

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი  
ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი

მერაბი სეფაშვილი

ალოქსანური დიაბეტის პირობებში ჰიპერგლიკემიით  
გამოწვეული ფუნქციური დატვირთვის საპასუხოდ ღვიძლის  
ადაპტაციის მექანიზმი

საბაკალავრო პროგრამა გამოყენებითი ბიომეცნიერებები და ბიოტექნოლოგია

ნაშრომი შესრულებულია გამოყენებითი ბიომეცნიერებების  
ბაკალავრის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: დიანა ძიძიგური

ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი

თბილისი, 2021 წ.

# სარჩევი

ანოტაცია .....	3
Annotation.....	4
შესავალი .....	5
თავი 1. ლიტერატურის მიმოხილვა.....	8
1.1 შაქრიანი დიაბეტი.....	8
1.1.1. ალოქსანური შაქრიანი დიაბეტის ექსპერიმენტული მოდელი.....	10
1.2 პოლიპლოიდური უჯრედების წარმოქმნის მექანიზმები.....	15
თავი 2. მასალა და მეთოდები .....	18
2.1 კვლევის ობიექტი და მოდელი.....	18
2.2 მასალის ფიქსაცია და პრეპარატების მომზადება სინათლის მიკროსკოპში შესწავლისათვის .	19
2.3 კოლხიციური მიტოზური ინდექსის განსაზღვრა.....	19
2.4 ჰეპატოციტების ბირთვებში დნმ-ს კონცენტრაციის განსაზღვრის მიზნით პრეპარატების მომზადება და შეღებვა.....	20
2.5 დნმ-ს კონცენტრაციის განსაზღვრა კომპიუტერული პროგრამის Image J დახმარებით .....	20
2.6 იმუნოჰისტოქიმიური ანალიზი .....	20
თავი 3. კვლევის შედეგები და მათი განხილვა.....	22
3.1 ალოქსანის დიაბეტოგენური დოზის საპასუხოდ ზრდასრული თეთრი ვირთაგვების სისხლში გლუკოზის კონცენტრაციის ცვლილებების შეფასება.....	22
3.2 ალოქსანური დიაბეტის საწყის ეტაპზე ზრდასრული ვირთაგვების პანკრეასში ინსულინმაპროდუცირებელი უჯრედების აქტიურობის ცვლილება.....	24
3.3 ალოქსანის დიაბეტოგენური დოზის საპასუხოდ ზრდასრული ვირთაგვების ღვიძლის ქსოვილის ჰისტორიტიექტონიკის ცვლილებების შესწავლა.....	25
3.4 ზრდასრული ვირთაგვების ღვიძლის პროლიფერაციული აქტიურობის ცვლილებების შეფასება.....	27

3.5 ალოქსანური დიაბეტის საწყის ეტაპზე ზრდასრული ვირთაგვების ღვიძლში სხვადასხვა პლოიდობის ჰეპატოციტების რაოდენობრივი თანაფარდობის ცვლილებების შესწავლა.....	29
3.6 ნაწილობრივი ჰეპატექტომიით ინდუცირებული ალდგენითი ზრდის საწყის ეტაპზე ზრდასრული ვირთაგვას ღვიძლის ჰეპატოციტების პლოიდობის ცვლილებების შესწავლა .....	32
დასკვნები.....	34
გამოყენებული ლიტერატურა.....	35

## ანოტაცია

შაქრიანი დიაბეტი, მისი გავრცელების სიხშირის, ინვალიდობისა და სიცოცხლის ხანგრძლივობის თვალთახედვით, არა მარტო საქართველოში, არამედ მთელ მსოფლიოში წარმოადგენს, როგორც მნიშვნელოვან სამედიცინო ასევე, სოციალურ-ეკონომიკურ პრობლემას. აღნიშნული პათოლოგიის ძირითადი არსი ისაა, რომ ორგანიზმში არ ხდება ინსულინის სინთეზი ან სინთეზირებული ინსულინის ეფექტურად გამოყენება. უკანასკნელი წლების კვლევებით, შაქრიანი დიაბეტის ექსპერიმენტულ მოდელზე ნაჩვენებია, ალოქსანის ან სტრეპტოზოტოცინის პრეპარატების ინექციიდან 1 თვის შემდეგ, ღვიძლში მაღალპლოიდური ჰეპატოციტების ( $2c \times 2$ ) რაოდენობის დაქვეითება. აღნიშნული მოვლენა აიხსნება ინსულინის კონცენტრაციის შემცირებით, რომელიც ციტოჩონჩხის რეორგანიზაციის დროს აკონტროლებს ციტოკინებს და შესაბამისად, მაღალპლოიდური უჯრედების რაოდენობას. ამავე დროს, არ არის შესწავლილი იცვლება თუ არა მაღალპლოიდური უჯრედების თანაფარდობა დაავადების განვითარების საწყის ეტაპზე (პირველი 48 სთ), როდესაც აღინიშნება გლუკოზის კონცენტრაციის მკვეთრი ცვლილებები.

წარმოდგენილი შრომის მიზანი იყო ჰიპერგლიკემიით გამოწვეული ფუნქციური დატვირთვის საპასუხოდ ღვიძლის ადაპტაციის მექანიზმის შესწავლა.

დადგინდა რომ ალოქსანის ინექციიდან 48 სთ-ში არ იცვლება ჰეპატოციტების მიტოზური აქტიურობა. ამავე დროს ღვიძლში სტატისტიკურად სარწმუნოდ იზრდება 4c უჯრედების რაოდენობა ( $p < 0.05$ ).

ალოქსანური დიაბეტის (თეთრი ზრდასრული ვირთაგვების ექსპერიმენტული მოდელი) განვითარების საწყის ეტაპზე (48 სთ) ღვიძლზე გაზრდილი ფუნქციური დატვირთვის საპასუხოდ პროლიფერაციული აქტიურობის ცვლილების გარეშე, მაღალპლოიდური ჰეპატოციტების ( $G_{2-0}$  პოპულაცია) წარმოქმნა, ორგანოს ადაპტაციურ თავისებურებას წარმოადგენს.

## Annotation

Diabetes mellitus represents a serious medical and social-economical problem because of its spread level and effects on disablement and life expectancy. The mentioned pathology is characterized by a lack of insulin synthesis or non-effective uptake of produced insulin. Recent studies and research have shown a decrease of high ploidy ( $2c \times 2$ ) hepatocytes within one month of injection of alloxan or streptozotocin drug in Diabetes mellitus experimental models. The described phenomenon can be explained by a decrease of insulin concentration, which controls cytokinesis, and accordingly the amount of high ploidy cells during cytoskeleton reorganization. Nevertheless, the changes in correlation between diploid and high ploidy cells is not investigated at the initial phase of disease (within the first 48 hours) when extreme changes in glucose concentration are indicated.

The aim of the presented work was to study the adaptive mechanism of the liver in response to hyperglycemic functional stress.

It was found that in 48 hours after alloxan injection there is no significant change in hepatocyte mitotic activity. Nevertheless, the amount of  $4c$  cells in liver is significantly increased ( $p < 0.05$ )

Formation of high ploidy hepatocytes ( $G_{2-0}$  population) without changes in proliferation activity in response to increased functional stress on liver during initial phase (within the first 48 hours) of alloxan induced diabetes (white adult rat experimental model) is an adaptive peculiarity of the organ.

## შესავალი

ძუძუმწოვრების ორგანიზმში ღვიძლი არის ორგანო, რომელიც გამოირჩევა მეტაბოლური ფუნქციების მრავალფეროვნებით და გააჩნია რეგენერაციის უნიკალური უნარი. ღვიძლის ყველა ფუნქცია და განახლების მაღალი უნარი ძირითადად მისი პარენქიმული უჯრედების, ჰეპატოციტების (ორგანოს მასის 80%-ს შეადგენს) მეშვეობით ხორციელდება. დადგენილია, რომ მასის დაკარგვისას ღვიძლის კომპენსატორული და ადაპტაციური ზრდა მიმდინარეობს მკაცრად რეგულირებადი ისეთი ძირითადი თანამიმდევრული პროცესებით, როგორებიც არის: პროლიფერაცია, ჰიპერტროფია და პოლიპლოიდიზაცია (პროცენტული წილებით 50, 20 და 30 შესაბამისად). მიუხედავად ზემოთ აღნიშნულისა, ღვიძლის აღდგენითი ზრდის პროცესების უჯრედული და მოლეკულური მექანიზმების შესწავლა დღემდე აქტუალურ პრობლემად რჩება, რადგან, გაირკვა, რომ სხვადასხვა პათოლოგიის და განსაკუთრებით ქრონიკული დაავადებების (ქრონიკული ვირუსული ჰეპატიტი, ალკოჰოლური ინტოქსიკაცია და თანმხლები პათოლოგიები, მაგ., ციროზი) დროს მისი განახლების უნარი არ აღმოჩნდა საკმარისი. უახლესი გამოკვლევებით მოპოვებულია შედეგებით მწირი ინფორმაცია იმის შესახებ, რომ ღვიძლის განახლება ყოველთვის არ მიმდინარეობს რეგენერაციის ზემოთ ხსენებული სამივე მექანიზმის იმავე თანამიმდევრობით. მაგალითად, დადგენილია, რომ, ალიმენტარული დისლიპიდემიის დროს, ჰეპატოგენური რაციონის გამოყენების ხანგრძლივობასა და დაზიანების ხარისხზე დამოკიდებული რეგენერაციის რომელი მექანიზმით მოხდება ორგანოს განახლება. კერძოდ, ნაჩვენებია, რომ საწყის ეტაპზე ქსოვილის განახლება ძირითადად ღვიძლის პარენქიმული უჯრედების პლოიდობის ზრდის ხარჯზე მიიღწევა (Бивалькевич, Карман, 2009); ჰეპატოციტებში პლოიდობის ზრდა ნაჩვენებია ასევე, ღვიძლში რკინის და სპილენძის დაგროვების შედეგად long-evans cinnamon (LEC) ვირთავებში უილსონის დაავადების მოდელზე (Yamada, 1998). პოლიპლოიდიზაციის ხარისხის ზრდა დადგენილია ასევე, რადიაციული და ოქსიდაციური სტრესის ფონზე (Gentric, 2015). ლიტერატურული მონაცემებით ნაღვლის საერთო სადინრის გარეთ დრენირების შემთხვევაში ნაწილობრივ ითრგუნება ღვიძლის პროლიფერაციული აქტიურობა. ნაჩვენებია, ასევე ნსს-ის ლიგირებიდან 4 დღის შემდეგ, დესტრუქციული ღვიძლის პარენქიმაში უჯრედების პლოიდობის ზრდა (ბაკურაძე, 2006). ტრავმის საპასუხოდ დნმ-ის

პლოიდობის ზრდა ასევე აღწერილია ძუძუმწოვრების სხვადასხვა ორგანოს (გული, რქოვანა) ქსოვილებშიც.

ზემოთ აღნიშნულიდან გამომდინარეობს, რომ ზოგიერთი პათოლოგიის დროს საწყის ეტაპზე ღვიძლში მაღალპლოიდური უჯრედების რაოდენობრივი ცვლილებები პოლიპლოიდიზაციის ინიციაციის სტიმულაციით მიიღწევა. გენომის ჯერადი ზრდა, ანუ პოლიპლოიდიზაციის უნარი, მიჩნეულია ცვლადი გარემოს ფაქტორებისა და სტრესის საპასუხოდ განვითარებულ ევოლუციურ მექანიზმად. (Ghiraldini et al., 2012). პოლიპლოიდური უჯრედები ყალიბდება აგრეთვე, სტრესისა და სხვადასხვა დაზიანებების საპასუხოდ და მოქმედებენ როგორც დამცავი მექანიზმი აპოპტოზისა და ოქსიდაციური სტრესით გამოწვეული დნმ-ს დაზიანებების დროს. ახორციელებენ რა არსებული გენეტიკური მასალის აღწარმოებას, ზოგავენ ენერგეტიკულ რესურსებს და ახანგრძლივებენ უჯრედის სიცოცხლეს (Celton-Morizur, Merlen, Couton, & Desdouets, 2010). აქედან გამომდინარე, თანამედროვე ეტაპზე განსაკუთრებული მნიშვნელობა შეიძინა სხვადასხვა პათოლოგიის პირობებში ღვიძლის ადაპტაციურ-კომპენსატორული პროცესების თავისებურებების შესწავლამ.

