

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის  
სახელმწიფო უნივერსიტეტი

გიორგი ნებიერიძე

ჰეპატოციტების პოლიპლოიდიზაციის სასიგნალო გზების  
შესწავლა ქოლესტაზური ღვიძლის მოდელზე

სამაგისტრო პროგრამა ბიოლოგია  
ნაშრომი შესრულებულია ბიოლოგიის მაგისტრის აკადემიური  
ხარისხის მოსაპოვებლად

ხელმძღვანელები:  
დინა ძიძიგური, ბიოლოგიის მეცნ. დოქტორი, პროფესორი  
ეკატერინე ბაკურაძე, ბიოლოგიის აკად. დოქტორი,  
ასოც.პროფესორი

თბილისი

2017

# სარჩევი

ანოტაცია.....	2
შესავალი .....	7
თავი 1. ლიტერატურის მიმოხილვა.....	11
1.1 პოლიპლოიდია და პოლიპლოიდიზაციის მოლეკულური საფუძვლები.....	11
1.2 პოლიპლოიდია ჰეპატოციტებში.....	12
1.3 ქოლესტაზი და ღვიძლის რეგენერაცია .....	14
1.4 ERK 1/2 და JNK სასიგნალო კასკადები .....	17
თავი 2. მასალა და მეთოდები .....	20
2.1. კვლევის ობიექტები და მოდელები.....	20
2.2. სინათლის მიკროსკოპში შესწავლისათვის მასალის ფიქსაცია და პრეპარატების მომზადება .....	21
2.3. კოლხიციური მიტოზური ინდექსის განსაზღვრა .....	21
2.4. ჰეპატოციტების ბირთვებში დნმ-ს რაოდენობის განსაზღვრის მიზნით პრეპარატების მომზადება და მათი შეღებვა.....	21
2.5. პლოიდობის განსაზღვრა კომპიუტერული პროგრამის - Image.J-ს საშუალებით .....	22
თავი 3. კვლევის შედეგები და განხილვა.....	23
3.1. ქოლესტაზურ ღვიძლში პლოიდობის ცვლილების შესწავლა c-MET რეცეპტორის ინჰიბირების შემდეგ.....	23
3.2. ქოლესტაზურ ღვიძლში მიტოზური აქტიურობის ცვლილების შესწავლა c -MET რეცეპტორის ინჰიბირების შემდეგ .....	27
3.3. ქოლესტაზურ ღვიძლში პლოიდობის ცვლილების შესწავლა MEK 1/2 ცილის ინჰიბირების შემდეგ.....	33
3.4. ქოლესტაზურ ღვიძლში მიტოზური აქტიურობის ცვლილების შესწავლა MEK1/2 ცილის ინჰიბირების შემდეგ .....	36
3.5. ქოლესტაზურ ღვიძლში პლოიდობის ცვლილების შესწავლა JNK სასიგნალო გზის ინჰიბირების შემდეგ.....	37
3.6. ქოლესტაზურ ღვიძლში მიტოზური აქტიურობის ცვლილების შესწავლა JNK ცილის ინჰიბირების შემდეგ.....	39
დასკვნები: .....	41
გამოყენებული ლიტერატურა.....	42

## ანოტაცია

**შესავალი.** ღვიძლის სტრუქტურისა და ფუნქციის აღდგენაში, როგორც ცნობილია, მნიშვნელოვანი როლი ენიჭება ისეთ პროცესებს, როგორებიცაა: **ჰიპერტოფია**, **პროლიფერაცია** და მისი ერთერთი ფორმა - **პოლიპლოიდიზაცია**. ამ ორი უკანასკნელი პროცესისთვის წინაპირობაა უჯრედის შესვლა ე.წ. მიტოზურ ციკლში. დღეისათვის იდენტიფიცირებულია ოთხი მთავარი კასკადური გზა, რომელიც უზრუნველყოფს უჯრედის ციკლში შესვლას, ესენია: ERK 1/2; JNK1/2/3; p38 და ERK5. მიუხედავად ამისა, არ არის ბოლომდე ცნობილი **პროლიფერაციის** და **პოლიპლოიდიზაციის** პროცესების ინიცირება ერთი და იგივე სასიგნალო გზით ხორციელდება, თუ განსხვავებულია მხოლოდ ამ კასკადური გზების აქტივაციის ფაქტორები. ამ საკითხის კვლევა აქტუალურია გამომდინარე იქიდანაც, რომ ჯერ კიდევ არ არის დადგენილი ციკლში შესული უჯრედი როდის ან რომელ ეტაპზე იღებს სიგნალს ციტოკინების და/ან კარიოკინების ბლოკის თაობაზე (არასრული მიტოზი), რის შედეგადაც წარმოიქმნება პოლიპლოიდური უჯრედები.

აღნიშნული საკითხის საფუძველზე ინტერესი განაპირობა ასევე, ქოლესტაზური ღვიძლის მოდელზე ჩატარებული კვლევის შედეგებმა. კერძოდ, ნაჩვენები იქნა, რომ: 1. ნაღვლის საერთო სადინარის ლიგირებიდან 4 დღის განმავლობაში ზრდასრული ვირთაგვების ღვიძლის პარენქიმაში მნიშვნელოვნად იზრდება მაღალპლოიდური უჯრედების შემცველობა; 2. ჰეპატოციტების მაღალი მიტოზური აქტიურობა, რომელიც ვლინდება ოპერაციიდან მე-4 დღეს, სწორედ პოლიპლოიდური უჯრედების წარმოქმნას ემსახურება.

ყოველივე ზემოთ აღნიშნულის გათვალისწინებით აუცილებლად მივიჩნიეთ ამ საკითხის შესასწავლად ზემოთ ხსენებული 4 სასიგნალო გზის შერჩევითი ბლოკირებით დაგვედგინა ქოლესტაზურ ღვიძლში პოლიპლოიდიზაციის ინიცირების მოლეკულური მექანიზმი. გამომდინარე იქიდან, რომ პროლიფერაციაში წამყვანი როლი ჰეპატოციტების ზრდის ფაქტორს (HGF) ენიჭება და ნაღვლის საერთო სადინარის ლიგირებიდან მეორე დღეს სისხლში სწორედ HGF-ის კონცენტრაციის მატება ხდება, საინტერესო იყო ქოლესტაზური ღვიძლის მოდელზე პოლიპლოიდიზაციის პროცესში HGF-ის როლის დადგენა. HGF-ით აქტივირებული სასიგნალო კასკადის ერთ-ერთი საფეხურის ცილებია MEK 1 და MEK 2 რომლებიც ERK 1/2 სასიგნალო ქსელის საკვანძო მოლეკულებია, რომელთა მონაწილეობის დადგენა პოლიპლოიდიზაციაში მნიშვნელოვანია, რადგან მათი გააქტიურება შეიძლება მოხდეს HGF-ის რეცეპტორის C-Met-ის გვერდის ავლით. გარდა ERK1/2 გზისა საინტერესო იყო ისეთი მძლავრი სასიგნალო გზის შესწავლა პოლიპლოიდიზაციაში, როგორიცაა JNK კასკადი. JNK ოჯახის ცილები აქტიურდებიან ციტოკინების, ულტრაიისფერი გამოსხივების,

ზრდის ფაქტორების ნაკლებობითა და ზოგიერთი G ცილასთან (G12/13) ასოცირებული რეცეპტორების მოქმედების შედეგად და იწვევენ უჯრედის ციკლში შესვლას.

**კვლევის მიზანი.** ზემოთ აღნიშნულიდან გამომდინარე, კვლევის მიზანი იყო ქოლესტაზური ღვიძლის მოდელზე ჰეპატოციტების პოლიპლოიდიზაციის პროცესში ERK 1/2-ისა და JNK სასიგნალო გზების როლის შესწავლა.

**კვლევის მასალა და მეთოდები.** კვლევის ობიექტად გამოვიყენეთ ზრდასრული ვირთაგვები (130–150 გრ). ექსპერიმენტულ მოდელი იყო ქოლესტაზური ღვიძლი (გამოწვეული ნაღვლის საერთო სადინარის გადაკეცვით). კვლევის მიზნიდან გამომდინარე, პირველი ამოცანის შესასრულებლად ცხოველები დავყავით სამ ჯგუფად: I– საკონტროლო ჯგუფი - ინტაქტური ცხოველები, II– პირველი საცდელი ჯგუფი - ქოლესტაზიანი ცხოველები და III – მეორე საცდელი ჯგუფი - ქოლესტაზიანი ცხოველები, რომლებშიც შეგვყავდა HGF-ის რეცეპტორის ინჰიბიტორი (PHA 665752) (1მგ/კგ–ზე) ოპერაციისას და შემდგომი სამი დღის განმავლობაში (სულ 4–ჯერ). მეორე ამოცანის შესასრულებლად ცხოველები დავყავით სამ ჯგუფად: I– საკონტროლო ჯგუფი - ინტაქტური ცხოველები, II– პირველი საცდელი ჯგუფი - ქოლესტაზიანი ცხოველები და III – მეორე საცდელი ჯგუფი - ქოლესტაზიანი ცხოველები, რომლებშიც შეგვყავდა MEK 1/2 სასიგნალო მოლეკულების ინჰიბიტორი (PD98059) (10მგ/კგ–ზე). მესამე მიზნის შესასრულებლად ცხოველები დავყავით სამ ჯგუფად: I– საკონტროლო ჯგუფი - ინტაქტური ცხოველები, II– პირველი საცდელი ჯგუფი - ქოლესტაზიანი ცხოველები და III – მეორე საცდელი ჯგუფი - ქოლესტაზიანი ცხოველები, რომლებშიც შეგვყავდა JNK ცილის ინჰიბიტორი (SP 600125) (1მგ/კგ–ზე). დნმ-ის რაოდენობას ვსაზღვავდით კომპიუტერული პროგრამა Image J გამოყენებით. ღვიძლის ქსოვილის პროლიფერაციული აქტიურობის შესაფასებლად ვიყენებდით კოლხიციური მიტოზური ინდექსის განსაზღვრის მეთოდს. მონაცემები სტატისტიკურად დამუშეებული იყო სტუდენტის t კრიტერიუმით. მონაცემებს სარწმუნოდ ვთვლიდით  $p < 0.5$  შემთხვევაში.

**კვლევის შედეგები.** კვლევის შედეგად დადგენილი იქნა, რომ HGF-ის რეცეპტორის ინჰიბიტორის გამოყენების შედეგად პირველი საცდელი ჯგუფის ცხოველების ღვიძლის პარენქიმულ უჯრედებში ნაღვლის საერთო სადინარის ლიგირებიდან მე-4 დღეს მნიშვნელოვნად იზრდება უჯრედების მიტოზური აქტიურობა კონტროლთან შედარებით. ამასთან, მცირდება დიპლოიდური (2c) და ორბირთვიანი (2c×2) ჰეპატოციტების რაოდენობა და მატულობს მაღალპლოიდური (4c, 4c×2, 8c) უჯრედების შემცველობა. მაღალპლოიდური უჯრედების ანალოგიური რაოდენობრივი მატება გამოვლინდა II საცდელი ჯგუფის ვირთაგვების ღვიძლის პარენქიმაშიც, თუმცა, ამავე ჯგუფის ცხოველების ღვიძლში

სტატისტიკურად სარწმუნოდ შემცირდა ჰეპატოციტების მიტოზური აქტიურობა. MEK 1/2 სასიგნალო ცილების ინჰიბირების შედეგად პირველი საცდელი ჯგუფის ცხოველების ღვიძლის პარენქიმულ უჯრედებში ნაღვლის საერთო სადინარის ლიგირებიდან მე-2 დღეს მნიშვნელოვნად იზრდება უჯრედების მიტოზური აქტიურობა კონტროლთან შედარებით. ამასთან, მცირდება დიპლოიდური (2c) და ორბირთვიანი (2c×2) ჰეპატოციტების რაოდენობა და მატულობს მაღალპლოიდური (4c, 4c×2, 8c) უჯრედების შემცველობა. მეორე საცდელი ჯგუფის ცხოველებში შეინიშნება ტეტრაპლოიდური (4c) უჯრედების კლების ტენდენცია, ხოლო საერთოდ არ გვხვდება ერთბირთვიანი ოქტაპლოიდური (8c) და ორბირთვიანი ოქტაპლოიდური (4c×2) უჯრედები, რაც ცალსახა მტკიცებულებაა პოლიპლოიდიზაციის პროცესის დათრგუნვისა. ხოლო რაც შეეხება პროლიფერაციულ აქტიურობას, იგი არ არის განსხვავებული პირველ და მეორე საცდელი ცხოველების ჯგუფებს შორის. JNK ცილის ინჰიბიტორის გამოყენების შედეგად პირველი საცდელი ჯგუფის ცხოველების ღვიძლის პარენქიმულ უჯრედებში ნაღვლის საერთო სადინარის ლიგირებიდან მე-2 დღეს მნიშვნელოვნად იზრდება უჯრედების მიტოზური აქტიურობა კონტროლთან შედარებით. ამასთან, მცირდება დიპლოიდური (2c) და ორბირთვიანი (2c×2) ჰეპატოციტების რაოდენობა და მატულობს მაღალპლოიდური (4c, 4c×2, 8c) უჯრედების შემცველობა. მაღალპლოიდური უჯრედების ანალოგიური რაოდენობრივი მატება გამოვლინდა II საცდელი ჯგუფის ვირთაგვების ღვიძლის პარენქიმაშიც, ასევე არ დაფიქსირდა რაიმე განსხვავება პირველი საცდელი ჯგუფისაგან მიტოზურ აქტიურობაში.

**დასკვნა: 1.** თეთრ, არახაზოვან ვირთაგვებში HGF-ისა და JNK კასკადური გზების ბლოკირებით, მხოლოდ უჯრედების გამრავლების შეფერხება იმაზე მეტყველებს, რომ ქოლესტაზურ ღვიძლში პროლიფერაცია და პოლიპლოიდიზაცია სხვადასხვა სასიგნალო გზებით წარმართება.

**2.** MEK 1/2 ცილების ბლოკირებით მაღალპლოიდური (ოქტაპლოიდური) უჯრედების წარმოქმნის შეფერხება იმაზე მიუთითებს, რომ ERK 1/2 სასიგნალო გზის აქტივაცია ჰეპატოციტების პოლიპლოიდიზაციისთვის ერთ-ერთი აუცილებელი პირობაა.

## Summary

### The Study of signaling pathways of hepatocytes polyploidization in model of cholestatic liver

**Introduction.** As it is known hypertrophy, cell proliferation and one of its form- polyploidization are important in the restoration of structure and function of the liver. Precondition for the last two processes is to enter to the mitotic cycle. Nowadays there are four main pathways that provide cells to enter to the cell cycle: ERK 1/2; JNK1 / 2/3; P38 and ERK5. Nevertheless, it is not clear yet, the processes are initiated by the same signaling pathways, or there are differences among pathway activation factors. The study of this issue is relevant because there is not yet known at which stage of cell cycle the cell gets the signal for blocking the cytokinesis and / or karyocinesis (incomplete mitosis), resulting in the formation of polyploid cells.

The interest in this issue also led from the results of the study of cholestatic liver model. In particular, it was shown that: 1. the amount of high-ploidy cells is significantly increased in the liver parenchyma of adult rats during 4 days from the common bile duct ligation; 2. High-mitotic activity of hepatocytes on the 4th day of operation, serves to form polyploid cells.

By considering all of this above, we decided the determination of the molecular mechanism of initiation of polyploidization in cholestatic liver by selective blocking of the above mentioned 4 signaling paths. Due to the fact that the leading role in proliferation is going to hepatocytes growth factor (HGF), and the concentration of HGF is increased on the second day after the common bile duct ligation, it was interesting to determine the role of HGF in the process of polyploidization in the cholestatic liver model. MEK 1 and MEK 2 are the key molecules of the signal pathway of ERK1/2. Determination of their role in polyploidization is important, because they can be activated by avoiding HGF receptor - C-Met. Beside to ERK1 / 2, it was interesting to study a JNK signaling pathway in polyploidization. Proteins of JNK family are activated by the lack of cytokines, ultraviolet radiation, growth factors and by the activity of some G protein (G12 / 13) associated receptors resulting the enter of cells in the cell cycle.

**The aim** of the research was to study the role of ERK 1/2 and JNK signaling pathways in the process of hepatocytes polyploidization in the cholestatic liver model.

**Materials and methods.** Experiments were carried out on adult white rats (130-150g). Model of cholestatic liver with common bile duct ligation was used. Animals of the First task were divided into three group: I-control intact animals, II –cholestatic animals (4th day), III-cholestatic animals with C-Met inhibitor (PHA 665752) inhibitor injection (1mg/kg) once a day during 4 days after surgery. Animals of the Second task were divided into three group: I-control intact animals, II –cholestatic animals (4th day), III-cholestatic animals with MEK 1/2 (PD98059) inhibitor injection (10mg/kg). Animals of the third task were divided into three group: I-control intact animals, II –cholestatic animals (4th day), III-cholestatic animals with JNK (SP 600125) inhibitor injection (1mg/kg). Nuclear DNA content was detected by using of computer software ImageJ 1.36 b. Determination of colchicine mitotic index was used for assessment of proliferative activity. Student's t test was used for comparison among the different groups.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

**Results.** It was established that after the using of C-Met inhibitor mitotic activity of hepatocytes is increased in the first test group in compare to control in the 4 day after the common bile duct ligation. At the same time the quantity of diploid (2c) and binucleic (2cx2) cells is decreased and polyploid cells (4c, 4cx2, 8c) is increased. The same picture was seen in the second test group, however mitotic activity has decreased statistically significantly.

The hepatocytes mitotic activity significantly increases on the 2nd day from common bile duct ligation in the first test group after inhibition of MEK 1/2. In addition, the number of diploid (2c) and binucleic ( $2c \times 2$ ) hepatocytes decreases and the polyploid (4c,  $4c \times 2$ , 8c) cells is increased. In the second test group of animals, the number of tetraploid cells (4c) has tendency to decreased, while octaploid (8c) and binuclear octaploid ( $4c \times 2$ ) cells are not present, which is evidence for suppression of polyploidization. With regard to proliferative activity, there is no difference between the animals from first and second test group.

