატროლის ორივე კონცენტრაციაზე მივიღეთ კვლავ ცხიმების დეპონირების შემცირება, თუმცა ინჰიბიტორების დამატების შემდგომ რეზერატროლის ეფექტი კიდევ უფრო გაძლიერდა ოლაპარიბის შემთხვევაში, ხოლო EX-527-მ, იმის მსგავსად, როგორც ეს ნანახი იყო ჰეპატოციტებისთვის - რეზერატროლის ეფექტი დათრგუნა [სურ 38, 39].



სურ. 38 მაკროფაგების, RAW264.7 უჯრედულ კულტურაში რეზერატროლის (5µM) 3 საათიანი მოქმედების ლიპიდების შემცველობაზე, ოლაპარიბის და EX-527-ის გამოყენებისას (გრაფიკზე ნაჩვენებია Oil Red O-ს შეღებვის სურათი), Y ღერძი - ლიპიდების დონე გამოსახულია პირობით ერთეულებში კონტროლთან შედარებით (სადაც კონტროლი უდრის 1)

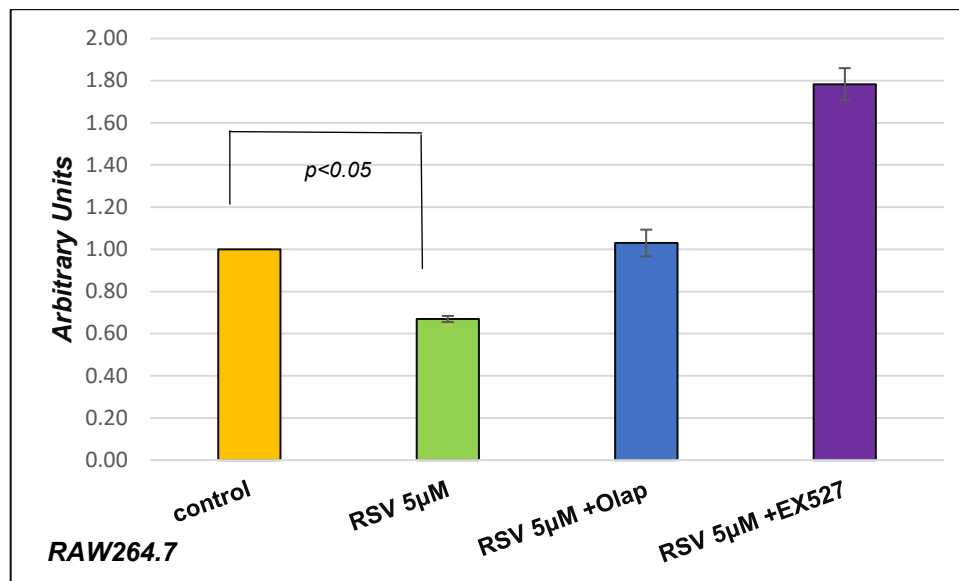


სურ. 39 მაკროფაგების, RAW264.7 უჯრედულ კულტურაში რეზვერატროლის (10µM) 3 საათიანი მოქმედების ლიპიდების შემცველობაზე, ოლაპარიბის და EX-527-ის გამოყენებისას (გრაფიკზე ნაჩვენებია Oil Red O-ს შეღებვის სურათი), Y ღერძი - ლიპიდების დონე გამოსახულია პირობით ერთეულებში კონტროლთან შედარებით (სადაც კონტროლი უდრის 1)

4.6.5 მაკროფაგებში რეზვერატროლის გავლენა ციტოკინების ექსპრესიაზე

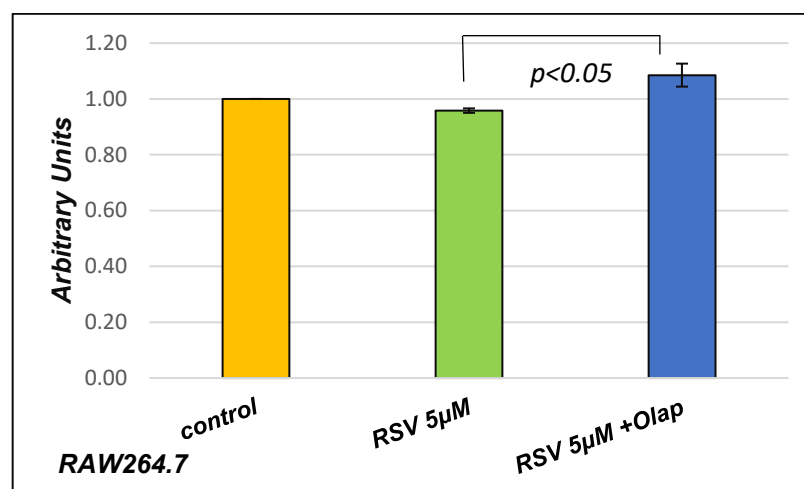
რეზვერატროლის მოკლე დროით (3სთ) მოქმედების შესასწავლად ანთებით პროცესებზე, განვსაზღვრეთ პრო-ანთებითი (TNF-α, IL-6) და რეგულატორული (IL-10) ციტოკინების დონე როგორც მაკროფაგების, ისე ჰეპატოციტების სამოდულო სისტემაში. პარალელურად დავაკვირდით PARP-1-ს და Sirt-1-ს დათრგუნვის გავლენას ამ პროცესზე, რისთვისაც ისევ გამოვიყენეთ შესაბამისი ინჰიბიტორები, ოლაპარიბი და EX527.

მაკროფაგებში რეზვერატროლის 5µM კონცენტრაციაზე მივიღეთ პრო-ანთებითი ციტოკინის TNF-α-ს დონის დაკლება ($p \text{ value} < 0.05$). აღნიშნული ეფექტი არ შეინიშნებოდა ორივე ინჰიბიტორის გამოყენების შემთხვევაში, პირიქით დაფიქსირდა ამ ციტოკინის დონის მატება ინჰიბიტორების მოქმედების ფონზე [სურ.40].



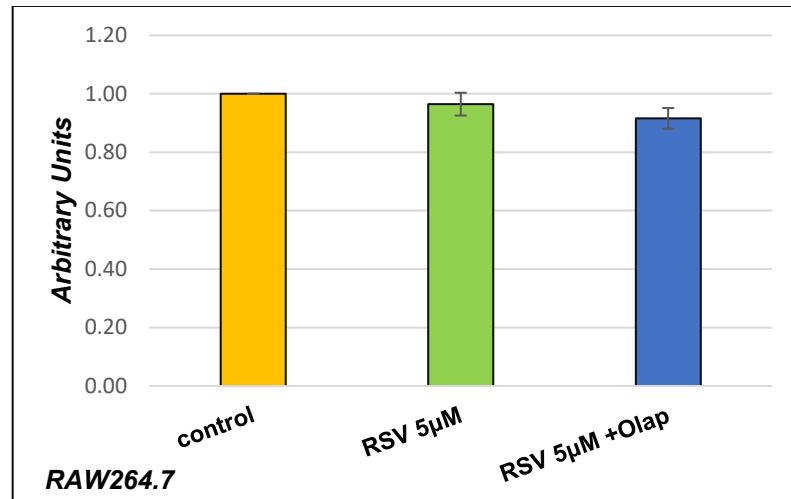
სურ.40. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის (5μM) გავლენის შეფასება, მაკროფაგების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ TNFα -ს დონის ცვლილებაზე, ოლაპარიბის და EX-527-ის გამოყენებისას Y ღერძი - TNFα -ს დონე გამოსახულია პირობით ერთეულებში კოტროლთან შედარებით (სადაც კონტროლი უდრის 1)

ხოლო რაც შეეხება IL-6-ს დონეს, რეზვერატროლის 5μM კონცენტრაციაზე მნიშვნელოვანი ცვლილება არ გამოჩნდა, თუმცა ოლაპარიბის დამატების ფონზე მივიღეთ სარწმუნო მატება მარტო რეზვერატროლ-დამატებულ ნიმუშთან შედარებით [სურ. 41].



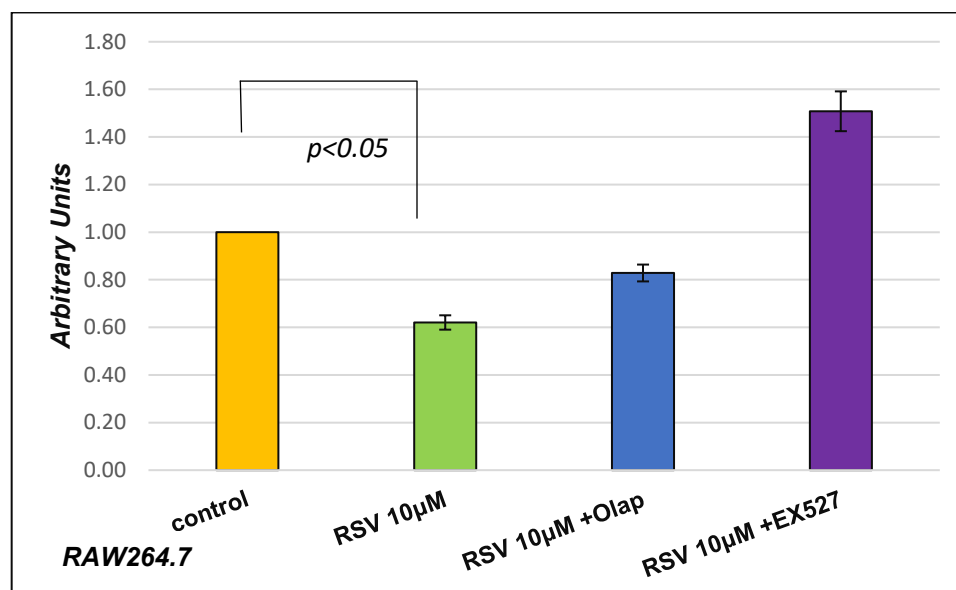
სურ. 41. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის (5μM) გავლენის შეფასება, მაკროფაგების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ IL-6-ს დონის ცვლილებაზე, ოლაპარიბის გამოყენებისას, Y ღერძი - IL-6-ს დონე გამოსახულია პირობით ერთეულებში კოტროლთან შედარებით (სადაც კონტროლი უდრის 1)

რეზერატროლმა ($5\mu\text{M}$) მაკროფაგებში ეფექტი არ გამოავლინა რეგულატორული ციტოკინის IL-10-ს დონეზე, ასევე ოლაპარიბის დამატებას არ ქონია გავლენა ამ კონკრეტულ შემთხვევაში [სურ. 42].



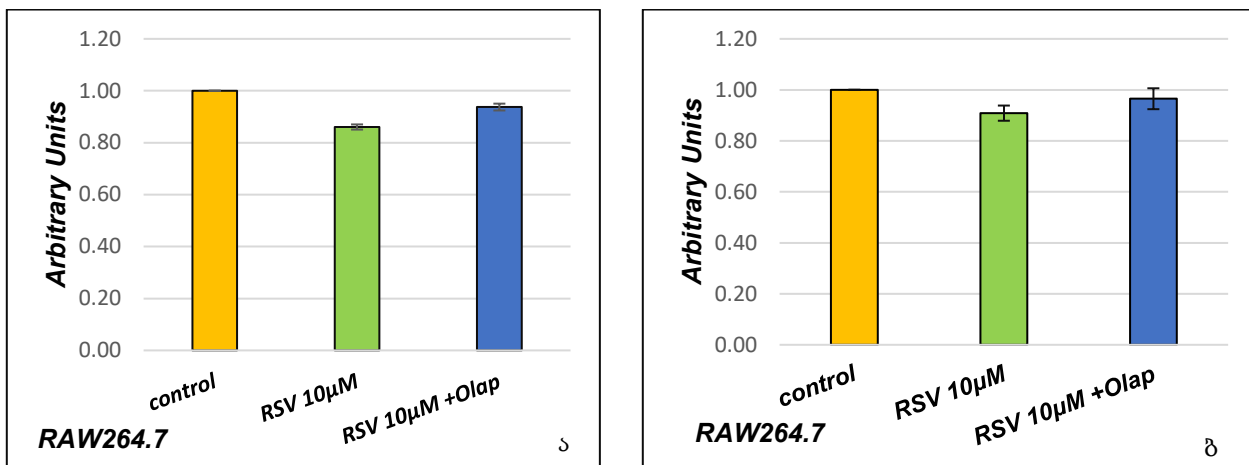
სურ. 42. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზერატროლის ($5\mu\text{M}$) გავლენის შეფასება, მაკროფაგების ნაღეჭზედა სითხეში, ციტოკინ IL-10-ს დონის ცვლილებაზე ოლაპარიბის გამოყენებისას, Y ღერძი - IL-10 -ს დონე გამოსახულია პირობით ერთეულებში კოტროლთან შედარებით (სადაც კონტროლი უდრის 1)

მაკროფაგებზე რეზერატროლის $10\mu\text{M}$ კონცენტრაციით მოქმედებისას, მსგავსად $5\mu\text{M}$ -იანი კონცენტრაციისა $\text{TNF}\alpha$ -ს დონის კლება შენარჩუნდა, რაც აღარ განმეორდა ინჰიბიტორების გამოყენებისას [სურ. 43].



სურ.43. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის (10 μ M) გავლენის შეფასება, მაკროფაგების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ TNF α -ს დონის ცვლილებაზე, ოლაპარიბის და EX-527-ის გამოყენებისას, Y ღერძი - TNF α -ს დონე გამოსახულია პირობით ერთეულებში კოტროლთან შედარებით (სადაც კონტროლი უდრის 1)

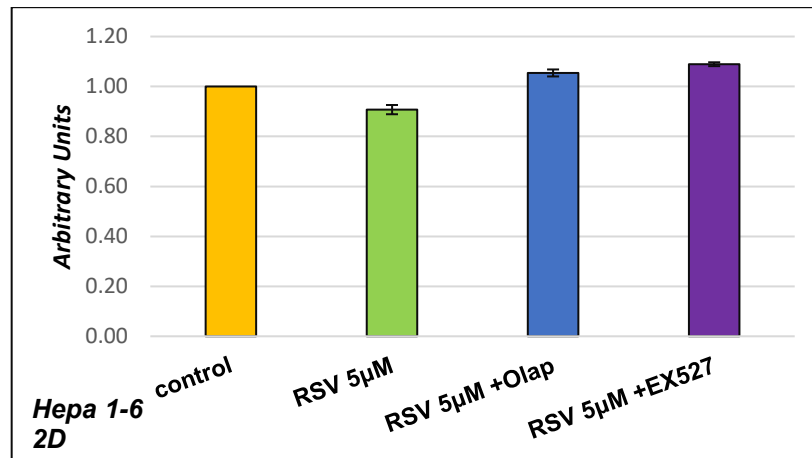
მაკროფაგებში IL-6-ს და IL-10-ს -ს ექსპრესიის შეფასებისას მკვეთრი ცვლილებები არ გამოჩნდა [სურ. 44 ა, ბ]. უფრო გამოიხატა რეზვერატროლის (10 μ M) საპასუხოდ ორივე ციტოკინის კლების ტენდენცია.



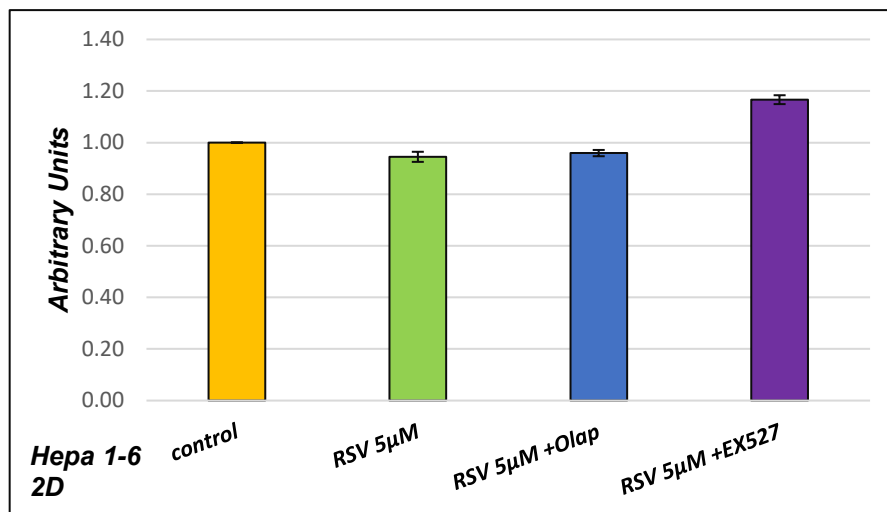
სურ.44. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის (10 μ M) გავლენის შეფასება, მაკროფაგების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ IL-6-ს (ა) და IL-10-ს (ბ) -ს დონის ცვლილებაზე, ოლაპარიბის გამოყენებისას, Y ღერძი - IL-6-ს (ა) და IL-10-ს (ბ) -ს დონე გამოსახულია პირობით ერთეულებში კოტროლთან შედარებით (სადაც კონტროლი უდრის 1)

4.6.6 ჰეპატოციტების მონოშრიან კულტურაში რეზვერატროლის გავლენა ციტოკინების ექსპრესიაზე

მაკროფაგების მსგავსად ჰეპატოციტების მონოშრიან კულტურაშიც განვსაზღვრეთ სამივე ციტოკინის დონე უჯრედების ნალექზედა სითხეში, რეზვერატროლის დაბალი კონცენტრაციებით მოქმედებისას მოკლე დროის წერტილზე. რეზვერატროლის, 5 μ M კონცენტრაციის ეფექტი TNF- α -ს და IL-6-ს ციტოკინებზე კონტროლთან შედარებით არ გამოჩნდა, თუმცა EX527-ს გამოყენებისას თითოეულ ციტოკინთან უფრო მატების ტენდენცია გამოიქვეყნა [სურ. 45, სურ. 46].