დღეისათვის, მნიშვნელოვან სოციალურ-ეკონომიკურ და სამედიცინო პრობლემას გავრცელების სიხშირის, ინვალიდობისა და სიცოცხლის ხანგრძლივობის თვალთახედვით, არა მარტო საქართველოში, არამედ მთელ მსოფლიოში წარმოადგენს შაქრიანი დიაბეტი. სხვადასხვა ქვეყნებში ჩატარებული კვლევების საფუძველზე დადგენილია, რომ შაქრიანი დიაბეტის ყოველ ერთ გამოვლენილ შემთხვევაზე მოდის ამ ავადმყოფობის ერთი გამოუვლენელი ფორმა, ე.ი., გააჩნიათ ფარულად მიმდინარე შაქრიანი დიაბეტი. ენდოკრინული დაავადებების სტრუქტურაში 50% მოდის შაქრიან დიაბეტზე (ლაგაბიძე, 2015). აღსანიშნავია, რომ ზემოთ აღწერილი პათოლოგიებისგან განსხვავებით, შაქრიანი დიაბეტის ექსპერიმენტულ მოდელებზე ნაჩვენებია ალოქსანის ან სტრეპტოზოტოცინის პრეპარატების ინექციიდან 1 თვის შემდეგ ღვიძლში მაღალპლოიდური ჰეპატოციტების ( $2c \times 2$ ) რაოდენობის დაქვეითება. აღნიშნული მოვლენა აიხსნება ინსულინის კონცენტრაციის შემცირებით, რომელიც ციტოჩონჩხის რეორგანიზაციის დროს აკონტროლებს ციტოკინებს და შესაბამისად, მაღალპლოიდური უჯრედების რაოდენობას. ამავე დროს, არ არის შესწავლილი იცვლება თუ არა მაღალპლოიდური უჯრედების თანაფარდობა დაავადების განვითარების საწყის ეტაპზე

(პირველი 48სთ), როდესაც აღინიშნება გლუკოზის კონცენტრაციის მკვეთრი ცვლილებები.  
(Celton-Morizur, Merlen, Couton, & Desdouets, 2010).



# თავი 1. ლიტერატურის მიმოხილვა

## 1.1 შაქრიანი დიაბეტი

შაქრიანი დიაბეტი (Diabetes mellitus) წარმოადგენს სერიოზულ პათოლოგიას, რომლის დროსაც ორგანიზმს არ შეუძლია ინსულინის სინთეზირება, ან სინთეზირებული ინსულინის ეფექტურად გამოყენება. ჯანდაცვის მსოფლიო ორგანიზაციის მიერ შემოთავაზებული თავდაპირველი კლასიფიკაციის თანახმად, განიხილებოდა ზემოთ ხსენებული პათოლოგიის ორი ტიპი; შაქრიანი დიაბეტი ტიპი I, ანუ ინსულინდამოკიდებული შაქრიანი დიაბეტი და შაქრიანი დიაბეტი ტიპი II, ანუ არა ინსულინდამოკიდებული შაქრიანი დიაბეტი (Wass, 2021). გარდა ამისა, გამოიყოფა დიაბეტის სხვა ტიპებიც. ასეთია გესტაციური დიაბეტი, რომელიც ვითარდება ორსულობის დროს (ხშირად მეორე ან მესამე ტრიმესტრში) და ჩვეულებრივ ქრება მშობიარობის შემდეგ. გესტაციური დიაბეტიანი მშობლის შვილები ჭარბწონიანობისა და ტიპი II შაქრიანი დიაბეტის განვითარების რისკის წინაშე არიან (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2021). გარდა ამისა, გამოიყოფა დიაბეტის სხვა სპეციფიკური ტიპები, რომელიც განპირობებულია სხვადასხვა ფაქტორებით, როგორებიცაა: გენეტიკური დეფექტები  $\beta$  უჯრედების ფუნქციონირებაში (მიტოქონდრიული დნმ-ს მუტაციები, ნეონატალური დიაბეტი), გენეტიკური დეფექტები ინსულინის მოქმედებაში (ლიპოდისტროფიები, ინსულინის სასიგნალო გზის იშვიათი დეფექტები), პანკრეასის ეგზოკრინული ნაწილის დაავადებები (პანკრეატიტი, ნეოპლაზია), ენდოკრინოპათიები (კუშინგის სინდრომი, აკრომეგალია, ჰიპერთიროიდიზმი, აუტოიმუნური პოლიჯირკვლოვანი სინდრომი), წამლებით ან ქიმიური ნაერთებით ინდუცირებული (გლუკოკორტიკოიდები, თიროიდული ჰორმონი,  $\gamma$ -ინტერფერონი, ანტირეტროვირუსული მკურნალობა), ინფექციები (ციტომეგალოვირუსი, კონგენიტალური წითურა) და ა.შ. (Wass, 2021).

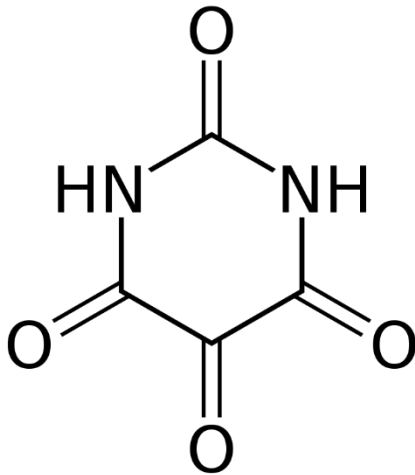
2019 წელს მსოფლიოს მასშტაბით შაქრიანი დიაბეტის დაახლოებით 463 მილიონი შემთხვევა იყო რეგისტრირებული (რაც ზრდასრული მოსახლეობის 8,8%-ს წარმოადგენს), ტიპი II დიაბეტი კი შემთხვევების 90%-ს წარმოადგენდა. აღსანიშნავია ისიც, რომ მსოფლიოში შაქრიანი დიაბეტის ყოველ ერთ გამოვლენილ შემთხვევაზე მოდის ერთი გამოუვლენელი შემთხვევა - პაციენტები, რომლებსაც აქვთ ფარულად მიმდინარე შაქრიანი დიაბეტი (Unwin, Gan, & Whiting, 2010). უკანასკნელ წლებში საქართველოში აღინიშნება დიაბეტის ზრდის ტენდენცია, რაც



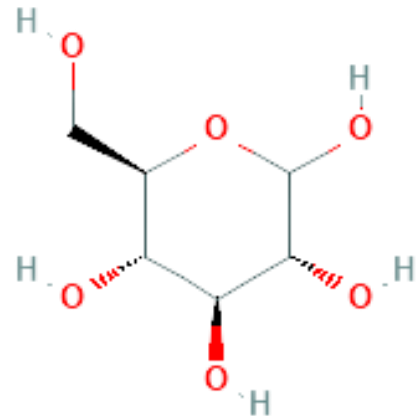
### 1.1.1. ალოქსანური შაქრიანი დიაბეტის ექსპერიმენტული მოდელი

შაქრიანი დიაბეტის შესწავლისათვის გამოიყენება დიაბეტის სხვადასხვა ექსპერიმენტული მოდელი, რომლებიც მიიღება ქირურგიული, ქიმიური და გენეტიკური მანიპულაციებით. შაქრიანი დიაბეტის მექანიზმების კვლევისას უმეტესად გამოიყენება ალოქსანითა და სტრუპტოზოტოცინით ინდუცირებული შაქრიანი დიაბეტის ქიმიური მოდელები (King, 2012).

ალოქსანი წარმოადგენს გლუკოზის ტოქსიკურ ანალოგს (სურ. 2). ორივე მათგანი არის ჰიდროფილური და ვერ აღწევს პლაზმური მემბრანის ლიპიდურ ბიშრეს. ალოქსანი უჯრედებში ხვდება GLUT2 ტრანსპორტერის დახმარებით. მისი მოლეკულა სტრუქტურულად იმდენად წააგავს გლუკოზას, რომ GLUT2 ტრანსპორტერი β უჯრედების ზედაპირზე იკავშირებს ამ გლუკომიმეტიკს და გადააქვს ციტოზოლში. (Lenzen, 2007).



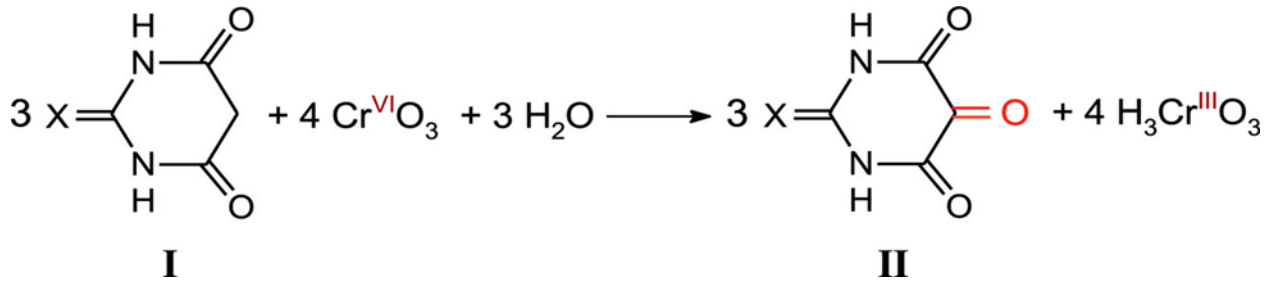
ალოქსანი



β-D გლუკოზა

სურ. 2 ალოქსანისა და გლუკოზის ქიმიური სტრუქტურები

ალოქსანი წარმოადგენს ბარბიტურის მჟავის წარმოებულს და მიიღება ბარბიტურის ან თიობარბიტურის მჟავის ქრომ (VI) ოქსიდით დაჟანგვის შედეგად (ბარბიტურის მჟავის შემთხვევაში X = O, ხოლო თიობარბიტურის შემთხვევაში X = S) (სურ. 3)

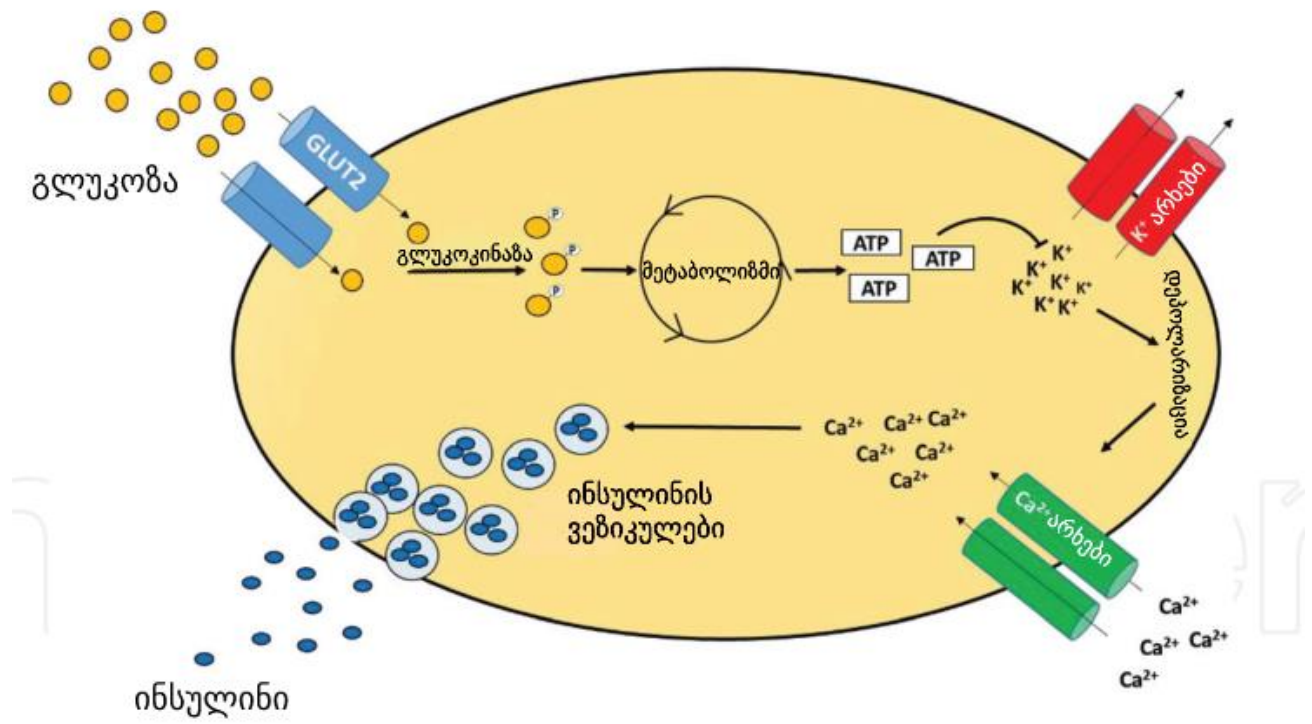


სურ. 3 ალოქსანის სინთეზის გზა

ალოქსანი გამოირჩევა ჰიდროფილობით, ავლენს სუსტი მჟავის თვისებებს და არის ქიმიურად არასტაბილური (pH 7.4 და 37°C-ს პირობებში მისი ნახევარდაშლის პერიოდია 1.5 წთ). თხევად გარემოში ის რამდენიმე წუთში გარდაიქმნება არადიაბეტოგენურ ალოქსანის მჟავად. (Ighodaro, Adeosun, & Akinloye, 2017).

