ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო
უნივერსიტეტი

ნათია ლიპარტია

ზრდასრული ვირთაგვას კუჭქვეშა ჯირკვლის ქსოვილზე პანკრეასის ენდოგენური ცილოვანი კომპლექსის ზემოქმედების შესწავლა

სამაგისტრო პროგრამა ბიოლოგია

ნაშრომი შესრულებულია ბიოლოგიის მაგისტრის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

ხელმძღვანელები: დიანა ძიძიგური
ბიოლოგიის მეცნ. დოქტორი, პროფესორი

ირინა მოდებაძე
ბიოლოგიის აკად. დოქტორი, ასისტენტ პროფესორი

თბილისი
2013

ანოტაცია

ორგანიზმში ქსოვილებისა და ორგანოთა განახლების საფუძველს, როგორც ცნობილია, ფიზიოლოგიური რეგენერაცია წარმოადგენს. ორგანოს დაზიანების ან ნაწილის დაკარგვის შემთხვევაში, მის ნაწილობრივ ან სრულ აღდგენას რეპარაციული რეგენერაცია უზრუნველყოფს. რეგენერაცია, უჯრედების პროლიფერაციით იწყება და ინიცირდება მიტოგენური ანუ ზრდის ფაქტორებით. ეს მოლეკულები უჯრედშორის სივრცეში მოხვედრის შემდეგ განსაზღვრული რეცეპტორებით შეიცნობიან. ლიგანდ-რეცეპტორული ურთიერთქმედებით სიგნალის ტრანსდუქცია უჯრედის შიგნით ტრანსკრიპციის ფაქტორების აქტივაციას და შედეგად სხვადასხვა გენთა კრებულის კასკადურ აქტივაციას განაპირობებს.

რეგენერაციის მარეგულირებელი მექანიზმების შესასწავლად საინტერესოა ისეთი ქსოვილების კვლევა, რომელთაც შეზღუდული აქვთ აღდგენითი ზრდის უნარი. მაგალითად, როგორიცაა კუჭქვეშა ჯირკვალი, რომელიც სხვა პარენქიმულ ორგანოებთან შედარებით დაბალი განახლების უნარით ხასიათდება. აღსანიშნავია, რომ პანკრეასის სხვადასხვა პათოლოგიის დროს ქირურგიული და ფარმაკოლოგიური პრეპარატებით მკურნალობის გარდა მიმართავენ, დამცველობითი მექანიზმების გააქტიურებას ზრდის ფაქტორების მეშვეობით. აქედან გამომდინარე, საინტერესოა კუჭქვეშა ჯირკვალის უჯრედების ზრდის მარეგულირებელი ენდოგენური ფაქტორის კვლევა.

ზრდასრული თეთრი ვირთაგვას პანკრეასიდან გამოყოფილი და ნაწილობრივ დახასიათებულია თერმოსტაბილური ცილების კომპლექსი (თცკ). ნაჩვენებია, რომ პანკრეასის თცკ მზარდი ვირთაგვას სხვადასხვა ქსოვილში (პანკრეასი, ღვიძლი, გული) ტრანსკრიპციის ინჰიბირების გზით, უჯრედების მიტოზური აქტიურობის დაქვეითებას იწვევს. ამავე დროს, არ არის ცნობილი მონაწილეობს თუ არა აღნიშნული ცილების კომპლექსი პანკრეასის ქსოვილის განახლების პროცესში. ასევე არ არის შესწავლილი სიმსივნურ უჯრედებზე მისი მოქმედება.

აქედან გამომდინარე, ჩვენი სამუშაოს მიზანი იყო ინ ვივო და ინ ვიტრო სისტემებში უჯრედების გამრავლებაზე თეთრი ზრდასრული ვირთაგვას პანკრეასის ენდოგენური ცილოვანი კომპლექსის ზემოქმედების შეწავლა.

კვლევის ობიექტები და მეთოდები: ზრდასრული ვირთაგვები (120-150გ) და ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემიის უჯრედული ხაზი (B ქლლ). პროლიფერაციული ქსოვილის მოდელად გამოყენებული იყო რეგენერირებადი პანკრეასის ქსოვილი რეზექციის შემდეგ (50%). ზრდასრული ვირთაგვას პანკრეასიდან თერმოსტაბილური ცილების სპირტული ექსტრაქცია. სინათლის მიკროსკოპში შესწავლისათვის მასალის ფიქსაცია და პრეპარატის მომზადება. მიტოზურ ინდექსის განსაზღვრა. ნატიური ელექტროფორეზი პოლიაკრილამიდის გელში. მიღებული მონაცემები დამუშავებული იყო სტანდარტული ვარიაციული სტატისტიკის მეთოდით. მონაცემების სარწმუნოება 95-99%-ს შეადგენდა.

შედეგები: გამოკვლევებით დადგინდა, რომ: 1. პანკრეასის რეზექციის საპასუხოდ ორგანოს დარჩენილ ქსოვილში პირველი მიტოზები ოპერაციიდან 24 საათის შემდეგ

ჩნდება. შემდგომ პროლიფერაციული აქტიურობის მაჩვენებელი იზრდება და ორჯერ აღწევს პიკს რეზექციიდან მე-3 და მე-7 დღეს; 2. პანკრეასის თცკ დამთრგუნველად მოქმედებს რეგენერირებადი ქსოვილის უჯრედების მიტოზურ აქტიურობაზე. ჰომოლოგიური უჯრედების გამრავლებაზე თცკ-ს დამთრგუნველი ზემოქმედება, რომელიც ინექციიდან პირველი ოცდაოთხი საათის განმავლობაში ვლინდება საკონტროლო მნიშვნელობას მხოლოდ ინექციიდან ოთხი დღის შემდეგ უბრუნდება; 3. პანკრეასის თცკ მაინჰიბირებელ ზეგავლენას ახდენს ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემიის უჯრედების პროლიფერაციულ აქტიურობაზე კულტურაში.

დასკვნები. 1. თეთრი ზრდასრული ვირთაგვას პანკრეასის თცკ-ს ჰომოტიპურ ქსოვილში აღდგენითი პროცესების ინჰიბირების უნარი გააჩნია. 2. თეთრი ზრდასრული ვირთაგვას პანკრეასის თცკ-ს ქსოვილოვანი სპეციფიკურობა არ ვლინდება ინ ვიტრო სიმსივნურ უჯრედებთან მიმართებაში.

Natia Lipartia

The Influence of Endogenous Protein Complex on the proliferative activity of adult rat pancreas cells

Summary

The physiological regeneration is the basis for renewal of tissues and organs in the body. In the case of damage or loss of a body part, a partial or full restoration is provided by reparative regeneration. Regeneration is started by cells proliferation, which is initiated by a mitogenic or growth factors. Factors are recognized by the receptors after they are released into the extracellular space. The transcription factors and various genes cascade activation within cell are caused by the ligand - receptor signal transduction.

Investigation of tissues with limited ability to regeneration is interesting for understanding regulatory mechanisms of the body. For example, the pancreas, which is characterized by the low ability of renewal compared to other parenchymal organs. It should be noted that in addition to surgical and pharmacologic therapy of different pancreatic pathologies, activation of protective mechanisms through the growth factors is used. Therefore the study of pancreas growth regulating endogenous factors seems to be very interesting.

The thermostable protein complex (TPC) from the adult white rat pancreas was separated and partially characterized. It is shown that the pancreatic TPC through inhibition of transcription decreases cell mitotic activity in different tissues (pancreas, liver, heart) of growing rat. At the same time, it is not known, whether the protein complex is involved in renewal process of pancreas tissue and its effect on tumor cells.

The aim of our work was to study the influence of white adult rat pancreatic endogenous protein complex on cells proliferation in vivo and in vitro.

Research objects and methods: Investigations were carried out on adult rats (120-150 g) and chronic lymphocytic leukemia cell lines (BCLL). The regenerative pancreas tissue after the resection (50%) was used as a model of proliferative tissue. Used methods: the alcohol extraction of termostable protein complex from adult rat pancreas, the fixation and the preparation of tissue slices for light microscope, determination of mitotic index, native electrophoresis in polyacrylamide gel. The obtained data were processed using the standard variation statistics. Data reliability was of 95-99%.

Results: Investigations have revealed that: 1. The first mitosis occurs in 24 hours in the response of pancreas resection. The proliferative activity increases and reaches a peak twice in the 3rd and 7th day after resection; 2. Pancreatic TPC decreases cell mitotic activity in regenerative tissue which is revealed in the first twenty-four hours after TPC injection. The effect is maintained for the next days. The mitotic index returns to the control point just four days after the TPC injection; 3. Pancreatic TPC has inhibitory effect on chronic lymphocytic leukemia cell proliferative activity in culture.

Conclusions: 1. The pancreatic TPC obtained form adult white rats inhibits renewal processes of homotypic tissue. 2. The tissue specificity of the pancreatic TPC does not reveal in case of tumor cells in vitro.

სარჩევი

შესავალი ---------- 7

თავი 1. ლიტერატურის მიმოხილვა

1.1. ზრდის ფაქტორების ზოგადი დახასიათება ---------- 9

1.2. პანკრეასის მორფოფუნქციური დახასიათება ---------- 13

თავი 2. მასალა და მეთოდები

2.1. კვლევის ობიექტი და მასალა ---------- 15

2.2. ზრდასრული ვირთაგვას ქსოვილებიდან

თერმოსტაბილური ცილების სპირტული ექსტრაქცია ---------- 15

2.3. სინათლის მიკროსკოპში შესწავლისათვის მასალის

ფიქსაცია და პრეპარატის მომზადება ---------- 16

2.4. ნატიური ელექტროფორეზი პოლიაკრილამიდის გელში ---------- 17

2.5. გელის შეღებვა ვერცხლის ნიტრატით ---------- 17

თავი 3. კვლევის შედეგები და მათი განხილვა

3.1. ზრდასრული ვირთაგვას პანკრეასის რეგენერაციის

თავისებურებების შესწავლა ---------- 18

3.1.1 რეგენერირებადი პანკრეასის ექსპერიმენტულ მოდელზე

ორგანოს აღდგენითი ზრდის შესწავლა დინამიკაში ---------- 18

3.1.2. ზრდასრული ვირთაგვას კუჭქვეშა ჯირკვლის რეპარაციულ

რეგენერაციაზე ენდოგენური თერმოსტაბილური ცილოვანი

კომპლექსის მოქმედების შესწავლა ---------- 23
3.2. პანკრეასის თცკ-ს კომპონენტების შესწავლა ---------- 28
3.2.1.პანკრეასის თცკ-ს დაბალმოლეკულური
ქვეფრაქციის გამოყოფა ---------- 28
3.3. პანკრეასის ენდოგენური თერმოსტაბილური ცილოვანი
კომპლექსის მოქმედება ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემიის
უჯრედების პროლიფერაციულ აქტიურობაზე კულტურაში ---------- 31

დასკვნები ---------- 36

გამოყენებული ლიტერატურა ---------- 37

შესავალი

ორგანიზმში ქსოვილებისა და ორგანოთა განახლების საფუძველს, როგორც ცნობილია, ფიზიოლოგიური რეგენერაცია წარმოადგენს (Лиознер 1975). ორგანოს დაზიანების (ტრავმები, სხვადსხვა პათოლოგიები) ან ნაწილის დაკარგვის შემთხვევაში, მის ნაწილობრივ ან სრულ აღდგენას რეპარაციული რეგენერაცია უზრუნველყოფს. რეგენერაციის უნარი, როგორც ცნობილია, ძუძუმწოვრების თითქმის ყველა ორგანოს გააჩნია (Бродский В.1981), სწორედ ამიტომ, აღდგენითი პროცესების ზოგადი კანონზომირებების დასადგენად კვლევა-ძიება უმრავლეს შემთხვევაში, მათ მაგალითზეც მიმდინარეობს. რეგენერაცია, უჯრედების პროლიფერაციით იწყება და ინიცირდება მიტოგენური ანუ ზრდის ფაქტორებით. ეს მოლეკულები უჯრედშორის სივრცეში მოხვედრის შემდეგ განსაზღვრული რეცეპტორებით შეიცნობიან. ლიგანდ-რეცეპტორული ურთიერთქმედებით სიგნალის ტრანსდუქცია უჯრედის შიგნით ტრანსკრიპციის ფაქტორების აქტივაციას და შედეგად სხვადასხვა გენთა კრებულის კასკადურ აქტივაციას განაპირობებს (Lodish at al. 2000).

ჰისტოგენეზისათვის დამახასიათებელი პროცესების (პროლიფერაცია, ჰიპერტროფია, პოლიპლოიდიზაცია) წვლილი სხვადასხვა ორგანოს რეგენერაციაში განსხვავებულია (Саламатина Н.Б. 1975; Карлсон Б. 1986), რაც უჯრედების ფუნქციური ადაპტაციით და გენეტიკურად დეტერმინირებული მექანიზმებითაა განპირობებული (Клишов А.А. 1984). შესაბამისად განსხვავებულია სხვადასხვა ორგანოს და ქსოვილის რეგენერაციის უნარიც. აქედან გამომდინარე, მარეგულირებელი მექანიზმების შესასწავლად საინტერესოა ისეთი ქსოვილების კვლევა, რომელთაც შეზღუდული აქვთ რეგენერაციის უნარი. მაგალითად, როგორიცაა კუჭქვეშა ჯირკვალი, რომელიც სხვა პარენქიმულ ორგანოებთან შედარებით დაბალი განახლების უნარით ხასიათდება (Сидорова В.Ф. 1969; Brochenbrough J.C et al. 1988). აღსანიშნავია, რომ პანკრეასის სხვადასხვა პათოლოგიის დროს უმრავლესად ქირურგიულ მკურნალობას მიმართავენ. მკურნალობაში იყენებენ ფარმაკოლოგიურ პრეპარატებს ან ახდენენ დამცველობითი

მექანიზმების გააქტიურებას ზრდის ფაქტორების მეშვეობით (Powers C.J at. al. 2000). აქედან გამომდინარე საინტერესოა კუჭქვეშა ჯირკვალის უჯრედების ზრდის მარეგულირებელი ენდოგენური ფაქტორის კვლევა.