After the using of JNK inhibitor mitotic activity of hepatocytes is increased in the first test group in compare to control in the 2nd day after the common bile duct ligation. At the same time the quantity of diploid (2c) and binucleic (2cx2) cells is decreased and polyploid cells (4c, 4cx2, 8c) is increased. Increased number of polyploidy cells was seen also in liver of animals of the second test group, where no difference in mitotic activity between the first and second test groups was detected.

**Conclusions.** 1. Inhibition only of cell proliferation by the blocking of HGF and JNK cascade pathways in non-linear rats indicates that proliferation and polyploidization in the cholestatic liver is managed by different signaling pathways. 2. Inhibition of the formation of high-ploidy (octaploid) cells by blocking of MEK 1/2 proteins indicates that ERK 1/2 signaling pathway is one of the necessary conditions for polyploidization of hepatocytes.

## შესავალი

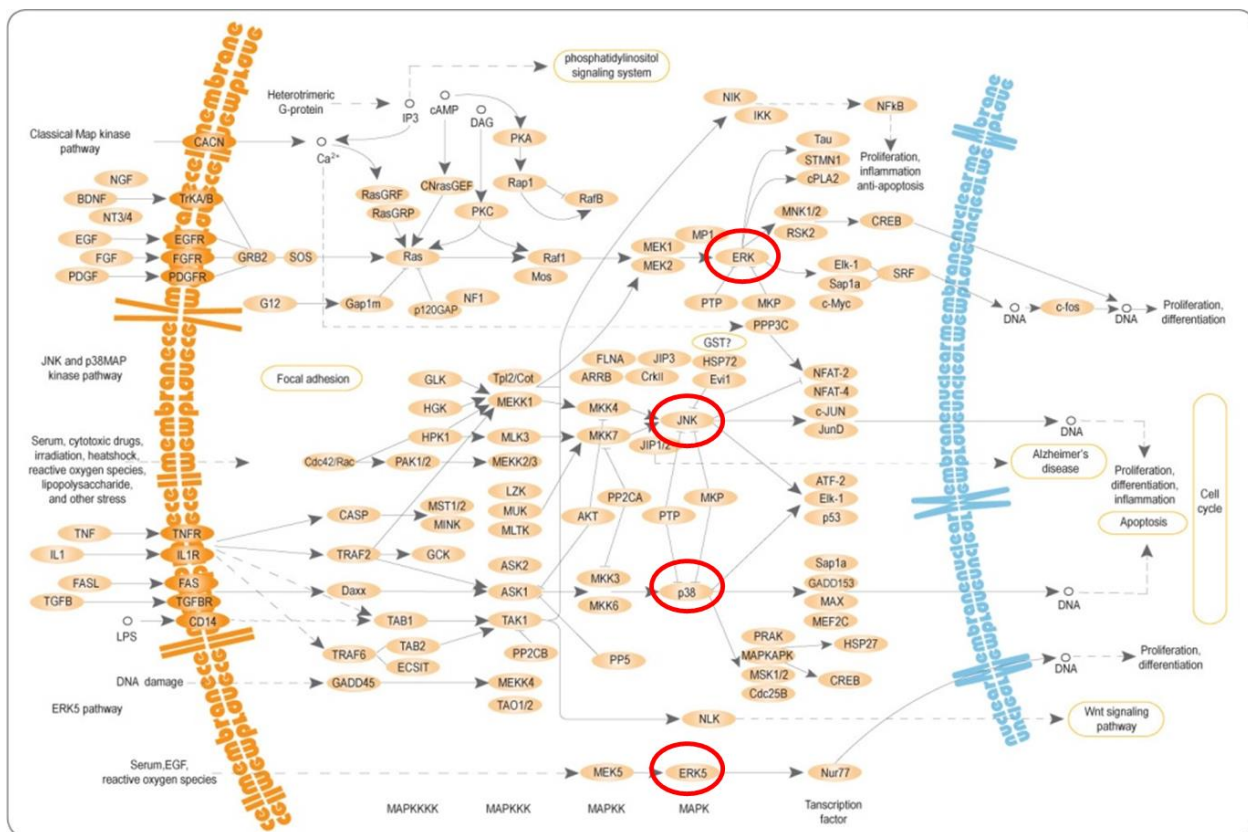
ღვიძლი სანტერესოა თავისი რეგენერაციული უნართა და კომპლექსური ფუნქციებით (Fausto et. al. 2006). იგი ადამიანში ერთ-ერთი ორგანოა, რომელსაც შეუძლია ჩარევის გარეშე მოახდინოს დაკარგული ქსოვილების რეგენერაცია. ღვიძლის მთლიანი მასის 25% საკმარისია იმისათვის, რომ მოხდეს ორგანოს სრული აღდგენა (Häussinger, Dieter, et. al. 2011). ღვიძლის რეგენერაციას ძირითადად ჰეპატოციტები უზრუნველყოფენ, რომლებიც სათანადო სიგნალის მიღების შემდეგ შედიან უჯრედულ ციკლში (G0 ფაზიდან გადადიან G1 ფაზაში), თუმცა, აღსანიშნავია, რომ ამ პროცესში ასევე მონაწილეობენ ენდოთელური უჯრედები და ბიპოტენტური ღეროუჯრედები - ღვიძლის ოვალური უჯრედები, რომლებსაც აქვთ უნარი დიფერენცირდნენ როგორც ჰეპატოციტებად, ისე ნაღვლის სადინარის უჯრედებად - ქოლანგიოციტებად. საყურადღებოა, რომ ძუძუმწოვრებში ღვიძლის რეგენერაციისას, მასისა და ფუნქციისაგან განსხვავებით, არ ხდება პირვანდელი ფორმის აღდგენა.

ღვიძლის რეგენერაციის საკვლევად ძირითადად იყენებენ ორ: რეზეცირებულ და ქიმიურად ინდუცირებული დაზიანების მქონე ღვიძლის მოდელს. საყურადღებოა, რომ მიუხედავად მთავარი სასიგნალო გზების მსგავსებისა, აღნიშნულ ორ მოდელში რეგენერაცია მაინც განსხვავებული მექანიზმებითა და კინეტიკით მიმდინარეობს (Mehendale et. al. 2010).

ღვიძლის მწვავე დაზიანების ან ქირურგიული რეზექციის შემდეგ ჰეპატოციტები იწყებენ აქტიურ გამრავლებას, რათა აღადგინონ ღვიძლის საწყისი მასა. დადგენილია, რომ ჰეპატოციტების პროლიფერაციული აქტიურობა პირდაპირპროპორციულ დამოკიდებულებაშია რეზექციული ქსოვილის მოცულობასთან. ასევე ცნობილია, რომ ღვიძლს მასისა და ფუნქციის აღდგენა ნაწიბურის წარმოქმნის გარეშე შეუძლია (Карлсон Б. М. et. al. 1986), აღნიშნულ პროცესში, პროლიფერაციის გარდა მნიშვნელოვანია პოლიპლოიდიზაცია და ჰიპერტროფია. შესწავლილია, რომ ღვიძლის რეგენერაციისას მასის აღდგენა ხდება ჰეპატოციტების: 50% - პროლიფერაციით, 30% - პოლიპლოიდიზაციით და 20% - ჰიპერტროფიით.

იმისათვის რომ უჯრედი გაიყოს ან გახდეს პოლიპლოიდური, იგი ამისათვის უნდა შევიდეს ციკლში. დღეისათვის იდენტიფიცირებულია ოთხი მთავარი სასიგნალო გზა, რომელიც აინიცირებს უჯრედის ციკლში შესვლას, ესენია: ERK1/2; JNK1/2/3; p38 და ERK5 (იხ. სურ. 1).





სურათი 1. უჯრედის ციკლში შესვლის მარეგულირებელი კასკადები

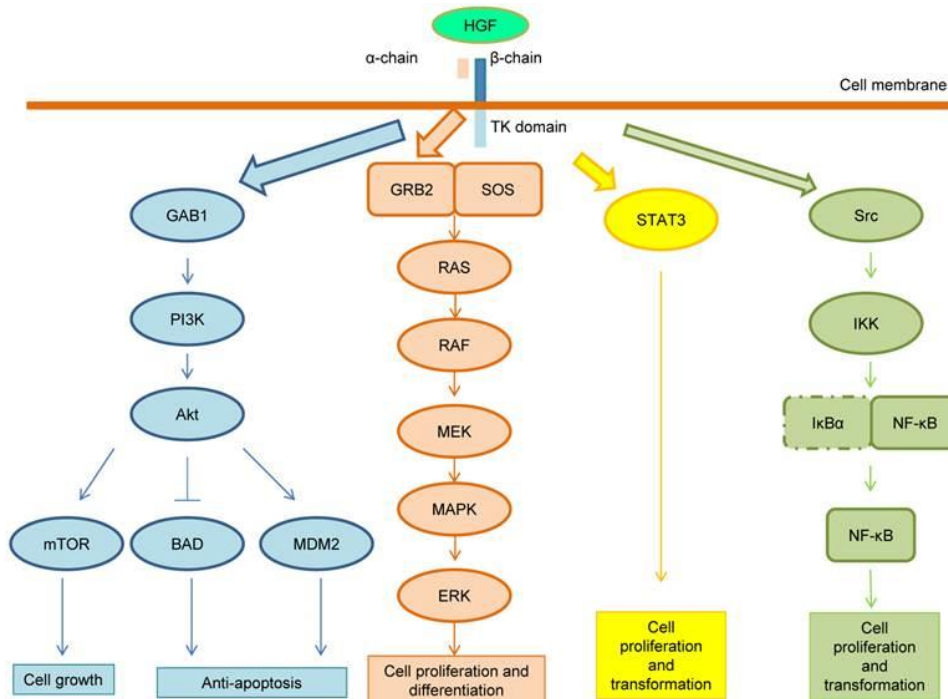
ბოლოდროინდელმა კვლევამ აჩვენა, რომ ღვიძლის რეგენერაციისას ჰიპერტროფია წინ უძღვის პროლიფერაციას (Miyaoka Y. et. al. 2012). გარდა ამისა, ცნობილი გახდა, რომ მანამდე არსებული დიპლოიდური და ტეტრაპლოიდური მონონუკლეარული ჰეპატოციტები არასტანდარტული უჯრედული ციკლით, სავარაუდოდ ენდორედუპლიკაციით დასაბამს აძლევენ ტეტრაპლოიდური და ოქტაპლოიდური ბირთვის მქონე უჯრედებს. ასევე, ნანახია, რომ ორბირთვიანი ჰეპატოციტები იყოფიან მარტივი დაყოფით და წარმოქმნიან ორ მონონუკლეარულ მაღალპლოიდურ შვილულ ჰეპატოციტებს. საყურადღებოა, რომ ღვიძლის რეგენერაციის მეორე დღეს ქსოვილში ვხვდებით 16n ქრომოსომების შემცველ ჰეპატოციტებს, ხოლო რეგენერაციის პროცესის დასრულებისას აღნიშნული ჰეპატოციტები აღარაა წარმოდგენილი ღვიძლის პარენქიმაში. ავტორების აზრით მაღალპლოიდური ჰეპატოციტების შემცირება დაკავშირებულია აპოპტოზთან (S. H. Sigal et. al. 1999).

დადგენილია, რომ ღვიძლის განსხვავებული პათოლოგიების დროს იცვლება სხვადასხვა პლოიდობის უჯრედების პროცენტული გადანაწილება ქსოვილში. მაგალითად დადგენილია, რომ ქოლესტაზურ ღვიძლში ოპერაციიდან მეოთხე დღეს მატულობს 4c და 8c ქრომოსომების შემცველი უჯრედების რაოდენობა, ხოლო დიპლოიდური უჯრედების

რაოდენობა კი მცირდება. ამავე დროს, ღვიძლის რეზექციის გარეშე მომატებულია მიტოზური ინდექსი (ზაკურაძე ე. 2006).

მიუხედავად იმისა, რომ ღვიძლში აღდგენითი ზრდის დროს მიმდინარე ზემოთ აღნიშნული 3 პროცესი ინტენსიური კვლევის საგანია, დღემდე უცნობია ამ პროცესების აღმძვრელი კონკრეტული სასიგნალო გზები.

ცნობილია, რომ ღვიძლის რეგენერაცია სხვადასხვა ფაქტორების ექსპრესიის გაძლიერებით იწყება, მათ შორისაა ციტოკინები, ზრდის ფაქტორები, სტრესული მიტოგენები და სტრესული ზრდის ფაქტორები. საყურადღებოა, რომ აღნიშნულ პროცესებში ერთ-ერთ წარმმართველ ფაქტორს ჰეპატოციტების ზრდის ფაქტორი (HGF) წარმოადგენს, იგი ღვიძლის უჯრედების პროლიფერაციისა და დიფერენციაციის სტიმულაციას C-MET რეცეპტორზე მოქმედების შედეგად ERK1/2 (RAS RAF MEK) სასიგნალო კასკადის გზით MAPK-ს გააქტიურებით განაპირობებს.



**სურათი 2. HGF-ით აქტივირებული სასიგნალო კასკადი**

დადგენილია, რომ ქოლესტაზურ ღვიძლში ნაღვლის საერთო სადინარის ლიგირებიდან მეორე დღეს მნიშვნელოვნად იზრდება HGF-ის კონცენტრაცია.

ღვიძლის უჯრედების პოლიპლოიდიზაციის პროცესში მონაწილე შესაძლო ფაქტორების გამოკვლევის მიზნით უპირველეს ყოვლისა საჭიროა ისეთი ზრდის ფაქტორის როლის დადგენა, როგორიცაა ჰეპატოციტების ზრდის ფაქტორი.

C-MET რეცეპტორის გააქტიურებას, როგორც ზემოთ იქნა აღნიშნული, მოსდევს უჯრედის ციკლში შესვლა, რაც მიიღწევა RAS-RAF-MEK სასიგნალო კასკადის ჩართვით, თუმცა ეს რთული სასიგნალო ქსელი შეიძლება სხვა ფაქტორითაც გააქტიურდეს. ჩამოთვლილი ფაქტორებიდან განსაკუთრებული მნიშვნელობა ენიჭება MEK 1/2 ცილებს, რომლებიც MAP კინაზას გზის ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი საფეხურია.

MAPK-ს გამააქტიურებელ, კიდევ ერთ მძლავრს სასიგნალო კასკადს წარმოადგენს c-Jun N-ტერმინალური კინაზას (JNK) გზა, რომელიც უმეტესად რეაგირებს სტრესულ სტიმულზე (G. F. Robinson et. al. 2001), ისეთებზე როგორებიცაა ციტოკინები, ულტრაიისფერი გამოსხივება, სითბური შოკი და ოსმოსური შოკი. იგი ახორციელებს c-Jun ფაქტორის მიბმასა და ფოსფორილირებას სერინ-63-ისა და სერინ-73-ის ტრანსკრიფციულად აქტიურ დომენებზე.

ყოველივე ზემოთთქმულიდან გამომდინარე, კვლევის მიზანი იყო ქოლესტაზური ღვიძლის მოდელზე ჰეპატოციტების პოლიპლოიდიაზაციის პროცესში HGF-ისა და JNK-ს კასკადური გზების როლის დადგენა.

## თავი 1. ლიტერატურის მიმოხილვა

### 1.1 პოლიპლოიდია და პოლიპლოიდიზაციის მოლეკულური საფუძვლები

პოლიპლოიდია არის ქრომოსომული ნაკრების ჯერადად გაზრდილი რაოდენობის მდგომარეობა, იგი ფართოდ გავრცელებული ფიზიოლოგიური ფენომენია, რომელსაც ვხვდებით: მცენარეებში, სოკოებში, მწერებში, თევზებში, ამფიბიებში და ძუძუმწოვრებში (S. P. Otto et. al. 2007). აღსანიშნავია, რომ პოლიპლოიდური უჯრედები დიპლოიდური უჯრედებისაგან წარმოიქმნება. პოლიპლოიდია დამახასიათებელია ტერმინალურად დიფერენცირებული უჯრედებისათვის, მაგალითად: მეგაკარიოციტები ( $16n-128n$ ), კარდიომიოციტები ( $4n$ ), ტროფობლასტის გიგანტური უჯრედები ( $8n-64n$ ), პურკინიეს ნეირონები, რეტინოგანგლიოციტები (S. M. Morillo et. al. 2010) და ჰეპატოციტები ( $4n-8n$ ) ღვიძლის პარენქიმაში. გარდა ამისა, სტრესისა და დაზიანების დროს ნაჩვენებია პოლიპლოიდური უჯრედების მატება. საშვილოსნოს გლუვი კუნთები ორსულობის დროს, გულის კუნთი და სისხლძარღვების გლუვი მუსკულატურა ჰიპერტენზიის დროს და თირიდიული უჯრედები ჰიპერთირეოიდიზმისას მიდრეკილნი არიან პლოიდობის მატებისკენ. ქრომოსომების არასტაბილურობით პოლიპლოიდური უჯრედების წარმოქმნა ასევე დამახასიათებელია კანცეროგენეზისათვის (T. Davoliand et. al. 2011).

ძუძუმწოვრებში პათოფიზიოლოგიური პროცესებით წარმოქმნილი პოლიპლოიდური უჯრედების ფორმირების სხვადასხვა მექანიზმები არსებობს. პოლიპლოიდური უჯრედების ჩამოყალიბება შეიძლება მოხდეს პროლიპერაციის გარეშე, პათოლოგიური ვირუსული ინფექციის შედეგად, ან უჯრედ-უჯრედული ურთიერთქმედებით, ასე ვითარდება მაგალითად ოსტეოკლასტები და ჩონჩხის კუნთის უჯრედები. ამ პროცესის დროს ხდება უჯრედების ბირთვების ან/და მემბრანების შერწყმა, შედეგად ფორმირდება მონონუკლეარული ან პოლინუკლეარული უჯრედი. (P. Gao et. al. 2011)

სხვა მექანიზმები დაკავშირებულია უჯრედების პროლიფერაციულ მდგომარეობასთან:

1. ენდორედუპლიკაცია - ამ პროცესის დროს უჯრედები S ან G ფაზაში აჩერებენ ციკლს და შედეგად ფორმირდება აუტოპლოიდური უჯრედები.