ალოქსანს გააჩნია ორი განსხვავებული პათოლოგიური ეფექტი: ის სელექტიურად აინჰიბირებს გლუკოზით ინდუცირებულ ინსულინის სეკრეციას გლუკოკინაზის ინჰიბირების შედეგად, რომელიც წარმოადგენს ბეტა უჯრედებში გლუკოზის სენსორს და იწვევს ინსულინდამოკიდებულ დიაბეტს, რაც განპირობებულია ალოქსანის მიერ ჟანგბადის რეაქტიული ფორმების წარმოქმნა, რასაც მოყვება ბეტა უჯრედების ნეკროზი.

გლუკოზით ინდუცირებული ინსულინის სეკრეციის სელექციური ინჰიბირება წარმოადგენს ალოქსანის თიოლის ჯგუფებთან ურთიერთქმედების მთავარ პათოფიზიოლოგიურ ეფექტს. ალოქსანს აქვს ცენტრალური 5-კარბონილ ჯგუფი, რომელიც ძალიან აქტიურად ურთიერთქმედებს თიოლის ჯგუფებთან. გლუკოკინაზა (ჰექსოკინაზა IV) წარმოადგენს ბეტა უჯრედებში არსებულ ყველაზე მგრძობიარე თიოლურ ფერმენტს. გლუკოკინაზის ინჰიბირება ამცირებს გლუკოზის ჟანგვასა და ატფ-ის წარმოქმნას, შესაბამისად ითრგუნება ინსულინის გლუკოზით ინდუცირებული სეკრეცია (სურ. 4) (Lenzen, 2007).

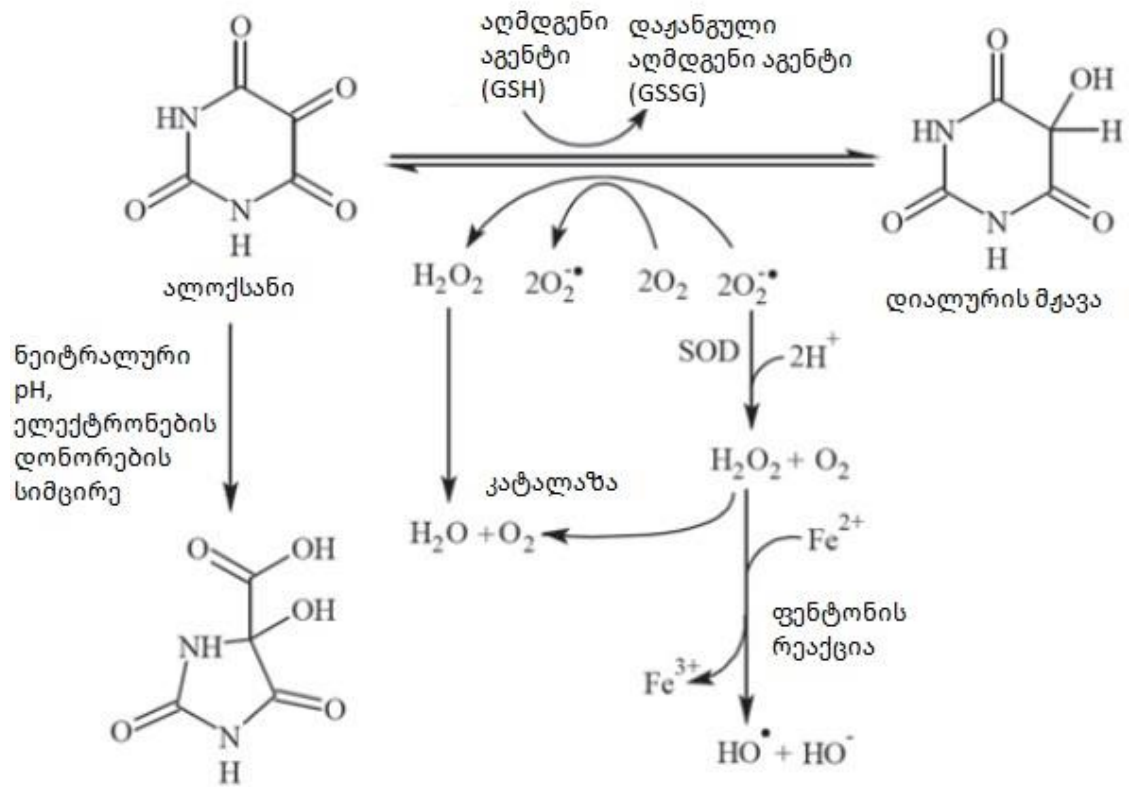


სურ. 4 ინსულინის სეკრეციის ნორმალური ფიზიოლოგია

ცხრილი 1.

I	$A + 2GSH \rightarrow AH_2 + GSSG$
II	$AH_2 + O_2 \rightarrow AH\cdot + O_2^- + H^+$
III	$AH\cdot + O_2 \rightarrow A + O_2^- + H^+$
IV	$AH_2 + O_2^- + H^+ \rightarrow AH\cdot + H_2O_2$
V	$AH\cdot + O_2^- + H^+ \rightarrow A + H_2O_2$
VI	$2H^+ + 2O_2^- \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$
VII	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH\cdot + OH^-$
VIII	$Fe^{3+} + O_2^- \rightarrow Fe^{2+} + O_2$
IX	$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{კატალაზა}} O_2 + 2H_2O$

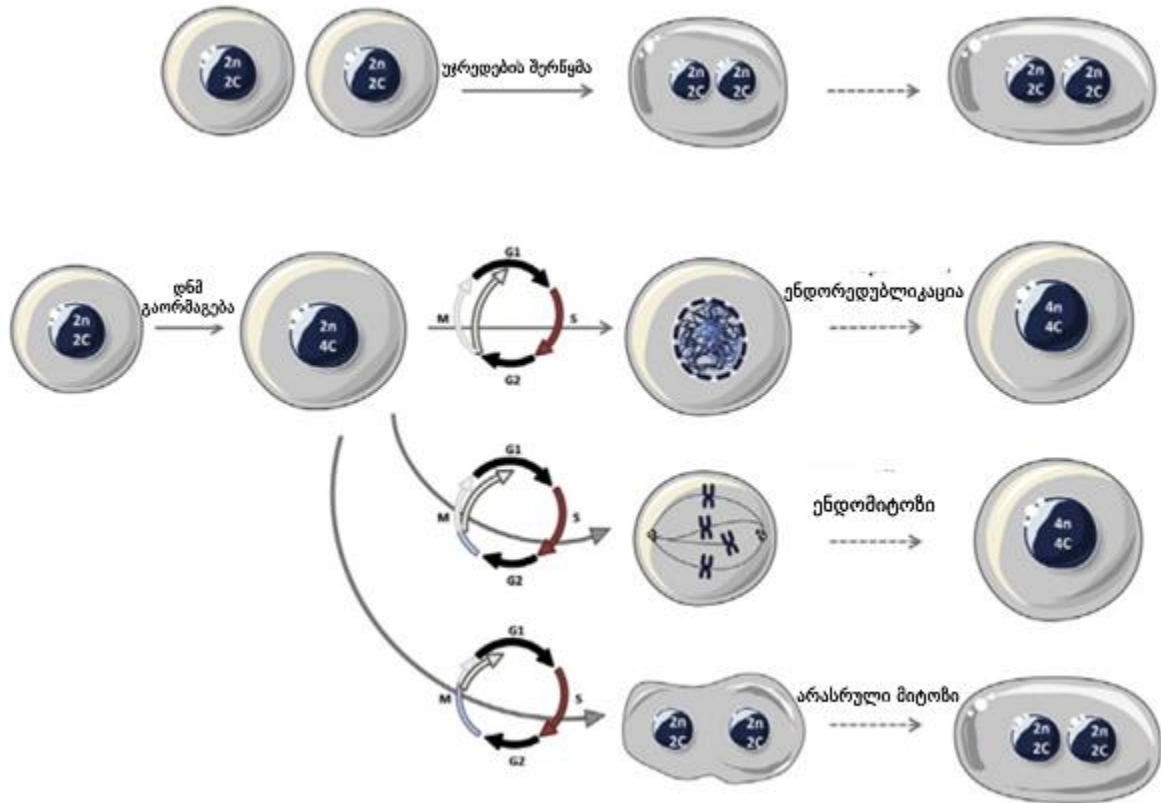
ალოქსანი, როგორც უკვე აღნიშნული იყო წარმოქმნის ჟანგბადის რეაქტიულ ფორმებს და იწვევს ბეტა უჯრედების ნეკროზს. ბეტა უჯრედში შეღწევის შემდეგ, ალოქსანი გლუტათიონის (GSH) დახმარებით აღდგება დიალურის მჟავამდე ( $AH_2$ ), თავად გლუტათიონი კი იჟანგება (I). შემდეგ კი იწყება ჟანგვა აღდგენითი რეაქციები, რომლის დროსაც თავდაპირველად წარმოიქმნება სუპეროქსიდის რადიკალები და წყალბადის იონები (II, III). SOD კატალაზებთან და სხვა ანტიოქსიდაციურ ფერმენტებთან ერთად ორგანიზმს იცავს ჟანგბადის რეაქტიული ფორმების წარმოქმნისაგან და სუპეროქსიდის რადიკალს გარდაქმნის წყალბადის ზეჟანგად და ჟანგბადად (VI), მაგრამ, ვინაიდან პანკრეასში კატალაზას კონცენტრაცია ძალიან მცირეა, წარმოქმნილი წყალბადის ზეჟანგი ერთვება ფენტონის რეაქციაში, რომლის შედეგადაც წარმოიქმნება ჰიდროქსიდის რადიკალები (VII), რომლებიც იწვევენ პანკრეასის ინსულინწარმომქმნელი უჯრედების ნეკროზს და ამის შედეგად ყალიბდება ცხოველებში ინსულინდამოკიდებული შაქრიანი დიაბეტი (ცხრილი 1.) (სურ. 5).



სურ. 5 ალოქსანის მიერ ჟანგბადის რეაქტიული ფორმების წარმოქმნის მექანიზმი

## 1.2 პოლიპლოიდური უჯრედების წარმოქმნის მექანიზმები

პოლიპლოიდია წარმოადგენს ფიზიოლოგიურ ფენომენს, რომლის დროსაც ორგანიზმებს ან ცალკეულ უჯრედებს გააჩნიათ ჰომოლოგიურ ქრომოსომათა ორზე მეტი ნაკრები. პოლიპლოიდია გავრცელებულია მცენარეებში, მწერებში, სოკოებში, თევზებში, ამფიბიებსა და ძუძუმწოვრებში. აღწერილია პოლიპლოიდური უჯრედების წარმოქმნის გზები, როგორც ნორმალურ ფიზიოლოგიურ მდგომარეობაში, ასევე სტრესისა და დაზიანების შედეგად (Donne, Saroul-Aïnama, Cordier, & Celton-Morizur, 2020) (სურ.6).



სურ. 6 პოლიპლოიდური უჯრედების წარმოქმნის გზები

პოლიპლოიდური უჯრედები შეიძლება წარმოიქმნას უჯრედების შერწყმის შედეგად. უჯრედების შერწყმა წარმოადგენს ძირითად პროცესს ზოგიერთი ქსოვილის განვითარებისა და ჰომეოსტაზის შენარჩუნებისათვის. მაგალითად, ძვალში მაკროფაგები ერწყმის, წარმოქმნის ოსტეოკლასტებს და ციტოტროფობლასტები ერწყმის ერთმანეთს სინციტიოტროფობლასტების წარმოსაქმენლად. ასევე, პოლიპლოიდური უჯრედების წარმოქმნაში მნიშვნელოვან როლს თამაშობს ვირუსული ინფექციები. ასეთი ვირუსებიდან ყველაზე კარგად შესწავლილია ადამიანის პაპილომავირუსი (აპვ/HPV). ვირუსული HPV-16 E5 ონკოპროტეინის ექსპრესია ინფიცირებულ



საშვილოსნოს ყელის ეპითელიურ უჯრედებზე იწვევს ორბირთვიანი ტეტრაპლოიდური ( $2c \times 2$ ) უჯრედების წარმოქმნას (Moody, Laimins, 2010).