ზრდასრული თეთრი ვირთაგვას პანკრეასიდან გამოყოფილი და ნაწილობრივ დახასიათებულია თერმოსტაბილური ცილების კომპლექსი (თცკ), ნაჩვენებია, რომ პანკრეასის თცკ მზარდი ვირთაგვას სხვადასხვა ქსოვილში (პანკრეასი, ღვიძლი, გული) ტრანსკრიპციის ინჰიბირების გზით, უჯრედების მიტოზური აქტიურობის დაქვეითებას იწვევს (Туманишвили Г.Д., 1981., Giorgobiani N. et al. 2005., მოდებაძე ი. და სხვა 2010). უჯრედების გამრავლებაზე პანკრეასის თცკ-ს ზემოქმედებით უჯრედების ინტერფაზაში (G2 ფაზა) შეფერხება შექცევადი პროცესია და მისი ხანგრძლივობა საშუალოდ 3 საათს შეადგენს. ამავე დროს, არ არის ცნობილი მონაწილეობს თუ არა აღნიშნული ცილების კომპლექსი პანკრეასის ქსოვილის განახლების პროცესში. ასევე არ არის შესწავლილი სიმსივნურ უჯრედებზე მისი მოქმედება.

ინ ვივო და ინ ვიტრო სისტემებში უჯრედების გამრავლებაზე თეთრი ზრდასრული ვირთაგვას პანკრეასის ენდოგენური ცილოვანი კომპლექსის ზემოქმედების შეწავლა.

თავი 1. ლიტერატურის მიმოხილვა

1.1. ზრდის ფაქტორების ზოგადი დახასიათება

მრავალუჯრედიან ორგანიზმის ქსოვილთა და ორგანოთა ზრდისა და დიფერენცირების პროცესში ჩართულია მრავალი ფაქტორი. მათ შორის არის ზრდის ფაქტორები, რომლებიც წარმოადგენენ პროტეინებს, რომლებსაც სიგნალები ერთი უჯრედიდან მეორეზე გადააქვთ და ამით ინფორმაციის გადატანას უზრუნველყოფენ. ისინი არეგულირებენ სხვადასხვა უჯრედშიდა პროცესებს და დიდ როლს თამაშობენ მრავალუჯრედიანი ორგანიზმების განვითარებაში. ზრდის ფაქტორები გარკვეულ გავლენას ახდენენ უჯრედებში ტრანსკრიპციულ აქტიურობაზე და გენების ექსპრესიაზე (Dijke P.T., Iwata K.K. 1992; Dazhong Xu et al. 2005).

ზოგიერთი ზრდის ფაქტორი ახდენს ზოგად ეფექტს, სტიმულირებენ უჯრედების დაყოფას მრავალ სხვადასხვა ტიპის უჯრედში, მაშინ როცა ზოგიერთი არის სპეციფიკური და მოქმედებს მხოლოდ კონკრეტული ტიპის უჯრედზე. ზრდის ფაქტორების უმრავლესობა არის მრავალფუნქციური და მოქმედებს არა მარტო უჯრედის ზრდაზე, არამედ ემბრიოგენეზზე, ანთებაზე, დიფერენციაციაზე, რეგენერაციასა და იმუნურ რეაქციებზე (Dijke P.T., Iwata K.K., 1992).

თითქმის ყველა ქსოვილიდან და ორგანოდან არის გამოყოფილი ზრდის მარეგულირებელი ფაქტორები. ნაჩვენებია, რომ რამოდენიმე ზრდის ფაქტორი სინთეზირდება მღრღნელების სანერწყვე ჯირვალში. ესენია: ექტოდერმული ზრდის ფაქტორი (EGF) და ნერვების ზრდის ფაქტორი (NGF). აგრეთვე მღრღნელების კუჭქვეშა ჯირკვალში ნაპოვნია ღვიძლის ზრდის ფაქტორი (HGF), ტრანსფორმაციის ფაქტორი ბეტა (TGF-β), ინსულინის მსგავსი ზრდის ფაქტორი 1 (IGF-1) და ფიბრობლასტები ზრდის ფაქტორი (FGF-β) (Amano O, Iseki S. 2001).

FGF თამაშობს მნიშვნელოვან როლს ქსოვილების ზრდის კონტროლში, მათ მორფოგენეზსა და განახლებაში დაზიანების შემთხვევაში.FGF ძირითადად ფილტვებსა და

თირკმელებში ექსპრესირდება. შედარებით ნაკლები რაოდენობითაა გულში, ჩონჩხის კუნთებსა და ტვინში. (Hu M.C-T et al., 1998).

FGF მეზოდერმული წარმოშობის ქსოვილთა უჯრედების მიტოგენს წარმოადგენს. ასეთი უჯრედებია: ფიბრობლასტები, სისხლძარღვების ენდოთელიუმის უჯრედები, გლუვკუნთოვანი უჯრედები, მიობლასტები, კერატინოციტები, ქონდროციტები და ოსტეობლასტები. FGF იწვევს უჯრედების პროლიფერაციის ან ჰიპერტროფიის აქტივაციას, რაც თავის მხრივ TGFβ1- ის მოქმედების შედეგად შეიძლება დაითრგუნოს (Dijke et al., 1992).

სიმსივნის ზრდის ფაქტორის (TGF) პროდუქცია ხდება ტრანსფორმირებული უჯრედებუს მიერ. ტრანსფორმაცია შეიძლება იყოს ქიმიური ან სპონტანური. უფრო მეტიც პოლიპეპტიდები TGF- ის თვისებებით გამოვლენილ იქნენ ვირთაგვების ბევრ ნორმალურ ქსოვლიში. მათი მეტნაკლებად მაღალი დონე აღმოჩენილ იქნა ამ ცხოველების ემბრიონებიდან გამოყოფილ ექსტრაქტებში (Moses H. L. et al., 1981).

TGFβ ძუძუმწოვართა უჯრედების პროლიფერაციისა და დიფერენცირების ერთერთი ყველაზე გავრცელებულ რეგულატორს წარმოადგენს. მისი მ-რნმ ზრდასრული ცხოვლების თითქმის ყველა უჯრედულ ტიპშია აღმოჩენილი (Denrynck R. et al., 1985).

TGF აინჰიბირებს ჰეპატოციტების პროლიფერაციას: ახდენს მათ ბლოკირებას უჯრედული ციკლის G1 ფაზაში. ასეთივე მოქმედება გაჩინია TGFβ სხვა ორგანოების ეპითელურ უჯრედებზე. TGFβ1 მიერ ზრდის კონტროლი დამოკიდებულია უჯრედების ასაკზე, სიმკვრივეზე და სხვა ზრდის ფაქტორების არსებობაზე. იგი აკავებს FGF- ით გამოწვეულ ენდოთელურ ზრდას. ინჰიბიტორული თვისების გარდა TGFβ დამახასითებელია სხვა თვისებებიც: მიტოგენეზი, ქემოტაქსისი, დიფერენცირების ინდუქცია ან დათრგნვა, რაც ქსოვილის ტიპზე და სხვა ზრდის ფაქტორების ყოფნა არყოფნაზეა დამოკიდებული (Casagrande et al., 1999).

TGFb ორგანიზმის ყველა უჯრედში ექსპერსირდება, იგი ლატენტურ ფორმასჰი იმყოფება და აქტივირდება მზოლოდ ფიზიოლოგიური აუცილებლობის შემთხვევაში, როდესაც მათ ,,შემნიღბველი” ცილები შორდება. TGFb- ს ლატენტური ფორმა რომ არ

არსებობდეს მისი მოქმედება იქნებოდა პერმანენტული. რასაც შეიძლება ორგანიზმის უჯრედებს შორის რეგულატორული სურთიერთკავშირის მთელი სისტემის დარღვევამდე მივეყვანეთ (Фильченков А.А. и др. 2002).

ინსულინის მსგავსი ზრდის ფაქტორები (IGF-I da IGF-II) წარმოადგენენ პოლიპეპტიდებს რომლებსაც გააჩნიათ პროინსულინის სტრუქტურული ჰომოლოგია. ისინი არეგულირებენ პროლიფერაციას და დიფერენციაციას მრავალი ტიპის უჯრედში და ამასთან ერთად გააჩნიათ უნარი გამოავლინონ ინსულინის მსგავსი მეტაბოლური ეფექტი. ინსულინისგან განსხვავებით მათი პროდუქცია ხდება ორგანიზმის თითქმის ყველა უჯრედში და ხშირად გვხვდება ცირკულაციაში. IGF გააჩნია პოტენციალი იმოქმედოს ენდოკრინული, ავტოკრინული ან პარაკრინული მექანიზმებით. მისი მეშვეობით ხდება შრატში სხავადასხვა ფაქტორების რაოდენობის მომატება, რაც ხელს უშლის მიოკარდიუმში იშემიური ცვლილებების ჩამოყალიბებას (Mathews Lisa et. al., 2011).

IGF წარმოადგენს ცხიმების დამშლელ ფაქტორს. ის ახდენს გლუკოზის ტრანსპორტის ბლოკირებას უჯრედის მემბრანის გავლით, რის გამოც ორგანიზმს აიძულებს ენერგია სხვა წყაროზე გადაერთოს, როგორიცაა ცხიმები. გლუკოზის ტრანსპორტის ბლოკურებისას კუნთოვანი უჯრედების მემბრანის გავლით კუნთებში გლიკოგენის მარაგი კლებულობს, რასაც საბოლოოდ კუნთის ვიზუალურ დაპატარავებამდე და კუნთის გამძლეობის შემცირებამდე მივყავართ. ზრდის ფაქტორები განსხვავებულად მოქმედებენ სხვადსხვა ორგანოებსა და ქსოვილებზე, მაგალითად ადამიანის EGF კუჭის მჟავის სეკრეციას ინჰიბირებს, თაგვისGEGF ასტიმულირებს თაგვებში ადრეულ ასაკში თვალის გახელას და კბილების ამოსვლას. იგი აგრეთვე წარმოადგენს მიტოგენს უჯრედთა მრავალი ტიპისათვის, მათ შორის, ეპითელური, ფიბრობლასტური და ენდოთელური უჯრედებისათვის. EGF სისტემატური შეყვანა ახალშობილ ვირთაგვებში იწვევს სისხლში მოცირკულირე EGF დონის შემცირებას და იწვევს სომატური ზრდის დაყოვნებას (Sussenbach J.S. et al 1998).

ეპიდერმული ზრდის ფაქტორის რეცეპტორი ნანახი იქნა სხვადასხვა ქსოვილებსა და უჯრედულ ხაზებში. მისი რაოდენობა მკაცრად კორელირებს ქსოვილების მაღალ პროლიფერაციულ აქტიურობასთან (Lin SY, et al. 2001).

PDGF თრომბოციტული ზრდის ფაქტორი პირველად სისხლის შრატში იყო აღმოჩენილი. ნაჩვენები იქნა, რომ იგი მეზენქიმური წარმოშობის ქსოვილთა უჯრედების ძლიერ მიტოგენს წარმოადგენს, PDGF ლოკალიზებულია თრომბოციტების გრანულებში და მისი გამოთვისუფლება ხდება კოლაგენის, თრომბინისა და არაქიდონის მჟავას მოქმედების შედეგად ფიბრობლასტების აგრეგაციის შემდეგ. PDGF არ ახდენს ეფექტს ენდოთელურ და ეპითელურ უჯრედებზე. ამ უჯრედებს არ აღმოაჩნდათ რეცეპტორები PDGF მიმართ PDGF B შეესაბამება მაიმუნის სარკომის მატრანსფორმირებელ გენ პროტოონკოგენ v-sis, PDGF აინდუცირებს მრავალი ბირთვული პროტოონკოგენის ექსპრესიას (King M. W.1999).

1.2. პანკრეასის მორფოფუნქციური დახასიათება

პანკრეასი წარმოადგენს მსხვილ ჯირკალს და შედგება ერთმანეთისგან სტრუქტურულად და ფუნქციურად განსხვავებული ენდოკრინული და ეგზოკრინული ნაწილებისაგან. მისი ეგზოკრინული ნაწილი, რომელიც გამოიმუშავებს პანკრეასის წვენს და გამოიყოფა თორმეტგოჯა ნაწლავის სანათურში, შეადგენს ორგანოს ძირითად მასას და გააჩნია ალვეოლური შენება. შემაერთებელი ქსოვილის ჩანაფენები ჯირკვალს პარენქიმას ყოფს წილაკებად, რომელთაც განსხვავებული ზომები და კონფიგურაცია გააჩნიათ. ეგზოკრინული ნაწილის სტრუქტურულ-ფუნქციურ ერთეულს წარმოადგენს აცინუსი, რომელიც შედგება აცინოციტებისაგან. ეს უჯრედები ასინთეზირებენ პანკრეასის წვენს, რომელიც გამომტანი სადინრის მეშვეობით გამოიტანება (Г. А. Акамов и др. 2001).