2. ენდომიტოზი - უჯრედები აღწევენ მეტაფაზამდე ან ანაფაზამდე, მაგრამ კარიოკინეზი და ციტოკინეზი არ ხდება. ასეთი, ყველაზე უკეთ შესწავლილი მაგალითია პოლიპლოიდური მეგაკარიოციტები (K. Ravid et. al. 2002). ეს უჯრედები ერთვებიან მიტოზში, მაგრამ მათი შვილეული ნუკლეოტიდები არ შორდებიან ერთმანეთს და მიიღება სფერული პოლიპლოიდური ბირთვი. მეგაკარიოციტების პოლიპლოიდიზაციის

მარეგულირებელი მექანიზმები გამოკვლეულია მეცნიერთა მრავალი ჯგუფის მიერ, ისინი ყურადღებას ამახვილებენ მიტოზისა და ციტოკინეზის რეგულირებაზე. ენდომიტოზის კონტროლი ხორციელდება Cdk1/Cyclin B-ს კომპლექსური რეგულაციით. სხვადასხვა მეგაკარიობლასტური უჯრედების ხაზების კვლევამ აჩვენა რომ ენდომიტოზს აინდუცირებს Cyclin B/Cdk1 მიტოზის კინაზის ინაქტივაცია და პირიქით, პირველად პოლიპლოიდურ მეგაკარიოციტებში cyclin B-ს დონე მომატებულია (A. Eliades et. al. 2010). გარდა ამისა, სხვა კვლევებმა აჩვენა რომ G1 ფაზის ხანგრძლივობის კლება დაკავშირებულია cyclin E-ს გაძლიერებულ ექსპრესიასთან. ბოლო კვლევებით დასტურდება რომ cyclin E აძლიერებს პრერეპლიკაციური კომპლექსის (Cdc6 და MCM2) კომპონენტების ექსპრესიას. (H. G. Nguyen and K. Ravid et. al. 2010)

3. დაუსრულებელი ციტოკინეზი - ეს პროცესი კარგად ჩანს პათოლოგიური დაყოფის დროს რომლის შედეგად წარმოიქმნებიან ორბირთვიანი ტეტრაპლოიდური უჯრედები. ასეთი უჯრედები ვითარდებიან ციტოკინეზის მაკონტროლებელი პროტეინების დისფუნქციით. თუმცა ბოლოდროინდელმა კვლევებმა დაადასტურა რომ ციტოკინეზის შეწყვეტა ნორმალური განვითარების დრისაც ხდება (მაგალითად ღვიძლისა და გულის კუნთის ქსოვილებში). (U. S. Eggert, T. J. Mitchison et. al. 2006)

## 1.2 პოლიპლოიდია ჰეპატოციტებში

პრენატალური ზრდის პერიოდში, გრადუალური პოლიპლოიდიზაციით ღვიძლის პარენქიმა განიცდის დრამატულ ცვლილებებს. ეს პროცესი გენერირებს ტრიპლოიდური და ოქტაპლოიდური უჯრედების კლასების ფორმირებას რომელთაც აქვთ ერთი ან ორი ბირთვი. ღვიძლის უჯრედების პოლიპლოიდურობა უპირატესად განიხილება როგორც ტერმინალური დიფერენცირების, დაბერების, პლურიპოტენტურობის დაკარგვისა და გაყოფის უნარის მკვეთრი დაქვეითების ინდიკატორი. ზრდასრულებში ჰეპატოციტების პოლიპლოიდიზაციას განსხვავებული ფაქტორები არეგულირებენ, მათ შორისაა ღვიძლის დაზიანება და ღვიძლის მასის დაკარგვა. საყურადღებოა, რომ ნაწილობრივი ჰეპატექტომიის დროს უჯრედების პროლიფერაციის მკვეთრმა მატებამ თან ახლავს ჰეპატოციტების პლოიდობის ზრდაც.

ჰეპატოციტების პოლიპლოიდია ძუძუმწოვართა ღვიძლისათვის დამახასიათებელი პროცესია. პოლიპლოიდური უჯრედები გვხვდება განვითარების როგორც პრენატალურ ისე პოსტნატალურ ეტაპებზე (S. H. Sigal. et. al. 1999) მღრღნელებში, ემბრიონის განვითარების

მეთოთხმეტე დღეს ჰეპატობლასტების უმეტესობა არიან ბიპოტენტურები, მათ აქვთ უნარი დიფერენცირდნენ ჰეპატოციტებად ან ნაღვლის სადინარის უჯრედებად. მეთხუთმეტე დღისათვის ჰეპატობლასტების უმეტესობა კომიტირებულია ჰეპატოციტების წარმოქმნისკენ. ორსულობის დანარჩენ პერიოდში და პოსტნატალური ზრდის პირველი ოთხი კვირის განმავლობაში ჰეპატობლასტები იძენენ დიფერენცირებული ჰეპატოციტების ფუნქციებს და ეს პერიოდი კორელაციაშია პროლიფერაციული აქტივობის მკვეთრ ვარდნასთან (S. Celton-Morizur et. al. 2009). კვლევებმა ცხადყო, რომ დაბადებიდან პირველი სამი კვირის განმავლობაში ღვიძლი ძირითადად წარმოდგენილია დიპლოიდური უჯრედებით ხოლო მეოთხე კვირიდან მათი პროპორციული რაოდენობა მცირდება და ჩნდებიან ორბირთვიანი ტეტრაპლოიდური და მონონუკლეარული ტეტრაპლოიდური ჰეპატოციტები (G. Margall-Ducos et. al. 2007). მომწიფების ასაკში ღვიძლის პლოიდური უჯრედების რაოდენობრივი თანაფარდობა აღარ იცვლება, ოქტაპლოიდური (ორბირთვიანი  $2 \times 4n$  და ერთბირთვიანი  $8n$ ) ჰეპატოციტები მნიშვნელოვნად მრავლდებიან დაბადებიდან 2-დან 3 თვემდე პერიოდში (J. E. Guidotti et. al. 2003).

საინტერესოა, რომ სხვადასხვა სახეობებში პოლიპლოიდიზაციის მეორე ტალღა ფიქსირდება დაბერების პერიოდში. მაგალითად, ადამიანში პოლიპლოიდური ჰეპატოციტები ჩნდებიან პოსტნატალურ პერიოდში ღვიძლის განვითარების (ჰეპატოგენეზის) დროს, მათი აკუმულაციის ხარისხი სტაბილურია მომწიფების პერიოდში, ხოლო დაბერებისას შეინიშნება მაღალპლოიდური ღვიძლის უჯრედების მკვეთრი მატება. ზრდასრულ ადამიანებში ჰეპატოციტების 40% ტეტრაპლოიდურია, ხოლო ზრდასრულ მღრნელებში კი - 70% (H. Toyoda. et. al. 2005). სხვადასხვა სახეობებში აღმოჩენილია უარყოფითი კორელაცია ღვიძლში მიტოზურ ინდექსსა და პოლიპლოიდურ ჰეპატოციტებს შორის. მაგალითად, თაგვის ღვიძლში ვხვდებით გაცილებით ნაკლებ მიტოზურ ინდექსს ვიდრე ვირთაგვებში, ხოლო პოლიპლოიდიზაცია კი მნიშვნელოვნად მაღალია თაგვებში.

2/3 ჰეპატექტომიის შემდეგ მიტოგენური სინგალები (ციტოკინები და ზრდის ფაქტორები) ახორციელებენ ჰეპატოციტების მოდულაციას, რომლებიც გაივლიან დაყოფის ერთ ან ორ ციკლს რათა აღადგინონ ღვიძლის მასა და ამ პროცესს თან ახლავს პოლიპლოიდური ჰეპატოციტების რაოდენობის მკვეთრი ზრდა. სხვადასხვა კვლევებმა აჩვენა რომ ღვიძლის რეგენერაცია ძირითადად დამოკიდებულია ჰეპატოციტების პროლიფერაციაზე (K. Si-Tayeb et. al. 2010), თუმცა ნაჩვენებია უჯრედების ჰიპერტროფიაც (S. Haga et. al. 2005). ბოლოდროინდელმა კვლევებმა აჩვენა რომ ღვიძლის რეგენერაციისას ჰიპერტროფია წინ უძღვის პროლიფერაციას (Y. Miyaoka et. al. 2012). გარდა ამისა, ამ კვლევამ

აჩვენა რომ მანამდე არსებული დიპლოიდური და ტეტრაპლოიდური მონონუკლეარული ჰეპატოციტები არასტანდარტული უჯრედული ციკლით, სავარაუდოდ ენდორედუპლიკაციით დასაბამს აძლევენ ტეტრაპლოიდური და ოქტაპლოიდური ბირთვის მქონე უჯრედებს. ასევე ნანახია, რომ ორბირთვიანი ჰეპატოციტები იყოფიან მარტივი დაყოფით და წარმოქმნიან ორ მონონუკლეარულ მაღალპლოიდურ შვილელ ჰეპატოციტებს. ღვიძლის რეგენერაციის დროს, ყველა ეს პროცესი ჰეპატოციტების პოლიპლოიდიზაციისა და ზომაში მატების საფუძველია. საყურადღებოა, რომ ღვიძლის რეგენერაციის მეორე დღეს ქსოვილში ნაჩვენებია ჰეპატოციტები ქრომოსომათა კრებულით 16n. ხოლო რეგენერაციის პროცესის დასრულების შემდეგ 16n ქრომოსომების შემცველი ჰეპატოციტები აღარაა წარმოდგენილი ღვიძლის პარენქიმაში. ავტორების აზრით მაღალპლოიდური ჰეპატოციტების შემცირება დაკავშირებულია აპოპტოზთან.

ზრდასრულ მღრნელებში ღვიძლის ქსოვილის პლოიდობის შეცვლა დაკავშირებულია ქიმიური აგენტებით ინდუცირებულ დნმ-ის სინთეზთან. მაგალითად, ორბირთვიანი ჰეპატოციტების წარმოქმნას ინდუცირებენ ნიტრატები, ასევე ღვიძლის მიტოგენები როგორებიცაა: ნატრიუმის ფენობარბიტონი (N. C. Martin et. al. 2001), 1,4-დიქლორობენზოლი და პეროქსისომული პროლიფერატორები განაპირობებენ ოქტაპლოიდური ერთბირთვიანი ჰეპატოციტების განვითარებას.

ღვიძლის ქსოვილის პოლიპლოიდიზაცია შეიძლება ინდუცირებული იყოს ამ ორგანოს დაზიანებით გამოწვეული პათოლოგიური პროცესებით. მაგალითად ვირთაგვების ღვიძლში, ადამიანის ვილსონის დაავადების ცხოველურ მოდელზე, წარმოდგენილია ჰიპერტროფული ჰეპატოციტები დიდი მოცულობის ბირთვებით და ამავე დროს შეჩერებულია მიტოზური აქტივობა (K. Takeda et. al. 2005).

### 1.3 ქოლესტაზი და ღვიძლის რეგენერაცია

ქოლესტაზი ბერძნული სიტყვაა (choleos-ნალველი stasis-დგომა, დაგუბება) და ნალვლის შეგუბებას ნიშნავს. არჩევენ მის ორ - ღვიძლშიდა და ღვიძლის გარეთა ფორმას. ღვიძლშიდა ქოლესტაზი განპირობებულია ღვიძლის უჯრედებში ნალვლის გამომუშავების დარღვევით. გარდა ამისა, შეიძლება ნალვლის სადინარში ნალვლის გადინების შეფერხება მოხდეს (ღვიძლის გარეთა ფორმა). უკანასკნელი მექანიკური წინააღმდეგობის წარმოქმნის შემთხვევებში (ნალველ-კენჭოვანი დაავადებები, პანკრეასის თავის სიმსივნე, სანაღვლე

გზების კიბო, ქრონიკული ან მწვავე სკლეროზირებადი პანკრეატიტი, თორმეტგოჯა ნაწლავის პოლიპოზი, პერიქოლედოქური ლიმფადენიტი და სხვა) ვითარდება.

ქოლესტაზის დროს ღვიძლის პათანატომიური სურათი უმეტესად ღვიძლის წილაკის ცენტრში არსებული ჰეპატოციტების ციტოპლაზმაში ნაღვლის პიგმენტის გრანულების დაგროვებაში გამოიხატება. ასევე ჰეპატოციტების დისტროფიული და ნეკროზული ცვლილებების განვითარება, ანთება და სანაღვლე გზების დესტრუქცია აღინიშნება. (Большаямед. энцикл. et. al. 1986).

ნორმაში ნაღვლის ფორმირება, როგორც ენტეროჰეპატური გზის (ჰეპატოციტები, ქოლანგიოციტები, ენტეროციტები) მემბრანული სატრანსპორტო სისტემების ნორმალურად ფუნქციონირებაზე, ასევე ბირთვული რეცეპტორებით ტრანსკრიპციისა და პოსტტრანსკრიპციული რეგულაციის კოორდინირებულ მოქმედებაზეა დამოკიდებული (Geier et. al. 2007; Kullak-Ublick et. al. 2004).

ჰეპატოციტებს შორის მჭიდრო კავშირების გაწყვეტა უჯრედების განვლადობის გაზრდას, ნაღვლის შემადგენელი ნივთიერებების პლაზმაში გადასვლასა და ნაღვლის კაპილარში ოსმოსური გრადიენტის მოშლას იწვევს, რაც ნორმაში ნაღვლის სეკრეციისათვის მამოძრავებელ ძალას წარმოადგენს (Jansen P.L., et. al. 2001).

ქოლესტაზისას, ჰეპატოციტების ციტოჩონჩხში გაზრდილია შუალედური მიკროფილამენტების რაოდენობა და დეზორგანიზებულია აქტინისა და კაპილარის გარშემო ცილოვანი დომენების განლაგება (Jansen P.L., et. al. 2001). ნაპრალისებრი კონტაქტის ცილები (koneqson32 და 26) ნაღვლის საერთო სადინარის გადაკეტიდან 24 სთ-ში ქრება, რაც ჰეპატოციტებს შორის  $Ca^{+2}$ -ის მიგრაციის დარღვევას იწვევს (Jansen P.L., et. al. 2001).

ცნობილია, რომ ქოლესტაზი ღვიძლის რეგენერაციას ორივე მოდელის - როგორც კარის ვენის ემბოლიის, ასევე ნაწილობრივი ჰეპატექტომიის დროს თრგუნავს. კარის ვენის ერთ-ერთი ტოტის ემბოლიის დროს, ბილირუბინის მაღალი კონცენტრაცია, არაემბოლიზებული წილების ზომაში ზრდას აფერხებს (Imamura, et. al. 1999). ნაწილობრივი ჰეპატექტომიის შემდეგ ქოლესტაზურ ცხოველებში ღვიძლის მასის მატება, საკონტროლო (მხოლოდ ჰეპატექტომირებულ) ცხოველებთან შედარებით ნელა ხდება (Tracy et. al. 1991).

ღვიძლის ნაწილობრივი რეზექციის შემდეგ ქოლესტაზურ ცხოველებში (მხოლოდ ჰეპატექტომირებულ ცხოველებთან შედარებით) იკლებს მიტოზური ინდექსი. ქოლესტაზის დროს რეგენერაციის შეფერხება, შეიძლება შემდეგი პროცესების - ღვიძლის ჰემოდინამიკის, რეგენერაციასთან დაკავშირებული მედიატორების წარმოქმნის, აპოპტოზის



სიხშირისა და ენტეროჰეპატური ცირკულაციის ცვლილებით იყოს განპირობებული (Yokoyama et. al. 2007).

ქოლესტაზი, ღვიძლის რეგენერაციაში მონაწილე ფაქტორების წარმოქმნაზეც ახდენს ზეგავლენას. c-myc-ის ექსპრესია, რომელიც ნაწილობრივი ჰეპატექტომიის დროს წინ უძღვის მიტოზების აღმოცენებას, ქოლესტაზის დროს ინჰიბირებულია (Tracy et. al. 1991). ქოლესტაზურ ღვიძლში ასევე დაბალია  $\kappa$ /EBP- $\alpha$  და  $\beta$ -ს ექსპრესიაც, რაც ნაწილობრივი ჰეპატექტომიის შემდეგ E ციკლინის ექსპრესიის დაბალ დონესთანაა დაკავშირებული (Nakano et. al. 2001).

ქოლესტაზურ ღვიძლში EGF-სა და IL-6-ის რაოდენობაც იკლებს. კერძოდ, ნაღვლის საერთო სადინარის გადაკეტვის შემდეგ, საგრძნობლად მცირდება EGF-ის მატრიცულირნმ-ის ექსპრესია (Bissig et. al. 2000). მისი რაოდენობის მატებას ადგილი არ აქვს ნაწილობრივი ჰეპატექტომიის შემდეგ ქოლესტაზურ ცხოველებში. ობსტრუქციული სიყვითლის ფონზე, ღვიძლის ნაწილობრივი რეზექციის შემდეგ IL-6-ის კონცენტრაცია, ინტაქტურ ცხოველებთან შედარებით არ იზრდება. ცნობილია, რომ EGF და IL-6 ღვიძლის რეგენერაციაში მონაწილე მნიშვნელოვანი ფაქტორებია (Bohm et. al. 2010).

ქოლესტაზის დროს, ღვიძლშიდა NK უჯრედებზე fas-ლიგანდისა და TLR2-ის (Toll-likereceptor 2) ექსპრესია ძლიერდება, რაც ჰეპატოციტებში აპოპტოზის სასიგნალო მექანიზმის ჩართვასთან ასოცირდება (Ogawa et. al. 2005). ღვიძლის ნორმალური რეგენერაციისას NF- $\kappa$ B-ს, bcl2-ის, TNF- $\alpha$ -სა და IL-6-ის ანტი-აპოპტოზური ეფექტის გამო აპოპტოზის ხარისხი მინიმუმამდეა დასული (Iimuro et. al. 1998; Tzung et. al. 1997; Takehara et. al. 1998; Sakamoto et. al. 1999). იმ ცხოველებში, რომელთაც ნაღვლის საერთო სადინარის გადაკეტვის შემდეგ ნაწილობრივი ჰეპატექტომია ჩაუტარდათ, დნმ-ს ოლიგონუკლეოსომური ფრაგმენტების რაოდენობამ და კასპაზა 3-ის აქტივობამ საგრძნობლად იმატა. ქოლესტაზიდან 5 დღის შემდეგ ნაწილობრივი ჰეპატექტომიისას ადრეული პასუხის გენების ექსპრესიის პროდუქტები ვლინდება მაგრამ ძლიერდება აპოპტოზის პროცესი, და არა ჰეპატოციტების პროლიფერაცია (Kanno H. et. al. 2001).