გარდა ამისა, პოლიპლოიდური უჯრედები ფორმირდება უჯრედული ციკლის სხვადასხვა გზით წარმართვის შედეგად. ენდორედუპლიკაცია წარმოადგენს უჯრედული ციკლის ე.წ. ალტერნატიულ ფორმას, რომლის დროსაც უჯრედები იორმაგებენ გენომს უჯრედის გაყოფის გარეშე. აღწერილია რამდენიმე მექანიზმი, რომელიც არეგულირებს ენდორედუპლიკაციას სხვადასხვა სახეობებსა და უჯრედების ტიპებში. ძირითადი პროცესი, რომელიც იწვევს ენდორედუპლიკაციას, არის მიტოზში შესვლის ინჰიბირება. ეს ინჰიბირება შეიძლება ხდებოდეს M ციკლინების პროტეოლიზის შედეგად E3 უბიქვიტინ ლიგაზას, ანუ ანაფაზის მასტიმულირებელი კომპლექსის/ციკლოსომის მიერ (APC/C). M-CDK კომპლექსის ინჰიბირება შეიძლება მოხდეს აგრეთვე ციკლინ-დამოკიდებული კინაზების ინჰიბიტორების (CKI) მიერ. მეორე მნიშვნელოვანი ფაქტორია S-CDK კომპლექსის აქტიურობის ცვლილება დაბალ და მაღალ კონცენტრაციას შორის G და S ფაზებს შორის, იმისათვის, რომ მოხდეს გენომის ზრდა. ძუძუმწოვრებში ენდორედუპლიკაციის ერთ-ერთი ყველაზე კარგად აღწერილი მაგალითია ტროფობლასტის გიგანტური უჯრედები. ტროფობლასტის გიგანტური უჯრედის პოლიპლოიდია არის მნიშვნელოვანი იმპლანტაციისათვის და აგრეთვე პოსტიმპლანტაციური პლაცენტაციისათვის. კერძოდ, p57 და p21 ციკლინ-დამოკიდებული კინაზების ინჰიბიტორების დაგროვება მნიშვნელოვანია ენდორედუპლიკაციის ინდუქციისათვის, რადგან ძლიერდება ციკლინ B-ს დეგრადაცია და ინჰიბირდება CDK1-ს აქტიურობა (Hartwell, Weinert, 1989).

ენდომიტოზის დროს უჯრედები აღწევენ მეტაფაზამდე, ან ანაფაზამდე, მაგრამ არ ხდება კარიოკინეზი და ციტოკინეზი. დაუსრულებელი ციტოკინეზის დროს კი უჯრედი არ იყოფა და შედეგად დიპლოიდური უჯრედებიდან მიიღება ორბირთვიანი ტეტრაპლოიდური უჯრედები. ღვიძლის განვითარების განმავლობაში თავდაპირველად ახალდაბადებული მღრღნელების ყველა ჰეპატოციტი დიპლოიდურია და ორგანო გამოირჩევა პროლიფერაციის მაღალი ხარისხით. თუმცა უჯრედების გაყოფა მღრღნელებში თანდათანობით მცირდება და ექვსი კვირის ასაკში დნმ-ს სინთეზი ხდება მხოლოდ რამდენიმე ჰეპატოციტში, იმავე სიხშირით, რა სიხშირითაც ნორმალურ ზრდასრულ ღვიძლში. სხვადასხვა *in vivo* კვლევებმა აჩვენა, რომ დაბადებიდან რამდენიმე კვირაში ჩნდება ორბირთვიანი ტეტრაპლოიდური ჰეპატოციტები ( $2c \times 2$ ). ამ დროს დიპლოიდური ( $2c$ ) ჰეპატოციტები გადიან უჯრედის ნორმალურ ციკლს, ან გადის უჯრედის ციკლს კარიოკინეზით,

მაგრამ დაუსრულებელი ციტოკინეზით. წარმოქმნილმა ორბირთვიანმა ტეტრაპლოიდურმა ჰეპატოციტებმა შეიძლება გაიმეორონ დნმ-ს რეპლიკაცია და უჯრედის ციკლი, რომლის შედეგად, იმ შემთხვევაში თუ მოხდება ციტოკინეზი, მიიღება ორი ერთბირთვიანი ტეტრაპლოიდური ჰეპატოციტი (4c), ან კვლავ დაუსრულებელი ციტოკინეზის შემთხვევაში უკვე ორბირთვიანი ოქტაპლოიდური ჰეპატოციტი (4c × 2) (Donne, Saroul-Ainama, Cordier, & Celton-Morizur, 2020).

## თავი 2. მასალა და მეთოდები

### 2.1 კვლევის ობიექტი და მოდელი

საკვლევ ობიექტად გამოვიყენეთ ზრდასრული თეთრი არახაზოვანი ვირთაგვები (130-150გ.). ალოქსანური დიაბეტის ექსპერიმენტული მოდელის მისაღებად ცხოველებს გაუკეთდათ ალოქსანის ინექცია (180 მგ/კგ) ინტრაპერიტონეალურად. ღვიძლის ადაპტაციის მექანიზმის გამოსავლენად განისაზღვრა შემდეგი ამოცანები: 1. ალოქსანური დიაბეტის მოდელის შემუშავება; 2. ინტაქტური და საცდელი ჯგუფის ცხოველების პანკრეასში ინსულინმაპროდუცირებელი უჯრედების აქტიურობის შეფასება იმუნოჰისტოქიმიური მეთოდით; 3. ვირთაგვების ღვიძლის ქსოვილის პარაფინის ანათლებიდან დამზადებულ მუდმივ პრეპარატებზე სინათლის მიკროსკოპის გამოყენებით აღნიშნული ქსოვილების ჰისტოარქიტექტონიკის ცვლილებების შესწავლა; 4. ზრდასრული თეთრი ვირთაგვების ღვიძლის პროლიფერაციული აქტიურობის ცვლილების შეფასება კოლხიციური მიტოზური ინდექსის განსაზღვრით; 5. ალოქსანის ინექციიდან სხვადასხვა ვადებზე (24 სთ და 48 სთ) ზრდასრული ვირთაგვას ღვიძლის ჰეპატოციტების პლოიდობის ცვლილებების შესწავლა; 6. აღდგენითი ზრდის საწყის ეტაპზე ზრდასრული ვირთაგვას ღვიძლის ჰეპატოციტების პლოიდობის ცვლილებების შესწავლა.

გლუკოზის კონცენტრაციას ვსაზღვრავდით გლუკომეტრის საშუალებით (მოდელი „On Call® Plus“) ალოქსანის ინექციამდე, ინექციიდან მე-3, მე-6, მე-9, 24-ე და 48-ე საათებზე შემდეგ ერთეულში - მგ/დლ<sup>1</sup>. ინტაქტური ზრდასრული ვირთაგვების სისხლში ნორმაში გლუკოზის კონცენტრაცია მერყეობს დიაპაზონში 71.1 მგ/დლ - 111.6 მგ/დლ (Wang et al, 2010).

დასახული ამოცანების შესასრულებლად ცხოველები დაყოფილი იყვნენ სამ ჯგუფად: 1. საკონტროლო ჯგუფი - ინტაქტური ვირთაგვები; 2. I საცდელი ჯგუფი - ცხოველები, რომელთაც გაუკეთდათ 180 მგ/კგ, ალოქსანი ინექციის სახით (24სთ); 3. II საცდელი ჯგუფი - ცხოველები, რომელთაც გაუკეთდათ ალოქსანი ინექციის სახით (48 სთ). მასალის აღება

<sup>1</sup> მგ/დლ-ს გარდა, სისხლში გლუკოზის კონცენტრაციის განსაზღვრისათვის გამოიყენება ერთეული მმოლ/ლ. მგ/დლ = 18 × მმოლ/ლ.

მოხდა ინექციიდან 24-ე და 48-ე სთ-ზე. საკვლევი ქსოვილების დამუშავების შემდეგ დამზადდა ღვიძლის ნაცხები. პარალელურად, ქსოვილს ჰისტოარქიტექტონიკის და პროლიფერაციული აქტიურობის შესაფასებლად, პარაფინის ანათლების შეღებვის შემდეგ დამზადდა მულტიპლ პრეპარატები მიკროსკოპული ანალიზისთვის.

მონაცემები სტატისტიკურად დამუშავებული იყო სტუდენტის  $t$  კრიტერიუმით. მონაცემებს სარწმუნოდ ვთვლიდით  $p < 0.05$  შემთხვევაში.

## **2.2 მასალის ფიქსაცია და პრეპარატების მომზადება სინათლის მიკროსკოპში შესწავლისათვის**

სინათლის მიკროსკოპში ქსოვილების (ღვიძლი და პანკრეასი) შესასწავლად მასალის ფიქსაციას ვახდენდით Na/K ფოსფატურ ბუფერზე დამზადებულ ფორმალდეჰიდის 4%-იან ხსნარში. ფიქსაციის შემდეგ მასალის გაუწყლოება მიმდინარეობდა სხვადასხვა კონცენტრაციის სპირტების მზარდ რიგში, აცეტონში, აცეტონ-ბენზოლსა და ბენზოლში. ქსოვილს ვაყალიბებდით ცვილ-პარაფინის ნარევი. 5-7 მკმ-ის სისქის ანათლებს ვღებავდით ჰემატოქსილინ-ეოზინით. პრეპარატებს ვსწავლობდით სინათლის მიკროსკოპში.

## **2.3 კოლხიციური მიტოზური ინდექსის განსაზღვრა**

ღვიძლის ქსოვილის პროლიფერაციული აქტიურობის შესაფასებლად ვიყენებდით კოლხიციური მიტოზური ინდექსის განსაზღვრის მეთოდს. ვირთაგვებში შეგვეყავდა კოლხიცინი (1მგ/კგ). დეკაპიტაციას ვახდენდით 2 საათის შემდეგ. სინათლის მიკროსკოპში შესწავლისათვის მასალას ვაფიქსირებდით და ვამზადებდით პარაფინის ანათლებს. ვღებავდით ჰემატოქსილინ-ეოზინით და სინათლის მიკროსკოპში ვითვლიდით 5000 ჰეპატოციტს, მათში ვსაზღვრავდით მიტოზური უჯრედების რაოდენობას 1000 უჯრედზე გადათვლით (პრომილი %).

## 2.4 ჰეპატოციტების ბირთვებში დნმ-ს კონცენტრაციის განსაზღვრის მიზნით პრეპარატების მომზადება და შეღებვა

ვირთავას ღვიძლის ქსოვილის ნაჭრებს (5მმ) ვათავსებდით I ბუფერში (ბუფერის pH = 8.0. 9.5 წილი 0.07M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0.5 წილი 0.07M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 10 წილი 5%-იანი C<sub>11</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) 20 წთ-ის განმავლობაში. შემდეგ გადაგვექონდა II ბუფერში (ბუფერის pH = 7.3. 8 წილი 0.07M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 2 წილი 0.07M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) და ვაყოვნებდით 5 წთ. გაჯირჯვებული ქსოვილიდან წვეთებს ვაწვეთებდით სასაგნე მინაზე და ვაკეთებდით ნაცხებს, რომელსაც ვაფიქსირებდით მეთანოლით.

დნმ-ს სპეციფიკურად შეღებვისათვის ვიყენებდით შიფის რეაქტივს (ფიოლგენის რეაქციას). პრეპარატებს, ჰიდროლიზის მიზნით, ვათავსებდით 10M LiCl-სა და 2 M HCl -ის ნარევიში (9:1) (საბოლოო ხსნარში LiCl-9M და HCl - 0.2M) 30წთ-ის განმავლობაში, ვავლებდით HCl 0.01M ხსნარში. საღებავში პრეპარატებს ვაჩერებდით 1 სთ. შემდეგ ვავლებდით გოგირდოვან წყალში (5გ K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ემატება 950მლ დისტილირებული წყალი 50მლ 1N HCl) 3-ჯერ. ამის შემდეგ ვავლებდით HCl 0.01M ხსნარში, ვატარებდით აღმავალი კონცენტრაციის სპირტებში და ვფარავდით საფარი მინით.