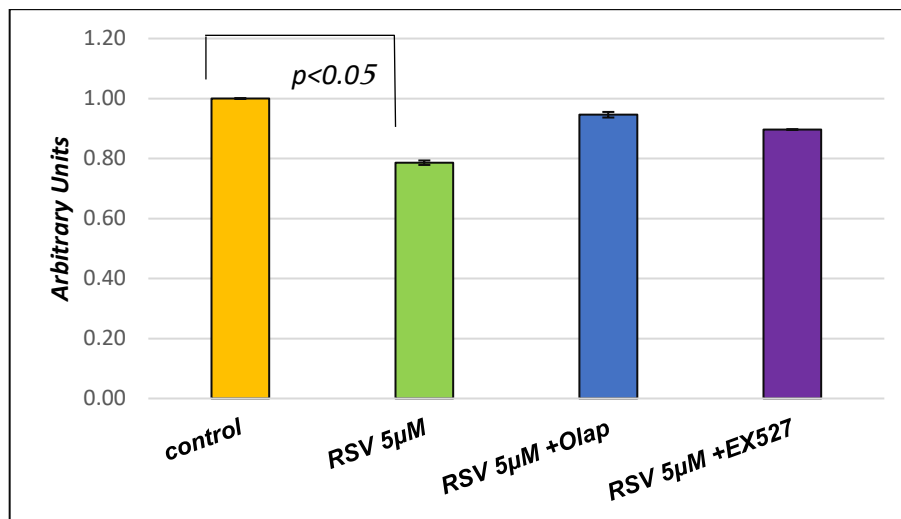


სურ. 45. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის (5μM) გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ TNFα -ს დონის ცვლილებაზე, ოლაპარიბის და EX-527-ის გამოყენებისას, Y ღერძი - TNFα -ს დონე გამოსახულია პირობით ერთეულებში კოტროლთან შედარებით (სადაც კონტროლი უდრის 1)



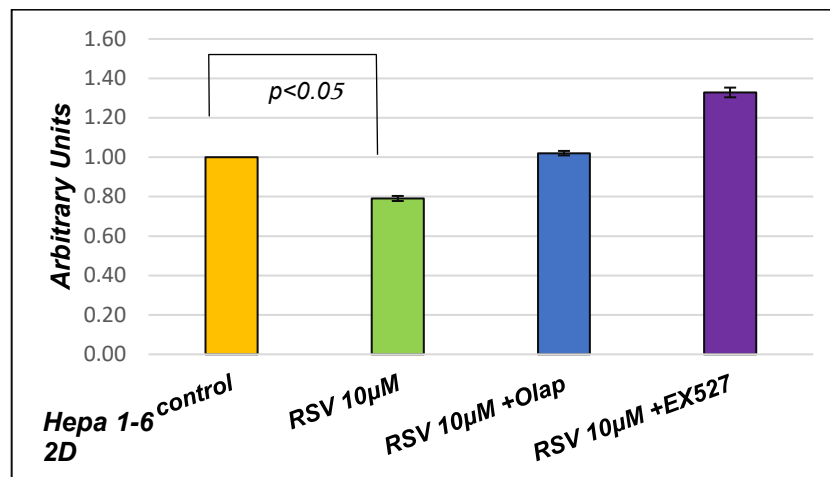
სურ. 46. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის (5μM) გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ IL-6-ს დონის ცვლილებაზე ოლაპარიბის გამოყენებისას, Y ღერძი - IL-6-ს დონე გამოსახულია პირობით ერთეულებში კოტროლთან შედარებით (სადაც კონტროლი უდრის 1)

რეზვერატროლმა (5μM) განსხვავებით TNFα -ისა და IL-6-სგან, მნიშვნელოვნად შეამცირა IL-10-ს ექსპრესია ($p < 0.05$) საკონტროლო ნიმუშთან შედარებით [სურ. 47].



სურ. 47. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის (5µM) გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინი IL-10-ს დონის ცვლილებაზე ოლაპარიბის გამოყენებისას, ოლაპარიბი - IL-10-ს დონე გამოსახულია პირობით ერთეულებში კოტროლთან შედარებით (სადაც კონტროლი უდრის 1)

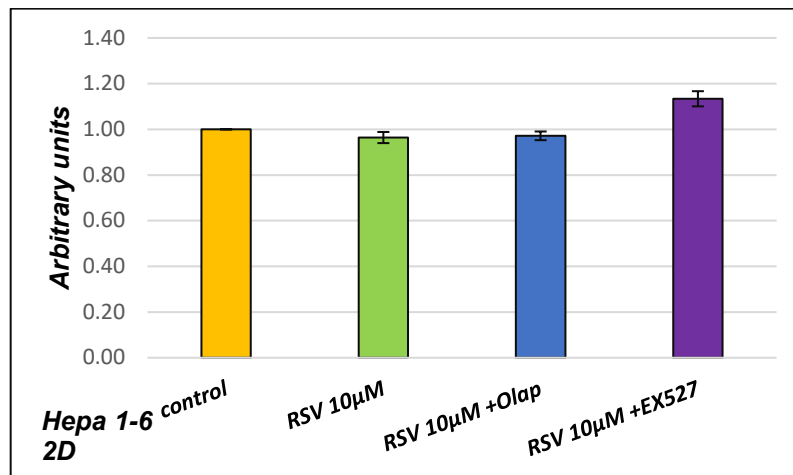
რაც შეეხება ჰეპატოციტებში რეზვერატროლის 10µM კონცენტრაციის მოქმედების შეფასებას, პრო-ანთებით ციტოკინი TNF-α-ს შემთხვევაში, რეზვერატროლმა გამოიწვია მისი ექსპრესიის შემცირება, რაც აღარ შენარჩუნდა ინჰიბიტორების თანაობისას [სურ. 48].



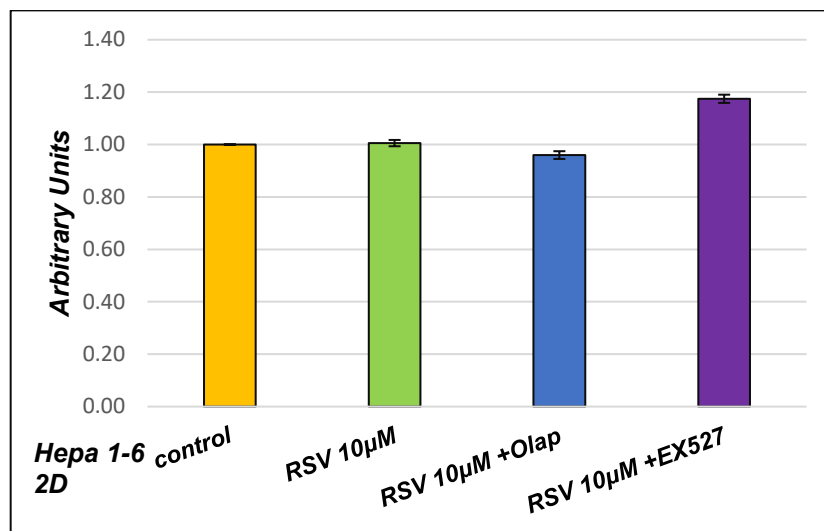
სურ. 48. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზვერატროლის (10µM) გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინი TNFα -ს დონის ცვლილებაზე, ოლაპარიბის და EX-527-ის გამოყენებისას, ოლაპარიბი - TNFα -ს დონე გამოსახულია პირობით ერთეულებში კოტროლთან შედარებით (სადაც კონტროლი უდრის 1)

TNF-α-სგან განსხვავებით, რეზვერატროლის 10µM კონცენტრაციამ არ გამოამჟღავნა გავლენა IL-10-ს და IL-6-ს ციტოკინების ექსპრესიაზე, ორივე ციტოკინის შემთხვევაში

რეზერატროლის და EX527-ს თანაობისას კონტროლთან შედარებით მივიღეთ მატების ტენდენცია, თუმცა არამნიშვნელოვანი [სურ. 49, სურ. 50].



სურ. 49. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზერატროლის (10µM) გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ IL-6-ს დონის ცვლილებაზე ოლაპარიბის გამოყენებისას, ოლაპარიბი - IL-6-ს დონე გამოსახულია პირობით ერთეულებში კონტროლთან შედარებით (სადაც კონტროლი უდრის 1)



სურ. 50. 3 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ რეზერატროლის (10µM) გავლენის შეფასება, ჰეპატოციტების ნალექზედა სითხეში, ციტოკინ IL-10-ს დონის ცვლილებაზე ოლაპარიბის გამოყენებისას, ოლაპარიბი - IL-10-ს დონე გამოსახულია პირობით ერთეულებში კონტროლთან შედარებით (სადაც კონტროლი უდრის 1)

5. შედეგების განხილვა

თეზისის მთავარ მიზანს წარმოადგენდა რეზერატორის მოქმედების მექანიზმის შესწავლა ლიპიდურ მეტაბოლიზმზე და პრო-ანთებით პროცესებზე, სტეატოზის *in vitro* მოდელის გამოყენებით. ღვიძლის კომპლექსური სტრუქტურიდან გამომდინარე სამოდელო სისტემისთვის გამოვიყენეთ ღვიძლის ძირითადი პარენქიმული უჯრედები - ჰეპატოციტები და ასევე მაკროფაგების უჯრედული კულტურები, რადგანაც ქსოვილოვანი მაკროფაგები - კუპფერის უჯრედები, მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ სტეატოზის დროს პრო-ანთებითი რეაქციების ინდუცირებაში (Pierantonelli et al., 2019). მიუხედავად იმ ფაქტისა, რომ ჰეპატოციტებისგან განსხვავებით, ექტოპიური ლიპიდების დაგროვება მაკროფაგებისთვის ნორმალურ ფიზიოლოგიურ პროცესს არ წარმოადგენს, ცნობილია, რომ უჯრედების ამ ტიპს გარკვეულწილად შეუძლიათ ცხიმების დეპონირება (Janabi et al., 2000). შესაბამისად, *in vivo* ღვიძლის გაცხიმოვნების პირობებში, ჭარბი ლიპიდების დეპონირება ღვიძლის ქსოვილოვან მაკროფაგებშიც მიმდინარეობს. ამგვარად, კორექტული მოდელის შესაქმნელად, ექსპერიმენტების ჩატარების წინ, თავისუფალი ცხიმოვანი მჟავების (FFA 1mM) დამატებით უჯრედების გაცხიმოვნებას ორივე ტიპის უჯრედების კულტურებში ვიწვევდით.

სტეატოზის მოდელის მისაღებად, გამოვიყენეთ ლიტერატურაში არსებული მონაცემები, სადაც აღწერილია ცხიმოვანი მჟავებით ინდუცირებული სტეატოზის მოდელების შემუშავების მეთოდოლოგია, რაც პრინციპში ეყრდნობა „დასავლურ დიეტაში“ ყველაზე გავრცელებულ ცხიმოვანი მჟავების გამოყენებას. NAFLD-ს მოდელების შესაქმნელად ჩვენც გამოვიყენეთ ნაჯერი პალმიტოლის მჟავის (PA, C16:0) და მონოუჯერი ოლეინის მჟავის (OA, C18:1) ნაზავი, რადგან სწორედ მათი გადაჭარბებული დონით მოხმარება იწვევს სტეატოზის განვითარებას (Zhang et al., 2023).

როგორც ცნობილია, სტეატოზის დიაგნოსტიკის ოქროს სტანდარტად დღემდე რჩება ბიოფსია და NAFLD-ს დიაგნოზის დადასტურება ხდება, როდესაც ჰეპატოციტების 5%-ზე მეტი შეიცავს ლიპიდურ წვეთებს (Perumpail et al., 2017). გაცხიმოვნების

შესაფასებლად უჯრედებს ვაკვირდებოდით ფაზოკონტრასტული მიკროსკოპით, სადაც კონტროლთან შედარებით შეიმჩნეოდა ლიპიდური წვეთების მკვეთრად მომატებული რაოდენობა. გარდა ამისა ნილის წითელით ლიპიდების შეღებვისას, როგორც ჰეპატოციტების, ისე მაკროფაგების მონოშრიან კულტურებში, შეიმჩნეოდა ლიპიდების დეპონირების ზრდა გაუცხიმოვნებელ ნიმუშებთან შედარებით.

კვლევის ფარგლებში გამოყენებული სამოდელო სისტემა, გარდა მონოშრიანი უჯრედული კულტურებისა, ასევე მოიცავდა ჩვენს მიერ შექმნილ ჰეპატოციტების სამგანზომილებიან (3D), სფეროიდულ კულტურას. აღნიშნული 3D კულტურის ფორმატი საშუალებას გვაძლევდა მიგველო სისტემა, რომელიც უჯრედებს შორის უფრო ძლიერი და სივრცობრივად მრავალმხრივი ადჰეზიური კონტაქტების ხარჯზე მიახლოებულია ქსოვილთან, შესაბამისად, უფრო კორექტულ მოდელს წარმოადგენს. სფეროიდული კულტურის მიღების და შემდგომ ცხიმოვანი მჟავებით მოქმედებით შევისწავლეთ სფეროიდების მორფოლოგია ელექტრონული მიკროსკოპით. ელექტრონული მიკროსკოპით მიღებულმა სურათებმა დაადასტურა სამგანზომილებიანი მოდელის მართებულობა, ვინაიდან სფეროიდული კულტურის ანათლებში მკვეთრად გამოჩნდა ლიპიდური წვეთები, რაც შეესაბამება სტეატოზური ღვიძლის ბიოფსიის სურათს. ამგვარად, ჩავთვალეთ, რომ შემუშავებული ექსპერიმენტალური სამგანზომილებიანი მოდელი კორექტულია და შეიძლება ჩაითვალოს არაალკოჰოლური ცხიმოვანი ღვიძლის დაავადების *in vitro* მოდელად.

აღსანიშნავია, რომ სამგანზომილებიან კულტურაში გაცხიმოვნების შედეგად შიდაუჯრედული ლიპიდების რაოდენობა თითქმის ორჯერ აღემატება გაცხიმოვნებულ მონოშრიან კულტურაში დაგროვებული ცხიმების კონცენტრაციას [სურ.8] ლიტერატურაში არსებულ მონაცემებზე დაყრდნობით, შესაძლებელია ლიპიდების ამდენად მაღალი დონე განპირობებულია იმით, რომ 3D სისტემაში უფრო ცუდად ხდება შიდა შრეებში განლაგებული უჯრედების მომარაგება ჟანგბადით და აქედან გამომდინარე ვითარდება ჰიპოქსია. ცნობილია, რომ უჯრედებში ჟანგბადის ნაკლებობა იწვევს ჰიპოქსიით ინდუცირებული ფაქტორის (HIF), HIF- α -ს სუბერთეულების (HIF-1 α , -2 α , და -3 α) სტაბილიზაციას. რასაც მოყვება ამ უკანასკნელის ციტოპლაზმიდან ბირთვში

გადასვლა, სადაც HIF-1 β -სთან და სხვა ცილებთან ერთად ქმნის ტრანსკრიპციულ კომპლექსს, დნმ-ში უკავშირდება ჰიპოქსიის მოპასუხე ელემენტს და იწვევს გენების ექსპრესიას. ნაჩვენებია, რომ გაცხიმოვნებულ ჰეპატოციტებში, ადგილი აქვს HIF2 α -ს სტაბილიზაციას, რაც ერთისმხრივ იწვევს β -დაჟანგვის შესუსტებას, PPAR α -ს ექსპრესიის შემცირებით (Chen et al., 2019), მეორეს მხრივ კი თავისუფალი ცხიმოვანი მჟავების გადამტანი რეცეპტორის, CD36-ს ექსპრესიის ზრდას და უჯრედების გაცხიმოვნების გაძლიერებას (Rey et al., 2020). უნდა აღვნიშნოთ, რომ ჩვენს კვლევებში როგორც მონოშრიან, ისე სფეროიდულ სამოდელო სისტემებში ერთი და იგივე კონცენტრაციის თავისუფალ ცხიმოვან მჟავებს ვიყენებდით, შესაბამისად გაცხიმოვნების სხვაობა უფრო მეტად აიხსნება სწორედ ჰიპოქსიით გამოწვეული ცვლილებებით.

სამოდელო სისტემის შემუშავების შემდეგ ეტაპზე, ლიტერატურაზე დაყრდნობით შევარჩიეთ რეზვერატროლის კონცენტრაციები. როგორც ნაჩვენებია რეზვერატროლის დაბალი კონცენტრაციები (1-10 μ M) გამოირჩევა ანტი-ოქსიდანტური, ანთებისა და აპოპტოზის სააწინააღმდეგო ეფექტებით, ხოლო მაღალი კონცენტრაციები (40-100 μ M) საპირისპიროდ პრო-აპოპტოზური, სიმსივნის სააწინააღმდეგო მოქმედებით ხასიათდება (Li et al., 2017; Sajish et al., 2015; Shin et al., 2009; Mukherjee et al., 2010; Kuršvietienė et al., 2016). აქედან გამომდინარე, ექსპერიმენტებში გამოსაყენებლად შევარჩიეთ რეზვერატროლის ორ დაბალი კონცენტრაცია, კერძოდ 5 μ M და 10 μ M კონცენტრაციები.

ჩვენი კვლევის მთავარი მიზანი იყო რეზვერატროლის მოქმედების გზის შესწავლა ლიპიდების დეპონირების შემცირებისას, ამიტომ სანამ ამ სასიგნალო გზებს შევისწავლიდით, ჯერ შევამოწმეთ რეზვერატროლის დაბალი კონცენტრაციების გავლენა გამდინარე ციტომეტრიით ლიპიდების დაგროვებაზე როგორც ჰეპატოციტების, ისე მაკროფაგების *in vitro* სამოდელო სისტემაზე. ნილის წითელით შეღებვით გამდინარე ციტომეტრიით შევაფასეთ ნეიტრალური ლიპიდების დონე. როგორც ჰეპატოციტების, ისე მაკროფაგების მონოშრიანი კულტურის გაცხიმოვნებულ უჯრედებში, საკონტროლო ნიმუშებთან შედარებით, მკვეთრად მოიმატა ლიპიდების დონემ, ხოლო რეზვერატროლის 10 μ M კონცენტრაციამ 24 სთ-იანი მოქმედებით მნიშვნელოვნად შეამცირა ლიპიდების დეპონირება [სურ.9, სურ.10]. შესაბამისად შეგვიძლია დავასკვნათ,

რომ მოცემულ კონცენტრაციაზე რეზვერატროლს აქვს კალორიების შეზღუდვის ეფექტი როგორც ჰეპატოციტებში, ისე მაკროფაგებში.