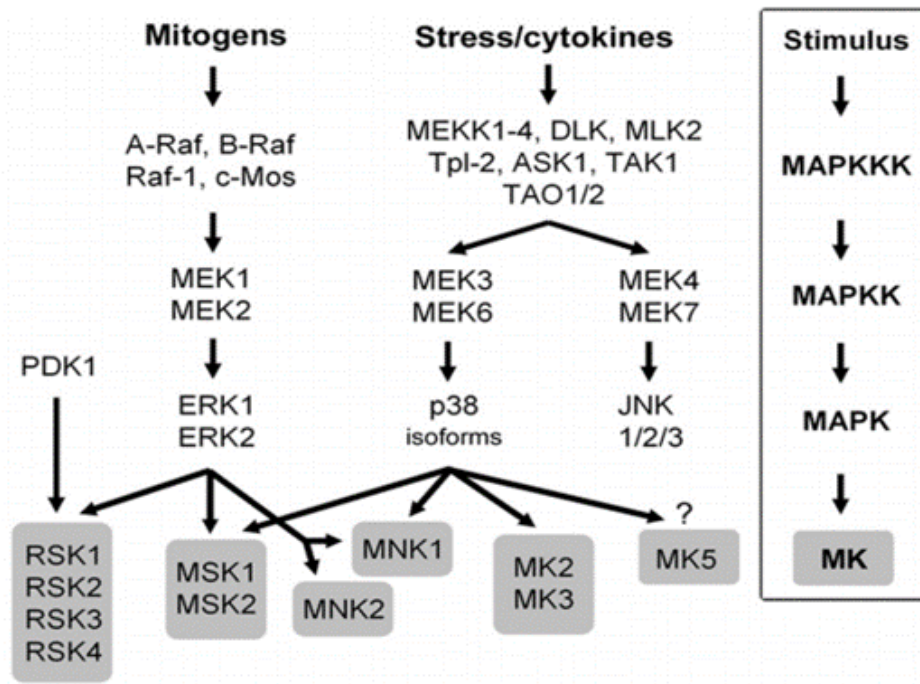
ნაღვლის სადინარის ობსტრუქციის შემდეგ, ენტეროჰეპატური ცირკულაციის მოშლა, ღვიძლის რეგენერაციაზე მნიშვნელოვან ზეგავლენას ახდენს. ნაჩვენებია, რომ ობსტრუქციული სიყვითლის ფონზე, ნაწილობრივი ჰეპატექტომიისას ნაღვლის სადინარის გარეთ დრენირება მნიშვნელოვნად თრგუნავს რეგენერაციის პროცესს – მცირდება დნმ-პოლიმერაზა  $\alpha$ -ს აქტიურობა, მიტოზური ინდექსი და  $H^3$ თიმიდინის ჩართვის ინტენსიურობა (Iyomasa et. al. 1992). საკონტროლო (ნაწილობრივი ჰეპატექტომია)

მაჩვენებელთან შედარებით, ღვიძლის ნაწილობრივი რეზექციის შემდეგ, რეგენერაციის უნარი უცვლელი რჩებოდა ნაღვლის შიდა დრენირების შემდეგ (Suzuki et. al. 1994). გარდა ამისა, ნაღვლის გარე დრენირებისას, შიდა დრენირებასთან შედარებით, ნაღვლის შემადგენელი ლიპიდების ექსკრეციაცაა დარღვეული (Mizuta et. al. 2002). ღვიძლის რეგენერაცია მნიშვნელოვნადაა დაკავშირებული ნაღვლის დინებისა და ნაღვლის შემადგენელი ლიპიდების ექსკრეციის სიჩქარეზე. მიღებული შედეგები აჩვენებს, რომ ენტეროჰეპატური ცირკულაციის დარღვევა, ღვიძლის რეგენერაციის შემაფერხებელი მნიშვნელოვანი ფაქტორია (Yokoyama et. al. 2007).

### 1.4 ERK 1/2 და JNK სასიგნალო კასკადები

იანუს კინაზების (JNK) ოჯახის პირველი ცილა პირველად გამოყოფილ იქნა ვირთაგვას ღვიძლიდან ციკლოპქსამიდის მოქმედების შედეგად (Kyriakis, J. M., and J. Avruch. et. al. 1990). JNK1, JNK2 და JNK3 ცილების ათი სხვადასხვა იზოფორმაა ცნობილი. JNK1, და JNK2 წარმოდგენილია ყველა უჯრედსა და ქსოვილში (Bode AM, Dong Z, et. al. 2007), ხოლო JNK3 ძირითადად წარმოდგენილია თავის ტვინის უჯრედებში. JNK ოჯახის ცილები აქტიურდებიან ციტოკინების, ულტრაიისფერი გამოსხივების, ზრდის ფაქტორების ნაკლებობითა და ზოგიერთი G ცილასთან (G12/13) ასოცირებული რეცეპტორების მოქმედების შედეგად (Kyriakis, J. M., and J. Avruch. et. al. 2001).

ისევე როგორც ERK1/2 და p38, JNK-ს აქტივაციისათვის საჭიროა ორმაგი ფოსფორილირება თიროზინისა და თრეონინის მიერ. MAPKK-ები რომლებიც აკატალიზებენ აღნიშნულ რეაქციას ცნობილია როგორც MEK4 და MEK7, ეს უკანასკნელნი კი თავის თავად აქტიურდებიან სხვადასხვა MAPKKK-ებით, როგორებიცაა MEKK1-4, MLK2 და MLK3, Tpl-2, DLK, TAO1 და TAO2, TAK1 და ASK1 და ASK2 (Kyriakis, J. M., and J. Avruch. et. al. 2001). ისევე როგორც ERK1/2 და p38, JNK აღიქმება უჯრედის ბირთვის მიერ (Mizukami, Y., K. Yoshioka, S. Morimoto, and K. Yoshida. et. al. 1997.). JNK-ს ყველაზე კარგად ცნობილ სუბსტრატს წარმოადგენს ტრანსკრიფციის ფაქტორი c-Jun. აღნიშნული ცილის ფოსფორილირება მკვეთრად ზრდის c-Jun დამოკიდებულ ტრანსკრიფციას (Weston, C. R., and R. J. Davis. et. al. 2002). ნაჩვენებია რომ JNK-ს მიერ ხდება ისეთი ტრანსკრიფციის ფაქტორების ფოსფორილირება როგორებიცაა ATF-2, NF-ATc1, HSF-1 და STAT3 (Chen, Z., T. B. Gibson, F. Robinson, L. Silvestro, G. Pearson, B. Xu, A. Wright, C. Vanderbilt, and M. H. Cobb. et. al. 2001, Kyriakis, J. M., and J. Avruch. et. al. 2001). დღეისათვის 13 MAPK კინაზა არის ნანახი, რომელიც ააქტიურებს JNK სასიგნალო გზიას (Keshet Y, Seger R. et. al. 2010).



სურათი 3. ERK1/2 და JNK სასიგნალო კასკადები

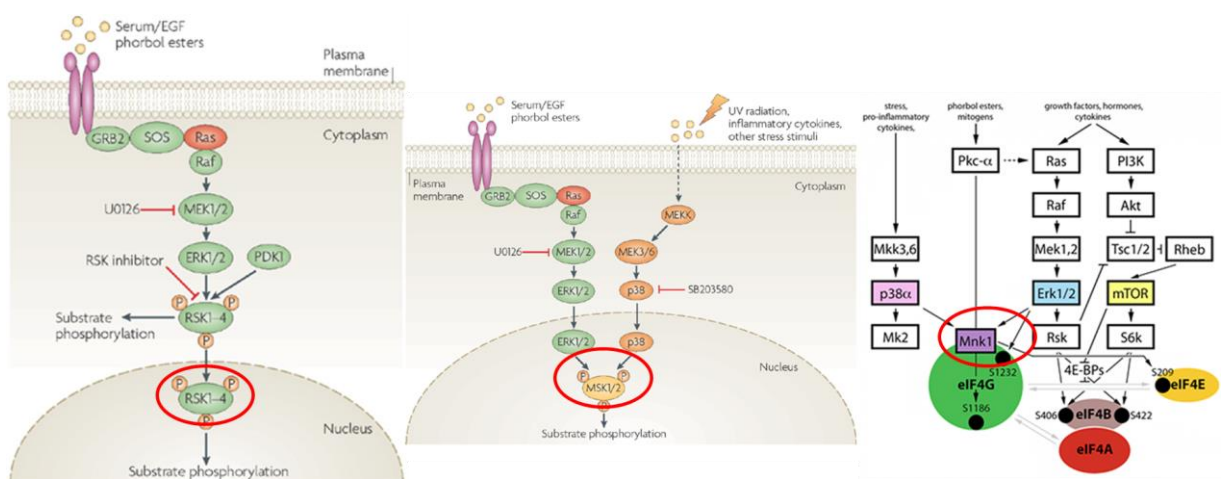
c-Jun N-ტერმინალური კინაზას გზა არის MAPK სასიგნალო გზის ერთ-ერთი მთავარი სასიგნალო კასკადი, რომელიც ურთიერთქმედებს საბოლოო ეფექტორთან. ის აკონტროლებს სხვადასხვა უჯრედულ პროცესებს, როგორებიცაა პროლიფერაცია, p53 ტრანსკრიფციის ფაქტორის ფოსფორილირება, ემბრიონული განვითარება და აპოპტოზი. აღსანიშნავია, რომ JNK მონაწილეობს ოქსიდაციური სტრესით დაზიანებული დნმ-ს რეპარაციაში, მისი ჰიპერექსპრესიის შედეგად ნაჩაზია სიცოცხლის ხანგრძლივობის მკვეთრი მატება დროზოფილაში (Wang MC, Bohmann D, Jasper H, et. al. 2005), ხოლო *Caenorhabditis elegans*-ში ნაჩაზია, რომ JNK-1 ცილის მუტაცია ამცირებს სიცოცხლის ხანგრძლივობას (Oh SW, Mukhopadhyay A, Srzikapa N, Jiang F, Davis RJ, Tissenbaum HA, et. al. 2005).

ძუძუმწოვართა ERK 1/2 გზა, ასევე ცნობილი, როგორც კლასიკური მიტოზის კინაზას კასკადი, შედგება MAPKKK-ებისაგან: A-Raf, B-Raf და Raf-1; MAPKK-ებისაგან: MEK1 და MEK2; MAPK-ებისაგან: ERK1 და ERK2. ERK1 და ERK2 ამინომჟავების 83%-ით იდენტურია. ისინი უმეტესად აქტიურდებიან ზრდის ფაქტორებით, ექსუდატით და ფორბოლის ეთერებით, ხოლო იშვიათად ჰეტეროტრიმერული G-ცილასთან შეუღლებული რეცეპტორების ლიგანდებით, ციტოკინებით, ოსმოსური სტრესითა და მიკროტუბულების დესტრუქციით. (Lewis, T. S., P. S. Shapiro, and N. G. Ahn. Et. al. 1998). MEKK1/2/3 და c-Mos კინაზები ასევე ცნობილია როგორც MAPKKK-ები ამ სასიგნალო კასკადში, თუმცა

უკანასკნელი კვლევები აჩვენებს რომ MAPKK1/2/3 მხოლოდ მცირედ ახდენს გავლენას ERK1/2 გზის გააქტიურებაზე (Xia, Y., C. Makris, B. Su. et. al. 2000).

ტიპური უჯრედის მემბრანული რეცეპტორები, როგორებიცაა თიროზინკინაზა (RTK) და G-ცილასთან შეუღლებული რეცეპტორები გადასცემენ სიგნალს Raf/MEK/ERK სასიგნალო კასკადს GTP -დამაკავშირებელი პროტეინის Ras-ის მეშვეობით. მემბრანასთან ასოცირებული Ras ცილის გააქტიურება ხორციელდება SOS ფაქტორის მოქმედებით, რომელიც ასტიმულირებს Ras-ს რომ გარდაქმნას გდფ გტფ-დ, რაც აძლევს მას შესაძლებლობას რომ იმოქმედოს მის შემდგომ სასიგნალო მოლეკულაზე Raf-ზე (Geyer, M., and A. Wittinghofer. et. al. 1997). Ras და Raf ცილების რეგულაცია მნიშვნელოვანია უჯრედისათვის სასიცოცხლოდ მნიშვნელოვანი ფუნქციების გამართულად მუშაობისათვის, რადგან მათი მასინთეზირებელი გენების მუტაცია იწვევს ონკოგენებს (Chong, H., H. G. Vikis, and K. L. Guan. et. al. 2003).

ERK 1/2 სასიგნალო გზა ითვლება უჯრედის პროლიფერაციის მთავარ მარეგულირებელ კასკადად, ამიტომ ERK გზის ინჰიბიტორები გამოიყენება როგორც ანტისიმსივნური აგენტები (Kohn, M., and J. Pouyssegur. et. al. 2003). გააქტიურებული ERK1 და ERK2 უზრუნველყოფენ მრავალი სუბსტრატის ფოსფორილირებას, მათ შორის მემბრანული, ბირთვული და უჯრედის ჩონჩხის ცილების ფოსფორილირებას. RSK-ები, MSK-ები და MNK-ები წარმოადგენს სამ მთავარ ცილების ჯგუფს, რომლებიც არიან ERK1/2-ის სუბსტრატები. ნაჩვენებია, რომ MSK-ები და MNK-ები შეიძლება გააქტიურდნენ როგორც ERK1/2-ის ასევე p38-ის მოქმედების შედეგად, ხოლო RSK ოჯახის ცილები კი წარმოადგენენ მხოლოდ ERK-ს სუბსტრატს (Frodin, M., and S. Gammeltoft. et. al. 1999).



სურათი 4. ERK1/2 სასიგნალო კასკადის ეფექტორი ცილები

## თავი 2. მასალა და მეთოდები

### 2.1. კვლევის ობიექტები და მოდელები

საკვლევ ობიექტად გამოვიყენეთ ზრდასრული თეთრი არახაზოვანი ვირთაგვები (130–150გ.). ქოლესტაზური ღვიძლის მოდელის მისაღებად ვირთაგვებში ვახდენდით ნაღვლის საერთო სადინარის (ნსს) გადაკეტვას. ქოლესტაზურ ღვიძლში (ექსპერიმენტული მოდელი) პოლიპლოიდიზაციის სასიგნალო გზ(ებ)ის გამოვლენის მიზნით განისაზღვრა სამი ამოცანა. პირველი ამოცანის ფარგლებში მოვახდინეთ HGF-ით, აქტივირებული სასიგნალო გზის ბლოკირება. მეორე ამოცანის ფარგლებში მოვახდინეთ MEK 1/2 ცილის ინჰიბირება, მესამე ამოცანა მიზნად ისახავდა და JNK ცილის ინჰიბირებას.

პირველი ამოცანის შესასრულებლად ცხოველები დაყოფილნი იყვნენ სამ ჯგუფად: 1. საკონტროლო ჯგუფი - ინტაქტური ვირთაგვები; 2. I საცდელი ჯგუფი - ქოლესტაზის მქონე ცხოველები; 3. II საცდელი ჯგუფი - ცხოველები, რომელთაც ნსს ლიგირებიდან 4 დღის განმავლობაში ვუკეთებდით HGF-ის ინჰიბიტორის (PHA 665752) ინექციებს (1მგ/კგ-ზე).

საკვლევ მასალას (ღვიძლის ქსოვილი), ვიღებდით ნაღვლის საერთო სადინარის გადაკეტვიდან მე-4 დღეს.

მეორე ამოცანის შესასრულებლად ცხოველები დაყოფილნი იყვნენ სამ ჯგუფად: 1. საკონტროლო ჯგუფი - ინტაქტური ვირთაგვები; 2. I საცდელი ჯგუფი - ქოლესტაზის მქონე ცხოველები; 3. II საცდელი ჯგუფი - ცხოველები, რომელთაც ნსს ლიგირებიდან 20 სთ-ის შემდეგ გავუკეთეთ MEK-ის ინჰიბიტორის ინექცია (PD98059) (1მგ/კგ-ზე).

საკვლევ მასალა (ღვიძლის ქსოვილი), ავიღეთ ნაღვლის საერთო სადინარის გადაკეტვიდან მე-2 დღეს.

მესამე ამოცანის შესასრულებლად ცხოველები დაყოფილნი იყვნენ სამ ჯგუფად: 1. საკონტროლო ჯგუფი - ინტაქტური ვირთაგვები; 2. I საცდელი ჯგუფი - ქოლესტაზის მქონე ცხოველები; 3. II საცდელი ჯგუფი - ცხოველები, რომელთაც ნსს ლიგირებიდან 2 დღის განმავლობაში გაუკეთდათ JNK ინჰიბიტორის ინექციები (SP 600125) (1მგ/კგ-ზე).

საკვლევ მასალა (ღვიძლის ქსოვილი), ავიღეთ ნაღვლის საერთო სადინარის გადაკეტვიდან მე-2 დღეს.

მონაცემები სტატისტიკურად დამუშევებული იყო სტუდენტის  $t$  კრიტერიუმით. მონაცემებს სარწმუნოდ ვთვლიდით  $p < 0.5$  შემთხვევაში.

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

სინათლის მიკროსკოპში ქსოვილების (ღვიძლი) 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 ნარევი. 5-7 მკმ-ის სისქის ანათლებს ვღებავდით ჰემატოქსილინ-ეოზინით. პრეპარატებს ვსწავლობდით სინათლის მიკროსკოპში "ЛОМО".

## **2.3. კოლხიციური მიტოზური ინდექსის განსაზღვრა**

ღვიძლის ქსოვილის პროლიფერაციული აქტიურობის შესაფასებლად ვიყენებდით კოლხიციური მიტოზური ინდექსის მეთოდს. ვირთაგვებში შეგვყავდა 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 (პრომილე %).