პანკრეასის ენდოგენური ნაწილი წარმოდგენილია კუნძულების სახით. ძუძუმწოვრებისა და ადამიანის პანკრეასის კუნძულები შეიცავენ α, β, δ da PP ტიპის ენდოკრინულ უჯრედებს. β უჯრედები (ინსულინის წარმომქმნელი) წარმოადგენენ კუნძულების ენდოკრინოციტების ძირითად მასას (75%). α უჯრედები (ინსულინის წარმომქმნელი) წარმოადგენენ კუნძულების ენდოკრინოციტების ძირითად მასას 20%-ია. δ უჯრედები ასინთეზებენ სომატოსტატინს, ხოლო PP უჯრედები გამოიმუშავებენ პანკრეასის პეპტიდს.

კუჭქვეშა ჯირკვლის ფიზიოლოგიური რეგენერაცია ხასიათდება მასის უჯრედული შემადგენლობის ნელი აღდგენით. პროლიფერაციული აქტივობის დაბალი მაჩვენებლები განაპირობებენ აღდგენის პერიოდის ხანგრძლივობას. რეპარაციული რეგენერაციის დროს ნაწილობრივი რეზექციის შემდეგ ჯირკვლის სტრუქტურის და ფუნქციის აღდგენა ხდება პროლიფერაციული აქტიობის გაზრდით როგორც რეგენერაციის ზონაში ასევე დაზიანებული ადგილის მოშორებითაც. რეპარაციული რეგენერაციის საწყის ეტაპზე ინსულოციტების მიტოზური დაყოფა წარმოადგენს აღდგენითი პროცესების არსებით კომპონენეტს. მაგრამ როგორც მრავალი მკვლევარი აღნიშნავს პროლიფერაციული აქტივობის გაძლიერებას ხანმოკლე ხასიათი გააჩნია (Г. А. Акамов и др. 2001).

ძუძუმწოვრების პანკრეასი ხასიათდება დაბალი მიტოზური აქტივობით და მნიშვნელოვანი პროლიფერაციული პასუხით მიტოგენური სიგნალებისა და ქსოვილის დაზიანების მიმართ. პანკრეასის ეპითელიუმის პროლიფერაცია შესაძლოა გამოწვეული იყოს ზრდის ფაქტორებით (Kritzik MR., et al. 1999). დადგენილია, რომ უჯრედების დაზიანების, დიეტით განპირობებული მასის დაკლების და ასევე რეზექციის შემთხვევაში, ჯირკვლის ქსოვილის დარჩენილ უბნებში აღინიშნება უჯრედების ჰიპერტროფია და სადინარის ამომფენი ეპითელიუმის მსგავსი უჯრედების პროლიფერაციის ინიცირება. არ გამორიცხავენ ამ პროცესში ღერო უჯრედების მონაწილეობასაც (Sharma A, et al. 1999).

ვირთაგვებში და თაგვებში შინაგანი ორგანოების ზრდის დროს უჯრედების მიტოზური აქტივობის შესწავლისას გაირკვა, რომ უჯრედების ინტენსიურად მიმდინარე მიტოზური აქტივობის პერიოდი გრძელდება დაბადებიდან დაახლოებით 30-40 დღე და მაქსიმალურ მნიშვნელობას მიტოზური ინდექსი სხვადასხვა ორგანოებში განსხვავებულ დროს აღწევს, ზემოთაღნიშნული პერიოდის ფარგლებში. მაგალითად ვირთაგვას კუჭქვეშა ჯირკვალში ასაკის მატებასთან ერთად 3-დან 75-დღემდე მიტოზური ინდექსი მცირდება 13,4-0,11%- მდე (Walker NI and Pound AW 1983; Сидорова В.Ф. 1969).

ახალგაზრდა ზრდასრულ ვირთაგვებში 90%-იანი პანკრეასექტომიის შემდეგ კუჭქვეშა ჯირკვალში ადგილი აქვს როგორც ეგზო-, ასევე ენდოკრინული ნაწილის რეგენერაციას (Brockenbrough J. et al. 1988).

რეგენერაცია შეიძლება მიმდინარეობდეს ორი გზით: 1) არსებული დიფერენცირებული უჯრედების პროლიფერაციით და 2) სადინრის ეპითელური უჯრედების პროლიფერაცით და დიფერენციაცია პანკრეასის ახალ წილაკებად. ეს უკანასკნელი წარმაოდგენს რეგენერაციის ადგილობრივ კერებს, რომელიც შედგება სადინრის მსგავსი ტუბულარული კომპლექსისაგან ან პატარა სადინრებისაგან, რომლებიც გარშემორტყმულია ფაშარი შემაერთებელი ქსოვილით (De Lisle R.C. et al. 1990; Hashiomoto N. 2009).

თავი 2. მასალა და მეთოდები

2.1. კვლევის ობიექტები და მასალა

ექსპერიმენტებში გამოყენებული იყო: ზრდასრული (150-180გ) ვირთაგვები და ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემიის უჯრედული ხაზი (B ქლლ). პროლიფერაციული ქსოვილის მოდელად გამოყენებული იყო რეგენერირებადი პანკრეასის ქსოვილი რეზექციის შემდეგ (50%-იან). ქსოვილის პროლიფერაციული აქტიურობის შესაფასებლად ვსაზღვრავდით მიტოზურ ინდექსს. ამ მიზნით, საკვლევ ობიექტებში შეგვყავდა პანკრეასის თცკ (200მკგ). ნექციები კეთდებოდა ინტრაპერიტონეალურად. მასალას ვიღებდით ინექციიდან 3 საათის შემდეგ და დინამიკაში 2, 3 4, 5 დღის შემდეგ. მასალის აღებამდე 2 საათით ადრე ცხოველებში შეგვყავდა კოლხიცინის ხსნარი (1მკგ/1გ).

B ქლლ-ის კულტურა გადატანილი იყო პლანშეტის ფოსოებში (კონცენტრაცია 1მლნ/მლ). ფოსოები გაყოფილი იყო ორ ჯგუფად: I ჯგუფი – საკონტროლო; II ჯგუფი - ვამატებდით პანკრეასის თცკ. ერთი საათის შემდეგ ყველა ფოსოში ვამატებდით კოლხიცინს (0,1მკგ/მლ). 2 საათის შემდეგ ვამზადებდით ნაცხებს. მიღებული მონაცემები დამუშავებული იყო სტანდარტული ვარიაციული სტატისტიკის მეთოდით. მონაცემების სარწმუნოების დასადგენად გამოყენებული იყო სტიუდენტის კრიტერიუმი. მონაცემების სარწმუნოება 95-99%-ს შეადგენდა.

2.2. ზრდასრული ვირთაგვას ქსოვილებიდან თერმოსტაბილური ცილების სპირტული ექსტრაქცია

თეთრი ვირთაგვას პანკრეასის ქსოვილს ვაცილებდით ცხიმოვან ქსოვილს, ვრეცხავდით ფიზიოლოგიური ხსნარით ოთახის ტემპერატურაზე. შემდეგ ვაქუცმაცებდით, ვამატებდით ცივ დისტილირებულ წყალს შეფარდებით 1:8 და

ვაჰომოგენიზირებდით ჰომოგენიზატორში. ჰომოგენატს სწრაფად ვყინავდით თხევად აზოტში და ვალღობდით ოთახის ტემპერატურაზე. მიღებულ მასას ვფილტრავდით ოთხკეცა დოლბანდში, ფილტრატს ვამატებდით 96^0 სპირტს საბოლოო კონცენტრაციამდე 50^0. ამ ხსნარს ვათავსებდით $+4^0C$ ერთი საათის განმავლობაში, შემდეგ ვაცენტრიფუგირებდით 600g 10 წუთის განმავლობაში K-23 ტიპის ცენტრიფუგაზე. მიღებულ სუპერნატანტს ვამატებდით 960 ეთილის სპირტს ისეთი რაოდენობით, რომ საბოლოო კონცენტრაცია ყოფილიყო 81^0, ამ ხსნარს ვათავსებდით $+4^0C$- ზე ერთი საათის განმავლობაში და ვაცენტრიფუგირებდით იმავე რეჟიმში. მიღებულ ნალექს ვხსნიდით წყალში და ვადუღებდით $+100^0C$ - ზე წყლის აბაზანაში 20 წუთის განმავლობაში. შემდეგ ვაცენტრიფუგირებდით, სუპერნატანტს ვყინავდით თხევად აზოტში და ვახდენდით ლიოფილიზაციას ადსორბციულ-კონდენსაციურ ლიოფილიზატორში. ლიოფილიზატში ცილას ვსაზღვრავდით ლოურის მეთოდით (Lowriy D.J.,et al. 1951).

2.3. სინათლის მიკროსკოპში შესწავლისათვის მასალის ფიქსაცია და პრეპარატების მომზადება

სინათლის მიკროსკოპში ქსოვილების (პანკრეასი, ღვიძლი, გული) შესასწავლად მასალის ფიქსაციას ვახდენდით Na/K ფოსფატურ ბუფერზე დამზადებულ ფორმალდეჰიდის 4%-იან ხსნარში. ფიქსაციის შემდეგ მასალის გაუწყლოება მიმდინარეობდა სხვადასხვა კონცენტრაციის სპირტების მზარდ რიგში. ქსოვილს ვაყალიბებდით ცვილ-პარაფინის ნარევში. 5-7 მკმ-ის სისქის ანათლებს ვღებავდით ჰემატოქსილინ-ეოზინით. B ქლლ-ის კულტურიდან ვამზადებდით ნაცხებს და ვღებავდით აზურ-ეოზინით. პრეპარატებს ვსწავლობდით სინათლის მიკროსკოპში "ЛОМО". მიტოზური ინდექსის დასადგენად ვითვლიდით არანაკლებ 5000 უჯრედისა.

2.4. ნატიური ელექტროფორეზი პოლიაკრილამიდის გელში

ნატიური ელექტროფორეზსს ვატარებდით დევისის მეთოდით (Davis B., 1964). გამოყენებული იყო აკრილამიდის გელი კონცენტრაციული გრადიენტით 10-25%. გელზე დასატან ნიმუშებს ვხსნიდით ბუფერში (0.5 M ტრის HCl pH-6.8; 50% გლიცერინი; 0.05% ბრომფენოლის ლურჯი) და ვახდენდით მათ ელექტროფორეზულ დაყოფას (დენის ძალა - 14 mA, ძაბვა - 100V). პროცესის დამთავრების შემდეგ ვახდენდით გელის შეღებვას ვერცხლის ნიტრატით.

2.5. გელის შეღებვა ვერცხლის ნიტრატით

ვერცხლით შეღებვას ვახდენდით ნესტერენკოს (Nesterenko et al, 1994) მეთოდის მიხედვით. მოხსნილ გელს ვასხამდით ფიქსატორს (60 მლ 50% აცეტონი; 1,5 მლ 50% სამქლორიანი ძმარმჟავა - ТХУ), ვრეცხავდით ბიდისტილატში 5 წუთი (ყველა პროცედურა მიმდინარეობდა ნჯღრევით). შემდეგ ვამუშავებდით აცეტონით (50%) – 5 წთ. ვასხამდით ნატრიუმის თიოსულფატის ხსნარს (100 მკლ 10% $Na_2S_2O_3$ x $5H_2O$ + 60 მლ ბიდისტილატი) 1 წთ. ვამუშავებდით ვერცხლის ნიტრატის ხსნარით (0.8 მლ 20% $AgNO_3$ + 0.6 ml 37% ფორმალდეჰიდი + 60 მლ ბიდისტილატი) 8 წთ. შემდეგ ვასხამდით ნატრიუმის კარბონატის და ნატრიუმის თიოსულფატის ხსნარს (1.2 გ Na_2Co_3 + 25 mkl 37% ფორმალდეჰიდი + 25 მკლ $Na_2S_2O_3$ + 60 მლ ბიდისტილატი). ვაყოვნებდით შეღებვამდე. შეღებვას ვაჩერებდით 4%-იანი ძმარმჟავას ხსნარით. ყოველ პროცედურას შორის გელს ვავლებდით ბიდისტილატში 3-5-წმ.