ჩვენ თავდაპირველად ჩამოვყალიბეთ ჰიპოთეზა, რომ რეზვერატროლის პოზიტიური ეფექტი სტეატოზის დროს შეიძლება დამოკიდებული იყოს მის გავლენაზე მაკროფაგების პოლარიზაციის პროფილზე, და ეს პოლარიზაციის პროცესი შეიძლება უკავშირდებოდეს უჯრედების ზედაპირზე პრო-ანთებითი რეაქციების ინიციატიაში მონაწილე Toll-რეცეპტორების ოჯახის წევრის, TLR4-ის ექსპრესიის მოდულაციას. შესაბამისად რეზვერატროლით მოქმედების შემდეგ შევამოწმეთ TLR4-ის ზედაპირული ექსპრესიის დონე. მიღებული შედეგით დადასტურდა ჩვენი ჰიპოთეზის სისწორე, ვინაიდან გაცხიმოვნებული ჰეპატოციტების მონოშირან კულტურაში რეზვერატროლმა გამოიწვია TLR4-ის ექსპრესიის შემცირება [სურ. 11].

როგორც ცნობილია, TLR4-დან ინდუცირებული სასიგნალო კასკადები იწვევენ პრო-ანთებითი ციტოკინების გამომუშავებას (Sharifnia et al., 2015). აქედან გამომდინარე გადავწყვიტეთ უჯრედების ნალექზედა სითხეში გვენახა ციტოკინური პროფილი. რეზვერატროლის მოქმედების შემდეგ, როგორც ჰეპატოციტებში, ისე მაკროფაგებში შევაფასეთ პრო-ანთებითი ციტოკინის IL-1 β -ს და რეგულატორული ციტოკინის IL-10-ს დონე [სურ. 12-15]. მიუხედავად იმისა, რომ მაკროფაგები არიან ანთებაზე პასუხისმგებელი უჯრედები და გამოიმუშავენ სხვადასხვა ციტოკინებს, ჰეპატოციტებსაც აქვთ უნარი გამოიმუშაონ ციტოკინები (Zhang et al., 2022), ამიტომ მაკროფაგების მსგავსად ამ უჯრედებშიც განვსაზღვრეთ ხსნადი ფაქტორები. ცნობილია, რომ პრო-ანთებითი ციტოკინები მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ NAFLD-ს პროგრესირებაში. THP-1 მაკროფაგების უჯრედულ ხაზზე აჩვენეს, რომ ნაჯერი ცხიმოვანი მჟავის პალმიტოლით მოქმედება, იწვევს უჯრედების M1 ტიპად პოლარიზაციას, ტრანსკრიპციის ფაქტორის NF- κ B აქტივაციას და პრო-ანთებითი ციტოკინების (IL-1 β , TNF- α და IL-6) გამომუშავებას (Wang et al., 2019). პრო-ანთებითი ციტოკინები IL-1 β , IL-6 და TNF α ახდენენ ისეთი იმუნური უჯრედების მოზიდვას, როგორიცაა ნეიტროფილები, მონოციტები, ბუნებრივი კილერები (NK) და NKT უჯრედები, რის შედეგადაც ღვიძლის გაცხიმოვნებასთან ერთად ვითარდება ქრონიკული ანთება და დაავადება პროგრესირებს უფრო მძიმე ფორმებში,

როგორცაა სტეატოჰეპატიტი, ფიბროზი, ციროზი (Pierantonelli et al., 2019). გარდა ამისა როგორც ჰეპატოციტებში, ისე მაკროფაგებში ეს ციტოკინები პასუხისმგებლები არიან ენდოპლაზმური ბადის სტრესის გამოწვევაზე, რაც თავის მხრივ ასოცირდება JNK/NF- κ B გზების აქტივაციასთან და შესაბამისად დამატებით პრო-ანთებითი ციტოკინების სინთეზთან, ჟანგვითი სტრესის განვითარებასთან, ინსულინის რეზისტენტობასთან და მიტოქონდრიის დისფუნქციასთან (Yamazaki et al., 2009; jiang et al., 2003, Pfaffenbach et al., 2010). მთელი ეს პროცესები თავის მხრივ იწვევს ღვიძლის გაცხიმოვნების გაძლიერებას და სისტემური ანთების განვითარებას (Han et al., 2015). ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ რეზერატროლის დაბალი კონცენტრაციები გამოირჩევა ანთების საწინააღმდეგო მოქმედებით (Tian et al., 2016), რაც ნაწილობრივ დაემთხვა ჩვენ შედეგებს, რადგან რეზერატროლით მოქმედებამ 24 სთ-იან დროის წერტილზე, მაკროფაგების შემთხვევაში შეამცირა პრო-ანთებითი ციტოკინის IL-1 β -ს ექსპრესია, ხოლო ჰეპატოციტების შემთხვევაში ეს ცვლილება არ გამოვლინდა [სურ.12. სურ.14]. რეზერატროლით გამოწვეული ლიპიდების დეპონირების შემცირება შეგვიძლია დავუკავშიროთ სწორედ მაკროფაგებში IL-1 β -ს გამომუშავების შემცირებას, ვინაიდან Negrin et al., 2014-ს მიხედვით, თავის პირველად ჰეპატოციტებში IL-1 β -თი მოქმედება მნიშვნელოვნად აძლიერებს ტრიგლიცერიდების დაგროვებას და FAS (Fatty acid synthase)-ს ექსპრესიას. გარდა ამისა, Stienstra et al., 2010-ის მიხედვით IL-1 β პასუხისმგებელია ბირთვული რეცეპტორის, PPAR α -ს აქტივობის დათრგუნვაზე და შესაბამისად ცხიმოვანი მჟავების დაჟანგვის ინჰიბირებაზე (Stienstra et al., 2010). ვინაიდან ტრანსკრიპციული ფაქტორი PPAR α იწვევს იმ გენების ექსპრესიას (მაგ. CPT1, ACOX1) რომლებიც დაკავშირებულნი არიან ცხიმოვანი მჟავების კატაბოლიზმთან (Villena et al., 2015). ამავე დროს ნაჩვენებია, რომ თავებში IL-1-ს რეცეპტორის ანტაგონისტით, IL-1-ს სასიგნალო გზის ინჰიბირება, მნიშვნელოვნად ამცირებს ღვიძლში ლიპოგენური გენების ექსპრესიას და გაცხიმოვნებას (Stienstra et al., 2010). პრო-ანთებითი ციტოკინთან ერთად განვსაზღვრეთ რეგულატორული ციტოკინის IL-10-ს დონე. როგორც ცნობილია, რომ NAFLD-ს პროგრესირებასთან ერთად IL-10-ს ექსპრესიაც მცირდება (Solleiro-Villavicencio et al., 2024). შესაბამისად, IL-10/JAK1/STAT3 სასიგნალო გზით ინდუცირებული პრო-ანთებითი

ციტოკინების ტრანსკრიპციული ინაქტივაცია სუსტდება და IL-10 ვეღარ ავლენს მის დამცველობით ეფექტს (Murray et al., 2005). საინტერესოა, რომ ჩვენს კვლევაში რეზერატროლის 10 μ M კონცენტრაციამ როგორც წინასწარ გაცხიმოვნებულ მაკროფაგებში, ისე ჰეპატოციტებში შეამცირა რეგულატორული ბუნების IL-10-ს დონე [სურ. 13. სურ.15]. რაც შეეხება ლიტერატურაში არსებულ მონაცემებს რეზერატროლის ზემოქმედებაზე IL-10-ს სეკრეციაზე, ისინი არაერთგვაროვანია და ურთიერთგამომრიცხავი. ერთისმხრივ ნაჩვენებია, რომ რეზერატროლი აფერხებს IL-10-ის გამომუშავებას M2 მაკროფაგებში (Kimura et al., 2016), ხოლო სხვა მკვლევარების ჯგუფის მიხედვით, რეზერატროლი აძლიერებს IL-10 სეკრეციას (Song et al., 2014). მართალია, IL-10 ცნობილია, როგორც ანთების საწინააღმდეგო მოქმედებით, თუმცა თუ მის მოქმედებას ჩავუღრმავდებით ვნახავთ რომ მისი მოქმედება საკმაოდ კომპლექსურია. ერთისმხრივ, IL-10/JAK1/STAT3 სასიგნალო გზა იწვევს SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3)-ს ტრანსკრიპციას, რომელიც აინდუცირებს ტრანსკრიფციული ფაქტორის NF- κ B-ს სუბერთეულის, p65-ს უბიქიტინ-დამოკიდებულ პროტეოსომულ დეგრადაციას და მისი მოქმედების დათრგუნვას (Sood et al., 2019). თუმცა მეორე მხრივ SOCS3 აგრეთვე იწვევს ინსულინის რეცეპტორის სუბსტარტის პროტეოლიზისურ დეგრადაციას და ღვიძლში SOCS3-ს ჰიპერ-ექსპრესია ასოცირდება ინსულინის რეზისტენტობასთან (Bi et al., 2018). ამავე დროს ნაჩვენებია, რომ SOCS-3-ის დათრგუნვა ჭარბწონიან, დიაბეტის მქონე თაგვებში აუმჯობესებს ინსულინის მგრძნობელობას და ღვიძლის სტეატოზს (Ueki et al., 2004).

კვლევის მომდევნო ეტაპზე შევამოწმეთ რეზერატროლის ეფექტი მოქმედების მოკლე ვადებზე, რადგანაც Sajish et al., 2015-ს ნაჩვენები ჰქონდათ, რომ Hela უჯრედებში, უკვე 1სთ-იანი მოქმედების შემთხვევაში, რეზერატროლი დაბალ კონცენტრაციებზე (5 μ M), PARP1-ის და NAMPT (Nicotinamide Phosphoribosyltransferase)-ს აქტივაციის გზით, ახდენდა NAD⁺-ს დონის და PAR-ლაციის მატებას (Sajish et al., 2015). აქედან გამომდინარე გადავწყვიტეთ ექსპერიმენტის დიზანი შეგვეცვალა, კერძოდ შევამცირეთ რეზერატროლის სამოქმედო დრო და 24სთ-იანი ინკუბაციის სანაცვლოდ, რეზერატროლს უჯრედებთან ვაინკუბირებდით 3სთ-ით.

სანამ რეზერატროლის მოქმედების მექანიზმს შევისწავლიდით მოქმედების მოკლე დროის წერტილზე, უპირველეს ყოვლისა შევაფასეთ ადრეული აპოპტოზის დონე, ამჯერად უკვე როგორც მონოშრიან კულტურებში, ისე ჰეპატოციტების სამგანზომილებიან კულტურაში. მიღებული შედეგების მიხედვით არცერთ სამოდელო სისტემაში რეზერატროლმა არ გამოავლინა აპოპტოზური მოქმედება [სურ.16-19]. ხოლო რაც შეეხება რეზერატროლის დაბალი კონცენტრაციების გავლენას ლიპიდების დეპონირებაზე, ყველა სამოდელო სისტემაში, მოქმედების მოკლე ვადაზე რეზერატროლმა კვლავ შეინარჩუნა კალორიების შეზღუდვის ეფექტი და მისი გავლენით შემცირდა ლიპიდების დეპონირება გაცხიმოვნებულ ნიმუშებთან შედარებით [სურ. 20-22]. ლიპიდების დონის შეფასებასთან ერთად გვანტერესებდა გამოავლენდა თუ არა რეზერატროლი ანტი-ოქსიდანტურ მოქმედებას. ამისათვის გავზომეთ ჟანგბადის აქტიური ფორმების (ჰიდროქსილის, პეროქსილის და სხვ.) ჯამური დონე. მიღებული შედეგების მიხედვით, რეზერატროლის ანტიოქსიდანტური ეფექტი გამოვლინდა მხოლოდ ჰეპატოციტების მონოშრიან კულტურაზე რეზერატროლის $10\mu\text{M}$ კონცენტრაციით მოქმედებისას [სურ.23], ჰეპატოციტების სფეროიდულ და მაკროფაგების მონოშრიან სისტემებში კი ჟანგბადის აქტიური ფორმების შემცირება არ გამოვლინდა [სურ. 24-25].

NAFLD-ს მოდელის გაუმჯობესების მიზნით, გადავწყვიტეთ ცხიმოვანი მჟავების დამატების პარალელურად უჯრედები გაგვეზარდა გლუკოზის მაღალი პროცენტის შემცველობის საკვებ არეზე. რადგანაც NAFLD-ის თანმხლები დაავადებაა მეორე ტიპის დიაბეტი (Queck et al., 2023), და ჩავთვალეთ, რომ უჯრედების მაღალი პროცენტის გლუკოზის შემცველ საკვებ არეში გაზრდა უფრო რეალურ შედეგს მოგვცემდა და ექსპერიმენტების ნაწილი სწორედ მაღალი გლუკოზის პირობებში გავაკეთეთ. ჩვენი მიზანი იყო, გაგვეგო, დაბალი და მაღალი გლუკოზის პირობებში $5\mu\text{M}$ და $10\mu\text{M}$ რეზერატროლის დამატება რა ცვლილებებს გამოიწვევდა ცხიმების შემცველობაში. აღსანიშნავია, რომ მონოშრიანი ჰეპატოციტების უჯრედული კულტურის შემთხვევაში, რეზერატროლით სტიმულაციის საპასუხოდ (3სთ), ლიპიდების შემცველობის დაწევა აღარ მოხდა [სურ.29]. ჰეპატოციტებისგან განსხვავებით, მაკროფაგებში რეზერატროლის

ეფექტი შენარჩუნდა და ორივე კონცენტრაციის საპასუხოდ მოხდა ლიპიდების დონის დაწევა [სურ.30]. ამგვარად, გამოიკვეთა, რომ განსხვავებული ტიპის უჯრედებში მივიღეთ განსხვავებული შედეგი მსგავსი სტიმულაციის საპასუხოდ, რაც ემთხვევა ლიტერატურაში არსებულ მონაცემებს, რომ რეზვერატროლის მოქმედება დამოკიდებულია უჯრედის ტიპზე (Ratajczak et al., 2021). გარდა ამისა, შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ ჰეპატოციტებში, რომლებსაც ახასიათებთ ცხიმების დაგროვება, ჭარბად არსებული გლუკოზა ასტიმულირებს *de novo* ლიპოგენეზს და მიუხედავად იმისა, რომ რეზვერატროლი ასტიმულირებს ცხიმების დეპონირების შემცირებას, ამ ეფექტს ფარავს გლუკოზით სტიმულირებული ლიპოგენეზი, რის ხარჯზე შეუძლებელი ხდება რეზვერატროლის ეფექტის დეტექცია. მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე მომდევნო ექსპერიმენტები გავაგრძელებთ გლუკოზის დაბალი კონცენტრაციის შემცველობის საკვებ არეში.

როგორც ცნობილია, NAFLD ხასიათდება რიგი ეპიგენეტიკური ცვლილებებით (Lee et al., 2014). მათ შორის გამოირჩევა ჰისტონ სამის მე-4 ლიზინის ტრიმეთილირების (H3K4me3) მაღალი დონით, რაც პირდაპირ კორელაციაშია დაავადების პროგრესირებასთან ერთად და ჰეპატოცელულარული კარცინომის მქონე პაციენტებში კორელაციაშია გადარჩენის ცუდ პროგნოზთან (He et al., 2012). აქედან გამომდინარე, გვინდოდა გვეჩვენა რეზვერატროლის მოქმედებისას მოკლე ვადაზე, მივიღებდით თუ არა ეპიგენეტიკურ ცვლილებას. ჰეპატოციტების მონოშრიან კულტურაში შევაფასეთ H3K4me3-ს ზოგადი დონე და შედეგების მიხედვით გამოვლინდა, რომ რეზვერატროლის 10 μ M კონცენტრაცია მნიშვნელოვნად ამცირებს ტრიმეთილირების საერთო დონეს [სურ.31], რაც ჩვენი ვარაუდით, შეიძლება განპირობებული იყოს გაცხიმოვნებულ უჯრედებში რეზვერატროლის მიერ დემეთილაზების გააქტიურებით, თუმცა ეს საჭიროებს დამატებით შემოწმებას რაც ამ ეტაპზე ჯერ მოხერხდა. He et al., 2012-ს მონაცემების გათვალისწინებით, რეზვერატროლს სავარაუდოდ შეუძლია იმოქმედოს პაციენტების გადარჩენის პროგნოზზე. ასევე მნიშვნელოვანია სამომავლოდ დადგინდეს კონკრეტულად რომელ გენებთან ადგილი აქვს ამ ეპიგენეტიკურ ცვლილებას.

მომდევნო ეტაპზე შევამოწმეთ, შენარჩუნდებოდა თუ არა რეზერატოლის 24 სთ-იანი მოქმედების შედეგი, რაც ჩვენი ვარაუდით დაკავშირებულია TLR4-ს ექსპრესიის მოდულაციასთან. თუმცა მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე, არცერთ სამოდელო სისტემაში, TLR4-ის ექსპრესიის მოდულაცია აღარ გამოვლინდა [სურ.26-28], რაც გვაფიქრებინებს, რომ მოკლე ვადებზე რეზერატოლის მიერ ინდუცირებული ცხიმების დეპონირების დაკლება TLR4-ის ექსპრესიის დაკლებაზე არ არის დამოკიდებული.