## **2.4. ჰეპატოციტების ბირთვებში დნმ-ს რაოდენობის განსაზღვრის მიზნით პრეპარატების მომზადება და მათი შეღებვა**

ვირთაგვას ღვიძლის ქსოვილის ნაჭრებს (5მმ) ვათავსებდით I ბუფერში (pH 8,0 - 5%-იანი საქაროზა 100მლ + 0,07 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  95 მლ + 0,07 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5მლ) 20 წთ-ის განმავლობაში. შემდეგ გადაგვქონდა II ბუფერში (pH 7,3 - 0,07 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  80% + 0,07M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20%) და ვაყოვნებდით 5 წთ. გაჯირჯებული 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 ნარევი (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  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$  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. პლოიდობის განსაზღვრა კომპიუტერული პროგრამის - Image.J-ს საშუალებით**

შიფის რეაქტივით შეღებილი პრეპარატების ფოტოგრაფირება ხდებოდა სინათლის მიკროსკოპში (Olympus CZ 4040) (90X10). 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.

### თავი 3. კვლევის შედეგები და განხილვა

#### 3.1. ქოლესტაზურ ღვიძლში პლოიდობის ცვლილების შესწავლა c-MET რეცეპტორის ინჰიბიტორების შემდეგ

ჰეპატოციტების პოლიპლოიდიზაციის პროცესი, როგორც ევოლუციური ადაპტაციის მექანიზმი (ჩეულებრივ განიხილება როგორც არასრული მიტოზის შედეგი), ასაკის მატებასთან ერთად იზრდება და გამოწვეულია ზოგიერთ ორგანოში მიტოზური აქტივობის დაქვეითებით (Бродский Л. В., Уриваева И.В. 1981; Saeter, G., et al.1988; Gerlyng, P., et al. 1993). ამავე დროს, ნაჩვენებია რომ ნაღვლის საერთო სადინარის (ნსს) ოკლუზია ოპერაციიდან მე-4 დღეს დესტრუქციული ღვიძლის პარენქიმაში უჯრედების მიტოზური აქტიურობის და პლოიდობის ზრდას იწვევს (ბაკურაძე ე. 2006).

რა გზით ხორციელდება ქოლესტაზის პირობებში უჯრედების გამრავლების და პოლიპლოიდიზაციის პროცესების სტიმულაცია ღვიძლის პარენქიმაში? ღვიძლის რეგენერაციაში როგორც ცნობილია, წამყვანი როლი ჰეპატოციტების ზრდის ფაქტორს (HGF) ენიჭება. ჰეპატოციტების ზრდის ფაქტორის შესაბამის თიროზინკინაზურ რეცეპტორთან (c-Met) დაკავშირება, ცნობილი პროტეინკინაზური კასკადის გააქტივებას იწვევს (Ras, Raf, Mek, Map). ფოსფორილებული Map-კინაზა (MAPK) ბირთვში გადაინაცვლებს და უჯრედული ციკლის რეგულაციაში მონაწილე ტრანსკრიპციის ფაქტორების გააქტიურებას და უჯრედების პროლიფერაციის სტიმულაციას იწვევს (Huh C.C. et al. 2004).

დადგენილია, რომ სწორედ HGF-ის კონცენტრაცია იზრდება ძალიან სწრაფად (პიკს მე-2 დღეს აღწევს) ნაღვლის საერთო სადინარის გადაკეტვის შემდეგ (Li Zh. et al. 2007). ყოველივე ზემოთ აღნიშნულიდან გამომდინარე, ჰეპატოციტების პოლიპლოიდიზაციაში HGF-ით აქტივირებადი სასიგნალო გზის მონაწილეობის დასადგენად, გამოვიყენეთ c-Met რეცეპტორის ინჰიბიტორი. ცხოველები დავყავით სამ ჯგუფად: I საკონტროლო ჯგუფი - ინტაქტური ცხოველები; II -პირველი საცდელი ჯგუფი, ცხოველები, რომელთაც გაუკეთდათ ნაღვლის საერთო სადინარის (ნსს) ლიგირება; III - მეორე საცდელი ჯგუფი - ცხოველები, რომელთაც ნსს-ს ლიგირებიდან 4 დღის განმავლობაში უკეთდებოდათ c-Met რეცეპტორის ინჰიბიტორის ინიექციები. დიეთილის ეთერის ნარკოზის პირობებში ოპერაციიდან მე-4 დღეს სამივე ჯგუფის ცხოველებს ჩაუტარდათ დეკაპიტაცია. ჰეპატოციტების იზოლირების მიზნით ღვიძლის ქსოვილი ამოკვეთის შემდეგ მოთავსებული იყო ფოსფატის ბუფერულ ხსნარში.

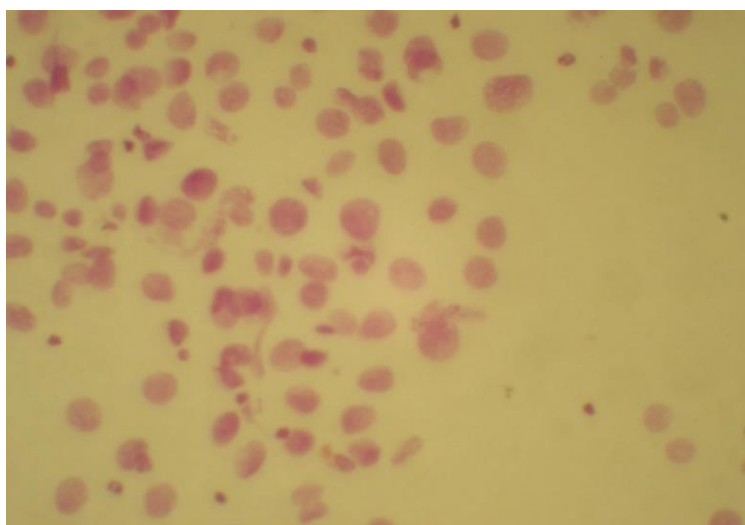


უჯრედებში დნმ-ს რაოდენობის შესაფასებლად გამოვიყენეთ ფიოლგენის რეაქცია (სურ. 5). ჰეპატოციტების პლოიდობის ცვლილებას ვსაზღვრავდით კომპიუტერული პროგრამით - Image J.

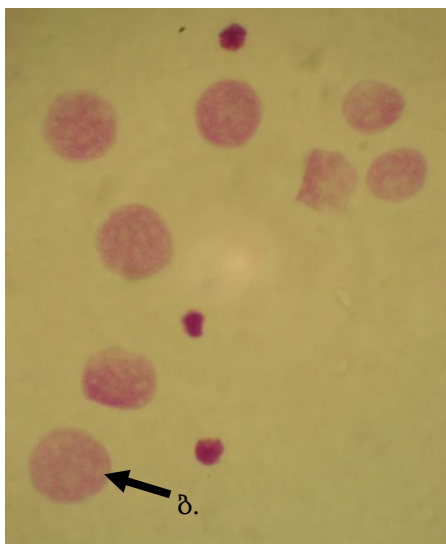
სურათზე 1 წარმოდგენილია ზრდასრული ვირთაგვების ღვიძლიდან იზოლირებული უჯრედების ნაცხების მიკროფოტოები. სურათიდან ჩანს, რომ გამოყოფილი უჯრედები ძირითადად ინარჩუნებენ მთლიანობას, იცვლიან მხოლოდ ფორმას, რაც იზოლაციის პროცესში უჯრედშორისი კონტაქტების დარღვევით არის განპირობებული (სურ.5 ა, ბ, გ).

ნაღვლის საერთო სადინარის (ნსს) ოკლუზია, როგორც უკვე ზემოთ იყო აღნიშნული, ოპერაციიდან მე-4 დღეს დესტრუქციული ღვიძლის პარენქიმაში უჯრედების მიტოზური აქტიურობის და პლოიდობის ზრდას იწვევს (ბაკურაძე ე. 2006).

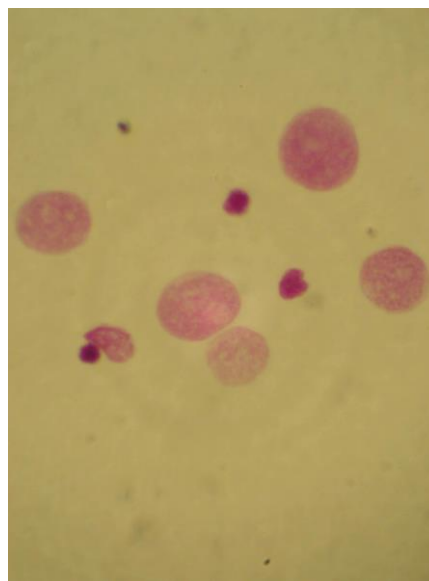
ჩვენს მიერ ჩატარებული კვლევის შედეგების ანალიზმა გვიჩვენა, რომ ინტაქტურ ვირთაგვებთან შედარებით ნაღვლის საერთო სადინარის ლიგირებიდან მე-4 დღეს პირველი საცდელი ჯგუფის ცხოველებში მკვეთრად მცირდება დიპლოიდური უჯრედების რაოდენობა. კერძოდ, მათი მაჩვენებელი ინტაქტური ცხოველების ღვიძლში შეადგენს  $53 \pm 7.7$ , ხოლო ქოლესტაზიდან 4 დღის შედეგ კი დაახლოებით ორჯერ მცირდება ( $22 \pm 3.3$ ). ამავე დროს, ინტაქტურ ცხოველებთან შედარებით პირველი საცდელი ჯგუფის ცხოველების ღვიძლის პარენქიმაში მკვეთრად იზრდება ტეტრა (4c) და ოქტაპლოიდური (8c) უჯრედების რაოდენობა.



ა)



ბ)



გ)

სურათი 5. იზოლირებული ჰეპატოციტები - შეღებვა შიფის რეაქტივით (ფიოლგენის რეაქცია); ღვიძლის პარენქიმული უჯრედის ბირთვი (ბ); გადიდება ა)  $4\times 10$ ; ბ) გ)  $40\times 10$

ბ) პირველი საცდელი ჯგუფი გ) მეორე საცდელი ჯგუფი

საკონტროლო ჯგუფის ცხოველებში, როგორც ცხრილიდან ჩანს,  $4c$  ქრომოსომის შემცველი უჯრედების რაოდენობა შეადგენს  $34\pm 8.6$ , ხოლო I საცდელი ჯგუფის ცხოველებში კი  $64\pm 3$ .  $8c$  ქრომოსომის შემცველი უჯრედების რაოდენობა  $0,5\pm 0,3$  და  $5\pm 1$  შესაბამისად (ცხრილი 1).

## ცხრილი 1

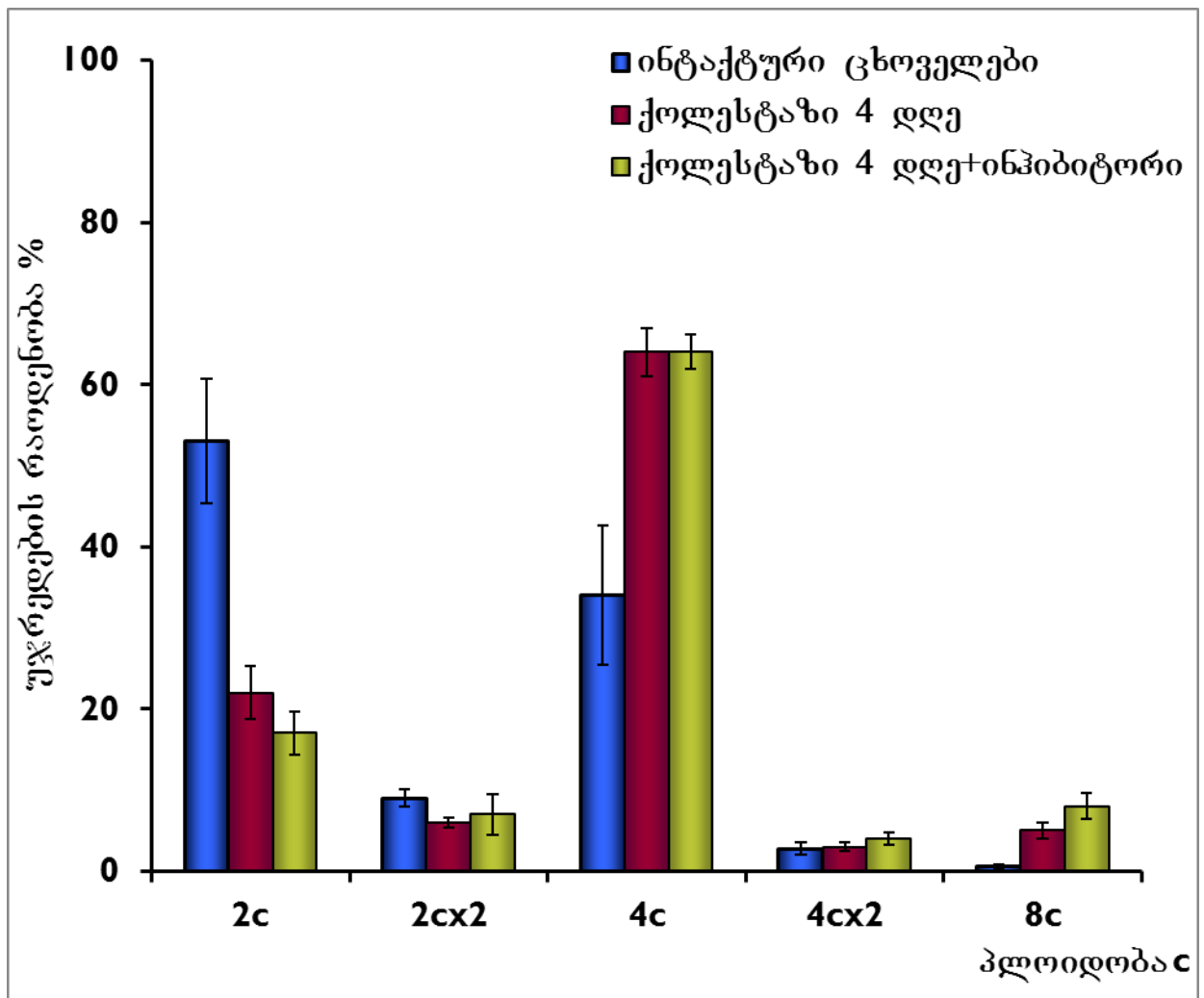
### ღვიძლში უჯრედების პლოიდობის ცვლილება

დნმ-ს რაოდენობა	$2c$	$2c \times 2$	$4c$	$4c \times 2$	$8c$
ინტაქტური ცხოველები	$53\pm 7.7$	$9\pm 1$	$34\pm 8.6$	$2,75\pm 0,8$	$0,5\pm 0,3$
I საცდელი	$22\pm 3.3$	$6\pm 0.6$	$64\pm 3$	$3\pm 0.6$	$5\pm 1$

<b>ჯგუფი</b>					
<b>II საცდელი</b>	<b>17 ±2.6</b>	<b>7±2.5</b>	<b>64±2.1</b>	<b>4±0.7</b>	<b>8±1.6</b>
<b>ჯგუფი</b>					

ასეთივე შედეგები დაფიქსირდა II საცდელი ჯგუფის ცხოველებში, რომელთაც ნაღვლის სადინარის ლიგირების შემდეგ 4 დღის განმავლობაში უკეთებოდათ c-MET რეცეპტორის ინჰიბიტორის ინექციები. ინტაქტურ ცხოველებთან შედარებით სარწმუნოდ შემცირდა დიპლოიდური უჯრედების რაოდენობა, კერძოდ,  $17 \pm 2.6\%$ -მდე, ხოლო ტეტრა და ოქტაპლოიდური უჯრედების რაოდენობაში კი დაფიქსირდა მნიშვნელოვანი მატება  $64 \pm 2.1\%$  და  $8 \pm 1.6\%$ , შესაბამისად (ცხრილი 1).

საყურადღებოა რომ I და II საცდელი ჯგუფის ცხოველების ღვიძლში როგორც დიპლოიდური უჯრედების ასევე მაღალპლოიდური უჯრედების რაოდენობებს შორის სარწმუნო განსხვავება არ გამოვლინდა (სურ. 6). კერძოდ, ნაღვლის საერთო სადინარის ლიგირებიდან მე-4 დღეს, ორივე საცდელი ჯგუფის ცხოველთა ღვიძლში, როგორც მე-2 სურათზე მოყვანილი დიაგრამების ანალიზი გვიჩვენებს, ერთნაირად კლებულობს დიპლოიდური უჯრედების შემცველობა და იზრდება ტეტრა და ოქტაპლოიდური ჰეპატოციტების რაოდენობა.



სურათი 6. ქოლესტაზურ ღვიძლში უჯრედების პლოიდობის ცვლილება C-Met ინჰიბიტორის ზემოქმედების შემდეგ

კვლევის შედეგებიდან გამომდინარეობს, რომ c-MET რეცეპტორის ინჰიბიტორის ინექციებით HGF-ით აქტივირებული სიგნალის გადაცემის კასკადური გზის ბლოკირება არ ახდენს ზეგავლენას ქოლესტაზურ ღვიძლში ჰეპატოციტების პოლიპლოიდიზაციის პროცესის ინიცირებაზე.

### 3.2. ქოლესტაზურ ღვიძლში მიტოზური აქტიურობის ცვლილების შესწავლა c -MET რეცეპტორის ინჰიბირების შემდეგ

რეგენერაციის ეფექტურობა დიდწილად განისაზღვრება იმ პირობებით, რომელშიც ის მიმდინარეობს. ამ თვალსაზრისით, უპირველეს ყოვლისა, არსებითია ორგანიზმის საერთო მდგომარეობა. ჰიპოვიტამინოზი, ინერვაციის დარღვევა და სხვა, ასევე მნიშვნელოვან ზეგავლენას ახდენს რეპარაციული რეგენერაციის მიმდინარეობაზე, აფერხებს მას ან ხელს უწყობს მისი პათოლოგიური ფორმის განვითარებას (Häussinger, Dieter, et. al. 2011).