თავი 3. შედეგები და მათი განხილვა

3.1. ზრდასრული ვირთაგვას პანკრეასის რეგენერაციის თავისებურებების შესწავლა

3.1.1. რეგენერირებადი პანკრეასის ექსპერიმენტულ მოდელზე ორგანოს აღდგენითი ზრდის შესწავლა დინამიკაში

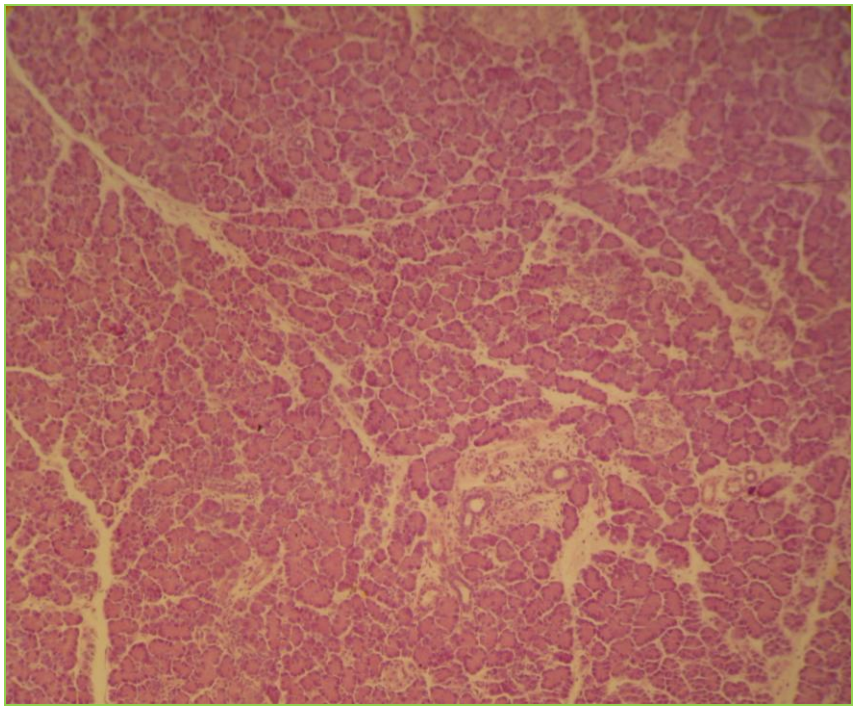
დღეისათვის ცნობილია უამრავი ზრდის მარეგულირებელი ფაქტორი, როგორც მასტიმულირებელი ისე დამთრგუნველი. ისინი გამოყოფილია და ნაწილობრივ დახასიათებულია ფილოგენეზური რიგის სხვადასხვა ინდივიდის თითქმის ყველა ქსოვილიდან და ორგანოდან (Giorgobiani N et al. 2005, Dzidziguri D. 2004, Amano O, Iseki S. 2001). ჩვენ ყურადღება შევაჩერეთ უჯრედების გამრავლებაზე დამთრგუნველი ზემოქმედების უნარის მქონე თერმოსტაბილური ცილების კომპლექსზე. ზემოთ როგორც უკვე იყო აღნიშნული, სპირტული ექსქტრაქციის გზით გამოყოფილი და ნაწილობრივ დახასიათებული თეთრი ზრდასრული ვირთაგვას პანკრეასის უჯრედებიდან თერმოსტაბილური ცილების კომპლექსი, მზარდი ინდივიდების პროლიფერად ქსოვილებში, ტრანსკრიპციიის ინჰიბირების გზით მიტოზური აქტიურობის დაქვეითებას იწვევს (მოდებაძე ი. და სხვა. 2010).

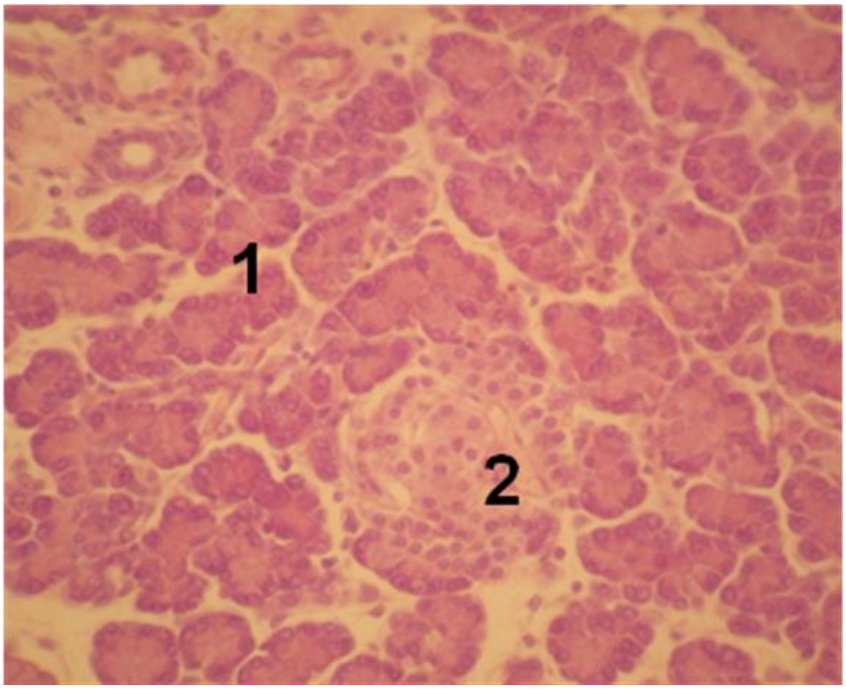
საინტერესო იყო შეგვესწავლა, თუ რა გავლენას მოახდენდა პანკრეასის თცკ-ს ზრდასრული ინდივიდის პროლიფერაციისადმი სტიმულირებული ქსოვილის მიტოზურ აქტიურობაზე. ამისათვის გამოვიყენეთ პანკრეასის რეზექციის მოდელი. პანკრეასი სხვა პარენქიმულ ორგანოებთან შედარებით დაბალი პროლიფერაციული აქტიურობით გამოირჩევა. ნაჩვენებია, რომ ორგანოს რეზექციის პირობებში ქსოვილის პროლიფერაციული აქტიურობის მაქსიმალური მაჩვენებლები ვლინდება რეზექციიდან ერთი კვირის განმავლობაში. რეპლიკაციური აქტიურობის მატება შეინიშნება მე-2 და მე-5 დღეს (Hayashi Keiko at al. 1999).

აქედან გამომდინარე, თავდაპირველად შევისწავლეთ პანკრეასის პარენქიმული უჯრედების პროლიფერაციული აქტიურობის ცვლილება კუჭქვეშა ჯირკვლის რეზექციდან პირველი რვა დღის განმავლობაში. პირველ სურათზე წარმოდგენილია ზრდასრული ვირთაგვას პანსკრეასის ჰისტოარქიტექტონიკის ამსახველი მიკროფოტოები, რომლებზეც კარგად განირჩევა ორგანოს ენდოკრინული და ეგზოკრინული ნაწილები, ასევე, ეგზოკრინულ ნაწილში კარგად გამოკვეთილი აცინუსები (სურათი 1. ა და ბ).

ჩვენი გამოკვლევებით დადგინდა, რომ რეზექციის საპასუხოდ ორგანოს დარჩენილ ქსოვილში პირველი მიტოზები ოპერაციიდან 24 საათის შემდეგ ჩნდება. მე-3 სურათზე მოყვანილი მრუდის ანალიზმა გვიჩვენა, რომ შემდგომ პროლიფერაციული აქტიურობის მაჩვენებელი იზრდება და ორჯერ აღწევს პიკს რეზექციიდან მე-3 და მე-7 დღეს. ამავე სურათიდან ჩანს, რომ უჯრედების მიტოზური ინდექსის მაქსიმალური მნიშველობა ორგანოს რეზექციიდან მე-3 დღეს ვლინდება (სურათი 2).

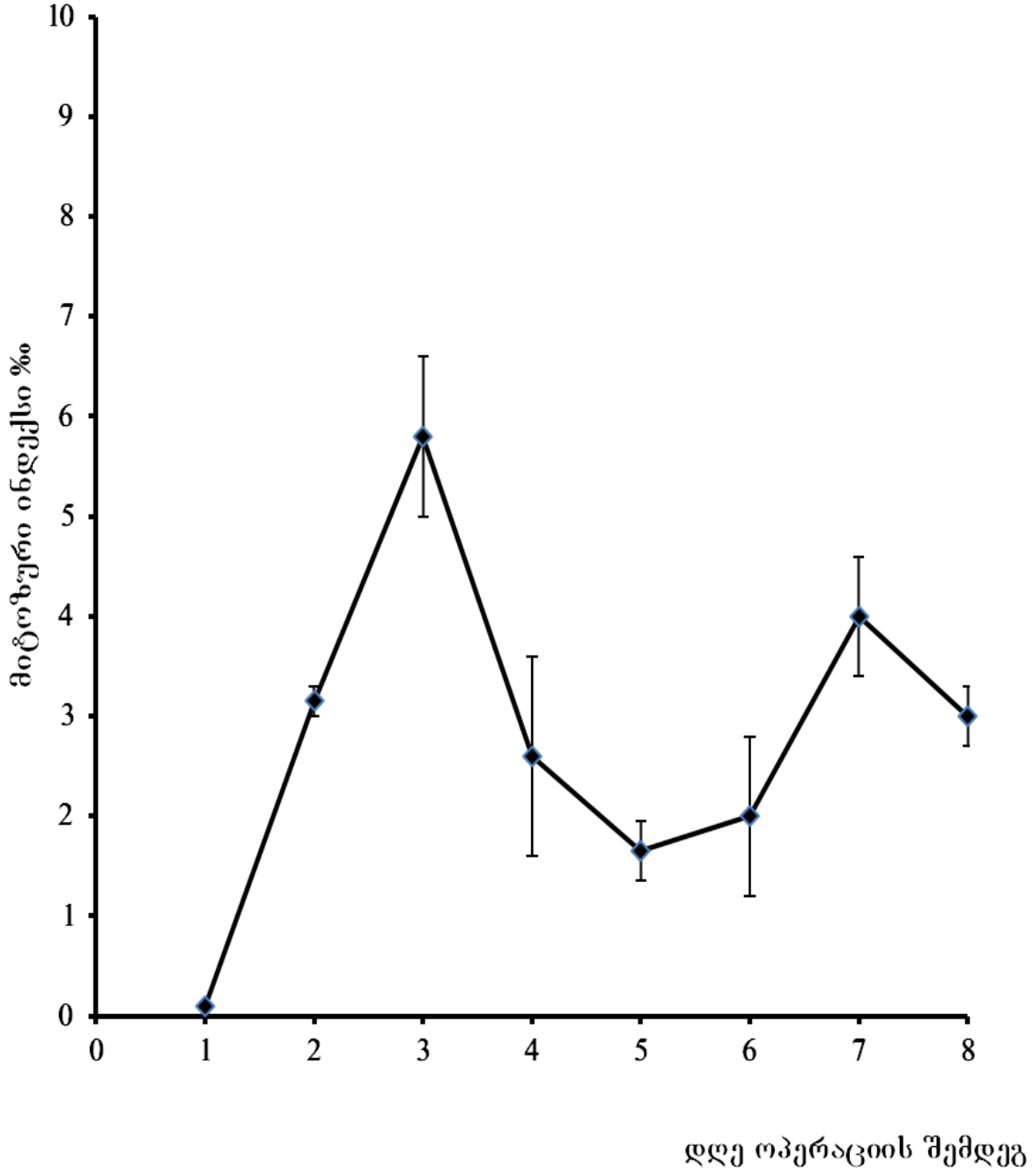
მე-3 სურათზე მოყვანილია პანკრეასის ჰისტოარქიტექტონიკის ამსახველი მიკროფოტოები, რომლებზეც კარგად განირჩვეა ორგანოს რეზექციიდან მე-3 დღეს პანკრეასის ქსოვილში აღმოცენებული მიტოზური ფიგურები (სურათი 3).

ა 

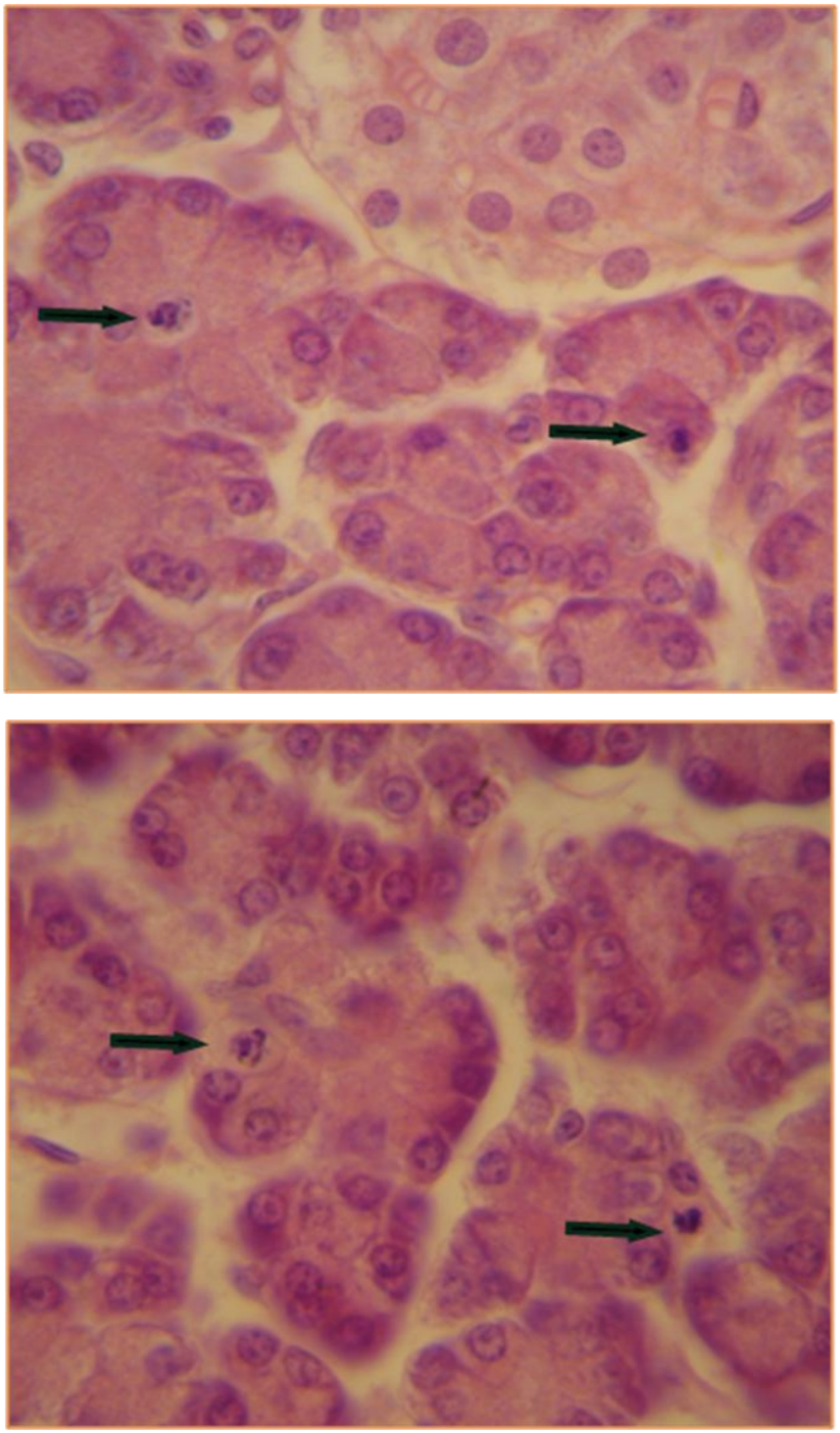


ბ

სურათი 1. ზრდასრული თეთრი ვირთაგვას პანკრეასის ჰისტოარქიტექტონიკა (შეღებვა – ჰემატოქსილინ-ეოზინი). ა – 10X10; 2 – 40X10. (1. ეგზოკრინული ნაწილი - აცინუსები; 2. ენდოკრინული ნაწილი - ლანგერჰანსის კუნძული).