TLR4-ს ექსპრესიის შეფასებასთან ერთად განვსაზღვრეთ ცხიმოვანი მჟავების გადამტანი რეცეპტორის CD36-ს ექსპრესია. ვინაიდან, ცხიმების დეპონირებასა და TLR4-ის სასიგნალო გზას შორის არსებული კავშირის შესახებ გარკვეული მონაცემები არსებობდა, კერძოდ Stewart et al., 2014-ს ნაჩვენები ჰქონდათ, რომ ცხიმოვანი მჟავებით მოქმედებისას, CD36-ცხიმოვანი მჟავის გადამტანი რეცეპტორი ქმნის ჰეტეროტრიმერულ კომპლექსს TLR4- და TLR6-თან, ხოლო კომპლექსის ჩამოყალიბების შემდეგ ხდება მისი ენდოციტოზი დინამინ-დამოკიდებული გზით, რასაც საბოლოოდ მოსდევს NF- κ B გენის აქტივაცია. CD36-ცხიმოვანი მჟავის გადამტან რეცეპტორს მნიშვნელოვანი როლი აქვს ცხიმოვანი მჟავების ათვისებისა და ლიპიდების მეტაბოლიზმისთვის (Pepino et al., 2014). ის ექსპრესირდება როგორც ჰეპატოციტებზე, ისე კუჭფერის უჯრედებზე (Chen et al., 2022). ნორმაში ჰეპატოციტებზე CD36-ს ექსპრესია დაბალია, მაგრამ იმატებს სტეატოზის განვითარებისას, შედეგად ძლიერდება ცხიმოვანი მჟავების ათვისება და ტრიგლიცერიდების დაგროვება (Wilson et al., 2016). სხვადასხვა ხაზის თაგვებში ჩატარებული ცდების მიხედვით CD36 წარმოადგენს ყველაზე კორელირებად გენს ცხიმოვანი ღვიძლის დაავადებასთან (Feng et al., 2022). Stewart et al. მონაცემებიდან გამომდინარე, გადაწყვიტეთ, რომ შეგვესწავლა რეზერატოლის გავლენა არა მხოლოდ TLR4-ის, არამედ CD36-ის ექსპრესიის დონეზე, რაც დაგვეხმარებოდა რეზერატოლის მოქმედების მექანიზმის გარკვევაში. თუმცა, მიღებული შედეგების მიხედვით, აღმოჩნდა, რომ მოკლე ვადებზე რეზერატოლით მოქმედებას არ მოჰყვებოდა არც TLR4-ის, არც CD36-ის ზედაპირული ექსპრესიის ცვლილება [სურ.26-28], შესაბამისად გამოვიტანეთ დასკვნა, რომ რეზერატოლით გამოწვეული ლიპიდების დაკლების ეფექტი, მინიმუმ ამ

მოკლე ვადებზე არ უკავშირდება ცხიმების ტრანსპორტერის ზედაპირული ექსპრესიის მოდულაციას.

მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე ჩვენი კვლევის მიზნის მისაღწევად, ყურადღება გადავიტანეთ ტრანსკრიპციულ ფაქტორ - peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ)-ზე, ვინაიდან PPAR γ 2 არეგულირებს ადიპოციტების დიფერენცირებასა და გლუკოზის მეტაბოლიზმს, გარდა ამისა აძლიერებს ანტიოქსიდანტურ სისტემებს და მონაწილეობს იმუნური სისტემის რეგულაციაში, მაკროფაგების M2 ტიპად პოლარიზაციის სტიმულირების ხარჯზე (Okuno et al., 2010; Schmidt et al., 2010). ვინაიდან ეს ბირთვული რეცეპტორი სწორედ ჩართულია იმ პროცესების რეგულირებაში, რაც NAFLD-ს დროს ირღვევა, ვივარაუდეთ რომ შეიძლება რეზერატოლის სასიგნალო გზაში სწორედ PPAR- γ მონაწილეობს. წერტილოვანი ბლოტინგის მეთოდით, შევისწავლეთ მისი ექსპრესიის დონე. მიღებული სურათიდან გამოჩნდა, რომ სამივე სამოდულო სისტემის შემთხვევაში ერთმანეთის მსგავსად მოხდა PPAR- γ -ს დონის აწევა რეზერატოლის მოქმედების საპასუხოდ [სურ. 32-34]. გარდა ამისა გამოვლინდა რომ ეს პროცესი დამოკიდებული არის ფერმენტ poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1)-ზე, რადგანაც PARP1-ის ინჰიბიტორმა - ოლაპარიბმა გამოიწვია PPAR- γ -ს დონის აწევის ბლოკირება [სურ.32-33]. შესაბამისად, გამოიკვეთა, რომ რეზერატოლის მიერ სტიმულირებულ სასიგნალო გზაში, როგორც ჰეპატოციტებში, ასევე მაკროფაგებში, PARP1-ს აქტივაცია წინ უძღვის PPAR- γ -ს დონის აწევას. ეს შედეგები შესაბამისობაში მოდის Sajish et al., 2015-ს მონაცემებთან, რომ რეზერატოლი დაბალ კონცენტრაციებზე ($\leq 10 \mu\text{M}$) უკავშირდება TyrRS-ს აქტიურ ცენტრს, მიმართავს მას ბირთვისკენ, სადაც იწვევს PARP1-ს აქტივაციას და NAD^+ -დამოკიდებულ აუტო-პოლი-ADP-რიბოზილირებას (Sajish et al., 2015). მიღებულ შედეგებს ამყარებს მაკროფაგების მონოშრიან კულტურაში შეფასებული PARP-ის მიერ გამოწვეულ PAR-ლაციის ხარისხის შეფასება ვესტერნ-ბლოტის მეთოდით [სურ. 35]. სადაც მივიღეთ რომ რეზერატოლის ორივე კონცენტრაციით ზემოქმედებისას (24 სთ-ით) ადგილი აქვს PAR-ლაციის მნიშვნელოვან მატებას.

ჩვენს მიერ მიღებული და ლიტერატურაში არსებული შედეგებით, რეზერვუაროლის სამიზნე მოლეკულა არის PARP1. ამასთანავე რეზერვუაროლის სამიზნე მოლეკულებიდან, ერთ-ერთი კარგად შესწავლილი მოლეკულაა NAD^+ დამოკიდებული ჰისტონების და ცილების დეაცეტილაზა, Sirt1. Andrade et al., 2014-ს მკვლევარების ჯგუფმა აჩვენა, რომ მაღალ ცხიმოვან თაგვებში, რეზერვუაროლი იწვევს SIRT1-ს ექსპრესიის მატებას, ამავე დროს ანთების შესუსტებას და ლიპიდების მეტაბოლიზმის გაუმჯობესებას (Andrade et al., 2014). შესაბამისად გადაწყვეტით შეგვემოწმებინა ამ ორი მოლეკულის, Sirt1 და PARP1-ს როლი რეზერვუაროლის სასიგნალო გზაში. მიღებული შედეგების თანახმად ჰეპატოციტების შემთხვევაში ორივე მოლეკულა ჩართულია რეზერვუაროლის სასიგნალო გზაში, ვინაიდან როგორც EX527 (Sirt1-ს ინჰიბიტორი)-ს, ისე ოლაპარიბის (PARP1-ს ინჰიბიტორი)-ს დამატებისას რეზერვუაროლის ეფექტი აღარ გამოვლინდა [სურ. 36-37]. საინტერესოა, რომ მაკროფაგებში მსგავსი ექსპერიმენტული დიზაინის ჩატარებისას მივიღეთ, რომ მაკროფაგებში რეზერვუაროლის სასიგნალო გზა მოიცავს სპეციფიურად Sirt1-ს აქტივაციას [სურ. 38-39]. როგორც მიღებული შედეგებიდან შეგვიძლია დავასკვნათ, რეზერვუაროლის მიერ ინდუცირებული ლიპიდების შემცირება ჰეპატოციტებში და მაკროფაგებში განსხვავებული მექანიზმებით მიმდინარეობს, რაც შეიძლება ავხსნათ ამ უჯრედებისთვის დამახასიათებელი ფიზიოლოგიური თვისებებიდან გამომდინარე. თუკი ჰეპატოციტებს მნიშვნელოვანი როლი აქვთ ლიპიდების მეტაბოლიზმში, მაკროფაგების მთავარი როლი ანთებითი პროცესების რეგულირებაა. შესაბამისად, ამ უჯრედებში SIRT1-ს და PARP1-ს როლი განსხვავებულია. ჰეპატოციტებში დეაცეტილაზური მოქმედების ცილა, SIRT1 მნიშვნელოვან როლს თამაშობს მეტაბოლიზმის რეგულირებაში (Nassir et al., 2016; Ding et al., 2017). SIRT1-ს აქტივაცია აძლიერებს β -ჟანგვას PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α)-ს დეაციტილირებით და აქტივაციით და პარალელურად თრგუნავს ლიპოგენეზის პროცესს, SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein 1c)-ის ინჰიბირებით (Rodgers et al., 2005; Ponugoti et al., 2010; Walker et al., 2012). რაც შეეხება PARP1-ს როლს ჰეპატოციტებში, ის პირველ რიგში ჩართულია ჟანგვითი სტრესით გამოწვეული დნმ-ს

დაზინების რეპარაციაში (Spiegel et al., 2021), თუმცა ამავე დროს PARP1 პირდაპირ ახდენს გავლენას ლიპიდების მეტაბოლიზმში ჩართული სხვადასხვა მოლეკულების გენების ექსპრესიაზე (Bai and Canto, 2012; Schiewer et al., 2012). როგორც Shin et al-ს ჯგუფმა აჩვენა, ადამიანის ჰეპატოციტების, HepG2 უჯრედულ ხაზზე რეზვერატროლის დაბალი კონცენტრაციებით გამოწვეულ AMPK (AMP-activated protein kinase) -ს აქტივაციას და ანტიოქსიდანტურ მოქმედებას, წინ უძღვის poly (ADP-ribose) polymerase (PARP-1)-LKB1 გზის აქტივაცია (Shin et al., 2009). ჰეპატოციტებისგან განსხვავებით მაკროფაგებში ლიპიდების მეტაბოლიზმი ნაკლებად ეყრდნობა PARP1-ს მოქმედებას და მნიშვნელობა აქვს SIRT1-ს აქტივაციას. ვინაიდან მაკროფაგებში, SIRT1 არეგულირებს ლიპიდების და ანთების ჰომეოსტაზს (Chang et al., 2014). კერძოდ SIRT1 იწვევს ღვიძლის X რეცეპტორის (liver X receptors, LXR) დეაქტივირებას და აქტივაციას, ხოლო LXR არეგულირებს ქოლესტერინის უჯრედიდან გადინებას, ATP დამაკავშირებელი კასეტის გადამტანის, ABCA1-ის ექსპრესიის გაზრდით და ამცირებს ქაფისებრი უჯრედების ფორმირებას (Chang et al., 2014).

განხილული ლიტერატურული მონაცემებიდან გამომდინარე, ჰეპატოციტების შემთხვევაში ლოგიკურია, რომ ლიპიდების დეპონირების შემცირება დამოკიდებულია როგორც PARP1 ისე SIRT1-ს აქტივაციაზე, ვინაიდან ამ უჯრედული ტიპის შემთხვევაში ორივე მოლეკულა არეგულირებს ლიპიდების მეტაბოლიზმს. შესაბამისად შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ჰეპატოციტებში რეზვერატროლი იწვევს ორივე მოლეკულის აქტივაციას. ხოლო მაკროფაგებში განსხვავებული სურათი გვაქვს და ლიპიდების დეპონირების შემცირება PARP1-სგან დამოუკიდებლად ხდება, რადგან როგორც უკვე ვახსენეთ PARP1 მაკროფაგებში ნაკლებად მონაწილეობს ლიპიდური მეტაბოლიზმის რეგულირებაში. ასე რომ, ამ ტიპის უჯრედის შემთხვევაში მხოლოდ SIRT1-ის სასიგნალო გზა მოქმედებს.

ლიპიდების მეტაბოლიზმში PARP1-ს და SIRT1-ს ფუნქციის შეფასების შემდეგ, გადავწყვიტეთ შეგვემოწმებინა, თუ რა როლი ექნებოდა ამ ორ მოლეკულას ანთებითი პროცესების რეგულირებაში. ამისათვის გადავწყვიტეთ განგვესაზღვრა პრო-ანთებითი (TNF- α , IL-6) და რეგულატორული (IL-10) ციტოკინები. მიღებული შედეგებიდან

გამოჩნდა, რომ ორივე ტიპის უჯრედში რეზერატოლი, მოქმედების მოკლე ვადაზე, კვლავ ახდენს ანთების საწინააღმდეგო მოქმედებას და ამცირებს TNF- α -ს დონეს [სურ.40, სურ.43, სურ.48], ამავე დროს ჰეპატოციტებში ამცირებს რეგულატორული ციტოკინის IL-10-ს დონეს [სურ.47]. მიღებული შედეგები შესაბამისობაშია 24სთ-იან დროის წერტილზე განსაზღვრულ ციტოკინების შედეგებთან, სადაც მსგავსად რეზერატოლის გავლენით მივიღეთ როგორც პრო-ანთებითი ისე რეგულატორული ციტოკინის შემცირება [სურ.13, სურ.14, სურ.15]. თუმცა საინტერესოა, რომ რეზერატოლის მიერ გამოვლენილი ეს ცვლილებები აღარ განმეორდა ინჰიბიტორების გამოყენებისას, რაც გვაფიქრებინებს რომ რეზერატოლის მიერ ანთებითი პროცესების რეგულირებაში მონაწილეობს ორივე მოლეკულა, Sirt1-იც და PARP1-იც. ამ შედეგების ანალიზისთვის მნიშვნელოვანია მხედველობაში მივიღოთ თუ რა გავლენა აქვს Sirt1-ის და PARP1-ის მოლეკულებს ანთებაზე. ლიტერატურაში ნაჩვენებია, რომ SIRT1 ახდენს ტრანსკრიპციული ფაქტორის NF- κ B-ს სუბერთეულის- RelA/p65 დეაქტილირებას ლიზინ-310-ზე და შესაბამისად ამცირებს NF- κ B-ს ტრანსკრიპციულ აქტივობას (Yeung et al., 2004; Yoshizaki et al., 2010). აქედან გამომდინარე შეგვიძლია ვთქვათ რომ, Sirt1-ს ერთგვაროვნად ანთების საწინააღმდეგო მოქმედება აქვს, თუმცა PARP1-ს შემთხვევაში სურათი უფრო კომპლექსურია. მაკროფაგებში PARP1 ასოცირდება უჯრედების M1 ტიპად პოლარიზაციასთან (Sobczak et al., 2020) და თავის მაკროფაგების უჯრედებში, LPS-ს საპასუხოდ PARP1 ახდენს NF- κ B-ს, p65-ს სუბერთეულის PAR-ილაციას და შედეგად ანთებითი ციტოკინების ტრანსკრიპციას (IL-1 β და IL-18) (Liu et al., 2012). თუმცა მეორეს მხრივ ჩვენს მიერ ჩატარებულ ექსპერიმენტებში ვაჩვენეთ, რომ რეზერატოლის საპასუხოდ ადგილი აქვს PARP1-დამოკიდებულ PPAR- γ -ს ექსპრესიის მატებას [სურ.32, 33], PPAR γ კი იწვევს მაკროფაგების პოლარიზაციას M2-ტიპად, თრგუნავს ისეთი პრო-ანთებითი ციტოკინების ექსპრესიას როგორცაა TNF- α , IL-1 β და IL-6. მისი სამოქმედო მექანიზმი გულისხმობს პირდაპირ ურთიერთქმედებას პრო-ანთებით ტრანსკრიპციულ ფაქტორებთან (NF- κ B, STAT, AP-1) და ამ გზით პრო-ანთებითი გენების ექსპრესიის ხელის შეშლას (Chen et al., 2003; Wang et al., 2001). გარდა ამისა Bi et al., 2018-ს მიხედვით, PPAR γ -ს აგონისტი როზიგლიტაზონი JAK2/STAT3 სასიგნალო გზის ინჰიბირებით

ჰეპატოციტებში ამცირებს SOCS3 ექსპრესიას. როგორც უკვე განვიხილეთ, IL-10-ს სასიგნალო გზა იწვევს სწორედ SOCS3-ს ექსპრესიის მატებას, რომელიც ასოცირდება ინსულინის რეზისტენტობასთან. შესაბამისად PPAR γ ერთის მხრივ პასუხიმგებელია პრო-ანთებითი ციტოკინების ექსპრესიის შემცირებაზე და მეორეს მხრივ IL-10-ს სასიგნალო გზის იჰიბირებაზე. ეს ორივე პროცესი კი სტეატოზის გაუმჯობესებასთან პირდაპირ კავშირშია.

განხილული ლიტერატურული მონაცემებიდან გამომდინარე, როგორც ჰეპატოციტებში ისე მაკროფაგებში, SIRT1-ს შემთხვევაში ლოგიკურია, თუ რატომ მივიღეთ ანთებითი პროცესის დათრგუნვა, თუმცა PARP1-ს შემთხვევაში მეტად ჰეტეროგენული სურათი გვაქვს ლიტერატურულ მონაცემებს თუ გავითვალისწინებთ. სავარაუდოდ ორივე ტიპის უჯრედში, ანთებითი პროცესის დათრგუნვა დამოკიდებულია PARP1 დამოკიდებულ PPAR γ -ს აქტივაციასთან და მის შემდგომ მოქმედებებთან.

6. დასკვნა და რეკომენდაციები:

კვლევის ფარგლებში მიღებული შედეგებიდან გამოვლინდა:

1. რეზვერატროლის დაბალ კონცენტრაციაზე ($10\mu\text{M}$) 24 საათიანი ინკუბაციის საპასუხოდ ჰეპატოციტებში შეინიშნება ორი პარალელური მოვლენა: ერთის მხრივ ხდება შიდაუჯრედული ლიპიდების კონცენტრაციის შემცირება, ხოლო მეორეს მხრივ - უჯრედების ზედაპირზე მცირდება TLR4-ის ზედაპირული ექსპრესია.
2. რეზვერატროლით გამოწვეული ლიპიდების დეპონირების შემცირება, ჰეპატოციტების და მაკროფაგების სამოდელო სისტემებში, მოკლე ვადაში (3სთ) არ ასოცირდება TLR4-ის ზედაპირული ექსპრესიის მოდულაციასთან.
3. ჰეპატოციტების და მაკროფაგების სამოდელო სისტემებში, რეზვერატროლი მოქმედების ორივე დროის წერტილზე (3სთ, 24სთ) ამცირებს, პრო-ანთებითი და რეგულატორული ციტოკინების დონეს.
4. ჰეპატოციტებში რეზვერატროლის ეფექტი ლიპიდების დეპონირების შემცირებაზე საჭიროებს როგორც PARP-1-ს, ისე Sirt1-ს სასიგნალო გზების აქტივაციას.
5. მაკროფაგებში რეზვერატროლის ეფექტი ლიპიდების დეპონირების შემცირებაზე დამოკიდებულია Sirt1-ს სასიგნალო გზების აქტივაციაზე, მაგრამ არ საჭიროებს PARP-1-ს გზის აქტივაციას.
6. როგორც ჰეპატოციტებში, ასევე მაკროფაგებში რეზვერატროლის ეფექტი პრო-ანთებითი ციტოკინების პროდუქციის შემცირებაზე დამოკიდებული აღმოჩნდა როგორც Sirt1-ს, ასევე PARP-1-ს სასიგნალო გზის აქტივაციაზე.
7. ჰეპატოციტების მონოშრიან კულტურაში რეზვერატროლი იწვევს H3K4me3-ს ზოგადი დონის შემცირებას.