## 2.5 დნმ-ს კონცენტრაციის განსაზღვრა კომპიუტერული პროგრამის Image J დახმარებით

შიფის რეაქტივით შეღებილი პრეპარატების ფოტოგრაფირება ხდებოდა სინათლის მიკროსკოპში. ინტერფერენციული ფილტრით, რომელიც მხოლოდ ერთი სიგრძის ტალღის (570ნმ) მქონე სინათლის სხივს ატარებდა. თითოეული სურათი მუშავდებოდა კომპიუტერულ პროგრამა Image J-ში. გადაგვყავდა 32 bit-ში, ვახდენდით ინვერტირებას (ფონი მუქდება, ხოლო ბირთვები ღია ფერს იღებს), ვხაზავდით თითოეულ ბირთვს და ვზომავდით შეღებვის ინტენსიურობას.

დიპლოიდური უჯრედების სტანდარტად მიღებული გვექონდა ლიმფოციტების შთანთქმა.

## 2.6 იმუნოჰისტოქიმიური ანალიზი

პარაფინის ანათლების დეპარაფინიზაციის შემდეგ პრეპარატებს ვამუშავებდით თერმულად (წყლის აბაზანაზე – 1000C) ციტრატულ ბუფერში (pH=6.0) 10წთ. ენდოგენური პეროქსიდაზას ინჰიბირებისათვის პრეპარატებს ვათავსებდით 3%-იანი წყალბადის პეროქსიდის ხსნარში 10წთ.

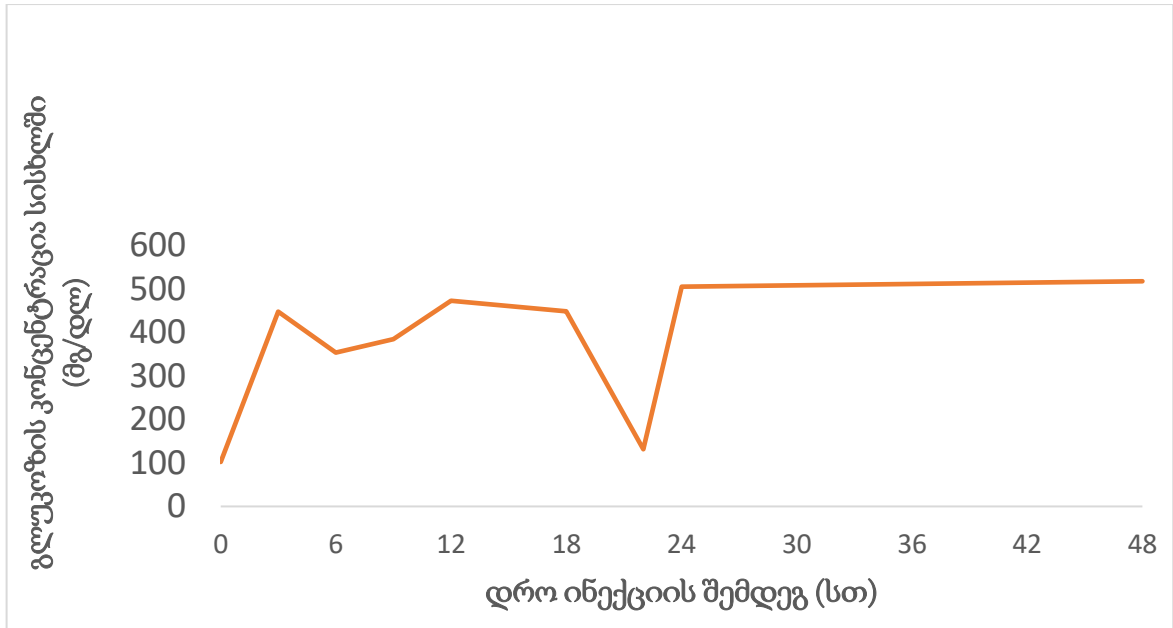
შემდეგ ანათლებს ვამუშავებდით 1% ხარის შრატის ალბუმინის და 0.5% თრიტონ X100-ის შემცველი 2%-იანი თხის შრატით 370C-ზე 30წთ-ით. ანათლებს ვამატებდით პირველად ანტისხეულებს (Mouse Anti Rat Insulin (განზავება 1:100), ინკუბაციას ვახდენდით 370C -ზე 2 სთ-ის განმავლობაში. ანათლებს PBS-ში გავლების შემდეგ ვამატებდით IgG ანტისხეულს (Anti Rat - განზავება 1:200), ინკუბაციას ვახდენდით 370C -ზე 2 სთ-ის განმავლობაში. პრეპარატების PBS-ში გავლების შემდეგ ვახდენდით შეღებილი ციტოპლაზმის გამოვლენას იმუნოპეროქსიდაზული რეაქციით, რისთვისაც ვიყენებდით 3,3-დამინობენზიდინის ტეტრაჰიდროქლორიდის ხსნარს (SIGMAFAST™ DAB with Metal Enhancer - სიგმა D0426). ბირთვების კონტრასტირებას ვახდენდით მაიერის ჰემატოქსილინით. პრეპარატებს ვფარავდით საფარი მინით.

## თავი 3. კვლევის შედეგები და მათი განხილვა

### 3.1 ალოქსანის დიაბეტოგენური დოზის საპასუხოდ ზრდასრული თეთრი ვირთაგვების სისხლში გლუკოზის კონცენტრაციის ცვლილებების შეფასება

ალოქსანური დიაბეტის მოდელის მისაღებად გამოვიყენეთ 50 თეთრი ზრდასრული არახაზოვანი ვირთაგვა (130-150გ.). ლიტერატურულ მონაცემებზე დაყრდნობით ცხოველებში დიაბეტის განვითარებისთვის ალოქსანის ინექციის რეკომენდებული დოზა არის 150-180 მგ/კგ. (Ighodaro, Adeosun, & Akinloye, 2017). ალოქსანის შეყვანით გამოწვეული ჰიპერგლიკემიის ხარისხის შესაფასებლად თითოეული ცხოველის სისხლში განისაზღვრა გლუკოზის კონცენტრაციის ცვლილება (ერთეული მგ/დლ) დინამიკაში. ამ მიზნით ალოქსანის ინექციიდან სხვადასხვა ვადებზე გლუკომეტრის გამოყენებით როგორც საკონტროლო, ასევე საცდელი ჯგუფის თითოეული ცხოველის სისხლში განისაზღვრა გლუკოზის შემცველობა.

სურათზე 7 წარმოდგენილია ზრდასრული თეთრი ვირთაგვების სისხლში გლუკოზის კონცენტრაციის ცვლილება ალოქსანის ინექციიდან პირველი 48 სთ-ის განმავლობაში. სურათიდან ნათლად ჩანს, რომ ალოქსანის ინექციიდან სამ საათში, ინტაქტურ ცხოველებთან შედარებით, საცდელი ჯგუფის ვირთაგვების სისხლში დაახლოებით 4-ჯერ გაიზარდა გლუკოზის რაოდენობა.



სურ. 7 ალოქსანის ინექციის შემდეგ ზრდასრული თეთრი ვირთაგვების სისხლში გლუკოზის კონცენტრაციის ცვლილება დინამიკაში (0-48 სთ)

შემდეგი სამი საათის განმავლობაში (3-6 სთ) საცდელი ცხოველების 95%-ს აღნიშნა სისხლში შაქრის კონცენტრაციის კლების ტენდენცია. ინექციიდან მე-20 საათზე გლუკოზის აღნიშნული მაჩვენებლები, როგორც სურათიდან ჩანს, უტოლდება საკონტროლო ცხოველების შესაბამის მაჩვენებელს. ალოქსანის ინექციიდან 24 სთ-ის შემდეგ სისხლში გლუკოზის კონცენტრაცია კვლავ იზრდება. აღნიშნული გაზრდილი მაჩვენებლები, შენარჩუნებული იყო ექსპერიმენტის ბოლომდე (48 სთ-ის განმავლობაში), რაც იმაზე მიუთითებს, რომ ალოქსანის ინექციის შემდეგ აღნიშნულ ვადაზე მიღწეულ იქნა სტაბილური ჰიპერგლიკემია (სურ. 7).

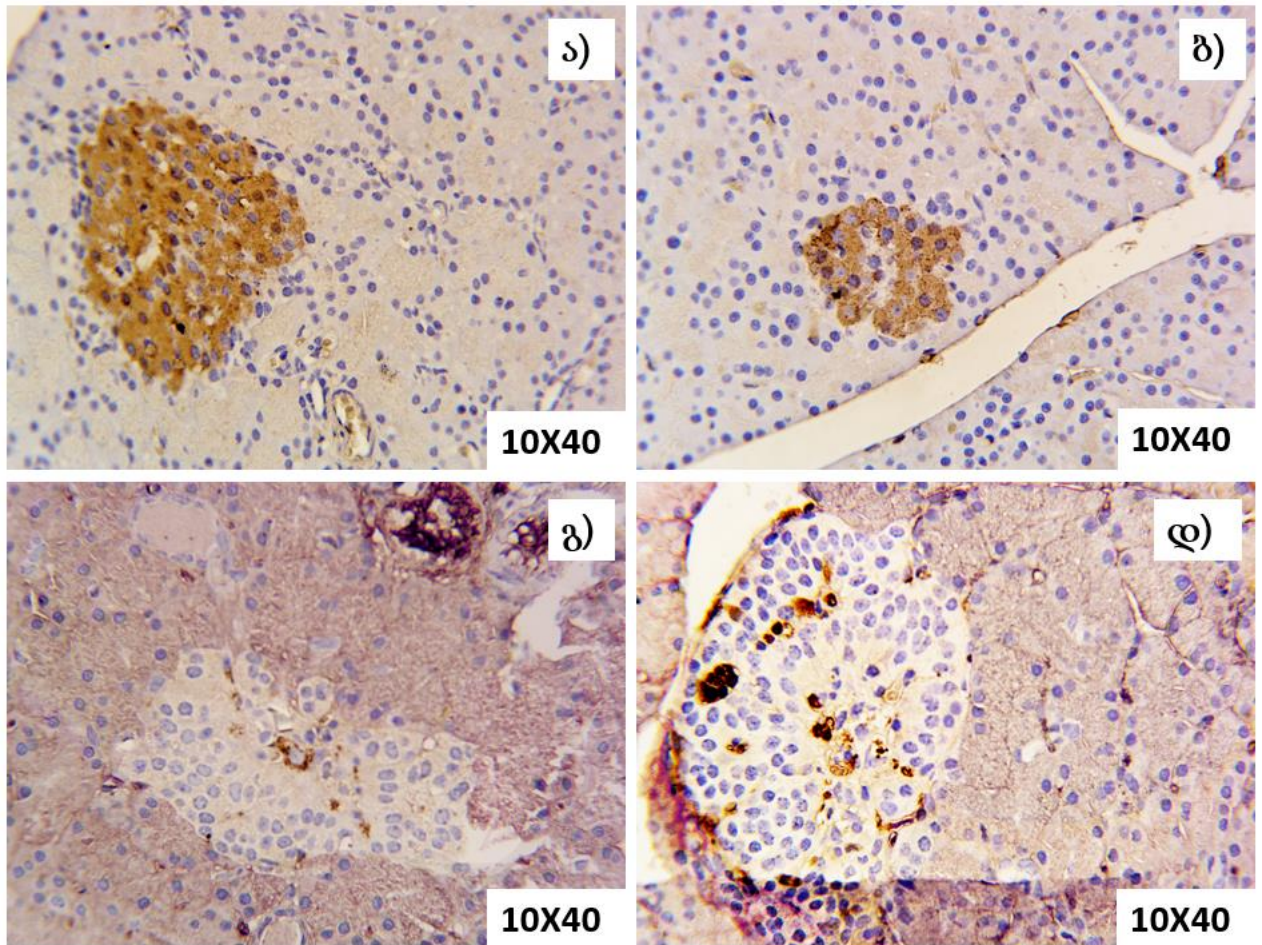


### 3.2 ალოქსანური დიაბეტის საწყის ეტაპზე ზრდასრული ვირთაგვების პანკრეასში ინსულინმაპროდუცირებელი უჯრედების აქტიურობის ცვლილება

აღსანიშნავია, რომ ალოქსანის ერთჯერადი ინექციით გამოწვეული ჰიპერგლიკემიის ჩვენ მიერ მიღებული მაჩვენებლები, ასევე, მთლიანად გლუკოზის კონცენტრაციის ცვლილების ამსახველი მრუდის ფორმა თანხვედრაშია ლიტერატურაში არსებულ მონაცემებთან (Lenzen, 2007). მიუხედავად ამისა, პარალელურად იმუნოჰისტოქიმიური მეთოდით შევაფასეთ ინსულინმაპროდუცირებელი უჯრედების რაოდენობრივი ცვლილებები. ამ მიზნით, გამოვიყენეთ შესაბამისი ფიქსაციის მეთოდით დამუშავებული ინტაქტური და საცდელი ჯგუფის ვირთაგვების პანკრეასის ქსოვილები და ინსულინის მიმართ ანტისხეულები. ინტაქტურ და საცდელი ჯგუფის ცხოველებში იმუნოჰისტოქიმიური მეთოდით შეფასდა პანკრეასში ინსულინმაპროდუცირებელი უჯრედების რაოდენობის ცვლილება.