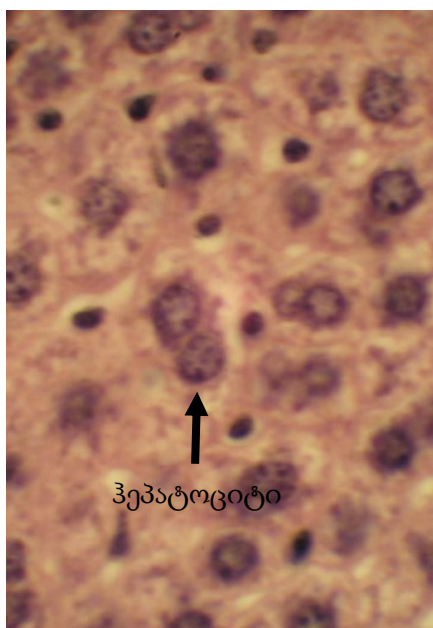
არანაკლებ მნიშვნელოვანია ღვიძლის რეგენერაციაში მონაწილე მარეგულირებელი ფაქტორების არსებობა, რომელთაგანაც აღსანიშნავია: ჰეპატოციტების ზრდის ფაქტორი (HGF), ეპიდერმული ზრდის ფაქტორი (EGF), ფიბრობლასტების ზრდის ფაქტორები (FGFs) და ინსულინის მსგავსი ზრდის ფაქტორები (IGFs) (Bohm et al, 2010). ისინი თავის ეფექტს თიროზინკინაზურ რეცეპტორთან დაკავშირებითა და შესაბამისი სასიგნალო გზის გააქტიურებით ახდენენ (Molecular cell biology, Lodish et al, 2000).

აქედან გამომდინარე, HGF აქტივირებადი გზის ბლოკირების შემდეგ შევისწავლეთ ღვიძლის უჯრედების პროლიფერაციული აქტიურობის ცვლილება. ღვიძლის ჰისტოარქიტექტონიკის ცვლილებების შესაფასებლად, თავდაპირველად ჩავატარეთ ინტაქტური და ქოლესტაზური ღვიძლის ქსოვილების მიკროსკოპული ანალიზი. სურათებზე 3,4,5 წარმოდგენილია ღვიძლის ჰისტოარქიტექტონიკის ამსახველი მიკროფოტოები (საკონტროლო, I საცდელი და II საცდელი ჯგუფის ცხოველები, შესაბამისად).

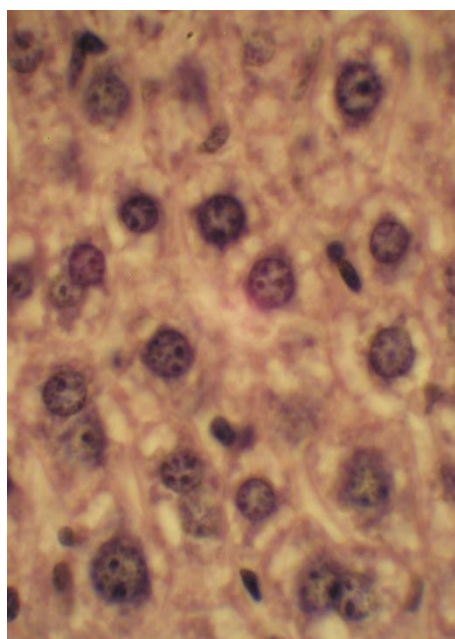
მე-4 სურათზე მოცემულია პირველი საცდელი ჯგუფის ცხოველების ღვიძლის ქსოვილის ფოტოები, სადაც კარგად ჩანს ქოლესტაზისთვის დამახასიათებელი ჰისტომორფოლოგია. კერძოდ, სინოსოიდური კაპილარები შევიწროვებულია, მაგრამ ღვიძლის წილაკს შენარჩუნებული აქვს რადიალური არქიტექტონიკა, ჰეპატოციტების უმეტესობა ინარჩუნებს ტიპურ სტრუქტურას (სურათი 4).



ა)



ბ)



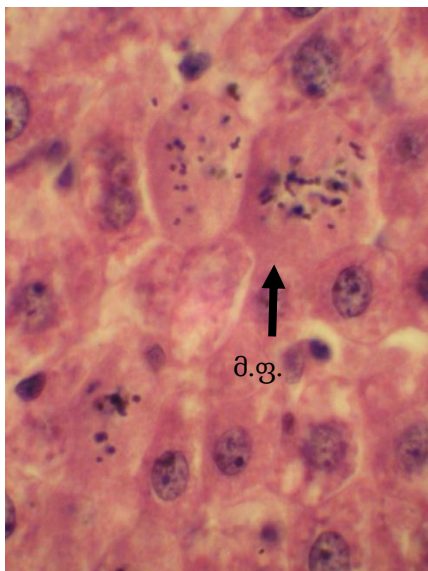
გ)

სურათი 7. ინტაქტური ცხოველების ღვიძლის ჰისტოარქიტექტონიკა; ღვიძლის პარენქიმა (პ.პ.); ღვიძლის ცენტრალური ვენა (ც.ვ.); ა) გადიდება 4x10, ბ) 40x10.

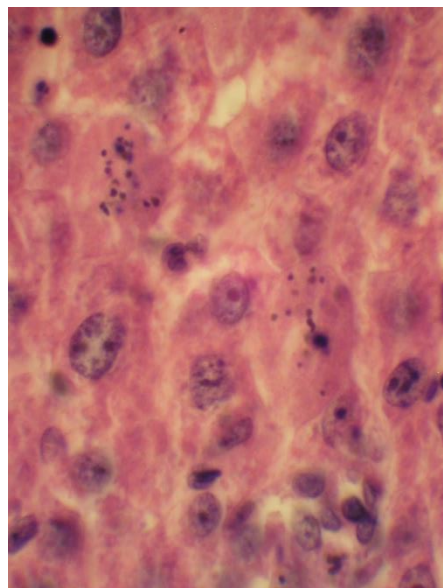




ა)



ბ)

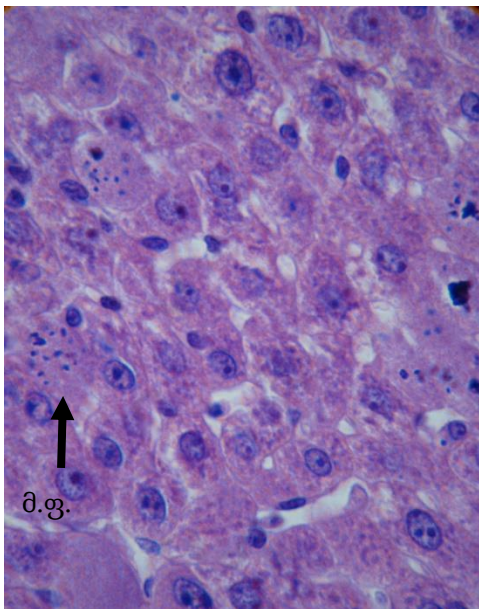


გ)

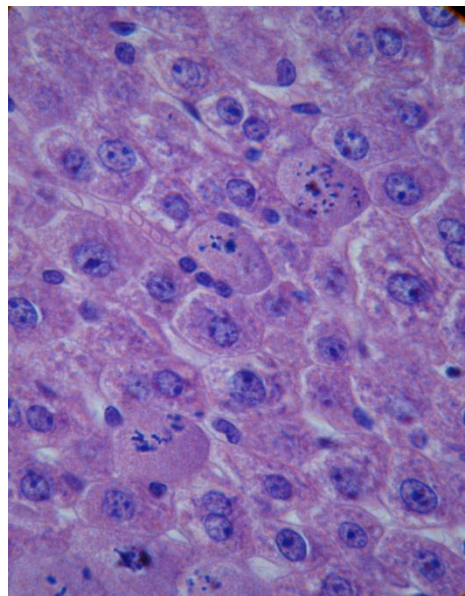
სურათი 8. I საცდელი ჯგუფის ცხოველების ღვიძლის ჰისტოარქიტექტონიკა; და მიტოზური ფიგურები (მ.ფ); ღვიძლის ცენტრალური ვენა (ღ.ც.ვ.); ა) გადიდება 4x10, ბ) და გ) 90x10



ს)



ბ)

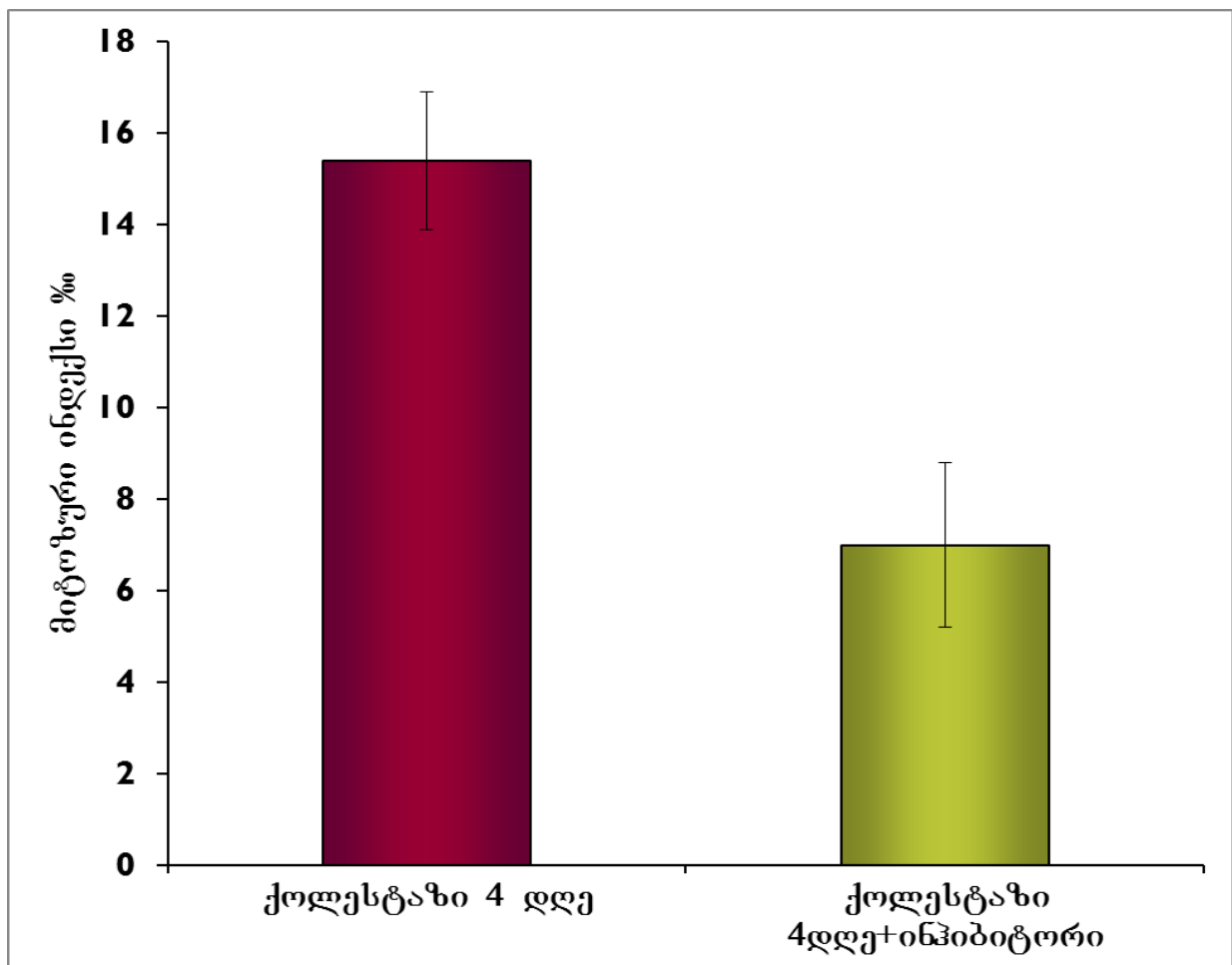


ბ)



**სურათი 9. III ჯგუფის ცხოველების ღვიძლის ჰისტოარქიტექტონიკა; და მიტოზური ფიგურები (მ.ფ); ა) გადიდება 4x10, ბ) და გ) 90x10**

II საცდელი ჯგუფის ცხოველებში, ღვიძლის მიკროსკოპული სურათი უცვლელია პირველ საცდელ ჯგუფთან შედარებით. შენარჩუნებულია ორგანოს რადიალური შენება, სინოსოიდების და ღვიძლის ფირფიტების ურთიერთობა, ჰეპატოციტების ტიპური სტრუქტურა (სურათი 5).



**სურათი 10. ქოლესტაზურ ღვიძლში უჯრედების მიტოზური აქტიურობის ცვლილება c-Met ინჰიბიტორის ზემოქმედების შემდეგ**

სურათებიდან ჩანს ასევე, ორივე საცდელი ჯგუფის ცხოველების ღვიძლის პარენქიმაში მიტოზური ფიგურები. მათი რაოდენობრივი შეფასებისთვის მოვახდინეთ კოლხიცინური მიტოზური ინდექსის განსაზღვრა. მეტაფაზური მიტოზური ფიგურების დათვლის შედეგად

დადგინდა, რომ ჰეპატოციტების ზრდის ფაქტორის რეცეპტორის ინჰიბირება დამთრგუნველ ზეგავლენას ახდენს ჰეპატოციტების პროლიფერაციაზე ქოლესტაზურ ღვიძლში. კერძოდ, II საცდელი ჯგუფის ცხოველების ღვიძლში I საცდელ ჯგუფთან შედარებით მიტოზური ინდექსი დაახლოებით 50%-ით კლებულობს:  $7\% \pm 1$  და  $15\% \pm 1.3$  შესაბამისად (სურ. 10)

როგორც ზემოთ აღვნიშნეთ, ჰეპატოციტებისთვის გამრავლებაში წამყვანი როლი განეკუთვნება ჰეპატოციტების ზრდის ფაქტორს (HGF) (Benvenuti & Comoglio, et. al. 2007). ასე მაგალითად, მისი კონცენტრაცია ნაწილობრივი ჰეპატექტომიიდან 1-3 საათში ძლიერ იზრდება. რეზექციიდან 60 წუთში იზრდება მისი რეცეპტორის – c-Met-ის ექსპრესიაც (Michalopoulos, et. al. 2007). c-Met knockout თაგვებში ღვიძლის ნაწილობრივი რეზექციის შემდეგ, უჯრედულ ციკლში შესვლისა და G<sub>1</sub>-დან S ფაზაში გადასვლის შეფერხება შეინიშნებოდა (Borowiak et. al. 2004).

ჩვენს მიერ მიღებული შედეგებიდან გამომდინარეობს, რომ c-Met რეცეპტორის ინჰიბიტორის ზემოქმედების შემდეგ, დაიბლოკა HGF ლიგანდრეცეპტორული კომპლექსის წარმოქმნის პროცესი. შესაბამისად, შეფერხდა ქოლესტაზურ ღვიძლში უჯრედების გამრავლების პროცესი და დაქვეითდა მათი მიტოზური აქტიურობა. ამავე დროს, როგორც უკვე ზემოთ იყო აღნიშნული, პროლიფერაციის დათრგუნვის ფონზე ღვიძლში სხვადასხვა პლოიდობის ჰეპატოციტების რაოდენობა არ იცვლება ინჰიბიტორის გამოყენების შემდეგ ქოლესტაზიან ცხოველებთან შედარებით, რაც შესაძლოა აიხსნას, იმით, რომ: პოლიპლოიდიზაციის პროცესი ქოლესტაზურ ღვიძლში სხვა სასიგნალო გზებით ნარჩუნდება და/ან HGF-ის კასკადური გზა არ მონაწილეობს ღვიძლის უჯრედების პოლიპლოიდიზაციის ინიცირების პროცესში.

### **3.3. ქოლესტაზურ ღვიძლში პლოიდობის ცვლილების შესწავლა MEK 1/2 ცილის ინჰიბირების შემდეგ**

MEK1/2 ცილა ERK1/2 სასიგნალო კასკადის საკვანძო მოლეკულაა, იგი სიგნალს Raf ცილისაგან იღებს. ERK1/2 სასიგნალო გზა, დღეისათვის მიჩნეულია როგორც ყველაზე მძლავრი უჯრედის ციკლის ჩამრთველი კასკადებიდან, ამიტომაც მნიშვნელოვანი იყო აღნიშნული გზის მონაწილეობის დადგენა MEK1/2 ცილის ინჰიბირებით, რადგანაც C-met რეცეპტორის გათიშვისას შესაძლოა ERK1/2 კასკადის გააქტიურება ალტერნატიული გზით მომხდარიყო.

ყოველივე ზემოთ აღნიშნულიდან გამომდინარე, ჰეპატოციტების პოლიპლოიდიზაციაში ERK1/2 სასიგნალო გზის მონაწილეობის დასადგენად, გამოვიყენეთ MEK1/2 ცილის ინჰიბიტორი. ცხოველები დავყავით სამ ჯგუფად: I საკონტროლო ჯგუფი - ინტაქტური ცხოველები; II - პირველი საცდელი ჯგუფი, ცხოველები, რომელთაც გაუკეთდათ ნაღვლის საერთო სადინარის (ნსს) ლიგირება; III - მეორე საცდელი ჯგუფი - ცხოველები, რომელთაც ნსს-ს ლიგირებიდან 20 საათის შემდეგ გაუკეთდათ MEK1/2 ცილის ინჰიბიტორის ინიექციები. დიეთილის ეთერის ნარკოზის პირობებში ოპერაციიდან 48 საათის შემდეგ სამივე ჯგუფის ცხოველებს ჩაუტარდათ დეკაპიტაცია. ჰეპატოციტების იზოლირების მიზნით ღვიძლის ქსოვილი ამოკვეთის შემდეგ მოთავსებული იყო ფოსფატის ბუფერულ ხსნარში.

უჯრედებში დნმ-ს რაოდენობის შესაფასებლად გამოვიყენეთ ფიოლგენის რეაქცია (სურ. 5). ჰეპატოციტების პლოიდობის ცვლილებას ვსაზღვრავდით კომპიუტერული პროგრამით - Image J.

ჩვენს მიერ ჩატარებული კვლევის შედეგების ანალიზმა გვიჩვენა, რომ ინტაქტურ ვირთაგვებთან შედარებით ნაღვლის საერთო სადინარის ლიგირებიდან მე-2 დღეს პირველი საცდელი ჯგუფის ცხოველებში მკვეთრად მცირდება დიპლოიდური უჯრედების რაოდენობა. კერძოდ, მათი მაჩვენებელი ინტაქტური ცხოველების ღვიძლში შეადგენს  $50 \pm 5.5$ , ხოლო ქოლესტაზიდან 2 დღის შემდეგ კი დაახლოებით ორჯერ მცირდება ( $25 \pm 2.67$ ). ამავე დროს, ინტაქტურ ცხოველებთან შედარებით პირველი საცდელი ჯგუფის ცხოველების ღვიძლის პარენქიმაში მკვეთრად იზრდება ტეტრა (4c) და ოქტაპლოიდური (8c) უჯრედების რაოდენობა.