კვლევის შედეგად მიღებული შედეგების განსამტკიცებლად და რეზვერატროლის სამოქმედო გზის უკეთ შესასწავლად, მნიშვნელოვანია მომავალში შემოწმდეს, დაბალი დოზის რეზვერატროლის მოქმედების საპასუხოდ ანთებით პროცესებზე

პასუხისმგებელი ტრანსკრიპციული ფაქტორის NF-κB-ს დონე, ცხიმოვანი მჟავების β დაჟანგვაზე პასუხისმგებელი ბირთვული რეცეპტორის PPARα-ს და ტრანსკრიპციის კო-აქტივატორის PGC1α-ს ექსპრესიის დონე, გარდა ამისა *de novo* ლიპოგენეზის მარეგულირებელი ტრანსკრიპციული ფაქტორების (SREBP-1c, ChREBP) დონე ვესტერნ ბლოტინგის მეთოდით. აგრეთვე მნიშვნელოვანია, რეზვერატროლით მოქმედებისას, ამ მოლეკულების შეფასება Sirt1-ს და PARP-1-ს დათრგუნვის პირობებში.

ბიბლიოგრაფია

ბეჟუაშვილი მ. ვაზის და მუხის მერქნის ლიგნინის კონვერსიის თეორიული საფუძვლების შემუშავება და მიღებული პროდუქტების გამოყენების გზების განსაზღვრა. სადოქტორო დისერტაცია, საქართველოს მეზღაღობის, მევენახეობისა და მეღვინეობის სამეცნიერო კვლევითი ინსტიტუტი, 1994.

ვეფხიშვილი ნ. ბიოლოგიურად აქტიური ზოგიერთი სტილბენის გამოკვლევა ქართულ წითელ ღვინოებში და მათი ტექნოლოგიური გამოყენება. სადოქტორო დისერტაცია, ი. გოგებაშვილის სახელობის თელავის სახელმწიფო უნივერსიტეტი, 2012.

კობტაშვილი მ., პატარაია მ., ბეჟუაშვილი მ. რესვერატროლის გავლენა ღვინის ზოგიერთ საფუარის გამრავლების ინტენსივობაზე ალკოჰოლური დუღილის პროცესში. *ვაზი და ღვინო*, 1 (1999), 47–54.

კობტაშვილი მ. რესვერატროლის შესწავლა ზოგიერთ სტანდარტულ ფერადყურძნიან ვაზის ჯიშებსა და მათგან წარმოებულ ღვინოებში. სადოქტორო დისერტაცია, საქართველოს მეზღაღობის, მევენახეობისა და მეღვინეობის სამეცნიერო კვლევითი ინსტიტუტი, 2006.

მესხი მ. კახური ტიპის თეთრი ღვინის სამკურნალო-კვებითი ღირებულების ამაღლება სტილბენური ნაერთებით. სადოქტორო დისერტაცია, საქართველოს მეზღაღობის, მევენახეობისა და მეღვინეობის სამეცნიერო კვლევითი ინსტიტუტი, 2006.

სურგულაძე მ. სტილბენოიდების-რესვერატროლის წარმოებულების იდენტიფიკაცია და ტრანსფორმაცია საფერავის (*Vitis vinifera* L.) ყურძნიდან ღვინოში. სადოქტორო დისერტაცია, საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტი, 2019.

Бежуашвили М.Г., Месхи М. Ю., Бостоганашвили М. В., Малания М. А. Фенольные источники и антиоксидантная активность виноматериалов, предназначенных для вин катехинского типа. *Виноделие и Виноградарство*, 5 (2005): 28-29.

Abou-Zeid LA., El-Mowafy AM. Differential recognition of resveratrol isomers by the human estrogen receptor-alpha: molecular dynamics evidence for stereoselective ligand binding. *Chirality*, 16(3) (2004): 190-5.

Adrian M., Jeandet P., Bessis R., Joubert J. M. Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminum chloride (AlCl₃). *J. Agric. Food Chem.*, 44 (1996): 1979-1981.

Adrian M., Jeandet P., Douillet-Breuil AC., Tesson L., Bessis R. Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000): 6103-6105.

Adrian M., Jeandet P., Veneau, J., Weston L. A. and Bessis R. Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *J. Chem. Ecol.*, 23(7) (1997): 1689-1702.

Adrian M., Rajaei H., Jeandet P., Veneau J. and Bessis R. Resveratrol Oxidation in *Botrytis cinerea* Conidia. *Phytopathology*, 88(5) (1998): 472-476.

Akazawa Y., Cazanave S., Mott J.L., et al. Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. *J Hepatol.*, 52 (4) (2010): 586-593.

Alisi A., Carpino G., Oliveira FL., Panera N., Nobili V., Gaudio E. The Role of Tissue Macrophage-Mediated Inflammation on NAFLD Pathogenesis and Its Clinical Implications. *Mediators Inflamm.*, (2017): 8162421.

Althaher AR. An Overview of Hormone-Sensitive Lipase (HSL). *ScientificWorld Journal.*, 2022 (2022): 1964684. <https://doi.org/10.1155/2022/1964684>.

Alvarez-Guardia D., Palomer X., Coll T., Davidson MM., Chan TO., Feldman AM., Laguna JC., Vázquez-Carrera M. The p65 subunit of NF-kappaB binds to PGC-1alpha, linking inflammation and metabolic disturbances in cardiac cells. *Cardiovasc. Res.*, 87 (2010): 449–458.

Amri A., Chaumeil JC., Sfar S. and Charrueau C. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *Journal of Controlled Release: official Journal of the Controlled Release Society*, 158 (2) (2012): 182–193.

Andrade JM., Paraíso AF., De Oliveira MV., Martins AM., Neto JF., Guimarães AL., De Paula AM., Qureshi M., Santos SH. Resveratrol attenuates hepatic steatosis in high-fat fed mice by decreasing lipogenesis and inflammation. *Nutrition*, 30(7-8) (2014): 915-9.

Andres-Lacueva C., Macarulla MT., Rotches-Ribalta M., Boto-Ordóñez M., Urpi-Sarda M., Rodríguez VM., et al. Distribution of resveratrol metabolites in liver, adipose tissue, and skeletal muscle in rats fed different doses of this polyphenol. *J Agric Food Chem.*, 60 (2012): 4833–40.

Arroyave-Ospina JC., Wu Z., Geng Y., Moshage H. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Implications for Prevention and Therapy. *Antioxidants*, 10(2) (2021): 174.

Arruda A. P. & Hotamisligil G. S. Calcium homeostasis and organelle function in the pathogenesis of obesity and diabetes. *Cell Metab.*, 22 (2015): 381–397.

Arruda AP., et al. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum–mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nat. Med.*, 20 (2014): 1427–1435.

Asghari S., Asghari-Jafarabadi M., Somi MH., Ghavami SM., Rafrat M. Comparison of Calorie-Restricted Diet and Resveratrol Supplementation on Anthropometric Indices, Metabolic Parameters, and Serum Sirtuin-1 Levels in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Controlled Clinical Trial. *J Am Coll Nutr.* 2018;37(3): 223–233.

Bai P, Cantó C, Oudart H, Brunyánszki A, Cen Y, Thomas C, Yamamoto H, Huber A, Kiss B, Houtkooper RH, et al. PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation. *Cell Metab.*, 13 (2011b): 461–468.

Bai P., Canto C. The role of PARP-1 and PARP-2 enzymes in metabolic regulation and disease. *Cell Metab.*, 16 (2012): 290–295.

Barroso WA., Victorino VJ., Jeremias IC., Petroni RC., Ariga SK. K., Salles, T. A., De Souza, H. P. High-fat diet inhibits PGC-1 α suppressive effect on NF κ B signaling in hepatocytes. *European Journal of Nutrition*, 57(5) (2017): 1891–1900.

Basuray S., Smagris E., Cohen JC., Hobbs HH. The PNPLA3 variant associated with fatty liver disease (I148M) accumulates on lipid droplets by evading ubiquitylation. *Hepatology*, 66 (2017): 1111–1124.

Baur JA., Pearson KJ., Price NL., Jamieson HA., Lerin C., Kalra A., et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444 (2006): 337–42.

Baur JA., Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov.* 5(2006): 493–506.

Bavaresco L., Petegolli, D., Cantu E., Fregoni M., Chiusa G., Trevisan M. Elicitation and accumulation of stilbene phytoalexins in grapevine berries infected by *Botrytis cinerea*. *Vitis*, 36 (2) (1997): 77–83.

Bechmann LP., Gieseler RK., Sowa JP., et al. Apoptosis is associated with CD36/fatty acid translocase upregulation in non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int.*, 30(6) (2010): 850–859.

Bezhuashvili M., Bavaresco L., Surguladze M, Tskhvedadze L., Shoshiashvili G, Gagunashvili L, Elanidze L, Vashakidze P. Stress-metabolite stilbenoids of grape skin of varieties Aleksandrouli and Mujuretuli (*Vitis vinifera* L.) in condition of Gray mold. AGRICULTURE & FOOD, 9th International Conference, Burgas, Bulgaria, August 16-19, 2021.

Bezhuashvili M., Tskhvedadze L., Surguladze M., Shoshiashvili G., Kharadze Sh., Gagunashvili L., Elanidze L., Vashakidze P. Stress-metabolites phytoalexins -stilbenoids of grape skin Rkatsiteli

variety (*Vitis vinifera* L.) in condition gray mildew. *EurAsian Journal of BioSciences*, 13(2019): 1-6.

Bezhuashvili, M., Bavaresco L., Surguladze M., Kharadze S., Shoshiashvili G., Darchiashvili N. and Vashakidze P. "Change of Phytoalexin Stilbenoids in the Vine Trunk (*Vitis vinifera* L.) under Crown Gall Infection (*Agrobacterium tumefaciens*)." *Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences* 18(2) (2024): 133–139.

Bezhuashvili M., Bavaresco L., Kharadze S., Surguladze M., Shoshiashvili G., Gagunashvili L., Elanidze L. and Vashakidze P. Stress-Metabolite Stilbenoids in Vine Trunk of Ojaleshi Grape Variety (*Vitis vinifera* L.) under Crown Gall Infection. *Journal of Chemical Health Risks*, 11 (3) (2021): 299–304.

Bezhuashvili M., Tskhvedadze L., Surguladze M., Shoshiashvili G., Elanidze L., Vashakidze P. Change of phytoalexins -stilbenoids of vine leave Tsitska variety (*Vitis vinifera* L.) in condition Downy mildew. *EurAsian Journal of BioSciences*, 14 (2020): 167-171.

Bezhuashvili M., Bavaresco L., Surguladze M., Tskhvedadze L., Shoshiashvili G., Darchiashvili N. and Vashakidze P. Phytoalexin stilbenoids of *V. vinifera* L cvs. Saperavi and Rkatsiteli as related to the grapevine resistance against gray mold (*Botrytis cinerea*) and to the healthy attributes of the wine. 44nd World congress of Vine and Wine., Cadiz-Jerez, Spain, 05-09 june, 2023.

Bezhuashvili M., Bavaresco L., Surguladze M., Tskhvedadze L., Shoshiashvili G., Darchiashvili N. and Vashakidze P. Change of phytoalexin stilbenoids of *Vitis vinifera* L. cvs. Rkatsiteli and Saperavi under powdery mildew infection in the lab and in the vineyard. 45nd World congress of Vine and Wine, France, Dijon, 14 - 18 October, 2024.

Bezhuashvili M., Kharadze Sh., Surguladze M., Bavaresco L., Shoshiashvili G., Gagunashvili L., Elanidze L., Vashakidze P. Phytoalexins stilbenoids of *V. vinifera* L. cvs. Saperavi and Rkatsiteli in relation to crown gall infection". 42 nd World congress of Vine and Wine., Geneva, Switzerland. 15-20 july, 2019.

Bi J., Sun K., Wu H., Chen X., Tang H., Mao J. PPAR γ alleviated hepatocyte steatosis through reducing SOCS3 by inhibiting JAK2/STAT3 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.*, 498(4) (2018):1037-1044.

Bo S., et al. Impact of sirtuin-1 expression on H3K56 acetylation and oxidative stress: a double-blind randomized controlled trial with resveratrol supplementation. *Acta Diabetol.*, 55 (2018): 331–340.

Bode LM., Bunzel D., Huch M., Cho G-S., Ruhland D., Bunzel M., et al. In vivo and in vitro metabolism of trans-resveratrol by human gut microbiota. *Am J Clin Nutr.*, 97(2013): 295–309.

Bonkowski MS., Sinclair DA. Slowing ageing by design: the rise of NAD⁺ and sirtuin-activating compounds. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.*, 17(11) (2016): 679–690.

Bowers JL., et al. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 141 (2000): 3657–3667.

Bravo R., Gutierrez T., Paredes F., Gatica D., Rodriguez AE., Pedrozo Z., Chiong M., Parra V., Quest AF., Rothermel BA. and Lavandero S. Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics. *Int J Biochem Cell Biol* 44 (2011): 16–20.

Bresciani L, Calani L, Bocchi L, Delucchi F, Savi M, Ray S, et al. Bioaccumulation of resveratrol metabolites in myocardial tissue is dose-time dependent and related to cardiac hemodynamics in diabetic rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 24(2014): 408–15.

Breuil AC., Jeandet P., Adrian M., Chopin F., Pirio N., Meunier P. and Bessis R. Characterization of a Pterostilbene Dehydrodimer Produced by Laccase of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 89(4) (1999): 298-302.

Bricambert J., Miranda J., Benhamed F., Girard J., Postic C., Dentin R. Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest.* 120 (2010): 4316–31.

Bril F., Lomonaco R., Orsak B., Ortiz-Lopez C., Webb A., Tio F., Hecht, J., Cusi K. Relationship between disease severity, hyperinsulinemia, and impaired insulin clearance in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 59 (2014): 2178–2187.

Brown, K., Theofanous, D., Britton, R. G., Aburido, G., Pepper, C., Sri Undru, S., & Howells, L. Resveratrol for the management of human health: How far have we come? A systematic review of resveratrol clinical trials to highlight gaps and opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(2024): 747.

Brown M. S. & Goldstein J. L. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab.*, 7(2008): 95–96.

Brun P., Castagliuolo I., Di Leo V., Buda A., Pinzani M., Palu G., Martines D. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292(2007): G518–G525.

Brunner KT., Henneberg CJ., Wilechansky RM., Long MT. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Obesity Treatment. *Curr Obes Rep.*, 8(3) (2019) 220-228. doi: 10.1007/s13679-019-00345-1.

Bujanda L., Hijona E., Larzabal M., Beraza M., Aldazabal P., García-Urkia N., Sarasqueta C., Cosme A., Irastorza B., González A., Arenas JI. Resveratrol inhibits nonalcoholic fatty liver disease in rats. *BMC Gastroenterol.*, 8 (2008): 40.

Burns J., Yokota T., Ashihara H., Lean M. E. and Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J. Agric. Food. Chem.*, 50(2002), 3337–3340.

Byrne CD., Targher G. Ectopic fat, insulin resistance, and nonalcoholic fatty liver disease: implications for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 34(6) (2014): 1155-61.

Cai H. et al. Cancer chemoprevention: evidence of a nonlinear dose response for the protective effects of resveratrol in humans and mice. *Sci. Transl. Med.*, 7(2015): 298ra117.

Cant C., Gerhart-Hines Z., Feige J. N., Lagouge M., Noriega L., Milne J. C., Elliott P. J., Puigserver P., Auwerx J. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, 458(2009): 1056–1060.

Cao SS., Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxid Redox Signal.*, 21(3) (2014) 396-413.

Carling D. Ampk Signalling in Health and Disease. *Curr Opin Cell Biol.*, 45(2017): 31–7.

Castellano-Castillo D., Denechaud PD., Fajas L., Moreno-Indias I., Oliva-Olivera W., Tinahones F., Queipo-Ortuño MI., Cardona F. Human adipose tissue H3K4me3 histone mark in adipogenic, lipid metabolism and inflammatory genes is positively associated with BMI and HOMA-IR. *PLoS One*, 14 (2019): e0215083.

Catalgol B., Batirel S., Taga Y., Ozer NK. Resveratrol: French paradox revisited. *Front Pharmacol.*, 3 (2012): 141141.

Chalasani N., Younossi Z., Lavine JE., Charlton M., Cusi K., Rinella M., et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases: hepatology, 2017. *Hepatology*, 67 (2018): 328–57.

Chalasani N., Younossi Z., LaVine J.E., Diehl A.M., Brunt E.M., Cusi K., Charlton M., Sanyal A.J. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*, 55(2012): 2005–2023.

Chanas SA., Jiang Q., McMahon M., McWalter GK., McLellan LI., Elcombe CR., Henderson CJ., Wolf CR., Moffat GJ., Itoh K., Yamamoto M. and Hayes JD. Loss of the Nrf2 transcription factor

causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. *Biochem J.*, 365 (2002): 405–416.

Chang HC., Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol Metab.*, 25(3) (2014):138–45.

Chávarri M. and Villarán MC. Encapsulation Technologies for Resveratrol in Functional Food. In *Functional Foods and Nutraceuticals*, edited by Jorge Carlos Ruiz Ruiz and Maira Rubi Segura Campos. Wiley, 2016. <https://doi.org/10.1002/9781119227625.ch8>.