პანკრეასის ქსოვილში, როგორც ცნობილია განირჩევა ეგზოკრინული და ენდოკრინული ფუნქციების შემსრულებელი ორი ნაწილი. ენდოკრინული ნაწილი წარმოდგენილია ორგანოს აცინუსებისგან შემდგომი ქსოვილოვანი გარსით გამოყოფილი დაახლოებით 0.3 მმ-ის პანკრეასის ანუ ლანგერჰანის კუნძულებით. ძირითადად მრგვალი ფორმის ამ კუნძულებში განირჩევა სხვადასხვა ჰორმონის მაპროდუცირებელი ხუთი ტიპის უჯრედი (ენდოკრინოციტები), რომელთაგანაც ინსულინის სეკრეცია ხორციელდება უპირატესად კუნძულის ცენტრალურ ზონაში განლაგებულნი ე.წ. β-უჯრედებით (5–10%) (Pawlina, 2016, para.18).

მე-8 სურათზე წარმოდგენილია საკონტროლო და საცდელი ჯგუფის თეთრი ზრდასრულ ვირთაგვების პანკრეასის ქსოვილების იმუნოჰისტოქიმიური ანალიზის ამსახველი მიკროფოტოები. სურათებიდან ჩანს, რომ ინტაქტური ვირთაგვების პანკრეასის ენდოკრინულ ნაწილში გამოვლინდა ინსულინის მაპროდუცირებელი უჯრედების ზომიერი და ჰომოგენური შეღებვა (სურ. 8ა და 8ბ). ამავე დროს, ალოქსანის ინექციიდან 48-ე საათზე, როდესაც სისხლში გლუკოზის კონცენტრაცია სტაბილურად მაღალია, ინტაქტურ ცხოველებთან შედარებით, თვალსაჩინოდ შემცირდა ანტისხეულების გამოყენებით პანკრეასის β უჯრედების შეღებვის ინტენსიურობა (სურ. 8გ და 8დ). მიღებული მონაცემებით დადასტურდა ალოქსანით განპირობებული ჰიპერგლიკემია და დიაბეტის განვითარება ვირთაგვებში.



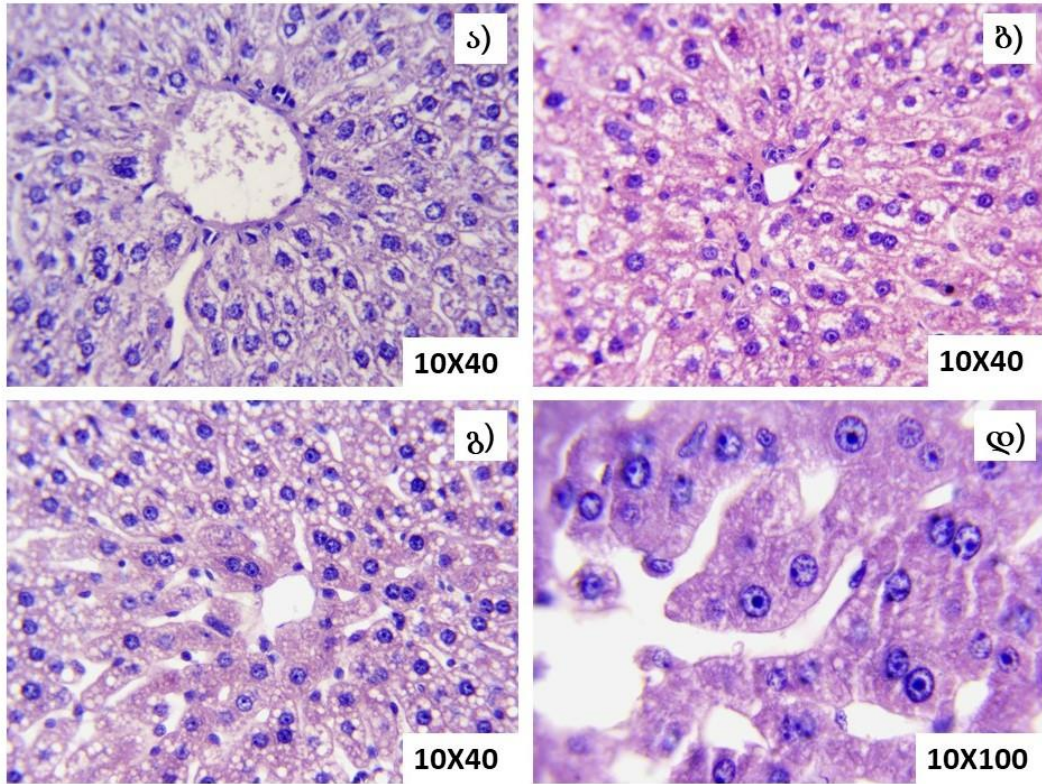
სურ. 8 ალოქსანით გამოწვეული ჰიპერგლიკემიის პირობებში ზრდასრული თეთრი ვირთაგვას პანკრეასის იმუნოჰისტოქიმიური ანალიზი (ინსულინის მიმართ ანტისხეულების გამოყენებით).

საკონტროლო ჯგუფი (ინტაქტური ცხოველები) - ა, ბ; საცდელი ჯგუფის ცხოველები (48 სთ.) - გ, დ.

### 3.3 ალოქსანის დიაბეტოგენური დოზის საპასუხოდ ზრდასრული ვირთაგვების ღვიძლის ქსოვილის ჰისტოარქიტექტონიკის ცვლილებების შესწავლა

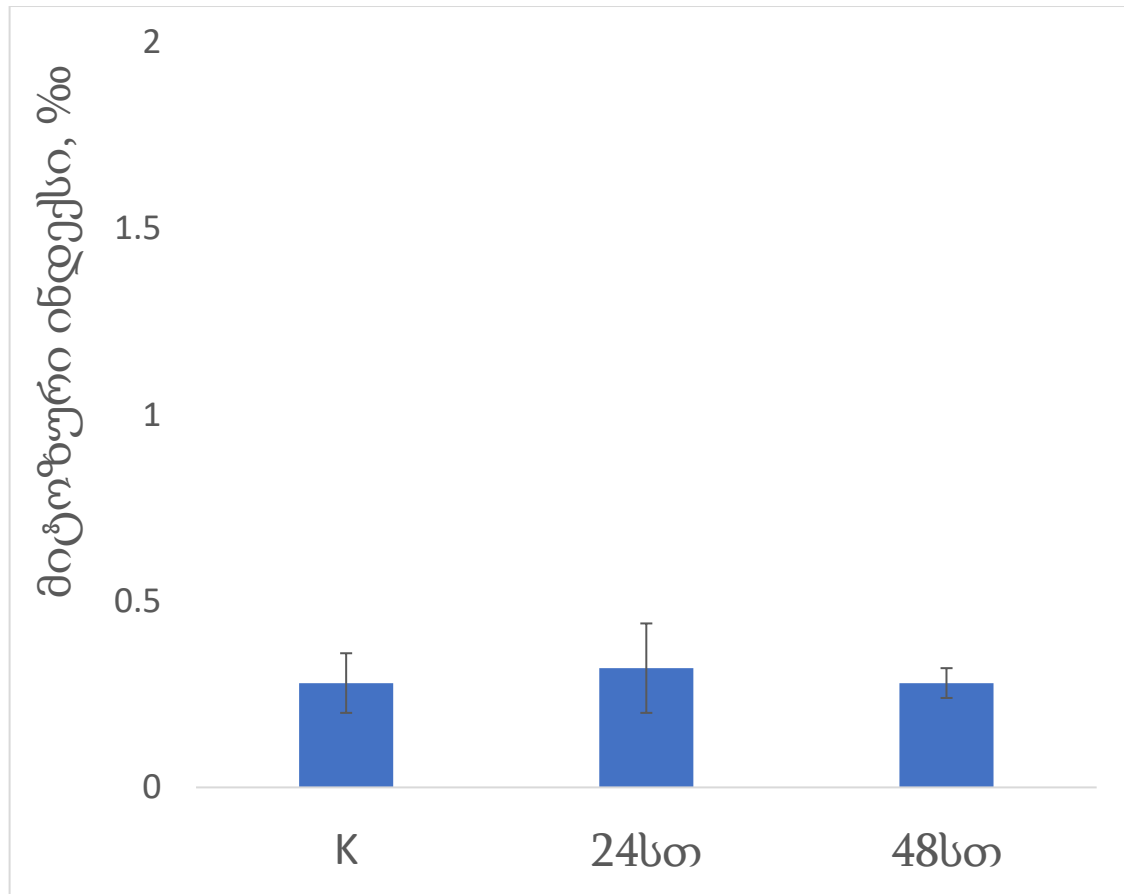
ჰეპატოციტების პლოიდების ცვლილებების შესწავლის პარალელურად შევაფასეთ, როგორც საკონტროლო, ასევე, საცდელი ჯგუფის ცხოველების ჰისტოარქიტექტონიკა და პროლიფერაციული აქტიურობა. ამ მიზნით, სამივე ჯგუფის ცხოველებს ინტრაპერიტონეალურად გაუკეთდათ კოლხიციინის ინექციები (1 მგ/კგ). ინექციიდან ორი საათის შემდეგ, ღვიძლის ქსოვილი დაფიქსირდა პარაფორმალდეჰიდის ფიქსატორში და პროტოკოლით გაწერილი სტანდარტული მეთოდით დამუშავების შემდეგ მასალა ჩავაყალიბეთ ცვილ-პარაფინის ნარევის ბლოკებში, საიდანაც დავამზადეთ 5 მკმ ანათლები. აღნიშნული ანათლები შევღებეთ ჰემატოქსილინ-ეოზინით და მუდმივი პრეპარატები გამოვიყენეთ ჰისტოარქიტექტონიკის და მიტოზური ინდექსის (1000 უჯრედზე გადათვლით, %) განსაზღვრისათვის.

ღვიძლის ტიპური ჰისტოარქიტექტონიკა, რომელიც კარგად ჩანს ინტაქტური ცხოველების პრეპარატებიდან გადაღებულ მიკროფოტოზე (სურ. 9ა), მცირედ არის შეცვლილი ალოქსანის ინექციიდან 24 სთ-ში (სურ. 9ბ). ალოქსანის ინექციიდან 48-ე საათზე ღვიძლის ქსოვილის ჰისტოარქიტექტონიკაში შეინიშნება მთელი რიგი სტრუქტურული ცვლილებები, კერძოდ, აღინიშნება ღვიძლის ქსოვილის ბაგირაკოვანი სტრუქტურების ნაწილობრივი რღვევა და ციტოპლაზმის გაღარიბება. დესტრუქციულ ცვლილებებთან ერთად ყურადღებას იქცევს დიდი ზომის ბირთვების რაოდენობის ზრდა, რომლებშიც განირჩევა ბირთვაკების აქტიური ფორმები (სურ. 9გ, 9დ).



სურ. 9 ზრდასრული თეთრი ვირთაგვების ღვიძლის ჰისტოარქიტექტონიკა ნორმაში და ალუმინის ინექციის შემდეგ (24, 48 სთ.) ა - ინტაქტური ცხოველი; ბ - ალუმინის ინექციიდან 24 საათის შემდეგ; გ და დ - ალუმინის ინექციიდან 48 საათის შემდეგ.