სურათი 2. ზრდასრული ვირთაგვას პანკრეასის უჯრედების პროლიფერაციული აქტიურობის ცვლილება ორგანოს რეზექციის შემდეგ.



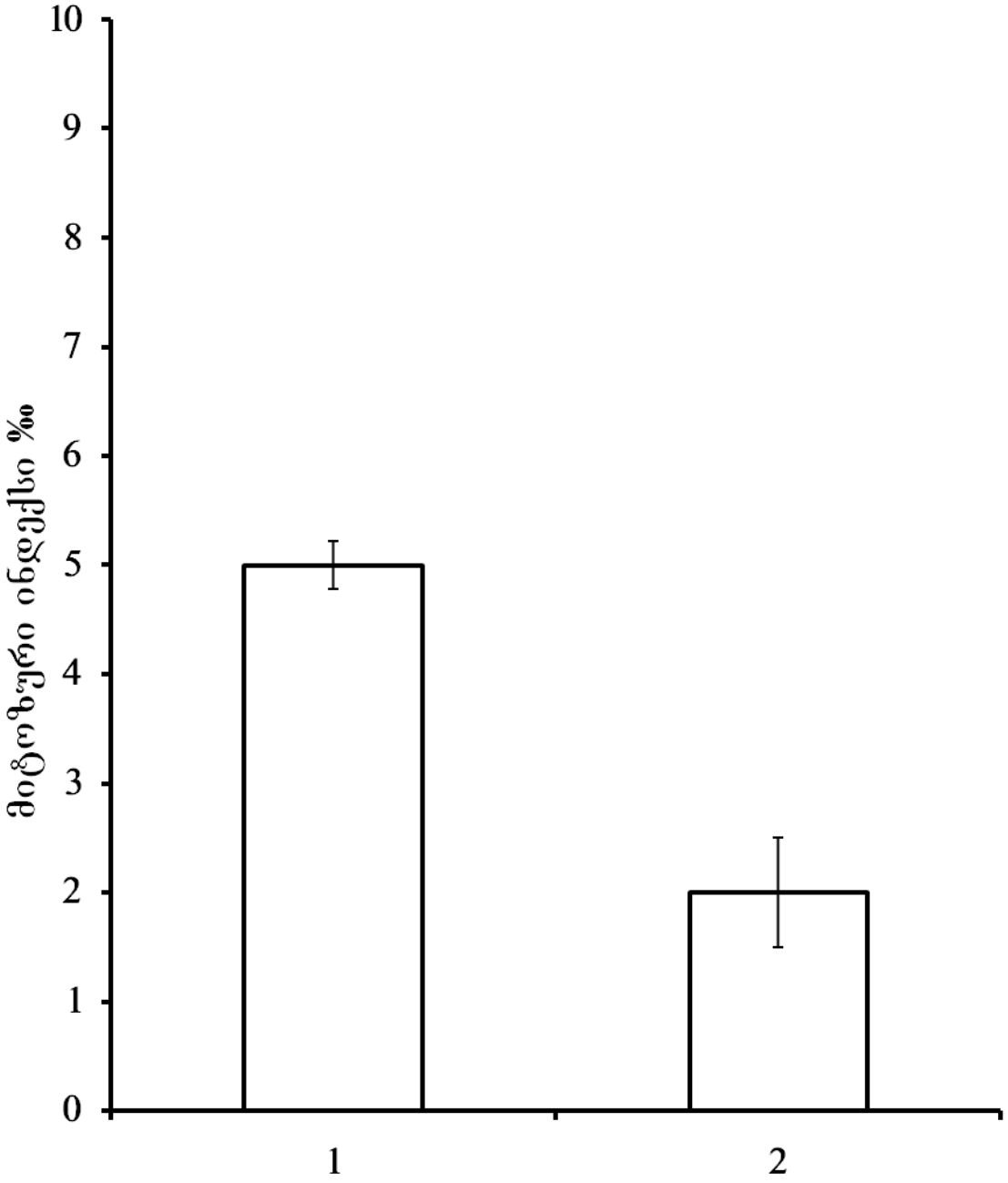
სურათი 3. მიტოზები პანკრეასის ქსოვილში ორგანოს რეზექციის შემდეგ (ოპერაციიდან მე-3 დღე) (შეღებვა – ჰემატოქსილინ-ეოზინი, 90X10).

3.1.2. ზრდასრული ვირთაგვას კუჭქვეშა ჯირკვლის რეპარაციულ რეგენერაციაზე ენდოგენური თერმოსტაბილური ცილოვანი კომპლექსის მოქმედების შესწავლა

კვლევის შემდგომ ეტაპზე შევისწავლეთ პანკრეასის თცკ-ს გავლენა რეზექცირებული ქსოვილის პროლიფერაციულ აქტიურობზე. ამ მიზნით, საცდელი ჯგუფის ცხოველებში ოპერაციიდან მე-3 დღეს (მაშინ როცა აღინიშნება მიტოზური ინდექსის მაქსიმალური მაჩვენებელი) ინტრაპერიტონიალურად შევიყვანეთ პანკრეასის თცკ (200მკგ). თცკ-ს ინექციიდან ერთ საათში როგორც საკონტროლო, ასევე საცდელი ჯგუფის ცხოველებს გავუკეთეთ კოლხიცინის ინექციები და ორი საათის შემდეგ მოვახდინეთ ეთერის ნარკოზის შემდეგ ცხოველების დეკაპიტაცია, მასალის აღება და დამუშავება. ორივე ჯგუფის ცხოველთა პანკრეასის ქსოვილის პარაფინის ანათლებზე ჰემატოქსილენ-ეოზინით შეღებვის შემდეგ და შევაფასეთ კოლხიცინური მიტოზური ინდექსის ცვლილება.

დადგინდა, რომ პანკრეასის თცკ დამთრგუნველად მოქმედებს რეგენერირებადი ქსოვილის უჯრედების მიტოზურ აქტიურობაზე. კერძოდ, გამოვლინდა, რომ საკონტროლო ჯგუფის ცხოველთა შესაბამის მაჩვენებელთან შედარებით, როგორც მე-4 სურათზე მოყვანილი დიაგრამებიდან ჩანს, მიტოზური ინდექსი დაახლოებით 50%-ით ქვეითდება პანკრეასის თცკ ინექციის შემდეგ (სურათი 4.).

ექსპერიმენტების შემდგომ სერიაში შევეცადეთ დაგვედგინა პანკრეასის თცკ-ს დამთრგუნველი ზემოქმედების ხანგრძლივობა. ამ მიზნით თცკ-ს მოქმედებით განპირობებული ეფექტები შევაფასეთ დინამიკაში, კერძოდ, ინექციიდან 5 დღის განმავლობაში. ამ მიზნით, პანკრეასის რეზექციიდან მე-2 დღეს ცხოველებში ინტრაპერიტონიალურად შეგვყავდა პანკრეასის თცკ და კოლხიცინური მიტოზური ინდექსის შესაფასებლად მასალას ვიღებდით ყოველდღე პირველი ოთხი დღის განმავლობაში. მე-5 სურათზე მოყვანილია რეგენერირებადი პანკრეასის ქსოვილში



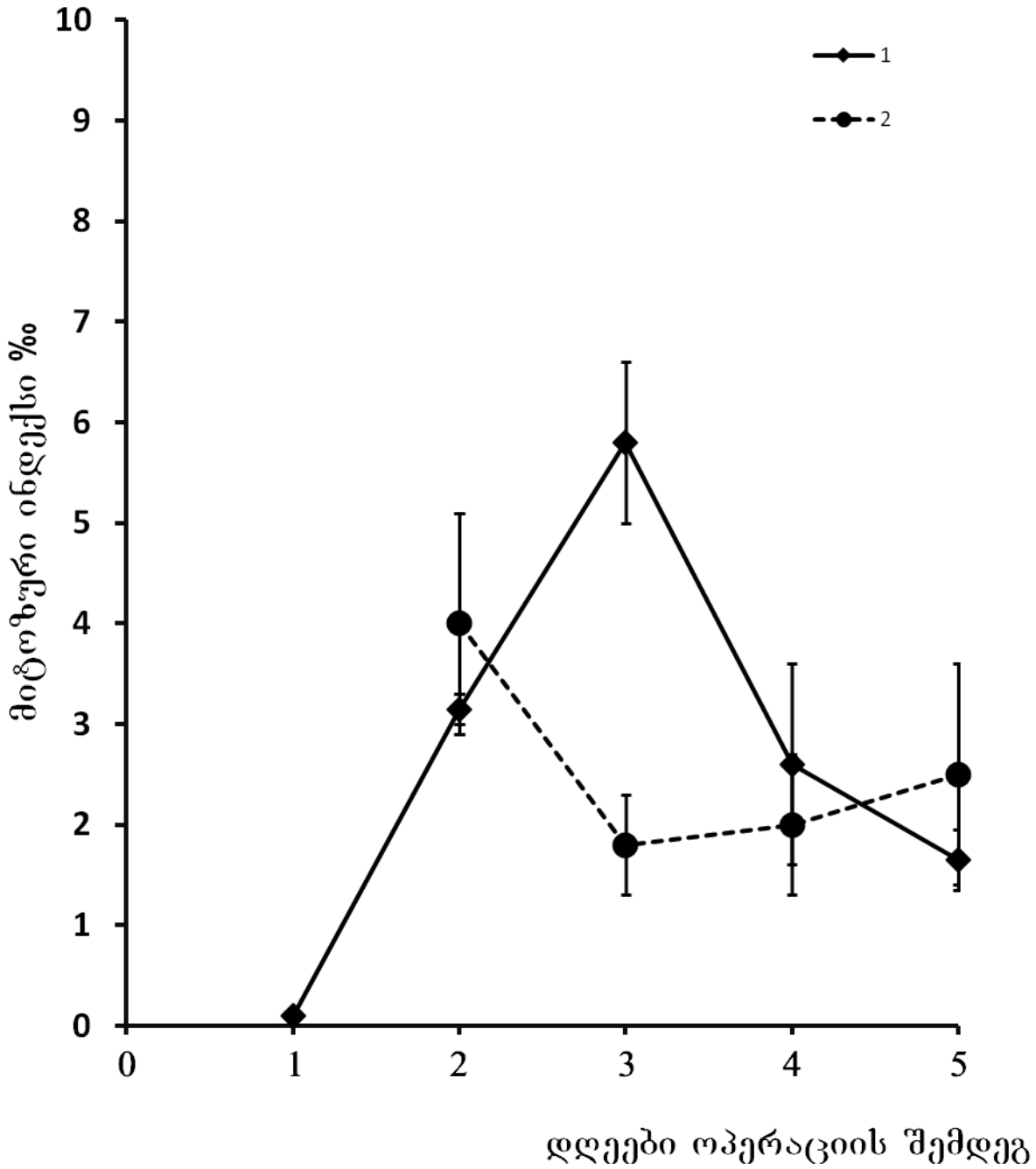
სურათი 4. პანკრეასის თცკ-ს გავლენა ზრდასრული ვირთაგვას ჰომოლოგიური უჯრედების პროლიფერაციულ აქტიურობაზე ორგანოს რეზექციიდან მ-3 დღეს (1 – კონტროლი (ორგანოს რეზექციიდან მე-3 დღე); 2 – ცდა (ორგანოს რეზექციიდან მე-3 დღე + პანკრეასის თცკ-ს ინექცია).

მიტოზური აქტიურობის ცვლილება ენდოგენური ცილოვანი კოპმპლექსის ზემოქმედების შემდეგ დინამიკაში.