Chen Z., Tian R., She Z., Cai J. & Li H. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biology and Medicine* 152 (2020): 116–141.

Chen J., Chen J., Fu H., Li Y., Wang L., Luo S., et al. Hypoxia exacerbates nonalcoholic fatty liver disease via the HIF-2 α /PPAR α pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 317(2019): E710–22.

Chen Y., Zhang J., Cui W., Silverstein RL. CD36, a signaling receptor and fatty acid transporter that regulates immune cell metabolism and fate. *J Exp Med.*, 219(6) (2022): e20211314. doi: 10.1084/jem.20211314.

Chen F., Wang M., O'Connor J.P., He M., Tripathi T. and Harrison L.E. Phosphorylation of PPAR γ via active ERK1/2 leads to its physical association with p65 and inhibition of NF- κ B. *J. Cell. Biochem.* 90(2003): 732–744.

Chen Z., Tian R., She Z., Cai J. and Li H. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 152 (2020): 116–141.

Chowdhry S., Nazmy MH., Meakin PJ., Dinkova-Kostova AT., Walsh SV., Tsujita T., Dillon JF., Ashford ML., Hayes JD. Loss of Nrf2 markedly exacerbates nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med.*, 48 (2010): 357–371.

Cohen JC., Horton JD., Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*, 332 (2011): 1519–23.

Cullinan SB., Diehl JA. Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol.*, 38(2006): 317–332.

Cusi K., Isaacs S., Barb D., et al. American Association of Clinical Endocrinology Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Primary Care

and Endocrinology Clinical Settings: Co-Sponsored by the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). *Endocr Pract.*, 28(5) (2022): 528–562.

Dasu MR., Devaraj S., Park S., Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 33 (2010): 861–868.

Day CP., James OF. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology*, 114(4) (1998): 842–845. doi:10.1016/s0016-5085(98)70599-2.

Davidov-Pardo G. and McClements DJ. Resveratrol encapsulation: Designing delivery systems to overcome solubility, stability and bioavailability issues. *Trends Food Sci. Technol.*, 38(2014): 88.

De La Serre CB., Ellis CL., Lee J., Hartman AL., Rutledge JC., Raybould HE. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 299 (2010): G440–G448.

Delmas D., Aires V., Limagne E., Dutartre P., Mazué F., Ghiringhelli F., Latruffe N. Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci.* 1215(2011): 48-59.

Deng XQ., Chen LL., Li NX. The expression of SIRT1 in nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in rats. *Liver Int.* 27(2007): 708–15.

Denton R. M. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1787(2009): 1309–1316.

Ding RB., Bao J., Deng CX. Emerging roles of SIRT1 in fatty liver diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 13(7) (2017): 852–867.

Donnelly KL., Smith CI., Schwarzenberg SJ., Jessurun J., Boldt MD., Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.*, 115(2005):1343–1351.

Donnez D., Jeandet P., Clement C., Courot E. Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. *Trends Biotechnol*, 27(2009):706–713.

Dowman JK., Tomlinson JW., Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM*, 103(2) (2010): 71–83.

Egnatchik RA., Leamy AK., Jacobson DA., Shiota M. and Young J. D. ER calcium release promotes mitochondrial dysfunction and hepatic cell lipotoxicity in response to palmitate overload. *Mol. Metab.*, 3(2014): 544–553.

- Eisele PS., Handschin C. Functional crosstalk of PGC-1 coactivators and inflammation in skeletal muscle pathophysiology. *Semin. Immunopathol.*, 36 (2014): 27–53.
- Erener S., Hesse M., Kostadinova R., Hottiger MO. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) controls adipogenic gene expression and adipocyte function. *Mol. Endocrinol.*, 26 (1) (2012): 79–86.
- Erener S., Mirsaidi A., Hesse M., Tiaden AN., Ellingsgaard H., Kostadinova R., Donath MY., Richards PJ., Hottiger MO. ARTD1 deletion causes increased hepatic lipid accumulation in mice fed a high-fat diet and impairs adipocyte function and differentiation. *FASEB J.*, 26 (2012b.): 2631–2638.
- Erridge C., Samani NJ. Saturated Fatty Acids Do Not Directly Stimulate Toll-Like Receptor Signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 29(2009):1944–9. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.194050
- Eslam M., Sanyal AJ., George J. International Consensus Panel. MAFLD: a consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease. *Gastroenterology*, 158(7) (2020): 1999–2014.
- Esler WP., Bence KK. Metabolic targets in nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.*, 8(2) (2019): 247–267.
- Feng Y., Sun W., Sun F., Yin G., Liang P., Chen S., Liu X., Jiang T., Zhang F. Biological Mechanisms and Related Natural Inhibitors of CD36 in Nonalcoholic Fatty Liver. *Drug Des Devel Ther.*, 16(2022): 3829–3845.
- Fernandez-Veledo S., Vila-Bedmar R., Nieto-Vazquez I., Lorenzo M. C-Jun N-terminal kinase 1/2 activation by tumor necrosis factor- α induces insulin resistance in human visceral but not subcutaneous adipocytes: reversal by liver X receptor agonists. *J Clin Endocrinol Metab.*, 94(9) (2009): 3583–3593. doi: 10.1210/jc.2009-0558.
- Ferre P. & Foufelle F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes. Metab.*, 12(2) (2010): 83–92.
- Filhoulaud G., Guilmeau S., Dentin R., Girard J., Postic C. Novel insights into ChREBP regulation and function. *Trends Endocrinol Metab.*, 24(2013): 257–68.
- Frasinariu OE., Ceccarelli S., Alisi A., Moraru E., Nobili V. Gut-liver axis and fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: an input for novel therapies. *Digestive and Liver Disease*, 45(7) (2013):543–551.

Friedman SL., Neuschwander-Tetri BA., Rinella M., Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat. Med.*, 24(2018): 908–922. doi: 10.1038/s41591-018-0104-9.

Fu G., Xu T., Shi Y., Wei N., Yang XL. tRNA-controlled nuclear import of a human tRNA synthetase. *J Biol Chem.*, 287(12) (2012): 9330-4.

Fu S., Yang L., Li P., Hofmann O., Dicker L., Hide W., Lin X., Watkins S.M., Ivanov A.R., Hotamisligil G.S. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature*, 473(2011):528–531.

Fulco M., Schiltz RL., Iezzi S., King MT., Zhao P., Kashiwaya Y., et al. Sir2 Regulates Skeletal Muscle Differentiation as a Potential Sensor of the Redox State. *Mol Cell*, 12(1) (2003): 51–62.

Gal R., Deres L., Horvath O., Eros K., Sandor B., Urban P., Soos S., Marton Z., Sumegi B., Toth K., Habon T. & Halmosi, R. Resveratrol Improves Heart Function by Moderating Inflammatory Processes in Patients with Systolic Heart Failure. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(11), (2020): 1108. <https://doi.org/10.3390/antiox9111108>.

Gambini J., Inglés M., Olaso G., Lopez-Grueso R., Bonet-Costa V., Gimeno-Mallench L., Mas-Bargues C., Abdelaziz KM., Gomez-Cabrera MC., Vina J., Borrás C. Properties of Resveratrol: *In Vitro* and *In Vivo* Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2015(2015): 837042.

García-Ruiz C., Fernández-Checa JC. Mitochondrial Oxidative Stress and Antioxidants Balance in Fatty Liver Disease. *Hepatol Commun.*, 2(2018): 1425-391.

Gastaldelli A., Sabatini S., Carli F., Gaggini M., Bril F., Belfort-DeAguiar R., Positano V., Barb D., Kadiyala S., Harrison S., Cusi K. PPAR- γ -induced changes in visceral fat and adiponectin levels are associated with improvement of steatohepatitis in patients with NASH. *Liver Int.*, 41(11) (2021): 2659-2670.

Shoshiashvili G., Darchiashvili N., Vashakidze P. Phytoalexin stilbenoids of Saperavi and Rkatsiteli (*Vitis vinifera* L.) as biomarkers of resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences*, 17(2) (2023):135-141.

Gomez-Zorita S., Tréguer K., Mercader J., Carpené C. Resveratrol directly affects in vitro lipolysis and glucose transport in human fat cells. *J. Physiol. Biochem.*, 69 (2013): 585–593.

Gongol B., Marin T., Peng IC., Woo B., Martin M., King S., Sun W., Johnson DA., Chien S., Shyy JY. AMPK α 2 exerts its anti-inflammatory effects through PARP-1 and Bcl-6. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(8) (2013): 3161-6.

Gowd V., Karim N., Shishir MRI., Xie LH, and Chen, W. Dietary polyphenols to combat the metabolic diseases via altering gut microbiota. *Trends Food Sci Technol.*, 93 (2019): 81–93.

Grander C., Grabherr F., Tilg H. Non-alcoholic fatty liver disease: pathophysiological concepts and treatment options. *Cardiovasc Res.*, 119(9) (2023) :1787-1798. doi: 10.1093/cvr/cvad095.

Gruber S., Nickel A. Toxic or not toxic? The specifications of the standard ISO 10993-5 are not explicit enough to yield comparable results in the cytotoxicity assessment of an identical medical device. *Front Med Technol.*, 5(2023): 1195529.

Hajjighasem A., Farzanegi P., Mazaheri Z., Naghizadeh M., Salehi G. Effects of resveratrol, exercises and their combination on Farnesoid X receptor, Liver X receptor and Sirtuin 1 gene expression and apoptosis in the liver of elderly rats with nonalcoholic fatty liver. *Peer J.*, 6 (2018): e5522.

Han J., Kaufman RJ. The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. *J Lipid Res.*, 57(8) (2016):1329-38.

Han J., Li E., Chen L., et al. The CREB coactivator CRTC2 controls hepatic lipid metabolism by regulating SREBP1. *Nature*, 524(7564) (2015): 243–246. doi:10.1038/nature14557.

Hao L., Chai Z. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and intervention. *Precision Nutrition*, 2(1) (2023): p e00029.

Harrison SA., Taub R., Neff GW., et al. Resmetirom for nonalcoholic fatty liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Nat Med.*, 29(2023): 2919-2928.

Hasan M., Bae H. An Overview of Stress-Induced Resveratrol Synthesis in Grapes: Perspectives for Resveratrol-Enriched Grape Products. *Molecules*, 22(2) (2017): 294.

He C., Xu J., Zhang J., Xie D., Ye H., Xiao Z., Cai M., Xu K., Zeng Y., Li H., Wang J. High expression of trimethylated histone H3 lysine 4 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol.*, 43(9) (2012): 1425-35.

Ho CM., Ho SL., Jeng YM., Lai YS., Chen YH., Lu SC. Accumulation of free cholesterol and oxidized low-density lipoprotein is associated with portal inflammation and fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Inflamm.*, 16 (2019): 7.

Houtkooper R.H., Auwerx J. Exploring the therapeutic space around NAD⁺. *J Cell Biol.*, 199(2) (2012): 205–209.

Howitz KT., Bitterman KJ., Cohen HY., Lamming DW., Lavu S., Wood JG., Zipkin RE., Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA: Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425(2003): 191-196.

Huang S., Zhang B., Chen Y., Liu H., Liu Y., Li X., Bao Z., Song Z., Wang Z. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor PJ34 attenuated hepatic triglyceride accumulation in alcoholic fatty liver disease in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 364 (2018): 452–461.

Huang Y., Cohen JC., Hobbs HH. Expression and characterization of a PNPLA3 protein isoform (I148M) associated with nonalcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem.*, 286 (2011): 37085-37093.

Hyslop PA., York DA. & Corina DL. Changes in the composition and fluidity of membranes in obese (ob/ob) mice: a study of hepatic microsomal NADPHcytochrome P450 oxidoreductase activity. *Int. J. Obes.*, 6 (1982): 279–289.

Jager S., Handschin C., St-Pierre J., Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104 (2007):12017–22.

Janabi M., et al. Oxidized LDL-induced NF-kappa B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 20 (2000): 1953–60.

Jang M., Cai L., Udeani GO., Slowing KV., Thomas CF., Beecher CW., et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275(1997): 218–20.

Jawad RA. & Sahib HB. Estimation the safety of parenteral resveratrol in mice. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31 (2022):167–175.

Jeandet P., Douillet-Breuil A., Bessis R., Debord S., Sbaghi M., Adrian M., Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, Phytoalexin Gene Expression in Transgenic Plants, Antifungal Activity, and Metabolism. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002): 2731–2741.

Jena AB., Samal RR., Bhol NK., Duttaroy AK. Cellular Red-Ox System in Health and Disease: The Latest Update. *Biomed. Pharmacother.*, 162(2023):114606.

Jiang HY., Wek SA., McGrath BC., Scheuner D., Kaufman RJ., Cavener DR., Wek RC. Phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF-kappaB in response to diverse cellular stresses. *Mol Cell Biol.*, 23(2003): 5651–5663.

- Jo H. et al. Endoplasmic reticulum stress induces hepatic steatosis via increased expression of the hepatic very low-density lipoprotein receptor. *Hepatology*, 57(2013): 1366–1377.
- Jun HJ., Kim J., Hoang MH., Lee SJ. Hepatic lipid accumulation alters global histone H3 Lysine 9 and 4 trimethylation in the peroxisome proliferator-activated receptor α network. *PLoS ONE*, 7(2012): 1575.
- Kakazu E., Mauer AS., Yin M., Malhi H. Hepatocytes release ceramide-enriched pro-inflammatory extracellular vesicles in an IRE1 α -dependent manner. *J Lipid Res.*, 57(2) (2016): 233–45.
- Kammoun HL., Chabanon H., Hainault I., Luquet S., Magnan C., Koike T., Ferre P. and Fofonova F. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J. Clin. Invest.*, 119(2009) :1201–1215.
- Kanaan GN., Harper ME. Cellular redox dysfunction in the development of cardiovascular diseases. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.*, 1861(2017): 2822–9.
- Karkucinska-Wieckowska A., Simoes I.C.M., Kalinowski P., Lebiedzinska-Arciszewska M., Zieniewicz K., Milkiewicz P., Górska-Ponikowska M., Pinton P., Malik A.N., Krawczyk M., et al. Mitochondria, oxidative stress and nonalcoholic fatty liver disease: A complex relationship. *Eur. J. Clin. Investig.*, 52(3) (2021): e13622.
- Khader A., Yang WL., Kuncewitch M., et al. Sirtuin 1 activation stimulates mitochondrial biogenesis and attenuates renal injury after ischemia-reperfusion. *Transplantation*, 98(2) (2014): 148–156.
- Kim JE., Chen J. and Lou Z. DBC1 is a negative regulator of SIRT1. *Nature*, 451(2008): 583–586.
- Kim SY., Jeong JM., Kim S.J., et al. Pro-inflammatory hepatic macrophages generate ROS through NADPH oxidase 2 via endocytosis of monomeric TLR4–MD2 complex. *Nat Commun.*, 8(2017): 2247.
- Kim HJ., et al. Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice. *J. Proteome Res.*, 10 (2011): 722–731.
- Kimura Y., Sumiyoshi M. Resveratrol Prevents Tumor Growth and Metastasis by Inhibiting Lymphangiogenesis and M2 Macrophage Activation and Differentiation in Tumor-associated Macrophages. *Nutr. Cancer*, 68 (2016): 667–678.
- Klatsky A., Armstrong M., Friedman G. Red wine, white wine, liquor, beer and risk for coronary artery disease hospitalization. *American Journal of Cardiology*, 80(4) (1997): 416–420.

Klotz LO., Sánchez-Ramos C., Prieto-Arroyo I., Urbánek P., Steinbrenner H., Monsalve M. Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol.*, 6 (2015): 51–72.

Koek GH., Liedorp PR., Bast A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin. Chim. Acta.*, 412 (2011): 1297–1305. doi: 10.1016/j.cca.2011.04.013.

Koek GH., Liedorp PR., Bast A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin. Chim. Acta.*, 412 (2011) :1297–1305. doi: 10.1016/j.cca.2011.04.013.

Kobayashi H., Suzuki TR., Funayama T., Nagashima M., Hayashi H., Sekine N., Tanaka T. Moriguchi H., Motohashi K., Nakayama M. Yamamoto Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat. Commun.*, 7 (2016): 11624.

Kokkorakis M., et al. Resmetirom, the first approved drug for the management of metabolic dysfunction-associated steatohepatitis: Trials, opportunities, and challenges. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 154 (2024): 155835.

Kolthur-Seetharam U., Dantzer F., McBurney MW., de Murcia G., Sassone-Corsi P. Control of AIF-mediated cell death by the functional interplay of SIRT1 and PARP-1 in response to DNA damage. *Cell Cycle*, 5 (2006): 873–877.

Kondo K., Matsumoto A., Kurata H., Tanahashi H., Koda H., Amachi T., Itakura H. Inhibition of oxidation of Low-Density Lipoprotein with red wine. *Lancet.*, 344 (1994): 115– 119.

Koshkina DO., Maluchenko NV., Korovina AN., Lobanova AA., Feofanov AV. and Studitsky VM. Resveratrol Inhibits Nucleosome Binding and Catalytic Activity of PARP1. *Biomolecules*, 14 (11) (2024): 1398.

Kraus WL. & Lis JT. PARP goes transcription. *Cell*, 113(2003): 677–683.

Krishnakumar R., Kraus WL. The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Mol Cell.*, 39(2010): 8–24.

Kuršvietienė L., Stanevičienė I., Mongirdienė A., Bernatoniienė J. Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. *Medicina (Kaunas)*, 52(3) (2016) :148-55.

Lagouge M., Argmann C., Gerhart-Hines Z., Meziane H., Lerin C., Daussin F., et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 alpha. *Cell*. 127 (2006): 1109–22.

Lan F., Weikel KA., Cacicedo JM., Ido Y. Resveratrol-Induced AMP-Activated Protein Kinase Activation Is Cell-Type Dependent: Lessons from Basic Research for Clinical Application. *Nutrients*, 9(7) (2017): 751.

Lan F., Cacicedo JM., Ido Y. Activation of AMPKK-AMPK cascade by silence information regulator 2 (sir2). *Diabetes*, 54(2005): A383.

Langcake P., Cornford CA., Pryce RJ. Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves. *Phytochemistry*, 18 (1979) :1025-1027.