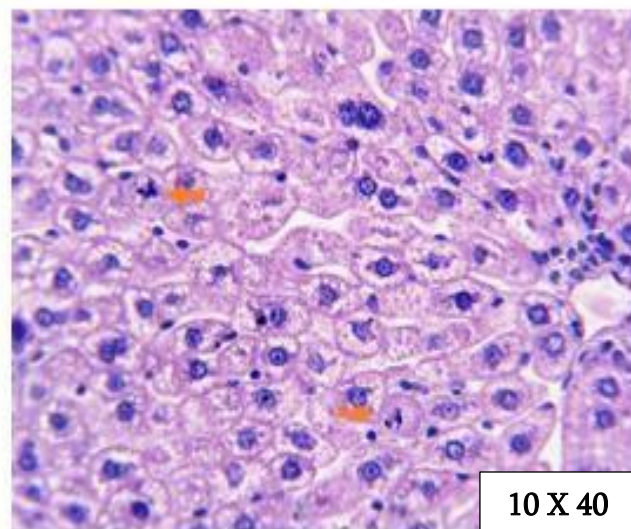
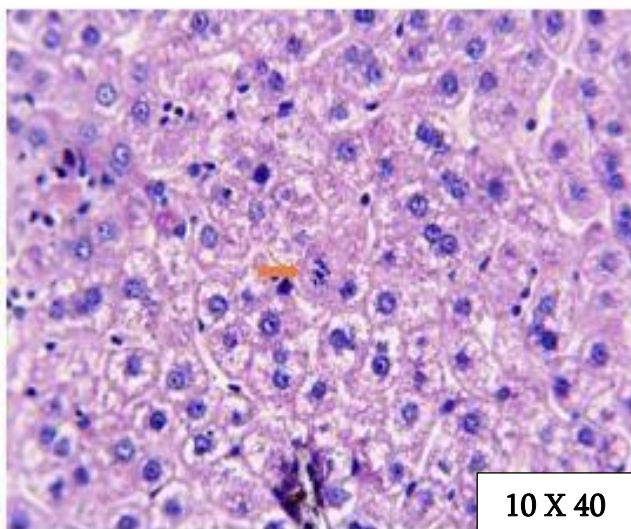
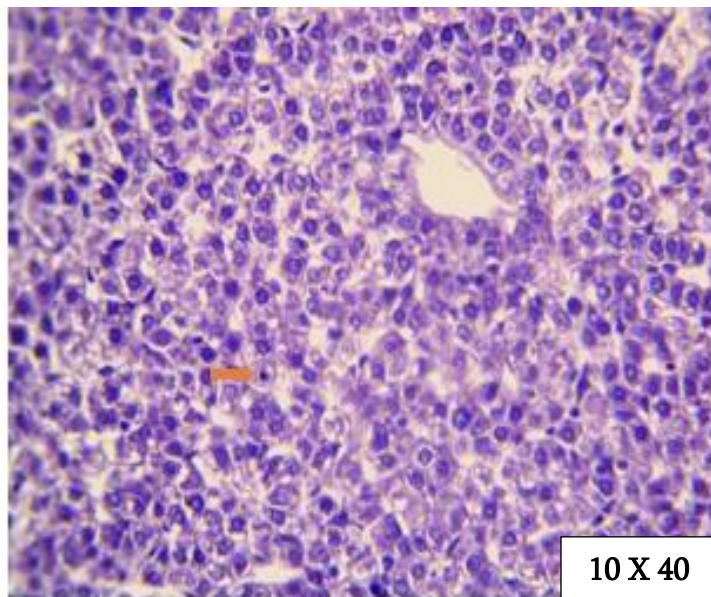
### 3.4 ზრდასრული ვირთაგვების ღვიძლის პროლიფერაციული აქტიურობის ცვლილებების შეფასება



სურ. 10 ზრდასრული თეთრი ვირთაგვების მიტოზური აქტიურობა ნორმაში და ალოქსანის ინექციიდან სხვადასხვა ვადებზე

გამოკვლევებით დადგინდა, რომ საკონტროლო ჯგუფის ცხოველებთან შედარებით, ალოქსანის ინექციის შემდეგ ღვიძლის ჰისტოარქიტექტონიკაში გამოვლენილი ცვლილების ფონზე, არ აღინიშნება პროლიფერაციული აქტიურობის მატება. სამივე ჯგუფის ცხოველების მიტოზური ინდექსების მაჩვენებლებს შორის სარწმუნო განსხვავება არ გამოვლინდა (სურ. 10).

სურ. 11-ზე ნაჩვენებია ერთეული მიტოზური ფიგურები საკონტროლო და საცდელი ჯგუფების ღვიძლში.



სურ. 11 მიტოზური ფიგურები ზრდასრული ვირთაგვების ღვიძლში.

ა - საკონტროლო ჯგუფის ცხოველების ღვიძლი; ბ და გ - საცდელი ჯგუფის ცხოველების ღვიძლი (ალოქსანის ინექციიდან 24 სთ და 48 სთ, შესაბამისად).

### 3.5 ალოქსანური დიაბეტის საწყის ეტაპზე ზრდასრული ვირთაგვების ღვიძლში სხვადასხვა პლოიდობის ჰეპატოციტების რაოდენობრივი თანაფარდობის ცვლილებების შესწავლა

ლიტერატურული მონაცემების თანახმად, როგორც ზემოთ იყო აღწერილი, შაქრიანი დიაბეტის ექსპერიმენტულ მოდელებზე ნაჩვენებია ალოქსანის ან სტრეპტოზოტოცინის პრეპარატების ინექციიდან 1 თვის შემდეგ, ღვიძლში მაღალპლოიდური ჰეპატოციტების ( $2c \times 2$ ) რაოდენობის დაქვეითება. აღნიშნული მოვლენა აიხსნება ინსულინის კონცენტრაციის შემცირებით, რომელიც ციტოჩონჩხის რეორგანიზაციის დროს აკონტროლებს ციტოკინებს და შესაბამისად, მაღალპლოიდური უჯრედების რაოდენობას. თუმცა, არ არის შესწავლილი ხდება თუ არა რაიმე ცვლილება მაღალპლოიდური უჯრედების თანაფარდობაში დაავადების განვითარების საწყის ეტაპზე, როდესაც აღინიშნება გლუკოზის კონცენტრაციის მკვეთრი ცვლილებები (ჰიპოგლიკემია, ჰიპერგლიკემია, ჰიპოგლიკემია და ჰიპერგლიკემია, შესაბამისად) (Celton-Morizur, Merlen, Couton, & Desdouets, 2010).

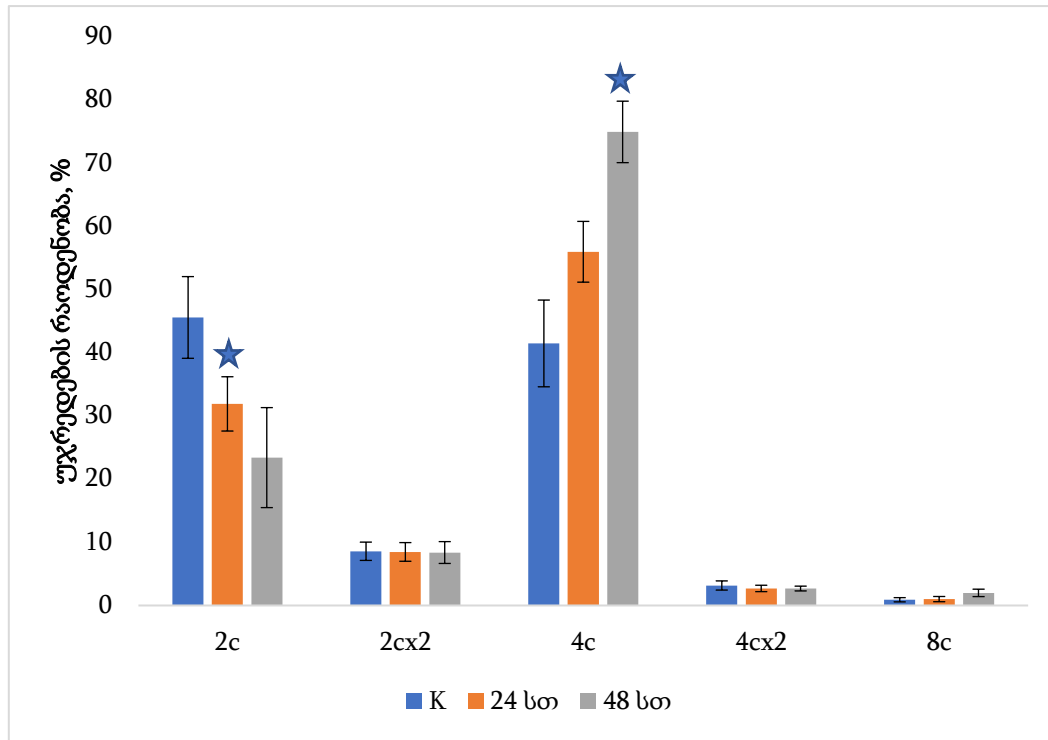
აქედან გამომდინარე, პარალელურად შევისწავლეთ ჰიპერგლიკემიით გამოწვეული ფუნქციური დატვირთვის საპასუხოდ ჰეპატოციტების პოლიპლოიდიზაციის ცვლილებები ალოქსანური დიაბეტის განვითარების საწყის ეტაპზე. ამ მიზნით, ალოქსანის ინექციიდან 24-ე და 48-ე საათებზე შეფასდა ღვიძლში სხვადასხვა პლოიდობის უჯრედების თანაფარდობის ცვლილება. კვლევის შედეგად მიღებული (რამდენიმე ცდის) გასაშუალოებული მონაცემები წარმოდგენილია ცხრილში 2. გამოკვლევებით დადგინდა, რომ ალოქსანის ინექციიდან 24-ე საათზე საცდელი ჯგუფის ვირთაგვების ღვიძლში სხვადასხვა პლოიდობის უჯრედების თანაფარდობა სტატისტიკურად სარწმუნოდ არ იცვლება. ამავე დროს მნიშვნელოვნად შეიცვალა სურათი 48-ე საათზე.

ცხრილი 2. ღვიძლში უჯრედების პლოიდობის ცვლილება ალოქსანის ინექციის შემდეგ

	კონტროლი	24-ე საათი	48-ე საათი
2c	45.5±6.4	31.9±4.2	23.4±7.9*
2c × 2	8.4±1.4	8.4±1.4	8.3±1.7
4c	41.4±6.8	55.9±4.8	74.9±4.8*
4c × 2	3.1±0.7	2.6±0.5	2.6±0.3
8c	0.9±0.3	1±0.4	1.9±0.5

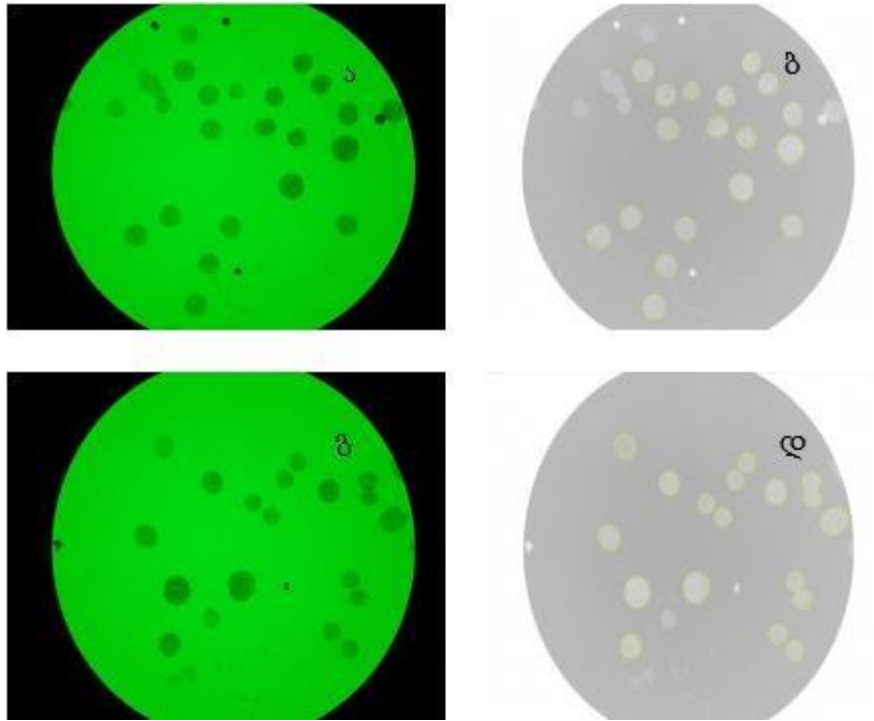
აღნიშნულ ვადებზე საცდელი ცხოველების ღვიძლის პარენქიმული უჯრედების (ჰეპატოციტები) პლოიდობის ცვლილებები უფრო თვალსაჩინოდ არის წარმოდგენილი ჰისტოგრამების სახით მე-10 სურათზე. სურათიდან ჩანს, რომ ალოქსანის ინექციიდან 48-ე საათზე, საკონტროლო მაჩვენებელთან შედარებით, საცდელი ცხოველების ღვიძლში, 51 %-ით სარწმუნოდ შემცირდა დიპლოიდური (2c) უჯრედების რაოდენობა. ამავე დროს, დაახლოებით 55 %-ით ასევე, სარწმუნოდ გაიზარდა მხოლოდ ერთბირთვიანი ტეტრაპლოიდური უჯრედების (4c) რაოდენობა (სურ.12). მიღებული შედეგებიდან გამომდინარეობს, რომ ალოქსანური დიაბეტის განვითარების ადრეულ ეტაპზე (48სთ) გაზრდილ ფუნქციურ დატვირთვას ღვიძლი მაღალპლოიდური უჯრედების რაოდენობრივი მატებით პასუხობს.