საკონტროლო ჯგუფის ცხოველებში, როგორც ცხრილიდან ჩანს, 4c ქრომოსომის შემცველი უჯრედების რაოდენობა შეადგენს  $45 \pm 5.3$ , ხოლო I საცდელი ჯგუფის ცხოველებში კი  $63 \pm 5.88$ . 8c ქრომოსომის შემცველი უჯრედები არ გვხვდება საკონტროლო ცხოველებში ხოლო I საცდელი ჯგუფის ცხოველებში მათი რაოდენობა შეადგენს  $1,4 \pm 0.75$  (ცხრილი 2).

## ცხრილი 2

ღვიძლში უჯრედების პლოიდობის ცვლილება MEK1/2 ცილის ინჰიბირებით

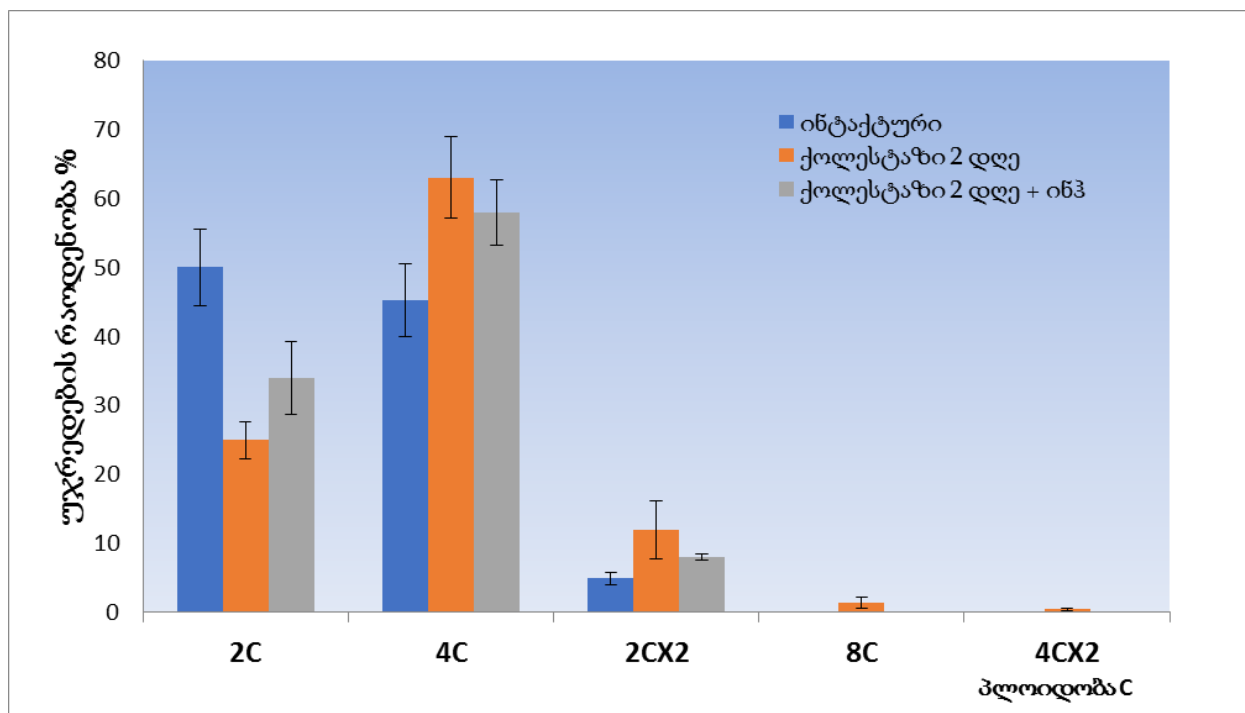
დნმ-ს რაოდენობა	2c	4c	2c x 2	8c	4c x 2
--------------------	----	----	--------	----	--------

ინტაქტური	50±5.5	45,2±5.3	4,9±0.85		
ქოლესტაზი (2 დღე)	25±2.67*	63±5.88*	12±4.22	1,4±0.75	0,5±0.19
ქოლესტაზი (2დღე)+ ინჰიბიტორი	34±5.31	58±4.76	8±0.47		

განსხვავებული შედეგები დაფიქსირდა II საცდელი ჯგუფის ცხოველებში, რომელთაც ნაღვლის სადინარის ლიგირებიდან 20 საათის შემდეგ გაუკეთდათ MEK1/2 ცილის ინჰიბიტორის ინექციები. ინტაქტურ ცხოველებთან შედარებით სარწმუნოდ შემცირდა დიპლოიდური უჯრედების რაოდენობა, კერძოდ, 34±5.31%-მდე, ხოლო ტეტრაპლოიდურისა კი პირიქით - გაიზარდა 58±4.76%-მდე. რაც შეეხება ოქტაპლოიდურ უჯრედებს, ისინი საერთოდ არ მოიპოვება ღვიძლის პარენქიმაში (ცხრილი 2).

საყურადღებოა რომ I და II საცდელი ჯგუფის ცხოველების ღვიძლში როგორც დიპლოიდური უჯრედების ასევე ტეტრაპლოიდური უჯრედების რაოდენობებს შორის სარწმუნო განსხვავება არ გამოვლინდა (სურ. 11). კერძოდ, ნაღვლის საერთო სადინარის ლიგირებიდან მე-2 დღეს, ორივე საცდელი ჯგუფის ცხოველთა ღვიძლში, როგორც მე-7 სურათზე მოყვანილი დიაგრამების ანალიზი გვიჩვენებს, ერთნაირად კლებულობს დიპლოიდური უჯრედების შემცველობა და იზრდება ტეტრაპლოიდური ჰეპატოციტების რაოდენობა, მაგრამ საყურადღებოა, რომ ოქტაპლოიდური უჯრედების რაოდენობა ნოლს უტოლდება II საცდელი ჯგუფის ცხოველების ღვიძლში.

კვლევის შედეგებიდან გამომდინარეობს, რომ MEK1/2 ცილის ინჰიბიტორის ინექციებით MEK1/2 კასკადური გზის ბლოკირება ახდენს ზეგავლენას ქოლესტაზურ ღვიძლში ჰეპატოციტების პოლიპლოიდიზაციის პროცესზე, კერძოდ კი იწვევს ოქტაპლოიდური უჯრედების წარმოქმნის ბლოკირებას.

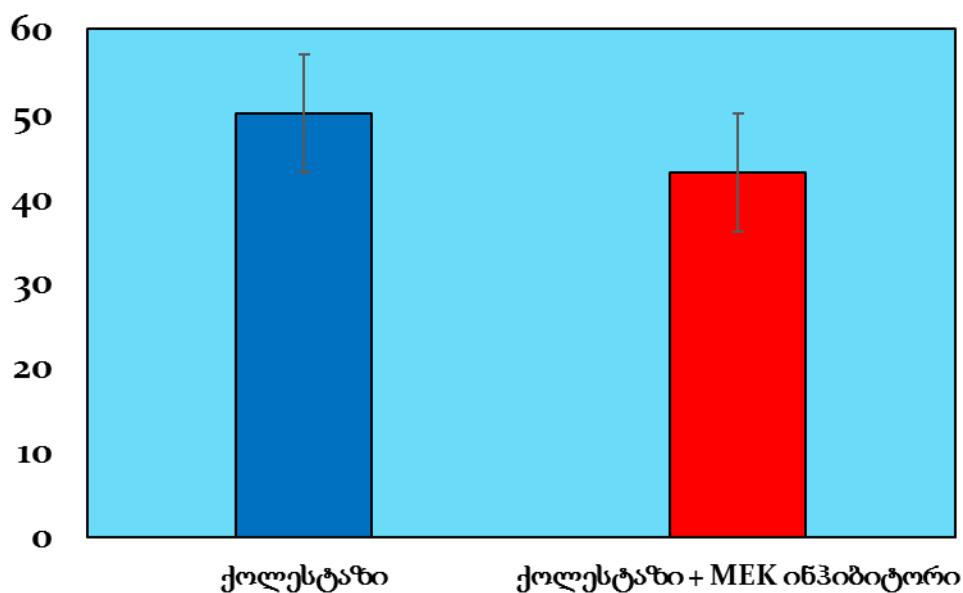


სურათი 11. ქოლესტაზურ ღვიძლში უჯრედების პლოიდობის ცვლილება C-Met ინჰიბიტორის ზემოქმედების შემდეგ

### 3.4. ქოლესტაზურ ღვიძლში მიტოზური აქტიურობის ცვლილების შესწავლა MEK1/2 ცილის ინჰიბირების შემდეგ

MEK1/2 ცილის ინჰიბირებით, ERK1/2 სასიგნალო გზის ბლოკირების შემდეგ შევისწავლეთ ღვიძლის უჯრედების პროლიფერაციული აქტიურობის ცვლილება. ღვიძლის ჰისტოარქიტექტონიკის ცვლილებების შესაფასებლად, თავდაპირველად ჩავატარეთ ინტაქტური და ქოლესტაზური ღვიძლის ქსოვილების მიკროსკოპული ანალიზი. იგი არ განსხვავდებოდა პირველი ექსპერიმენტის შედეგად მიღებული მონაცემებისაგან.

მიტოზური უჯრედების რაოდენობრივი შეფასებისთვის მოვახდინეთ კოლხიცინური მიტოზური ინდექსის განსაზღვრა. მეტაფაზური მიტოზური ფიგურების დათვლის შედეგად დადგინდა, რომ MEK1/2 ცილის ინჰიბირება არ მოქმედებს ჰეპატოციტების პროლიფერაციაზე ქოლესტაზურ ღვიძლში. კერძოდ, I და II საცდელ ჯგუფებში მიტოზური ინდექსის მაჩვენებლებია:  $50\% \pm 7$  და  $43\% \pm 9.7$  შესაბამისად (სურ. 12).



სურათი 12. ქოლესტაზურ ღვიძლში უჯრედების მიტოზური აქტიურობის ცვლილება MEK1/2 ცილის ინჰიბიტორის ზემოქმედების შემდეგ

### 3.5. ქოლესტაზურ ღვიძლში პლოიდობის ცვლილების შესწავლა JNK სასიგნალო გზის ინჰიბირების შემდეგ

JNK სასიგნალო კასკადი ერთ-ერთია მიტოგენების გამააქტიურებელი გზებიდან, მისი ძირითადი მოლეკულებია JNK1, JNK2 და JNK3. ჩვენთვის საინტერესო იყო ღვიძლის უჯრედების პოლიპლოიდიზაციაში JNK სასიგნალო გზის მონაწილეობის დადგენა. ამ მიზნით გამოვიყენეთ JNK ცილის ინჰიბიტორი (SP 600125).

ცხოველები დავყავით სამ ჯგუფად: I საკონტროლო ჯგუფი - ინტაქტური ცხოველები; II -პირველი საცდელი ჯგუფი, ცხოველები, რომელთაც გაუკეთდათ ნაღვლის საერთო სადინარის (ნსს) ლიგირება; III - მეორე საცდელი ჯგუფი - ცხოველები, რომელთაც ნსს-ს ლიგირებიდან 2 დღის განმავლობაში გაუკეთდათ JNK ცილის ინჰიბიტორის (SP 600125) ერთჯერადი ინიექციები (1მგ/კგ-ზე). დიეთილის ეთერის ნარკოზის პირობებში ოპერაციიდან 48 საათის შემდეგ სამივე ჯგუფის ცხოველებს ჩაუტარდათ დეკაპიტაცია. ჰეპატოციტების იზოლირების მიზნით ღვიძლის ქსოვილი ამოკვეთის შემდეგ მოთავსებული იყო ფოსფატის ბუფერულ ხსნარში და ზემოთ აღწერილი მეთოდის თანახმად ვამზადებდით პრეპარატებს ფერადი რეაქციისთვის. კერძოდ, უჯრედებში დნმ-ს

რაოდენობის შესაფასებლად გამოვიყენეთ ფიოლგენის რეაქცია (სურ. 5). ჰეპატოციტებში პლოიდობის ცვლილებას ვსაზღვრავდით კომპიუტერული პროგრამით - Image J.

ჩვენს მიერ ჩატარებული კვლევის შედეგების ანალიზმა გვიჩვენა, რომ ინტაქტურ ვირთაგვებთან შედარებით ნაღვლის საერთო სადინარის ლიგირებიდან მე-2 დღეს პირველი საცდელი ჯგუფის ცხოველებში მკვეთრად მცირდება დიპლოიდური უჯრედების რაოდენობა. კერძოდ, მათი მაჩვენებელი ინტაქტური ცხოველების ღვიძლში შეადგენს  $26 \pm 4$ , ხოლო ქოლესტაზიდან 2 დღის შედეგ კი დაახლოებით ორჯერ მცირდება ( $14.3 \pm 3.4$ ). ამავე დროს, ინტაქტურ ცხოველებთან შედარებით პირველი საცდელი ჯგუფის ცხოველების ღვიძლის პარენქიმაში მკვეთრად იზრდება ტეტრა (4c) და ოქტაპლოიდური (8c) უჯრედების რაოდენობა.

საკონტროლო ჯგუფის ცხოველებში, როგორც ცხრილიდან ჩანს, 4c ქრომოსომის შემცველი უჯრედების რაოდენობა შეადგენს  $68 \pm 3$ , ხოლო I საცდელი ჯგუფის ცხოველებში კი  $73 \pm 3.5$ . 8c ქრომოსომის შემცველი უჯრედების საკონტროლო ცხოველებში შეადგენს  $3.1 \pm 1.1$ , ხოლო I საცდელი ჯგუფის ცხოველებში მათი რაოდენობა შეადგენს  $9 \pm 2.1$  (ცხრილი 3).

ასეთივე შედეგები დაფიქსირდა II საცდელი ჯგუფის ცხოველებში, რომელთაც ნაღვლის სადინარის ლიგირების შემდეგ 2 დღის განმავლობაში უკეთებოდათ JNK ცილის ინჰიბიტორის ინექციები. ინტაქტურ ცხოველებთან შედარებით სარწმუნოდ შემცირდა დიპლოიდური უჯრედების რაოდენობა, კერძოდ,  $19 \pm 4.3$ -მდე, ტეტრაპლოიდური უჯრედების რაოდენობა არ შეცვლილა კონტროლთან შედარებით, ხოლო ოქტაპლოიდური უჯრედების რაოდენობაში კი დაფიქსირდა მნიშვნელოვანი მატება -  $11 \pm 3.3$  (ცხრილი 3).

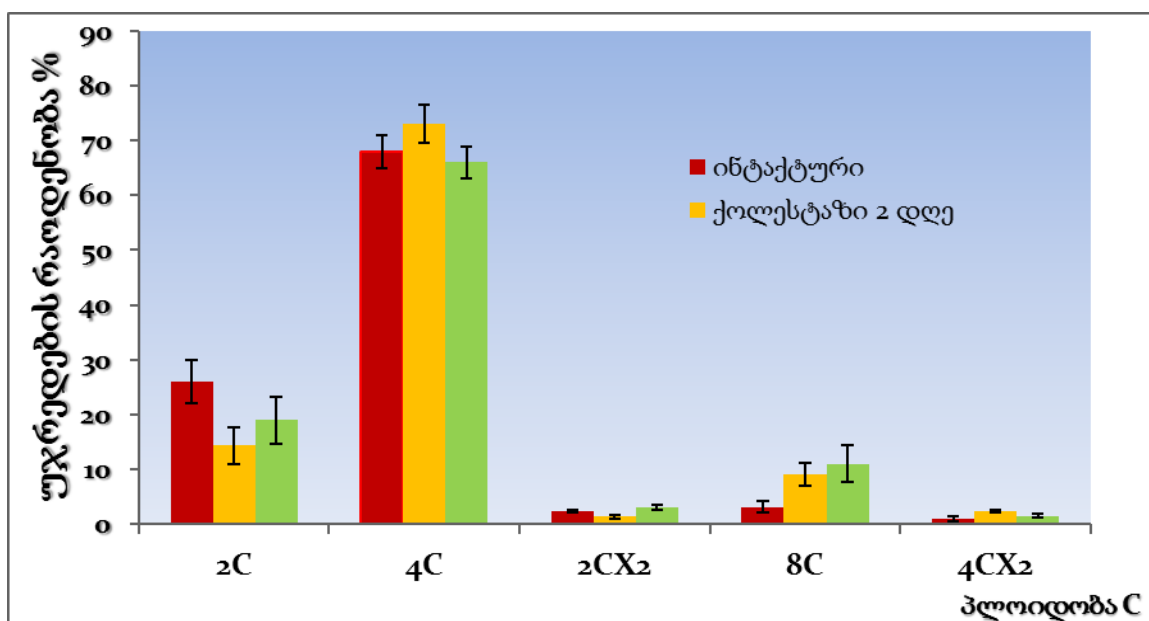
### ცხრილი 3

ღვიძლში უჯრედების პლოიდობის ცვლილება JNK ცილის ინჰიბიტორით

დნმ-ს რაოდენობა	2c	4c	2c x 2	8c	4c x 2
ინტაქტური	$26 \pm 4$	$68 \pm 3$	$2.3 \pm 0.3$	$3.1 \pm 1.1$	$1 \pm 0.5$
ქოლესტაზი (2 დღე)	$14.3 \pm 3.4$	$73 \pm 3.5$	$1.3 \pm 0.3$	$9 \pm 2.1$	$2.3 \pm 0.3$
ქოლესტაზი (2დღე)+ ინჰიბიტორი	$19 \pm 4.3$	$66 \pm 2.8$	$3 \pm 0.5$	$11 \pm 3.3$	$1.5 \pm 0.4$

საყურადღებოა, რომ I და II საცდელი ჯგუფის ცხოველების ღვიძლში როგორც დიპლოიდური უჯრედების, ასევე მაღალპლოიდური უჯრედების რაოდენობებს შორის სარწმუნო განსხვავება არ გამოვლინდა (სურ. 13). კერძოდ, ნაღვლის საერთო სადინარის ლიგირებიდან მე-2 დღეს, ორივე საცდელი ჯგუფის ცხოველთა ღვიძლში, როგორც მე-9 სურათზე მოყვანილი დიაგრამების ანალიზი გვიჩვენებს, ერთნაირად კლებულობს დიპლოიდური უჯრედების შემცველობა, მნიშვნელოვნად არ იცვლება ტეტრაპლოიდური უჯრედების რაოდენობა და იზრდება ოქტაპლოიდური ჰეპატოციტების რაოდენობა.