Langcake P., Pryce R. J. The production of resveratrol by *Vitis Vinifera* and other members of the Vitaceaeas a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.*, 9 (1976): 77-86.

Langcake P. Disease resistance of *Vitis* spp and the production of the stress metabolites resveratrol, E-viniferin, R-viniferin and pterostilbene. *Physiol. Plant Pathol.*, 18 (1981): 213-226.

Lanz T., Tropf S., Marner F.J., Schroder J., Schroder G. The role of cysteines in polyketide synthases. Site-directed mutagenesis of resveratrol and chalcone synthases, two key enzymes in different plant-specific pathways. *J. Biol. Chem.*, 266 (1991): 9971–9976.

Lançon A., Delmas D., Osman H., Thénot JP., Jannin B., Latruffe N. Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process. *Biochem Biophys Res Commun*. 316(4) (2004): 1132-7.

Lau A. W., Liu P., Inuzuka H. and Gao D. SIRT1 phosphorylation by AMP-activated protein kinase regulates p53 acetylation. *Am. J. Cancer Res*. 4 (2014): 245–255.

Lee JH., Friso S., Choi SW. Epigenetic mechanisms underlying the link between non-alcoholic fatty liver diseases and nutrition. *Nutrients*, 6 (2014): 3303–3325.

Lee JN. & Ye J. Proteolytic activation of sterol regulatory element-binding protein induced by cellular stress through depletion of Insig-1. *J. Biol. Chem.*, 279 (2004): 45257–45265.

Lee JS., Mendez R., Heng, HH., Yang, ZQ. & Zhang, K. Pharmacological ER stress promotes hepatic lipogenesis and lipid droplet formation. *Am. J. Transl. Res.*, 4 (2012): 102–113.

Leo L. and Sunny ME. US FDA approves first drug for fatty liver disease NASH. *Reuters* 2024 Mar 14; [e-pub]

Li L., Fu J., Liu D., Sun J., Hou Y., Chen C., Shao J., Wang L., Wang X., Zhao R., Wang H., Andersen ME., Zhang Q., Xu Y., Pi J. Hepatocyte-specific Nrf2 deficiency mitigates high-fat diet-induced hepatic steatosis: Involvement of reduced PPAR γ expression. *Redox Biol.*, 30(2020): 101412.

Li S., Tan HY., Wang N., Zhang ZJ., Lao L., Wong CW., Feng Y. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 16 (2015): 26087–26124.

Li X., Zhang W., Cao Q., et al. Mitochondrial dysfunction in fibrotic diseases. *Cell death discovery*, 6(1) (2020): 80.

Li ZZ., Berk M., McIntyre TM., et al. Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease: role of stearyl-CoA desaturase. *J Biol Chem.*, 284(9) (2009): 5637–5644.

Lin HY., Ko CY., Kao TJ., et al. CYP17A1 Maintains the survival of glioblastomas by regulating SAR1-mediated endoplasmic reticulum health and redox homeostasis. *Cancers (Basel)*, 11(9) (2019): 1378.

Li J., Yu S., Ying J., Shi T., Wang P. Resveratrol prevents ROS-induced apoptosis in high glucose-treated retinal capillary endothelial cells via the activation of AMPK/Sirt1/PGC-1 α pathway. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2017 (2017): 7584691.

Lin HY., et al. Integrin α V β 3 contains a receptor site for resveratrol. *Faseb.J.*, 20 (2006): 1742–1744. doi: 10.1096/fj.06-5743fje.

Liu GH., Qu J., Shen X. NF- κ B/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1783(5) (2008): 713–727.

Liu L., Ke Y., Jiang X., He F., Pan L., Xu L., Zeng X., Ba X. Lipopolysaccharide activates ERK-PARP-1-RelA pathway and promotes nuclear factor- κ B transcription in murine macrophages. *Hum. Immunol.*, 73(2012): 439–447.

Liu JX., Li D., Zhang T., Tong Q., Ye RD., Lin LC. SIRT3 protects hepatocytes from oxidative injury by enhancing ROS scavenging and mitochondrial integrity. *Cell Death Dis.*, 8 (2017): e3158.

Luca S.V., Macovei I., Bujor A., Miron A., Skalicka-Woźniak K., Aprotosoaie A.C., Trifan A. Bioactivity of Dietary Polyphenols: The Role of Metabolites. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 60(2020): 626–659.

Luo W., Xu Q., Wang Q., Wu H., Hua J. Effect of modulation of PPAR- γ activity on Kupffer cells M1/M2 polarization in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep*. 7(2017): 44612.

Lyu K., Zhang Y., Zhang D., Kahn M., Ter Horst K.W., Rodrigues MRS., Gaspar RC., Hirabara SM., Luukkonen PK., Lee S., et al. A Membrane-Bound Diacylglycerol Species Induces PKC-Mediated Hepatic Insulin Resistance. *Cell Metab.*, 32 (2020): 654–664.e5.

Ma Y., Lee G., Heo SY., Roh YS. Oxidative Stress Is a Key Modulator in the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Antioxidants*, 11(1) (2022): 91.

Ma Y., Nie H., Chen H., Li J., Hong Y., Wang B., et al. Nad⁺/Nadh Metabolism and Nad⁺-Dependent Enzymes in Cell Death and Ischemic Brain Injury: Current Advances and Therapeutic Implications. *Curr Med Chem.*, 22(10) (2015): 1239–47.

Mankowski RT., et al. Higher dose of resveratrol elevated cardiovascular disease risk biomarker levels in overweight older adults - A pilot study. *Exp. Gerontol.*, 131(2020): 110821.

Mariani S., Fiore D., Basciani S., Persichetti A., Contini S., Lubrano C., Salvatori L., Lenzi A., Gnessi L. Plasma levels of SIRT1 associate with non-alcoholic fatty liver disease in obese patients. *Endocrine*, 49 (2015): 711- 716.

Marušić M., Paić M., Knobloch M., Liberati Pršo AM. NAFLD, insulin resistance, and diabetes mellitus type 2. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2021(2021): 6613827.

Mazhar IJ., Yasir M., Sarfraz S., Shlaghya G., Narayana SH., Mushtaq U., Shaman Ameen B., Nie C., Nechi D., Penumetcha SS. Vitamin E and Pioglitazone: A Comprehensive Systematic Review of Their Efficacy in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Cureus*, 15(8) (2023): e43635.

Petersen MC., Shulman GI. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev.*, 98(4) (2018): 2133–2223.

Meng D., Zhang F., Yu W., Zhang X., Yin G., Liang P., Feng Y., Chen S., Liu H. Biological Role and Related Natural Products of SIRT1 in Nonalcoholic Fatty Liver. *Diabetes Metab Syndr Obes.*, 16(2023): 4043-4064.

Meng Q., Li J., Wang C., et al. Biological function of resveratrol and its application in animal production: a review. *J Animal Sci Biotechnol.*, 14(2023): 25.

Michan S., Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J.* 404(2007): 1–13.

Middleton E. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Jr. Pharmacol. Rev.*, 52(4) (2000): 673- 751.

- Miele L., Alberelli MA., Martini M., Liguori A., Marrone G., Cocomazzi A., Vecchio F.M., Landolfi R., Gasbarrini A., Grieco A., et al. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) severity is associated to a nonhemostatic contribution and proinflammatory phenotype of platelets. *Transl. Res.*, 231(2021): 24–38.
- Miller ER., Pastor-Barriuso R., Dalal D., Riemersma RA., Appel LJ., Guallar E. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med.* 142(2005): 37.
- Mukhopadhyay P., Horváth B., Rajesh M., Varga ZV., Gariani K., Ryu D., Cao Z., Holovac E., Park O., Zhou Z., et al. PARP inhibition protects against alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.*, 66(2017): 589–600.
- Mukherjee S., Dudley JL., Das DK. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Dose Response.*, 8(4) (2010):478-500. doi: 10.2203/dose-response.09-015.Mukherjee.
- Murray PJ. The primary mechanism of the IL-10-regulated anti-inflammatory response is to selectively inhibit transcription, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 102 (2005): 8686-91.
- Nassir F., Ibdah J. A. Sirtuins and nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 22(46) (2016): 10084–10092.
- Niesen D., Hessler C. and Navindra SP. Beyond resveratrol: A review of natural stilbenoids identified from 2009–2013. *J. of Berry Research*, 3 (2013):181-196.
- Nin V., Escande C., Chini CC., Giri S., Camacho-Pereira J., Matalonga J., Lou Z., Chini EN. Role of deleted in breast cancer 1 (DBC1) protein in SIRT1 deacetylase activation induced by protein kinase A and AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.*, 287(28) (2012): 23489-501.
- Nogueira-de-Almeida CA. Metabolic syndrome definition in adolescents should incorporate insulin resistance. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.*, 25 (2020): 287–8.
- Novelle MG., Wahl D., Diéguez C., Bernier M., de Cabo R. Resveratrol supplementation: Where are we now and where should we go? *Ageing Res Rev.*, 21(2015): 1–15.
- Shimizu Y. Liver in systemic disease. *World J Gastroenterol.*, 14(26) (2008): 4111-4119. doi:10.3748/wjg.14.4111.
- Okada K., Warabi E., Sugimoto H., Horie M., Gotoh N., Tokushige K., Hashimoto E., Utsunomiya H., Takahashi H., Ishii T., et al. Deletion of Nrf2 leads to rapid progression of steatohepatitis in mice fed atherogenic plus high-fat diet. *J Gastroenterol.*, 48(2013): 620–632.

Okuno Y., Matsuda M., Miyata Y., Fukuhara A., Komuro R., Shimabukuro M., Shimomura I. Human catalase gene is regulated by peroxisome proliferator activated receptor-gamma through a response element distinct from that of mouse. *Endocr J.*, 57(4) (2010): 303-9.

Oliveira-Marques V., Marinho H. S., Cyrne L., Antunes F. Role of hydrogen peroxide in NF-kappaB activation: from inducer to modulator. *Antioxidants & redox signaling*, 11(9) (2009): 2223–2243.

Ota T., Gayet C., Ginsberg HN. Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *J Clin Invest.*, 118(1) (2008): 316-32. doi: 10.1172/JCI32752.

Ozcan U., et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*, 313(5790) (2006): 1137–1140. doi: 10.1126/science.1128294.

Ozcan U., et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*, 306 (2004): 457–461.

Pace-Asciak CR., Haln S., Diamandis EP., Soleas G. and Goldberg DM. The red wine phenolic trans-resveratrol and quercetin bloke human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. *Clinica chemista Acta.*, 235(1995): 207-221.

Pal D., Dasgupta S., Kundu R., Maitra S., Das G., Mukhopadhyay S., et al. Fetuin-A Acts as an Endogenous Ligand of TLR4 to Promote Lipid-Induced Insulin Resistance. *Nat Med.*, 18(2012): 1279–85. doi: 10.1038/nm.2851.

Pal M., Febbraio M. A. and Lancaster GI. The roles of c-Jun NH2-terminal kinases (JNKs) in obesity and insulin resistance. *J. Physiol.*, 594 (2016): 267–279.

Paul B., Masih I., Deopujari J., Charpentier C. Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakchasava, an ayurvedic medicine from India. *Journal of Ethnopharmacology*, 68(1–3) (1999): 71–76.

Peng TI. and Jou MJ. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1201 (2010): 183–188.

Pepino MY., Kuda O., Samovski D., Abumrad NA. Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism. *Annu Rev Nutr.* 34(2014): 281-303. doi: 10.1146/annurev-nutr-071812-161220.

Perumpail BJ., Khan MA., Yoo ER., Cholankeril G., Kim D., Ahmed A. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 23(2017): 8263–76.

Petersen MC., Madiraju AK., Gassaway BM., Marcel M., Nasiri AR., Butrico G., Marcucci MJ., Zhang D., Abulizi, A., Zhang, X.M., et al. Insulin receptor Thr1160 phosphorylation mediates lipid-induced hepatic insulin resistance. *J. Clin. Investig.*, 126 (2016): 4361–4371.

Petäjä EM., Yki-Järvinen H. Definitions of Normal Liver Fat and the Association of Insulin Sensitivity with Acquired and Genetic NAFLD-A Systematic Review. *Int J Mol Sci.*, 17(5) (2016): 633. doi: 10.3390/ijms17050633.

Pezet R., Pont V. Mise en évidence de pte'rostilbe`ne dans les grappes de Vitis vinifera. *Plant Physiol. Biochem.*, 26(1988):603–607.

Pfaffenbach KT., Gentile CL., Nivala AM., Wang D., Wei Y., Pagliassotti MJ. Linking endoplasmic reticulum stress to cell death in hepatocytes: roles of C/EBP homologous protein and chemical chaperones in palmitate-mediated cell death. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 298(5) (2010): E1027–35.

Pfluger PT., Herranz D., Velasco-Miguel S., Serrano M. and Tschöp M.H. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (28) (2008): 9793–9798.

Piazzolla VA., Mangia A. Noninvasive diagnosis of NAFLD and NASH. *Cells*, 9(4) (2020):1005.
Pierantonelli I., Svegliati-Baroni G. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Basic Pathogenetic Mechanisms in the Progression From NAFLD to NASH. *Transplantation*, 103(1) (2019): e1–e13.

Pillai JB., Isbatan A., Imai S., Gupta MP. Poly (ADP-ribose) polymerase-1-dependent cardiac myocyte cell death during heart failure is mediated by NAD⁺ depletion and reduced Sir2alpha deacetylase activity. *J Biol Chem.*, 280(2005):43121–43130.

Pirola CJ., Gianotti TF., Burgueño AL., Rey-Funes M., Loidl CF., Mallardi P., Martino JS., Castaño GO., Sookoian S. Epigenetic modification of liver mitochondrial DNA is associated with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Gut*, 62(2013):1356–1363.

Planas JM., Alfaras I., Colom H., Juan ME. The bioavailability and distribution of trans-resveratrol are constrained by ABC transporters. *Arch Biochem Biophys.*, 527(2012):67–73. doi: 10.1016/j.abb.2012.06.004.

Podrini C., Borghesan M., Greco A., Pazienza V., Mazzocchi G., Vinciguerra M. Redox homeostasis and epigenetics in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Curr Pharm Des.*, 19(2013):2737–2746.

Ponugoti B., Kim DH., Xiao Z., Smith Z., Miao J., Zang M., et al. SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism. *J Biol Chem.*, 285 (2010): 33959–70.

Porstmann T., Santos CR., Griffiths B., Cully M., Wu M., Leever S., et al. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab.*, 8(3) (2008): 224–36.

Pouwels S., Sakran N., Graham Y., Leal A., Pintar T., Yang W., Kassir R., Singhal R., Mahawar K., Ramnarain D. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss. *BMC Endocr Disord.*, 22(1) (2022):63. doi: 10.1186/s12902-022-00980-1.

Promlek T. et al. Membrane aberrancy and unfolded proteins activate the endoplasmic reticulum stress sensor Ire1 in different ways. *Mol. Biol. Cell.*, 22(2011): 3520–3532.

Purushotham A., Schug TT., Xu Q., Surapureddi S., Guo X., Li X. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab.*, 9(4) (2009):327–38.

Qiu W., Kohen-Avramoglu R., Mhapsekar S., Tsai J., Austin RC., Adeli K. Glucosamine-induced endoplasmic reticulum stress promotes ApoB100 degradation: evidence for Grp78-mediated targeting to proteasomal degradation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 25(2005): 571–577.

Qiu W., Zhang J., Dekker MJ., Wang H., Huang J., Brumell JH., and Adeli K. Hepatic autophagy mediates endoplasmic reticulum stress-induced degradation of misfolded apolipoprotein B. *Hepatology*, 53(5) (2011):1515–1525. doi:10.1002/hep.24269.

Rajamohan SB., Pillai VB., Gupta M., Sundaresan NR., Birukov KG., Samant S. SIRT1 promotes cell survival under stress by deacetylation-dependent deactivation of poly (ADP-ribose) polymerase 1. *Mol Cell Biol.*, 29(2009):4116–4129.

Ratajczak K., Glatzel-Plucińska N., Ratajczak-Wielgomas K., Nowińska K. and Borska S. Effect of Resveratrol Treatment on Human Pancreatic Cancer Cells through Alterations of Bcl-2 Family Members. *Molecules*, 21 (2021): 6560.

Renaud S., de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.*, 339(1992): 1523–6.

Rey E., Meléndez-Rodríguez F., Marañón P., Gil-Valle M., Carrasco AG., Torres-Capelli M., Chávez S., Del Pozo-Maroto E., Rodríguez de Cía J., Aragonés J., García-Monzón C., González-

Rodríguez Á. Hypoxia-inducible factor 2 α drives hepatosteatosis through the fatty acid translocase CD36. *Liver Int.*, 40(10) (2020):2553-2567.

Rivera CA. et al. Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.*, 47 (2007): 571–579.

Rodgers JT., Lerin C., Haas W., Gygi SP., Spiegelman BM., Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature*, 434(7029) (2005):113–118.

Romeo S., Kozlitina J., Xing C., et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet.*, 40(12) (2008):1461-1465. doi:10.1038/ng.257.

Saha S., Buttari B., Panieri E., Profumo E., Saso L. An overview of Nrf2 signaling pathway and its role in inflammation. *Molecules*, 25(22) (2020):5474.

Said A., Akhter A. Meta-analysis of randomized controlled trials of pharmacologic agents in non-alcoholic steatohepatitis. *Ann Hepatol.*, 16(4) (2017):538-547. doi: 10.5604/01.3001.0010.0284.

Sajish M., Schimmel P. A human tRNA synthetase is a potent PARP1-activating effector target for resveratrol. *Nature*, 519(7543) (2015):370–373.

Satapati S., Sunny NE., Kucejova B., et al. Elevated TCA cycle function in the pathology of diet-induced hepatic insulin resistance and fatty liver. *J Lipid Res.*, 53(6) (2012):1080-1092. doi:10.1194/jlr.M023382.

Sanyal AJ., Chalasani N., Kowdley KV., McCullough A., Diehl AM., Bass NM., et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med.*, 362(2010): 1675–85.