სურ. 12 ალოქსანის ინექციიდან სხვადასხვა ვადაზე (24, 48 სთ) თეთრი ზრდასრული ვირთაგვების ღვიძლში ჰეპატოციტების პლოიდობის ცვლილება

მე-13 სურათზე წარმოდგენილია საკონტროლო და საცდელი ჯგუფების ვირთაგვების ღვიძლის ქსოვილებიდან იზოლირებული უჯრედების ნაცხები, შეღებვა ფიოლგენის რეაქციით.

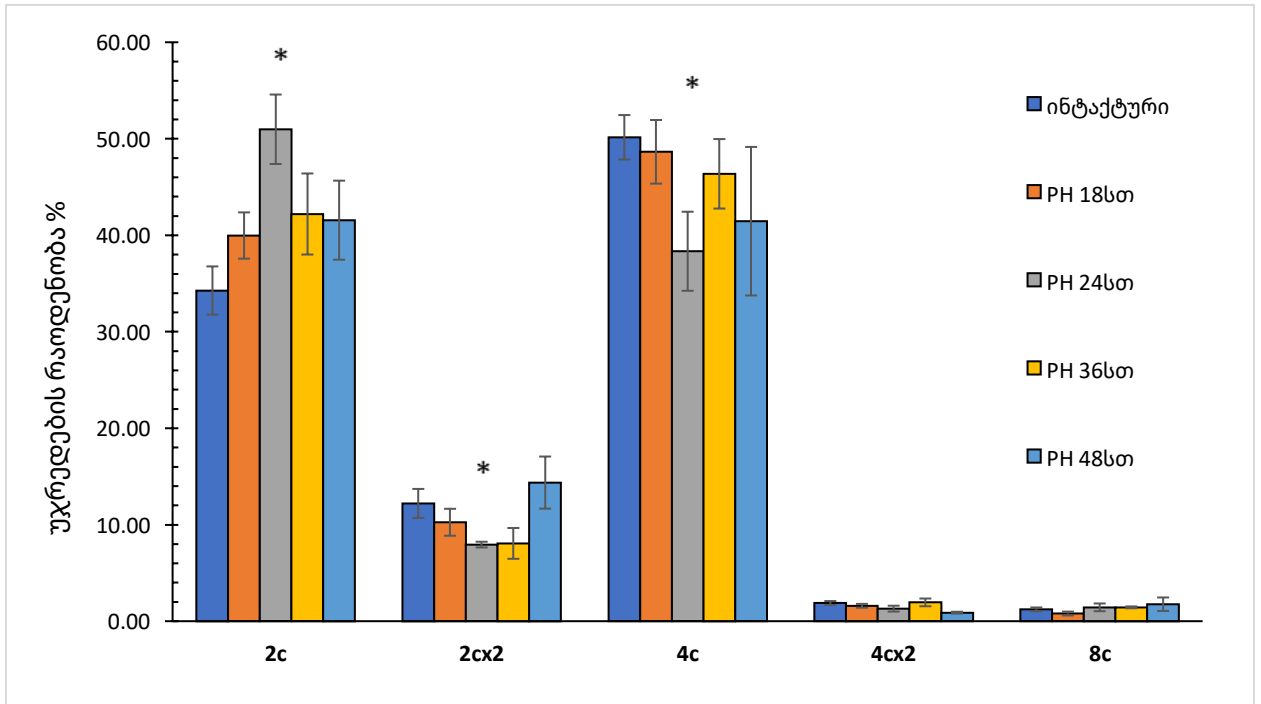


სურ. 13 ა, ბ - ფიოლგენის რეაქციით შეღებილი იზოლირებული ჰეპატოციტები; ბ, დ - ფოტო კომპიუტერულ პროგრამა ImageJ-ში დამუშავების შემდეგ (10 × 100)

### 3.6 ნაწილობრივი ჰეპატექტომიით ინდუცირებული ალდგენითი ზრდის საწყის ეტაპზე ზრდასრული ვირთაგვას ღვიძლის ჰეპატოციტების პლოიდობის ცვლილებების შესწავლა

ღვიძლის ქსოვილისთვის, როგორც ცნობილია, დამახასიათებელია პოლიპლოიდური უჯრედების არსებობა, რაც დაკავშირებულია მის მრავალფუნქციურ ბუნებასთან. უახლესი გამოკვლევებით მოპოვებულია შედეგებით მწირი ინფორმაცია იმის შესახებ, რომ ღვიძლის კომპენსატორული და ადაპტაციური ზრდა, ყოველთვის არ მიმდინარეობს რეგენერაციის მკაცრად რეგულირებადი თანამიმდევრული პროცესებით, როგორებიც არის: პროლიფერაცია, ჰიპერტროფია და პოლიპლოიდიზაცია. მაღალპლოიდური უჯრედების რაოდენობრივი მატება, ღვიძლის რეზექციის საპასუხოდ, ჩვეულებრივ გვიან (რამდენიმე დღე) ვადებზე არის ნაჩვენები. აქედან გამომდინარე, კვლევის შემდეგ ეტაპზე შევეცადეთ დაგვედგინა, ხომ არ ხდება რეგენერირებად ღვიძლში პირველი ორი დღის განმავლობაში პოლიპლოიდური უჯრედების

რაოდენობრივი თანაფარდობის ცვლილება. ამ მიზნით, ზრდასრული ვირთაგვებს ჩავუტარეთ ღვიძლის რეზექცია და ოპერაციიდან პირველი 48 სთ-ის განმავლობაში შევაფასეთ ჰეპატექტომიის გავლენა ჰეპატოციტების პლოიდობის ცვლილებაზე დინამიკაში (18, 24, 36 და 48 საათში). კვლევის შედეგები წარმოდგენილია სურ.14-ზე.



სურ. 14 ნაწილობრივი ჰეპატექტომიის გავლენა ჰეპატოციტების პლოიდობის ცვლილებაზე დინამიკაში (18, 24, 36 და 48 სთ-ში)

გამოკვლევებით დადგინდა, რომ ჰეპატექტომიის შედეგად ინტაქტურთან შედარებით საცდელი ჯგუფის ცხოველებში ოპერაციიდან 18 საათში ჰეპატოციტების პლოიდობის სტატისტიკურად სარწმუნო ცვლილებები არ აღინიშნება. აღსანიშნავია, რომ საცდელი ჯგუფის ცხოველებში ოპერაციიდან 24 საათში ინტაქტურთან შედარებით სტატისტიკურად სარწმუნოდ გაიზარდა 2c უჯრედების რაოდენობა, შემცირდა 2c × 2 და 4c უჯრედების პროცენტული წილი, რაც იმაზე მიუთითებს, რომ აღნიშნულ ვადაზე იწყება უჯრედების პროლიფერაცია. ასევე უცვლელი რჩება 4c × 2 და 8c უჯრედების რაოდენობა (სურ. 14). საცდელი ჯგუფის ცხოველებში ინტაქტურთან შედარებით სხვადასხვა პლოიდური უჯრედების წილის სტატისტიკურად სარწმუნოდ ცვლილებები არ გამოვლინდა არც შემდგომ ვადებზე (36სთ და 48სთ).

## დასკვნები

1. ალოქსანური დიაბეტით განპირობებულ ფუნქციურ დატვირთვას საწყის ეტაპზე ღვიძლი ენდორედუპლიკაციის მექანიზმის აქტივაციით პასუხობს, რაც უჯრედების  $G_{2-0}$  პოპულაციის წარმოქმნაზე მიუთითებს.
2. ალოქსანის ინექციით გამოწვეული ჰიპერგლიკემიის პირობებში (შაქრიანი დიაბეტი) ღვიძლის მიტოზური აქტიურობის ცვლილების გარეშე, ენდორედუპლიკაციის გზით მაღალპლოიდური უჯრედების რაოდენობრივი მატება, ორგანოს ადაპტაციურ თავისებურებას წარმოადგენს.

## გამოყენებული ლიტერატურა

- 1) Ashton, M. P., Eugster, A., Walther, D., Daehling, N., Riethausen, S., Kuehn, D., Klingel, K., Beyerlein, A., Zillmer, S., Ziegler, A. G., & Bonifacio, E. (2016). Incomplete immune response to coxsackie B viruses associates with early autoimmunity against insulin. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep32899>
- 2) Bilous, R., Donnelly, R., & Idris, I. (2021). *Handbook of Diabetes* (5th ed.). Wiley-Blackwell.
- 3) Celton-Morizur, S., Merlen, G., Couton, D., & Desdouets, C. (2010). Polyploidy and liver proliferation: Central role of insulin signaling. *Cell Cycle*, 9(3), 460–466. <https://doi.org/10.4161/cc.9.3.10542>
- 4) Donne, R., Saroul-Ainama, M., Cordier, P., Celton-Morizur, S., & Desdouets, C. (2020). Polyploidy in liver development, homeostasis and disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 17(7), 391–405. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0284-x>
- 5) Gentric, G., Maillet, V., Paradis, V., Couton, D., L'Hermitte, A., Panasyuk, G., Fromenty, B., Celton-Morizur, S., & Desdouets, C. (2015). Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Investigation*, 125(3), 981–992. <https://doi.org/10.1172/jci73957>
- 6) Gestational Diabetes. (2021, June 30). National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. <https://www.niddk.nih.gov/health-information/diabetes/overview/what-is-diabetes/gestational?dkrd=hisr0003>
- 7) Ghiraldini, F. G., Silva, I. S., & Mello, M. L. S. (2012). Polyploidy and chromatin remodeling in hepatocytes from insulin-dependent diabetic and normoglycemic aged mice. *Cytometry Part A*, 81A(9), 755–764. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22102>
- 8) Hartwell, "L.H." & "Weinert, "T.A." Checkpoints: "controls" that "ensure" the "order" of "cell" 28" cycle" events. "Science" **246**, "629,34" (1989)."

- 9) Ighodaro, O. M., Adeosun, A. M., & Akinloye, O. A. (2017). Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. *Medicina*, 53(6), 365–374. <https://doi.org/10.1016/j.medici.2018.02.001>
- 10) King, A. J. (2012). The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*, 166(3), 877–894. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x>
- 11) Lenzen, S. (2007). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2), 216–226. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0886-7>
- 12) Moody, C. A., & Laimins, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*, 10(8), 550–560. <https://doi.org/10.1038/nrc2886>
- 13) Pawlina, W. P. R. M. H. (2021). *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology* by Michael H. Ross PhD Wojciech Pawlina MD(1905–06-10) (8th edition, Vol. 16). LWW.
- 14) Tracy, S., & Gauntt, C. (2008). Group B Coxsackievirus Virulence. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 49–63. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-75546-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-540-75546-3_3)
- 15) Unwin, N., Gan, D., & Whiting, D. (2010). The IDF Diabetes Atlas: Providing evidence, raising awareness and promoting action. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 87(1), 2–3. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2009.11.006>
- 16) Wang, Z., Yang, Y., Xiang, X., Zhu, Y., Men, J., & He, M. (2010). Wei sheng yan jiu = Journal of hygiene research, 39(2), 133–142
- 17) Wass, H. T. A. J. (2021). *Oxford Handbook of Endocrinology and Diabetes*. OUP/Boehringer.
- 18) Yamada T, Sogawa K, Kim JK, et al. Increased polyploidy, delayed mitosis and reduced protein phosphatase-1 activity associated with excess copper in the Long Evans Cinnamon rat. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*. 1998 Mar;99(3):283-304.
- 19) ბაკურაძე, ე. (2006). ვირთაგვას ღვიძლის რეგენერაციის თავისებურებები ქოლესტაზის პირობებში.

- 20) Бивалькевич, Н., Карман, Ю. (2009). МЕХАНИЗМЫ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ АЛИМЕНТАРНОЙ ДИСЛИПИДЕМИИ, ЗДОРОВЬЕ МЕДИЦИНСКАЯ ЭКОЛОГИЯ. НАУКА 4-5 (39-40).
- 21) ჯანმრთელობის დაცვა. სტატისტიკური ცნობარი (2018). საქართველოს ოკუპირებული ტერიტორიებიდან დევნილთა, შრომის, ჯანმრთელობის და სოციალური დაცვის სამინისტრო. დაავადებათა კონტროლის და საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის ეროვნული ცენტრი.