კვლევის შედეგებიდან გამომდინარეობს, რომ JNK ცილის ინჰიბიტორის ინექციებით JNK კასკადური გზის ბლოკირება არ ახდენს ზეგავლენას ქოლესტაზურ ღვიძლში ჰეპატოციტების პოლიპლოიდიზაციის პროცესზე.



სურათი 13. ქოლესტაზურ ღვიძლში უჯრედების მიტოზური აქტიურობის ცვლილება JNK ცილის ინჰიბიტორის ზემოქმედების შემდეგ

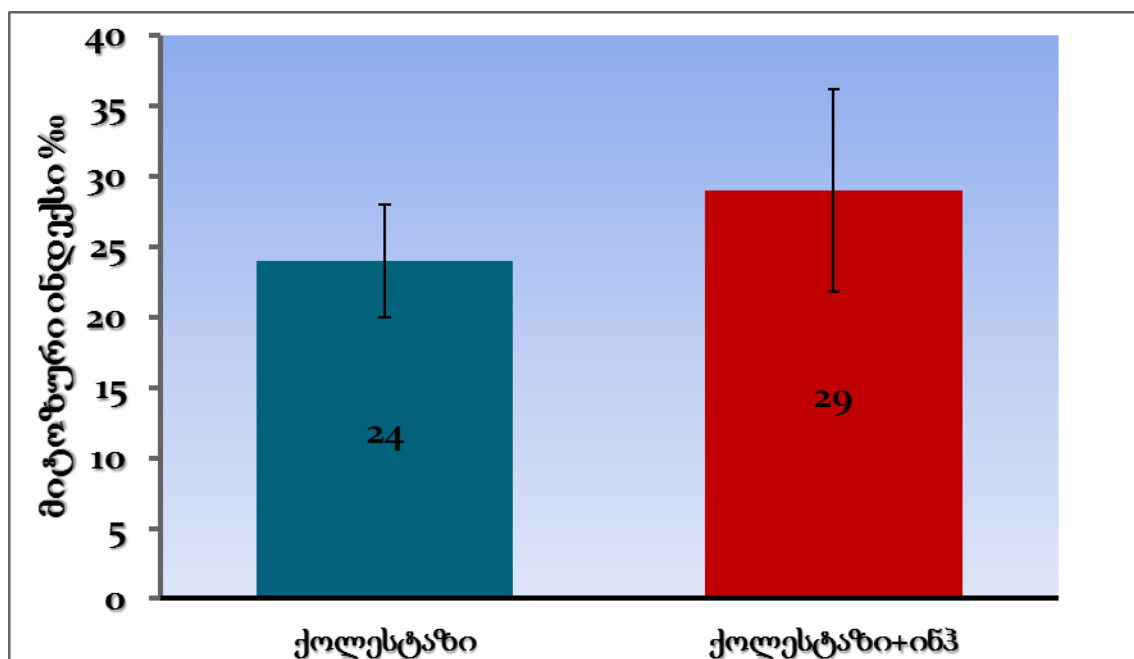
### 3.6. ქოლესტაზურ ღვიძლში მიტოზური აქტიურობის ცვლილების შესწავლა JNK ცილის ინჰიბირების შემდეგ

JNK ცილის ინჰიბირებით, JNK სასიგნალო გზის ბლოკირების შემდეგ შევისწავლეთ ღვიძლის უჯრედების პროლიფერაციული აქტიურობის ცვლილება. ღვიძლის ჰისტოარქიტექტონიკის ცვლილებების შესაფასებლად, თავდაპირველად ჩავატარეთ



ინტაქტური და ქოლესტაზური ღვიძლის ქსოვილების მიკროსკოპული ანალიზი. იგი არ განსხვავდებოდა პირველი ექსპერიმენტის შედეგად მიღებული მონაცემებისაგან.

მიტოზური უჯრედების რაოდენობრივი შეფასებისთვის მოვახდინეთ კოლხიციური მიტოზური ინდექსის განსაზღვრა. მეტაფაზური მიტოზური ფიგურების დათვლის შედეგად დადგინდა, რომ JNK ცილის ინჰიბირება არ მოქმედებს ჰეპატოციტების პროლიფერაციაზე ქოლესტაზურ ღვიძლში. კერძოდ, I და II საცდელ ჯგუფებში მიტოზური ინდექსის მაჩვენებლებია:  $24\% \pm 4$  და  $29\% \pm 7.2$  შესაბამისად (სურ. 14).



სურათი 14. ქოლესტაზურ ღვიძლში უჯრედების მიტოზური აქტიურობის ცვლილება JNK ცილის ინჰიბიტორის ზემოქმედების შემდეგ

## დასკვნები:

1. HGF-ისა და JNK კასკადური გზების ბლოკირებით, მიღებული შედეგები იმაზე მიუთითებს, რომ ქოლესტაზურ ღვიძლში პროლიფერაცია და პოლიპლოიდიზაცია სხვადასხვა სასიგნალო გზებით წარიმართება.
2. ქოლესტაზურ ღვიძლში ჰეპატოციტების პოლიპლოიდიზაციისთვის ERK1/2 ერთ-ერთი ძირითადი სასიგნალო გზაა.

## გამოყენებული ლიტერატურა

1. ბაკურაძე ე. ვირთაგვას ღვიძლის რეგენერაციის თავისებურებები ქოლესტაზის პირობებში ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიდატის ხარისხის მოსაპოვებელი დისერტაციის ავტორეზიუმე 2006წ.
2. Большая медицинская энциклопедия 1986 , Т.27, с.47-48.
3. Бродский Л. В., Уриваева И.В. Клеточная полиплоидия, пролиферация и дифференцировка.// Москва, «Наука», 1981, 256стр.
4. Benvenuti S, Comoglio PM (2007) The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis. J Cell Physiol 213: 316-325.
5. Bissig KD, Marti U, Solioz M, Forestier M, Zimmermann H, Luthi M, et al. Epidermal growth factor is decreased in liver of rats with biliary cirrhosis but does not act as paracrine growth factor immediately after hepatectomy. J Hepatol 2000;33:275–81.
6. Bode AM, Dong Z (August 2007). "The Functional Contrariety of JNK". Mol. Carcinog. 46 (8): 591–8. doi:10.1002/mc.20348. PMC 2832829 Freely accessible. PMID 17538955. The protein products of jnk1 and jnk2 are believed to be expressed in every cell and tissue type, whereas the JNK3 protein is found primarily in brain and to a lesser extent in heart and testis“.
7. Böhm F, Köhler UA, Speicher T, Werner S. Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. EMBO Mol Med. 2010 2(8):294-305.
8. Borowiak M, Garratt AN, Wustefeld T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C (2004) Met provides essential signals for liver regeneration. Proc Natl Acad Sci USA 101: 10608-10613.
9. Celton-Morizur S., G. Merlen, D. Couton, G. Margall-Ducos, and C. Desdouets, “The insulin/Akt pathway controls a specific cell division program that leads to generation of binucleated tetraploid liver cells in rodents,” Journal of Clinical Investigation, vol. 119, no. 7, pp. 1880–1887, 2009.
10. Chen, Z., T. B. Gibson, F. Robinson, L. Silvestro, G. Pearson, B. Xu, A. Wright, C. Vanderbilt, and M. H. Cobb. 2001. MAP kinases. Chem. Rev. 101:2449–2476.
11. Chong, H., H. G. Vikis, and K. L. Guan. 2003. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. Cell Signal. 15:463–469.
12. Davoli T. and T. De Lange, “The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer,” Annual Review of Cell and Developmental Biology, vol. 27, pp. 585–610, 2011.
13. Eggert U. S., T. J. Mitchison, and C. M. Field, “Animal cytokinesis: from parts list to mechanisms,” Annual Review of Biochemistry, vol. 75, pp. 543–566, 2006.

14. Eliades, N. Papadantonakis, and K. Ravid, "New roles for cyclin E in megakaryocytic polyploidization," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 24, pp. 18909–18917, 2010.
15. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology*. 2006;43:S45–S53.
16. Frodin, M., and S. Gammeltoft. 1999. Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol. Cell. Endocrinol.* 151:65–77
17. Gao P. and J. Zheng, "Oncogenic virus-mediated cell fusion: new insights into initiation and progression of oncogenic viruses-related cancers," *Cancer Letters*, vol. 303, no. 1, pp. 1–8, 2011.
18. Geier A, Wagner M, Dietrich CG, Trauner M. Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:283–308.
19. Gerlyng, P., Abyholm A., Grotmol T., Erikstein B., Huitfeldt H. S., Stokke T., Seglen P. O. Binucleation and polyploidization patterns in developmental and regenerative rat liver growth. *Cell Prolif.* 1993, 26: 557- 565.
20. Geyer, M., and A. Wittinghofer. 1997. GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:786–792. 64.
21. Guidotti J. E., O. Br  gerie, A. Robert, P. Debey, C. Brechot, and C. Desdouets, "Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 21, pp. 19095–19101, 2003.
22. Haga S., W. Ogawa, H. Inoue et al., "Compensatory recovery of liver mass by Akt-mediated hepatocellular hypertrophy in liver-specific STAT3-deficient mice," *Journal of Hepatology*, vol. 43, no. 5, pp. 799–807, 2005.
23. H  ussinger, Dieter, ed. (2011). *Liver Regeneration*. Berlin: De Gruyter. p. 1. ISBN 9783110250794.
24. Iimuro Y., Nishiura, T., Hellerbrand, C., Behrns, K. E., Schoonhoven, R., Grisham, J. W., and Brenner, D. A. NF  kappa B prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. *J. Clin. Invest.* 101: 802, 1998.
25. Imamura H, Shimada R, Kubota M, Matsuyama Y, Nakayama A, Miyagawa S, et al. Preoperative portal vein embolization: an audit of 84 patients. *Hepatology* 1999;29:1099–105.
26. Iyomasa S, Terasaki M, Kuriki H, Nimura Y, Shionoya S, Kojima K, et al. Decrease in regeneration capacity of rat liver after external biliary drainage. *Eur Surg Res* 1992;24:265–72.
27. Jansen P.L., Muller M., Strum E. Genes and Cholestasis // *Hepatology* 2001, Vol.34, pp. 1067-1073.

28. Kanno H, Abe T, Saito T, Tsuchiya T, Miyazawa M, Suzuki M, Ishii S, Motoki R, Gotoh M  
Induction of immediate early genes after partial hepatectomy in cholestatic liver. *J Hepatobiliary  
Pancreat Surg.* 2001;8(3):259-67.
29. Keshet Y, Seger R. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components  
regulates a diverse array of physiological functions[J]. *MAP Kinase Signaling Protocols: Second  
Edition*, 2010: 3-38.
30. Kohno, M., and J. Pouyssegur. 2003. Pharmacological inhibitors of the ERK signaling pathway:  
application as anticancer drugs. *Prog. Cell Cycle Res.* 5:219-224.
31. Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology  
and liver disease. *Gastroenterology*2004;126:322-342.
32. Kyriakis, J. M., and J. Avruch. 1990. pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel  
serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J.  
Biol. Chem.* 265:17355-17363.
33. Kyriakis, J. M., and J. Avruch. 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal  
transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* 81:807-869.
34. Lewis, T. S., P. S. Shapiro, and N. G. Ahn. 1998. Signal transduction through MAP kinase  
cascades. *Adv. Cancer Res.* 74:49-139.
35. Lodish H; Berk A; Zipursky S.L; Matsudaira P; Baltimore D; Darnell J.E. *Molecular Cell  
Biology.*// W. H. Freeman and Company., New York, 2000. -1200ps.
36. Margall-Ducos G., S. Celton-Morizur, D. Couton, O. Br  gerie, and C. Desdouets, "Liver  
tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis," *Journal of Cell  
Science*, vol. 120, no. 20, pp. 3633-3639, 2007.
37. Martin N. C., A. H. McGregor, N. Sansom, S. Gould, and D. J. Harrison, "Phenobarbitone-  
induced ploidy changes in liver occur independently of p53," *Toxicology Letters*, vol. 119, no. 2,  
pp. 109-115, 2001.
38. Mehendale, H.M.; Apte, U. (2010). "Liver Regeneration and Tissue Repair". *Comprehensive  
Toxicology*. pp. 339-67. doi:10.1016/B978-0-08-046884-6.01013-7. ISBN 978-0-08-046884-6.
39. Michalopoulos GK Liver regeneration. *J Cell Physiol* (2007) 213: 286-300.
40. Miyaoka Y., K. Ebato, H. Kato, S. Arakawa, S. Shimizu, and A. Miyajima, "Hypertrophy and  
unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration," *Current Biology*, vol.  
22, no. 13, pp. 1166-1175, 2012.

41. Mizukami, Y., K. Yoshioka, S. Morimoto, and K. Yoshida. 1997. A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion. *J. Biol. Chem.* 272:16657–16662.
42. Mizuta A, Chijiwa K, Saiki S, Kuroki S, Nakamura K, Tanaka M. Differences in biliary lipid excretion after major hepatectomy in obstructive jaundiced rats with preoperative internal, external, or no biliary drainage. *Eur Surg Res* 2002;34:291–9.
43. Morillo S. M., P. Escoll, A. De La Hera, and J. M. Frade, “Somatic tetraploidy in specific chick retinal ganglion cells induced by nerve growth factor,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 1, pp. 109–114, 2010.
44. Nakano K, Chijiwa K, Tanaka M. Lower activity of CCAAT/ enhancer- binding protein and expression of cyclin E, but not cyclin D1, activating protein-1 and p21 (WAF1), after partial hepatectomy in obstructive jaundice. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:640–5.
45. Nguyen H. G. and K. Ravid, “Polyploidy: mechanisms and cancer promotion in hematopoietic and other cells,” *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 675, pp. 105–122, 2010.
46. Ogawa A, Tagawa T, Nishimura H, Yajima T, Abe T, Arai T, et al. Toll-like receptors 2 and 4 are differentially involved in Fasdependent apoptosis in Peyer's patch and liver at an early stage after bile duct ligation in mice. *Gut* 2005;55:105–13.
47. Oh SW, Mukhopadhyay A, Svrzikapa N, Jiang F, Davis RJ, Tissenbaum HA (2005). "JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (12): 4494–9.
48. Otto S. P., “The evolutionary consequences of polyploidy,” *Cell*, vol. 131, no. 3, pp. 452–462, 2007.
49. Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, and M. H. Cobb. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrinol. Rev.* 22:153–183.
50. Ravid K., J. Lu, J. M. Zimmet, and M. R. Jones, “Roads to polyploidy: the megakaryocyte example,” *Journal of Cellular Physiology*, vol. 190, no. 1, pp. 7–20, 2002.
51. Saeter, G., Schwarze P. E., Nesland J. M., Juuls N., Pettersen E. O., Seglen P. O. The polyploidizing growth pattern of normal rat liver is replaced by divisional, diploid growth in hepatocellular nodules and carcinomas. *Carcinogenesis* 1988, 9: 939-945.
52. Sakamoto T, Liu Z, Murase N, Ezure T, Yokomuro S, Poli V, et al. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology* 1999;29:403–11.

53. Sigal S. H., P. Rajvanshi, G. R. Gorla et al., "Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events," *American Journal of Physiology*, vol. 276, no. 5, pp. G1260–G1272, 1999.
54. Si-Tayeb K., F. P. Lemaigre, and S. A. Duncan, "Organogenesis and development of the liver," *Developmental Cell*, vol. 18, no. 2, pp. 175–189, 2010.
55. Suzuki H, Iyomasa S, Nimura Y, Yoshida S. Internal biliary drainage, unlike external drainage, does not suppress the regeneration of cholestatic rat liver after partial hepatectomy. *Hepatology* 1994;20:1318–22.
56. Takeda K., H. Eguchi, S. Soeda, A. Shirahata, and M. Kawamura, "Fe(II)/Cu(I)-dependent P-type ATPase activity in the liver of long-evans cinnamon rats," *Life Sciences*, vol. 76, no. 19, pp. 2203–2209, 2005.
57. Takehara T, Hayashi N, Mita E, Kanto T, Tatsumi T, Sasaki Y, et al. Delayed Fas-mediated hepatocyte apoptosis during liver regeneration in mice: hepatoprotective role of TNF alpha. *Hepatology* 1998;27:1643–51.
58. Toyoda H., O. Bregerie, A. Vallet et al., "Changes to hepatocyte ploidy and binuclearity profiles during human chronic viral hepatitis," *Gut*, vol. 54, no. 2, pp. 297–302, 2005
59. Tracy T.F.Jr., Bailey P.V., Goerke M.E., Sotelo-Avila C., Weber T.R., Cholestasis without cirrhosis alters regulatory liver gene expression and inhibits hepatic regeneration // *Surgery* 1991, Vol. 110, pp. 176-183.
60. Tzung SP, Fausto N, Hockenbery DM. Expression of Bcl-2 family during liver regeneration and identification of Bcl-x as a delayed early response gene. *Am J Pathol* 1997;150:1985–95.
61. Wang MC, Bohmann D, Jasper H (2005). "JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling". *Cell*. 121 (1): 115–25.
62. Weston, C. R., and R. J. Davis. 2002. The JNK signal transduction pathway. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12:14–21.
63. Xia, Y., C. Makris, B. Su, E. Li, J. Yang, G. R. Nemerow, and M. Karin. 2000. MEK kinase 1 is critically required for c-Jun N-terminal kinase activation by proinflammatory stimuli and growth factor-induced cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:5243–5248.
64. Yukihiro Yokoyama, Masato Nagino and Yuji Nimura. Mechanism of impaired hepatic regeneration in cholestatic liver, *J Hepatobiliary Pancreat Surg* (2007) 14:159–166.