Schiewer MJ., Goodwin JF., Han S., Brenner JC., Augello MA., Dean JL., et al. Dual roles of PARP-1 promote cancer growth and progression. *Cancer Discov.*, 2(12) (2012): 1134–1149.

Schmidt MV., Brüne B., Von Knethen A. The nuclear hormone receptor PPAR γ as a therapeutic target in major diseases. *Scientific World Journal*, 10(2010):2181-97.

Scirpo R., Fiorotto R., Villani A., Amenduni M., Spirli C., Strazzabosco M. Stimulation of nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- γ limits NF- κ B-dependent inflammation in mouse cystic fibrosis biliary epithelium. *Hepatology*, 62(5) (2015):1551-62.

Sharifnia T., Antoun J., Verriere TG., Suarez G., Wattacheril J., Wilson KT., Peek RM, Abumrad NN., Flynn CR. Hepatic TLR4 signaling in obese NAFLD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 309(4) (2015): G270-8. doi: 10.1152/ajpgi.00304.2014.

Shelness GS., Ingram MF., Huang XF. and DeLozier JA. Apolipoprotein B in the rough endoplasmic reticulum: translation, translocation and the initiation of lipoprotein assembly. *J. Nutr.*, 129(1999): 456S–462S.

Shi Y., Qi W. Histone Modifications in NAFLD: Mechanisms and Potential Therapy. *Int J Mol Sci.*, 24(19) (2023):14653.

Shimozono R., Asaoka Y., Yoshizawa Y., Aoki T., Noda H., Yamada M., Kaino M., Mochizuki H. Nrf2 activators attenuate the progression of nonalcoholic steatohepatitis-related fibrosis in a dietary rat model. *Mol Pharmacol.*, 84(2013):62–70.

Shin SM., Cho IJ. and Kim SG. Resveratrol Protects Mitochondria against Oxidative Stress through AMP-Activated Protein Kinase-Mediated Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibition Downstream of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-LKB1 Pathway. *Molecular Pharmacology*, 76(4) (2009): 884–95.

Shin SK., Cho HW., Song SE., Song DK. Catalase and nonalcoholic fatty liver disease. *Pflugers Arch.*, 470(2018): 1721–1737.

Sica A., Invernizzi P., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology. *Hepatology*, 59(5) (2014):2034–2042. doi: 10.1002/hep.26754.

Simões ICM., Fontes A., Pinton P., Zischka H., Wieckowski MR. Mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 95(2018): 93–99.

Smirne C., Croce E., Di Benedetto D., Cantaluppi V., Comi C., Sainaghi PP., Minisini R., Grossini E., Pirisi M. Oxidative Stress in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Livers*, 2(2022): 30-76. <https://doi.org/10.3390/livers2010003>.

Sobczak M., Zyma M., Robaszkiewicz A. The Role of PARP1 in Monocyte and Macrophage Commitment and Specification: Future Perspectives and Limitations for the Treatment of Monocyte and Macrophage Relevant Diseases with PARP Inhibitors. *Cells*, 9(9) (2020): 2040.

Solleiro-Villavicencio H., Méndez-García LA., Ocampo-Aguilera NA., Baltazar-Pérez I., Arreola-Miranda JA., Aguayo-Guerrero JA., Alfaro-Cruz A., González-Chávez A., Fonseca-Sánchez MA., Fragoso JM., et al. Decreased Hepatic and Serum Levels of IL-10 Concur with Increased Lobular Inflammation in Morbidly Obese Patients. *Medicina*, 60(2024): 862.

Song J., Cheon SY., Jung W., Lee WT., Lee JE. Resveratrol induces the expression of interleukin-10 and brain-derived neurotrophic factor in BV2 microglia under hypoxia. *Int J Mol Sci.*, 15(9) (2014):15512-29. doi: 10.3390/ijms150915512.

Sood V., Lata S., Ramachandran VG., Banerjea AC. Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3) Degrades p65 and Regulate HIV-1 Replication. *Front Microbiol.*, 10(2019):114.

Sookoian S., Pirola CJ. Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 53(6) (2011):1883–1894.

Sookoian S., Pirola CJ. Systematic review with meta-analysis: risk factors for non-alcoholic fatty liver disease suggest a shared altered metabolic and cardiovascular profile between lean and obese patients. *Aliment Pharmacol Ther.*, 46(2) (2017):85–95. doi: 10.1111/apt.14112.

Saponaro CM., Gaggini F. Carli and Gastaldelli A. The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. *Nutrients*, 7(11) (2015): 9453–74.

Spiegel JO., Van Houten B., Durrant JD. PARP1: Structural insights and pharmacological targets for inhibition. *DNA Repair (Amst)*. 103(2021):103125.

Stervbo U., Vang O., Bonnesen C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chem.*, 101(2007):449–57.

Stewart CR., Stuart LM., Wilkinson K., Van Gils JM., Deng J., Halle A. et al. CD36 Ligands Promote Sterile Inflammation through Assembly of a Toll-Like Receptor 4 and 6 Heterodimer. *Nature Immunology*, 11 (2) (2010): 155–61.

Stienstra R., Saudale F., Duval C., Keshtkar S., Groener JE., et al. Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1beta-dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity. *Hepatology*, 51(2010): 511–522.

Sunny NE., Bril F., Cusi K. Mitochondrial adaptation in nonalcoholic fatty liver disease: novel mechanisms and treatment strategies. *Trends Endocrinol. Metab.*, 28(2017):250–260. doi: 10.1016/j.tem.2016.11.006.

Sunny NE., Bril F. and Cusi K. Mitochondrial adaptation in nonalcoholic fatty liver disease: novel mechanisms and treatment strategies. *Trends Endocrinol. Metab.*, 28(2017): 250–260.

Sutti S. & Albano E. Adaptive immunity: an emerging player in the progression of NAFLD. *Nature Reviews: Gastroenterology and Hepatology*, 17(2020): 81–92.

Svegliati-Baroni G., Pierantonelli I., Torquato P., et al. Lipidomic biomarkers and mechanisms of lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med.*, 144(2019): 293–309.

Szabo G., Bala S., Petrasek J., Gattu A. Gut-liver axis and sensing microbes. *Dig Dis.*, 28(2010): 737–744.

Szende B., Tyihák E., Király-Véghely Z. Dose-dependent effect of resveratrol on proliferation and apoptosis in endothelial and tumor cell cultures. *Exp. Mol. Med.*, 32(2000):88–92.

Takaoka MJ. Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.) *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido Imperial University*, 3(1940):1–16.

Tang BL. Sirt1 and the mitochondria. *Molecules and Cells*, 39(2) (2016): 87–95.

Tang YL., Zhu L., Tao Y., Lu W., Cheng H. Role of targeting TLR4 signaling axis in liver-related diseases. *Pathol Res Pract.*, 244(2023):154410.

Tao H., Hajri T. Very lowdensity lipoprotein receptor promotes adipocyte differentiation and mediates the proadipogenic effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Biochem. Pharmacol.*, 82(2011):1950–1962.

Tian Y., Ma J., Wang W., et al. Resveratrol supplement inhibited the NF- κ B inflammation pathway through activating AMPK α -SIRT1 pathway in mice with fatty liver. *Mol Cell Biochem.*, 422(1–2) (2016):75–84.

Tilg H., Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*, 52(2010):1836–1846.

Timmers S. et al. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metab.*, 14(2011): 612–622.

Toiber D., Sebastian C., Mostoslavsky R. Characterization of nuclear sirtuins: molecular mechanisms and physiological relevance. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 206(2011):189–224.

Trela BC., Waterhouse AL. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44(5) (1996):1253–1257.

Turner RS. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease. *Neurology*, 85(2015):1383–1391.

Urano F., Wang X., Bertolotti A., Zhang Y., Chung P., Harding HP., Ron D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, 287(5453) (2000):664-6.

Vachher M., Bansal S., Kumar B., Yadav S., Burman A. Deciphering the role of aberrant DNA methylation in NAFLD and NASH. *Heliyon*, 8(2022): e11119.

Valenzuela R., Espinosa A., González-Mañán D., D'Espessailles A., Fernández V., Videla LA., Tapia G. N-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation significantly reduces liver oxidative stress in high fat induced steatosis. *PLoS One*, 7(10) (2012): e46400.

Valle A., Álvarez-Barrientos E., Arza S., et al. PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovascular Research*, 66(3) (2005):562-573.

Vernia S., Cavanagh-Kyros J., Garcia-Haro L., Sabio G., Barrett T., Jung DY., Kim JK., Xu J., Shulha HP., Garber M., Gao G., Davis RJ. The PPAR α -FGF21 hormone axis contributes to metabolic regulation by the hepatic JNK signaling pathway. *Cell Metab.*, 20(3) (2014):512-25.

Vesely O., Baldovska S., Kolesarova A. Enhancing Bioavailability of Nutraceutically Used Resveratrol and Other Stilbenoids. *Nutrients*, 13(2021): 95.

Vespasiani-Gentilucci U., Carotti S., Perrone G., Mazzarelli C., Galati G., Onetti-Muda A., Picardi A., Morini S. Hepatic toll-like receptor 4 expression is associated with portal inflammation and fibrosis in patients with NAFLD. *Liver Int.*, 35(2015): 569-581.

Villena JA. New insights into PGC-1 coactivators: Redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. *FEBS J.*, 282(2015): 647-672.

Viscoli CM., Inzucchi SE., Young LH., Insogna KL., Conwit R., Furie KL., Gorman M., Kelly MA., Lovejoy AM., Kernan WN. IRIS Trial Investigators. Pioglitazone and Risk for Bone Fracture: Safety Data from a Randomized Clinical Trial. *J Clin Endocrinol Metab.*, 102(3) (2017):914-922.

Volmer R., Van der Ploeg K. & Ron D. Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 110 (2013): 4628-4633.

Voloshyna I., Hai O., Littlefield MJ., Carsons S., Reiss AB. Resveratrol mediates anti-atherogenic effects on cholesterol flux in human macrophages and endothelium via ppar γ and adenosine. *Eur. J. Pharmacol.*, 698 (2013): 299-309.

Waffo-Teguo P, Krisa S, Richard Tand M'erillon JM. Grapevine stilbenes and their biological effects, in *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*, ed. by Ramawat KG and M'erillon JM. Springer, Berlin, pp. 25–54(2008).

Walker AK., Naar AM. SREBPs: regulators of cholesterol/lipids as therapeutic targets in metabolic disorders, cancers and viral diseases. *Clin Lipidol.*, 7(2012):27–36.

Walle T., Hsieh F., DeLegge M.H., Oatis J.E., Walle U.K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab. Dispos.* 32(2004):1377–1382. doi: 10.1124/dmd.104.000885.

Walle T. Bioavailability of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci.*, 1215(2011):9–15.

Walter P., Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334 (2011): 1081–1086.

Wang M., Kaufman RJ. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature*, 529(7586) (2016):326–35.

Wang P., Sang S. Metabolism and pharmacokinetics of resveratrol and pterostilbene. *Biofactors*, 44(2018):16–25.

Wang RH., Kim HS., Xiao C., Xu X., Gavrilova O., Deng CX. Hepatic Sirt1 deficiency in mice impairs mTorc2/Akt signaling and results in hyperglycemia, oxidative damage, and insulin resistance. *J Clin Invest.*, 121(2011): 4477–90.

Wang RH., Li C., Deng CX. Liver steatosis and increased ChREBP expression in mice carrying a liver specific SIRT1 null mutation under a normal feeding condition. *Int J Biol Sci.*, 6(2010): 682–90.

Wang X., de Carvalho Ribeiro M., Iracheta-Vellve A., Lowe P., Ambade A., Satishchandran A., Bukong T., Catalano D., Kodys K., Szabo G. Macrophage-Specific Hypoxia-Inducible Factor-1 α Contributes to Impaired Autophagic Flux in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*, 69(2) (2019):545–563.

Wang Y., Kory N., BasuRay S., Cohen JC., Hobbs HH. PNPLA3, CGI-58, and Inhibition of Hepatic Triglyceride Hydrolysis in Mice. *Hepatology*, 69(6) (2019):2427–2441.

Wang Y. Molecular Links between Caloric Restriction and Sir2/SIRT1 Activation. *Diabetes Metab J.* 38(2014):321–9.

Wang P., Anderson PO., Chen S., Paulsson KM., Sjogren HO. and Li S. Inhibition of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB in CD4 T cells by peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands. *Int. Immunopharmacol.* 1(2001): 803–812.

Wang Y., Viscarra J., Kim SJ. and Sul HS. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16 (2015): 678–689.

Waterhouse AL., Lamuela Raventos RM. The occurrence of piceid, a stilbene glucoside in grape berries. *Phytochemistry*, 37(1994): 571-573.

Wei Y., Wang D., Topczewski F., Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 291(2) (2006): E275-E281.

Wenzel E., Somoza V. Metabolism and Bioavailability of Trans-Resveratrol. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49(2005): 472–481.

Wilson CG., Tran JL., Erion DM., Vera NB., Febbraio M., Weiss EJ. Hepatocyte-Specific Disruption of CD36 Attenuates Fatty Liver and Improves Insulin Sensitivity in HFD-Fed Mice. *Endocrinology*, 157(2) (2016):570-85.

Wu J., Meng Z., Jiang M., Zhang E., Trippler M., Broering R., et al. Toll-like receptor-induced innate immune responses in non-parenchymal liver cells are cell type-specific. *Immunology*, 129(3) (2010): 363–374.

Xu L., Fan YH., Zhang XJ., Bai L. Unraveling the relationship between histone methylation and nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol.*, 16(5) (2024):703-715.

Xu X., So JS., Park JG., Lee AH. Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP. *Semin Liver Dis.*, 33(2013):301–311.

Yamaguchi K., Yang L., McCall S., et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 45(6) (2007):1366–1374. doi:10.1002/hep.21655.

Yamazaki H., Hiramatsu N., Hayakawa K., Tagawa Y., Okamura M., Ogata R., Huang T., Nakajima S., Yao J., Paton AW., et al. Activation of the Akt-NF-kappaB pathway by subtilase cytotoxin through the ATF6 branch of the unfolded protein response. *J Immunol.*, 183(2009):1480–1487.

Yanez M., Jhanji M., Murphy K., Gower RM., Sajish M., Jabbarzadeh E. Nicotinamide Augments the Anti-Inflammatory Properties of Resveratrol through PARP1 Activation. *Sci Rep.*, 9(1) (2019):10219.

Yeaman SJ. Hormone-sensitive lipase - new roles for an old enzyme. *Biochemical Journal*, 379(1) (2004):11–22. doi: 10.1042/bj20031811.

Yeung F., Hoberg JE., Ramsey CS., Keller MD., Jones DR., Frye RA. and Mayo MW. Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *The EMBO Journal* 23 (12) (2004): 2369–2380.

Yoshizaki T., Schenk S., Imamura T., Babendure JL., Sonoda N., Bae EJ., Oh DY., Lu M., Milne JC., Westphal C., Bandyopadhyay G., Olefsky JM. SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 298(3) (2010): E419-28.

Younossi ZM., Golabi P., de Avila L., Paik JM., Srishord M., Fukui N., Qiu Y., Burns L., Afendy A., Nader F. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J. Hepatol.*, 71(2019):793–801.

Younossi ZM., Golabi P., Paik JM., Henry A., Van Dongen C., Henry L. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review. *Hepatology*, 77(4) (2023) :1335-1347.

Yu X., Jia Y., Ren F. Multidimensional biological activities of resveratrol and its prospects and challenges in the health field. *Front Nutr.*, 11(2024):1408651.

Yu L., Gao Y., Aaron N., Qiang L. A glimpse of the connection between PPAR γ and macrophage. *Front Pharmacol.* 14(2023):1254317.

Yu Y., Liu Y., An W., Song J., Zhang Y., Zhao X. STING-mediated inflammation in Kupffer cells contributes to progression of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest.*, 129(2) (2019):546-555.

Yu D., Chen G., Pan M., Zhang J., He W., Liu Y., et al. High fat diet-induced oxidative stress blocks hepatocyte nuclear factor 4 α and leads to hepatic steatosis in mice. *Journal of Cellular Physiology*, 233(6) (2018):4770–4782.

Yu EL., Schwimmer JB. Epidemiology of Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin. Liver Dis.*, 17(2021): 196–199.

Zhang WJ., Li KY., Huang BH., Wang H., Wan SG., Zhou SC. The hepatocyte in the innate immunity. *Virology*, 576(2022):111-116.

Zhang Y., Yuan F., Li P., Gu J., Han J., Ni Z., Liu F. Resveratrol inhibits HeLa cell proliferation by regulating mitochondrial function. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 241(2022): 113788.

Zhang H., Di Baise JK., Zuccolo A., Kudrna D., Braidotti M., Yu Y., Parameswaran P., Crowell MD., Wing R., Rittmann BE., Krajmalnik-Brown R. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106 (2009): 2365–2370.

Zhang K., Shen X., Wu J., Sakaki K., Saunders T., Rutkowski DT., Back SH., Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell*, 124(2006):587–599.

Zhang WF., Wu YK., Mu D., Gong JP., Wu CX., Huang C. Kupffer cells: Increasingly significant role in nonalcoholic fatty liver disease. *Ann. Hepatol.*, 13(2014):489–495.

Zhang XQ., Xu CF., Yu CH., Chen WX., Li YM. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, 20(7) (2014):1768-1776.

Zhang Y., Chen ML., Zhou Y., et al. Resveratrol improves hepatic steatosis by inducing autophagy through the cAMP signaling pathway. *Mol Nutr Food Res*, 59(8) (2015):1443–1457.

Zhang M., Bai X., Du Q., et al. The Different Mechanisms of Lipid Accumulation in Hepatocytes Induced by Oleic Acid/Palmitic Acid and High-Fat Diet. *Molecules*, 28(18) (2023):6714.

Zhu CW. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol with glucose and malate (RGM) to slow the progression of Alzheimer's disease: a pilot study. *Alzheimers Dement.*, 4 (2018) 609–616.

Zortea K., Franc V. C., Guimaraes P. & Belmonte-de-Abreu P. S. Resveratrol supplementation did not improve cognition in patients with schizophrenia: results from a randomized clinical trial. *Front Psychiatry*, 7 (2016): 159.