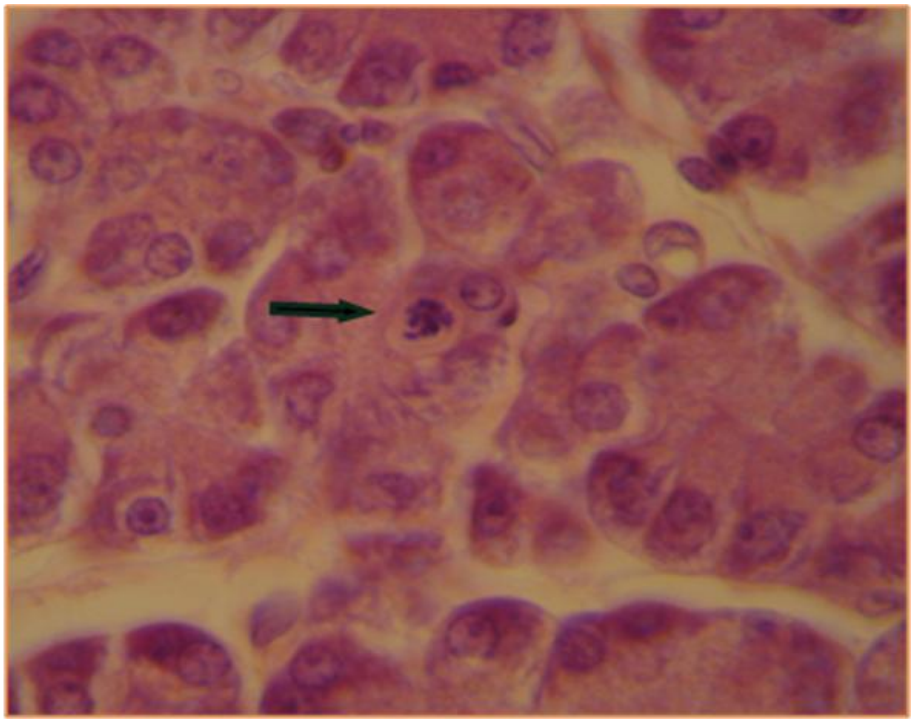
გამოკვლევებით დადგინდა, რომ პანკრეასის უჯრედებიდან გამოყოფილი თერმოსტაბილური ცილების კომპლექსის ჰომოლოგიური უჯრედების გამრავლებაზე დამთრგუნველი ზემოქმედება ინექციიდან პირველი ოცდაოთხი საათის განმავლობაში ვლინდება. აღნიშნული ეფექტი შენარჩუნებულია შემდგომ დღეებშიც. მიტოზური ინდექსის მაჩვენებელი საკონტროლო მნიშვნელობას მხოლოდ ინექციიდან ოთხი დღის შემდეგ უბრუნდება (სურათი 5).

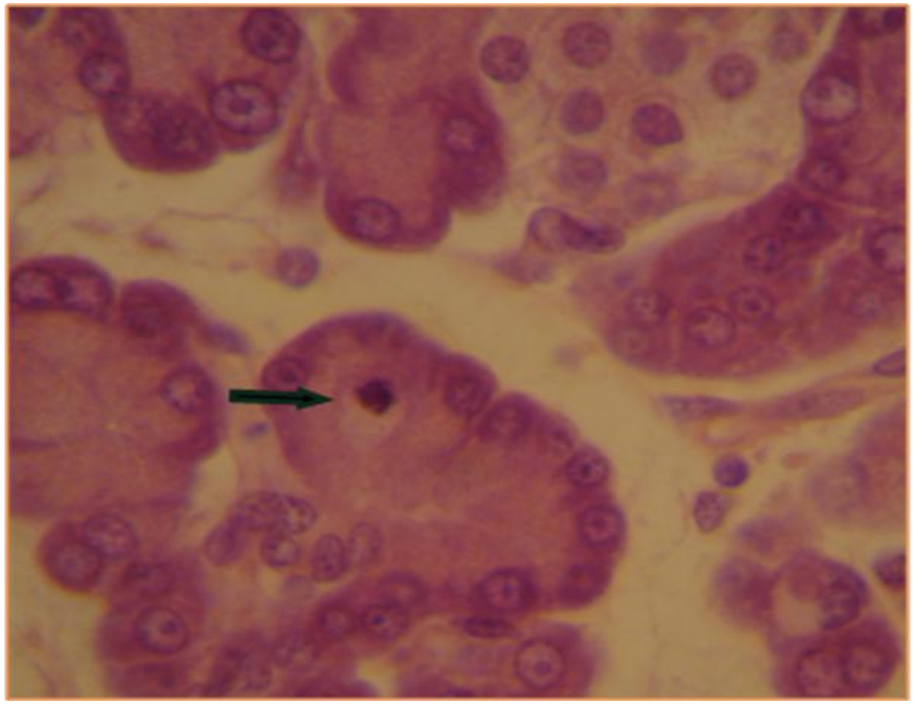
ვირთაგვას სხვადასხვა ქსოვილის უჯრედებიდან გამოყოფილი ცილოვანი კომპლექსების ჰომო და ჰეტეროტიპურ უჯრედებზე ჩატარებული ექსპერიმენტებით ნაჩვენებია, რომ თცკ-ს მოქმედებით მზარდი ორგანოს პროლიფერაციული აქტიურობის შემცირება ტრანსკრიპციის დათრგუნვის გზით მიიღწევა (Giorgobiani N. et al. 2005). ანალოგიური შედეგები არის მიღებული პანკრეასის თცკ-ს შემთხვევაში. კერძოდ, ნაჩვენებია, რომ პანკრეასის თცკ ზრდასრული ვირთაგვას ჰომოლოგიური უჯრედების ტრანსკრიპციული აქტიურობის დაქვეითებას იწვევს. პროლიფერაციისადმი სტიმულირებული ქსოვილის უჯრედების ინტერფაზაში მიმდინარე ტრანსკრიპციული პროცესები აუცილებელია უჯრედების რეპლიკაციისათვის და მიტოზის ფაზაში გადასვლისათვის. აღნიშნულიდან გამომდინარე შეიძლება ვიფიქროთ, რომ პანკრეასის რეზექციის დროს რეგენერირებად ქსოვილში თცკ მოქმედებს ინტერფაზის სხვადასხვა ფაზაში მყოფ უჯრედებზე. ამით აიხსნება მიტოზური აქტიურობის დამთრგუნველი ეფექტის შენარჩუნება თცკ-ს ინექციიდან 3 დღის განმავლობაში.

მე-6 სურათზე წარმოდგენილია პანკრეასის ჰისტოარქიტექტონიკის ამსახველი მიკროფოტოები ენდოგენური თცკ-ს მოქმედების შემდეგ. სურათიდან ჩანს, რომ თცკ-ს დამთრგუნველი ზემოქმედება ქსოვილში მიტოზური ფიგურების სიმცირით გამოიხატება (სურათი 6).



სურათი 5. პანკრეასის თცკ-ს გავლენა ზრდასრული ვირთაგვას პანკრეასის უჯრედების პროლიფერაციული აქტიურობის ცვლილებაზე ორგანოს რეზექციის შემდეგ დინამიკაში (1. პანკრეასის რეზექცია; 2. პანკრეასის რეზექცია + თცკ-ს რეზექციიდან მე-2 დღეს).





სურათი 6. მიტოზები პანკრეასის რეგენერირებად ქსოვილში პანკრეასის თცკ-ს ინექციის შემდეგ (ოპერაციიდან მე-3 დღე) (შეღებვა – ჰემატოქსილინ-ეოზინი, 90X10).

3.2. პანკრეასის თცკ-ს კომპონენტების შესწავლა

3.2.1. პანკრეასის თცკ-ს დაბალმოლეკულური ქვეფრაქციის გამოყოფა

ჩვენს მიერ ჩატარებული გამოკვლევებით, როგორც უკვე ზემოთ აღვნიშნეთ, ნაჩვენები იქნა ზრდასრული ვირთაგვას პანკრეასის ენდოგენური ცილოვანი კომპლექსის მონაწილეობა ორგანოს რეპარაციულ რეგენერაციაში. აღნიშნული ცილოვანი კომპლექსი, ისევე როგორც ზრდასრული თეთრი ვირთაგვას სხვადასხვა ქსოვილებიდან მიღებული თერმოსტაბილური ცილების კომპლექსები, როგორც წესი მიღებულია სპირტული ექსტრაციითა და თერმული დამუშავების გზით. დადგენილია, რომ მათ მსგავსი თვისებები და დაახლოებით იდენტური შედგენილობა გააჩნიათ. ნაჩვენებია, რომ აღნიშნული კომპლექსები, შეიცავს მოლეკულური მასით მნიშვნელოვნად განსხვავებულ ცილების ორ ქვეფრაქციას: დაბალმოლეკულური (12-14კდ) და შედარებით მაღალმოლეკულური მასების მქონე ცილების ჯგუფებს (40-60 კდ). მიუხედავად ამისა, თცკ არის მრავალკომპონენტიანი და შეიცავს ელექტროფორეზული ძვრადობის მიხედვით განსხვავებულ დაახლოებით თხუტმეტამდე ცილას (Giorgobiani N et al. 2005, Dzidziguri D. 2007).

ენდოგენური ფაქტორების ქსოვილიდან გასუფთავების მრავალი მეთოდი არსებობს. სხვადასხვა მეთოდის მეშვეობით ხდება განსხვავებული ბუნების ფაქტორების გამოყოფა. ერთ-ერთი მეთოდი, რომელიც გამოიყენება ფაქტორების მისაღებად არის უხეში ქსოვილოვანი ექსტრატების მიღება. ასეთი ექსტრაქტები, როგორც ცნობილია, პროლიფერაციის რეგულატორებთან ერთად შეიცავს ისეთ ნივთიერებებს რომლებიც არაპირდაპირ გავლენას ახდენენ პროლიფერაციაზე (Kiger et all 1971). სწორედ ამიტომ, საჭიროა მათი შემდგომი გასუფთავება და აქტიური საწყისის გამოვლენა. ამავე დროს ცნობილია, რომ რიგ შემთხვევაში ბიოლოგიური ეფექტები ცილათა კომპლექსური მოქმედებით მიიღწევა.

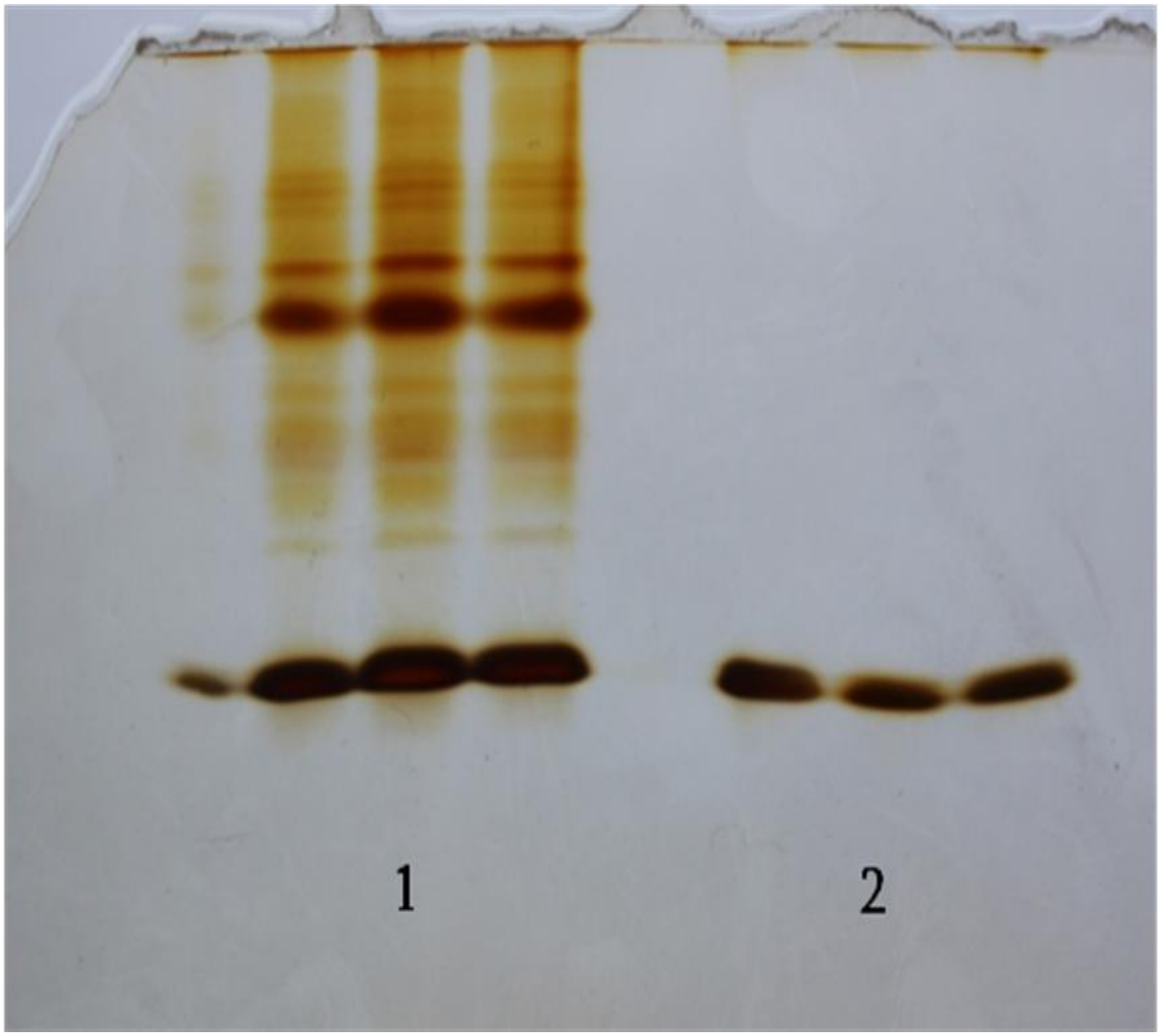
აქედან გამომდინარე, კვლევის შემდგომ ეტაპზე გადავწყიტეთ პანკრეასის თერმოსტაბილური ცილოვანი კომპლექსის შემადგენელი კომპონენტების

თანამიმდევრულად გამოცალკავება, რათა დაგვედგინა თითოეულის როლი თცკ-ს მიღწეულ ეფექტებში.

ამ მიზნით, გამოვიყენეთ ელექტროფორეზის მეთოდი. ცილების ელექტროფორეზული ანალიზი ფართოდ გავრცელებული მეთოდია და გამოიყენება ცილოვანი ფაქტორების გასასუფთავებლად (Ros A, et all 2002). ამ მეთოდის მეშვეობით შესაძლებელია დადგინდეს არა მხოლოდ კომპლექსში შემავალი კომპონენტების რაოდენობა, არამედ თითოეული კომპონენტის მასა.

თავდაპირველად შევეცადეთ ცილოვანი კომპლექსიდან გამოგვეყო დაბალმოლეკულური ქვეფრაქცია. ამ მიზნით, მოვახდინეთ გელიდან მისი შემცველი ნაწილის ამოჭრა, დამუშავება და მიღებული ნიმუშის ელექტროფორეზი პოლიაკრილამიდის გელში (ცილების ნატიური ფორეზი). დადგინდა, რომ გამოყოფილი ქვეფტრაქცია ინარჩუნებს ნატიურობას, რაზეც მიუთითებს მსგავსი ელექტოფორეზული ძვრადობა. მიღებული შედეგებიდან გამომდინარეობს ასევე, რომ გამოცალკავებული ქვეფრაქცია იდენტურია ტოტალური თცკ-ს დაბალმოლეკულური ქვეფრაქციის, რომლის წონა მერყეობს 12 დან 14 კილოდალტონამდე (სურათი 7).

თცკ-ს დაბალმოლეკულური ქვეფრაქციის შემდგომი კვლევა, მისი ნატიურობის დადგენა უკვე შემდგომი კვლევის საგანს წარმოადგენს.



სურათი 7. პანკრეასის თერმოსტაბილური ცილოვანი კომპლექსის (თცკ) ნატიური გელ-ელექტროფორეზი.

1. ტოტალური ცილოვანი კომპლექსი;

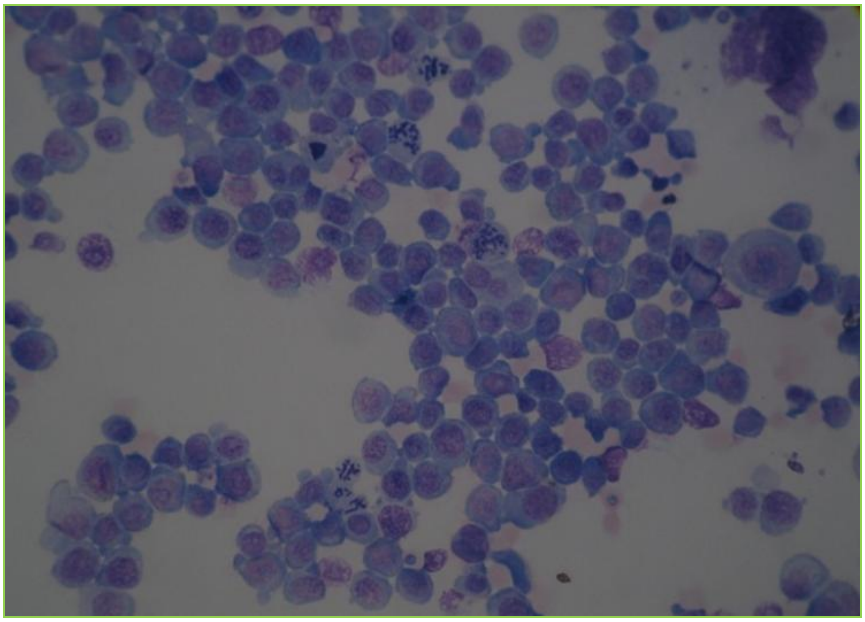
2. თცკ-დან გამოყოფილ დაბალმოლეკულური ფრაქცია.

3.3. პანკრეასის ენდოგენური თერმოსტაბილური ცილოვანი კომპლექსის მოქმედება ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემიის უჯრედების პროლიფერაციულ აქტიურობაზე კულტურაში

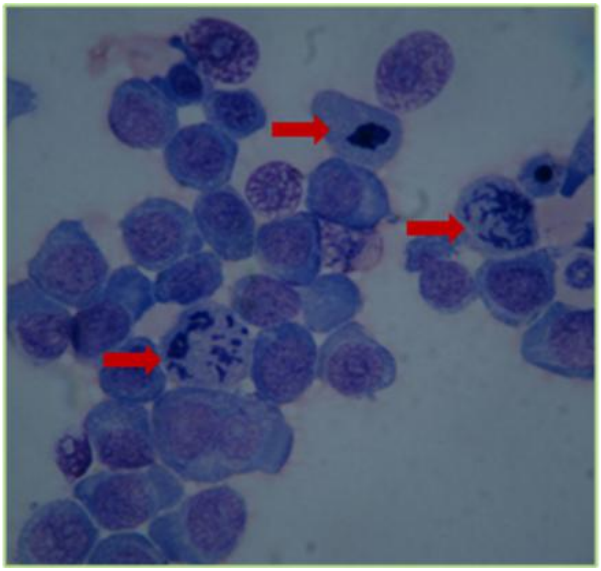
დღეისათვის დიდი მნიშვნელობა ენიჭება რეგულატორული გენებით კოდირებადი ენდოგენური ცილოვანი ფაქტორების შესწავლას, რადგან პროლიფერაციის მარეგულირებელი მექანიზმების მოშლა იწვევს არაკონტროლირებად ზრდას, რაც სიმსივნის წარმოქმნის საფუძველს წარმოადგენს. ამ შემთხვევაში უჯრედებში ან აღარ ხდებ ენდოგენური ინჰიბიტორების ექსპრესია, ან მათი ის რაოდენობა, რომელიც დამახასიათებელია ნორმალური უჯრედებისთვის არ არის საკმარისი ავთვისებიანი ზრდის შესაჩერებლად.

სიმსივნის მკურნალობის დროს, ხშირად მიმართავენ ქსოვილის ფართომასშტაბიან რეზექციას და ფარმაკოლოგიური პრეპარატების გამოყენებას ან დამცველბითი მექანიზმების გააქტიურებას ზრდის ფაქტორების მეშვეობით (Powers C.J. et al. 2000). ამ შემთხვევაში სასურველია ორგანოს დარჩენილი ნაწილის სიცოცხლისუნარანობის შენარჩუნება. ამ თვალთაზრისით მნიშვნელოვან შესწავლის საგანს წარმოადგენს პროლიფერაციის მარეგულირებელი ენდოგენური ფაქტორების გამოყენება სიმსივნის მკურნალობაში.

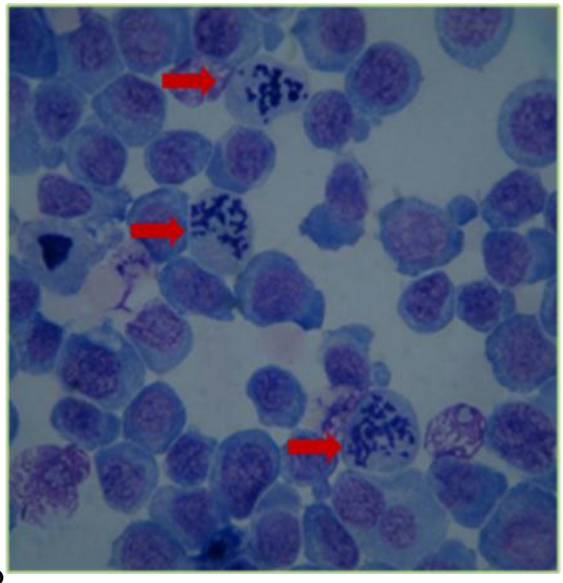
აქედან გამომდინარე კვლევის შემდგომ ეტაპზე გადავწყვითეთ პანკრეასის თცკ-ს ზეგავლენის შესწავლა სიმსივნური უჯრედების გამრავლებაზე. ამ მიზნით შევარჩიეთ ადამიანის B ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემიის უჯრედები. ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემიის კულტურის ნაცხები მოყვანილია მე-8 სურათზე. აღნიშნულ ნაცხებზე განირჩევა ტრანსფორმირებული ლიმფობლასტები და შეინიშნება უჯრედების პოლიმორფია. კარგად განირჩევა მიტოზური ფიგურები, რომელიც მხედველობის არეში 2 და მეტიც კი შეიძლება შეგვხვდეს (სურათი 8).



ა



ბ



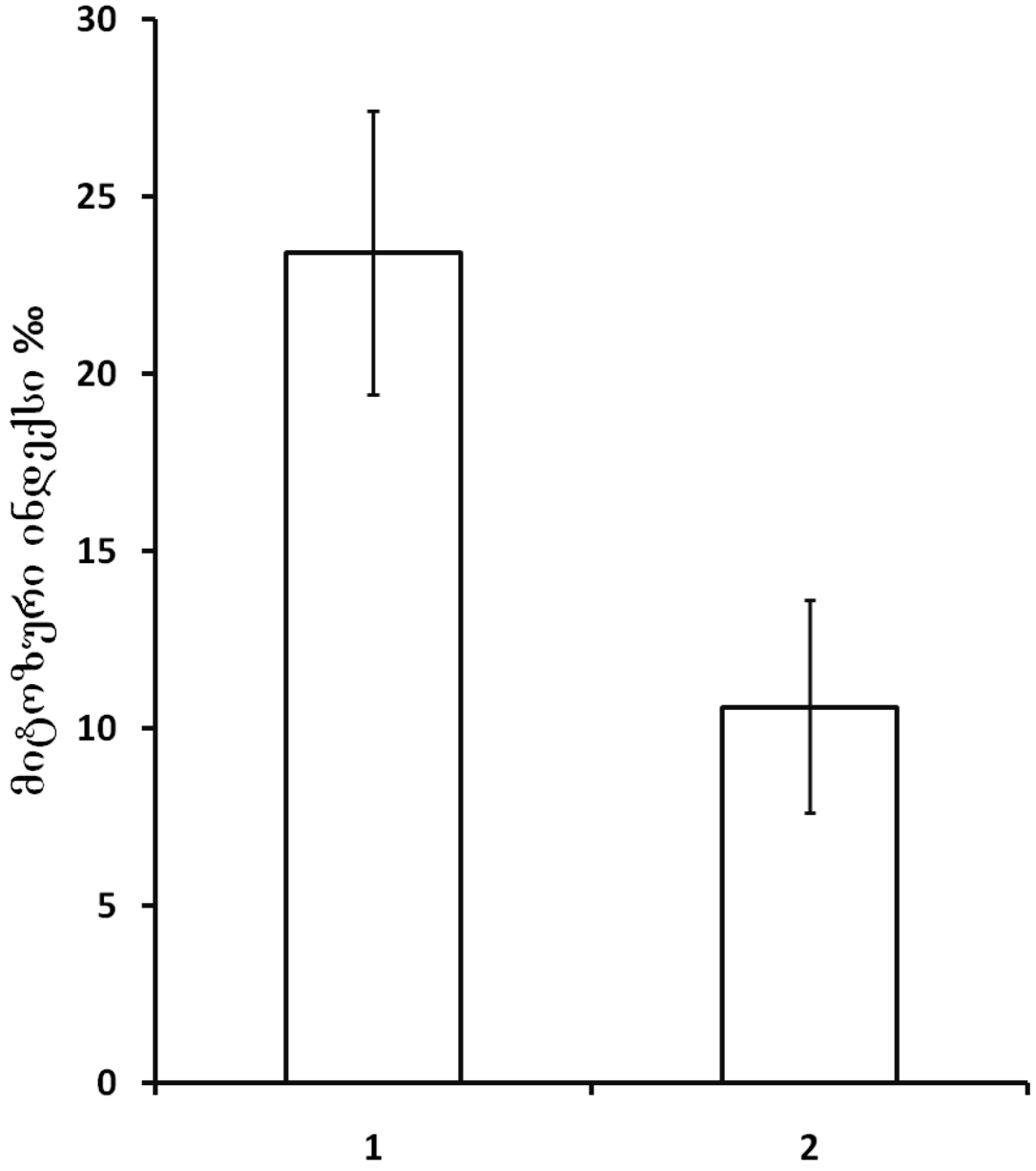
გ

სურათი 8. მიტოზური ფიგურები ადამიანის B ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემიის კულტურაში (ა – 20X10; ბ, გ – 90X10).

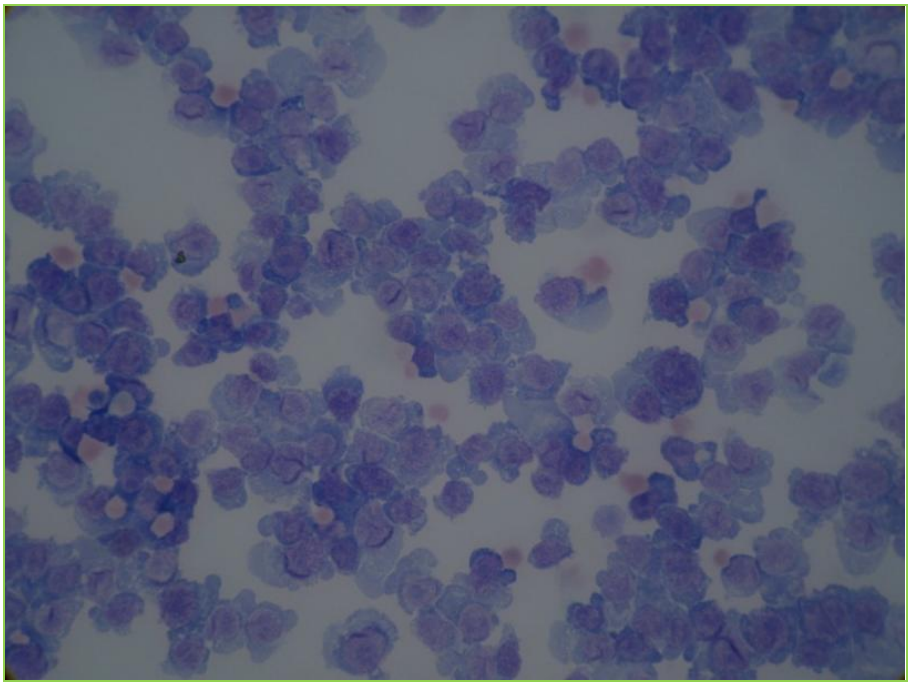
ჩვენს მიერ ჩატარებული გამოკვლევებით დადგინდა, რომ პანკრეასის თცკ მაინჰიბირებელ ზეგავლენას ახდენს ადამიანის B ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემიის უჯრედების პროლიფერაციული აქტიურობაზე. კერძოდ თცკ-ს ზეგავლენით კონტროლთან შედარებით 50%-ით ქვეითდება ტრანსფორმირებული უჯრედების მიტოზური ინდექსი კულტურაში (სურათი 9).

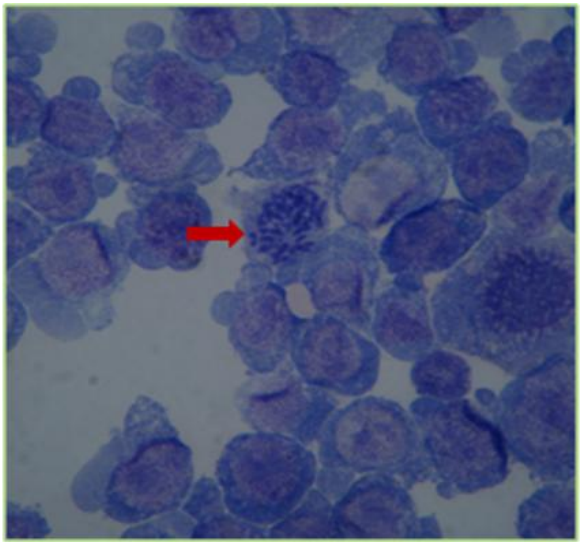
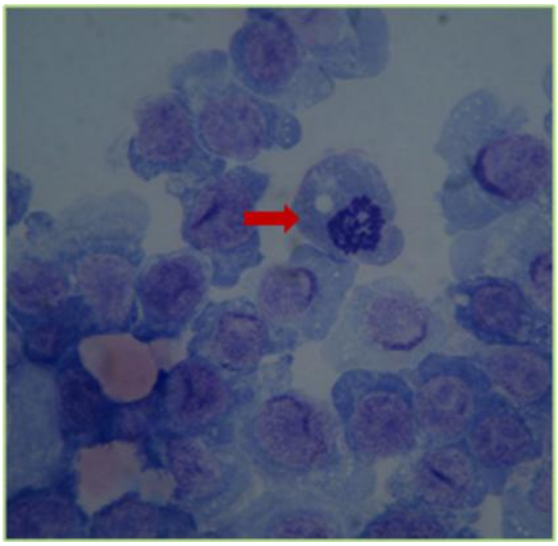
მე-10 სურათზე კი წარმოდგენილია ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემიის კულტივირებული უჯრედების ნაცხები, პანკრეასის თცკ-ს ზემოქმედების შემდეგ. უჯრედები ამ შემთხვევაშიც პოლიმორფულია. პრეპარატის ზოგიერთ უბანში ტრანსფორმირებულ უჯრედებს შორის გვხვდება დესტრუქციული უჯრედები, ბირთვები პიკნოზურია. აგრეთვე კარგად შეიმჩნევა მიტოზური ფიგურების სიმცირე (სურათი 10).

ზემოთ თქმულიდან გამომდინარეობს, რომ ზრდასრული ვირთაგვას პანკრეასის უჯრედებიდან მიღებული თერმოსტაბილური ცილების კომპლექსს აქვს უნარი დათრგუნოს ტრანსფორმირებული უჯრედების (ადამიანის B ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემიის კულტივირებული უჯრედები) გამრავლება ინ ვიტრო სისტემაში. აქედან ასევე გამომდინარეობს, რომ თცკ-ს ქსოვილსპეციფიკურობა არ ვლინდება ტრანსფორმირებულ უჯრედებთან მიმართებაში. თცკ-ს კომპონენტების საბოლოო და სრული იდენტიფიკაციის შემდეგ, მომავალში შესაძლებელი გახდება სიმსივნური უჯრედების გამრავლებაზე თცკ-ს მოქმედების უფრო სიღრმისეული შესწავლა და კლინიკური გამოკვლევების დაგეგმვა.



სურათი 9. პანკრეასის თცკ-ს ზემოქმედება ადამიანის B ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემიის უჯრედების პროლიფერაციულ აქტიურობაზე (1 – კონტროლი; 2 – ცდა).

ა 

ბ  

სურათი 10. პანკრეასის თცკ-ს გავლენა ადამიანის B ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემიის კულტურის უჯრედების პროლიფერაციულ აქტიურობაზე - მიტოზური ფიგურები. (ა – 20X10; ბ, გ – 90X10)

დასკვნები

1. თეთრი ზრდასრული ვირთაგვას პანკრეასის თერმოსტაბილურ ცილოვან კომპლექსს ჰომოტიპურ ქსოვილში აღდგენითი პროცესების ინჰიბირების უნარი გააჩნია.

2. თეთრი ზრდასრული ვირთაგვას პანკრეასის თერმოსტაბილური ცილოვანი კომპლექსის ქსოვილოვანი სპეციფიკურობა არ ვლინდება ინ ვიტრო სიმსივნურ უჯრედებთან მიმართებაში.

გამოყენებული ლიტერატურე

1. ი. მოდებაძე, გ. მოსიძე, ნ. კიკნაძე, დ. ძიძიგური. ვირთაგვას კუჭქვეშა ჯირკვლის უჯრედების ზრდის მარეგულირებელი ენდოგენური ფაქტორის გამოყოფა და დახასიათება. სამედიცინო ჟურნალი, სამეცნიერო-პრაქტიკული ჟურნალი, სამედიცინო ინსტიტუტი "ქუთაისი", გვ. 25-29, #1 (2), 2010.
2. Акамов Г. А., И. Г. Акмаев, Ю. П. Афанасьев, В. П Бабминдра, Руководство по Гистологии Том II, 2001.
3. Бродский Л. В., Уриваева И.В. Клеточная полиплоидия, пролиферация и диференцировка.// Москва, «Наука», 1981, 256стр.
4. Карлсон Б. М. Регенерация.//, Москва, "Наука", 1986, г.1, стр.5.
5. Клишов А.А. Гистогенез и регенерация тканей // Ленинград, медицина, 1984.
6. Лиознер Л.Д. Новое в учении о регенерации.// Москва, медицина, 1977, стр.33.
7. Саламатина Н.Б. Действие внутриклеточных факторов на рост почки крысы после частичной нефректомии.// Сообщения Акад. Наук Груз. ССР 1975, Т.78, №3, стр.725-728.
8. Сидорова В.Ф. Постнатальный рост и восстановление внутренных органов у позвоночных изд «Наука» 1969, с. 187.
9. Туманишвили Г.Д., Лежава Р.А., Гогсадзе Л.А., Гиоргадзе Н.В. Внутритканевые рост-тормозящие вещества сердца. Цитология, 1981, 23:1133-1141.
10. Фильченков А.А., В.Н. Залесский, Р.С. Стойка TGFB: ПРОАТЕРОГЕННЫЙ ИЛИ АНТИАТЕРОГЕННЫЙ ЦИТОКИН// Журнал 'Цитокины и воспаление', 2002, № 1.
11. Amano O, Iseki S. - Expression and localization of cell growth factors in the salivary gland. - Kaibogaku Zasshi 2001, v.76, I. 2, pp. 201-212.
12. Brockenbrough, J. S., Weir G. C., and S. Bonner-Weir. Discordance of exocrine and endocrine growth following 90% partial pancreatectomy in the rat. Diabetes 37: 232-236, 1988.

13. Casagrande F., Malecaze F., Manenti S., Darbon J-M.- Regulation by transforming growth factor-beta 1 of G1 ciclin-dependent kinases in humen retinal epithelial cells.- Pilliare Marie-Jeanne, Experimenlat Eya Research 1999, vol. 68, pp. 193-199.

14. Davis, B. J. Disc Electrophoresis. II. Method and Application to Human Serum Proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121: 404-427, 1964.

15. Dazhong Xu, Anthony Makkinje, John M. Kyriakis. Gene 33 Is an Endogenous Inhibitor of Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor Signaling and Mediates Dexamethasone-induced Suppression of EGF Function. Vol. 280, Issue 4, 2924-2933, 2005.

16. De Lisle R.C., Grendell J.H., Williams J.A. Growing pancreatic acinar cells (postpancreatitis and fetal) express a ductal antigen. Pancreas. 1990; 5:381-8.

17. Denrynck R., Jarett J.A., Chen E.Y., Eaton D.H., Bell J.R., et al.- Human trasforming factor-b complementary DNA seqence and expression in normal and transforming cells. – Nature, 1985, 316, 701-705.

18. Dijke P.T., Iwata K.K., Growth factors for wound healing, //Bio.Technology, 1992, Vol. 7, N.8, pp. 793-798.

19. Dzidziguri D., Aslamazishvili T., Chkhobadze M., Khorava P., Chigogidze T., Managadze L. The influence of white rat protein factor on transcriptional activity of normal and transformed cells// Proc. Georgian Acad. Sci., Biol. Ser. B. 2004, 2(1-2):30-35.

20. Dzidziguri D., Chigogidze TG, Managadze LG, Aslamazishvili TT, Kerkendzhiia SM. The study of kidney protein complexes that inhibit gene expression in the nuclei of homotypic cells. Georgian Medical News, 2007, N2 (143): 50-53

21. Giorgobiani N, Dzidziguri D, Rukhadze M, Rusishvili L, and Tumanishvili G Possible role of endogenous growth inhibitors in regeneration of organs: searching for new approaches. cel biol intern. 2005, 29(12):1047-1049.

22. Hayashi Keiko, Tsuyoshi Takahashi, Akira Kakita, Shohei Yamashina. Regional Differences in the Cellular Proliferation Activity of the Regenerating Rat Pancreas after Partial Pancreatectomy Vol. 62 (1999) No. 4 P 337-346 Archives of Histology and Cytology

23. Hashimoto N., Exocrine pancreatic function after total gastrectomy in rat. Hepatogastroenterology, 2009; 56(94-95):1274-6.

24. Hu M.C-T, Qiu R., Wang Y.P., Hill D., FGF-18, a novel member of the fibroblast growth factor family, stimulates hepatic and intestinal proliferation. Molecular and Cellular Biology, 1998, Vol 18, pp. 6063-6074.

25. Kiger N., Isolation and immunological study of thymic lymphocytic inhibitory factors. Europ. J. Clin. Biol. Res., 1971, 16, 556-572.

26. King M. W., Growth factors.// Medical Biochemistri, Terre Haute Centre for Medical Education, 1999

27. Kritzik MR, Jones E, Chen Z, Krakowski M, Krahl T, Good A, Wright C, Fox H, Sarvetnick N. PDX-1 and Msx-2 expression in the regenerating and developing pancreas. J. Endocrinol. 1999; 163: 523-30.

28. Lin SY., Makino K., Xia W., Matin A., Wen Y., Kwong KY., Bourguignon L., Hung MC. Nuclear localization of EGF receptor an dits potential new role as a transcription factor. Nat. Cell Biol., 2001, V.3, Issue 9, pp.802-8.

29. LodishH, Berk A, Zipursky S.L, Matsudaira P, Baltimore D, Dsarnell J.E, Molecular Cell Biology. W.H. Freeman and Company, New York 2000, 1200 ps.

30. Lowry D.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randell R.J., Protein measurement with the folin phenol reagent// J. Biol. Chem. 1951, vol. 193, p. 265-275.

31. Mathews Lisa**,** Nagaraja Haleagrahara and Srikumar Chakravarthi /Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) Reduces Ischemic Changes and Increases Circulating Angiogenic Factors in Experimentally - Induced Myocardial Infarction in Rats/ *Vascular Cell* 2011, **3**:13 doi:10.1186/2045-824X-3-13

32. Moses H. L., Branum E. L., Proper J.A., Robinson R. A. - Transforming growth factor production by chemically transformed cells. – cancer Res., 1981, 41, 7, 2842-2848.

33. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. Endocr Relat Cancer. 2000; 7:165-97.

34. Ros A, Faupel M, Mees H, Oostrum Jv, Ferrigno R, Reymond F, Michel P, Rossier JS, Girault HH. Protein purification by Off-Gel electrophoresis. Proteomics. Feb;2(2):151-6 2002

35. Sharma, A, Zangen DH, Reitz P, Taneja M, Lissauer ME, Miller CP, Weir GC, Habener JF, and Bonner-Weir S. The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration. Diabetes 48: 507-513, 1999.

36. Sussenbach J.S., Rodenburg RTJ., Scheper W., Holthuizen P., Transcriptional and post-transcriptional regulation of the human IGF-II gene expression.,// Advances in Experimental Medicine and Biology, 1998, Vol. 343, pp. 63-71.

37. Walker NI, and Pound AW. An autoradiographic study of the cell proliferation during involution of the rat pancreas. J Pathol 139: 407-418, 1983.