ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

თორნიკე ნოზაძე

მოზარდ ვირთაგვებში სპერმატოგენეზის და სათესლე მილაკების კაპილარული ქსელის ფორმირების თავისებურებების ურთიერთკავშირის შესწავლა

საბაკალავრო პროგრამა - ბიოლოგია

ნაშრომი შესრულებულია ბიოლოგიის ბაკალავრის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

ხელმძღვანელები: პროფ. დიანა ძიძიგური ბიოლოგიის მეცნ.დოქტორი

ასოც. პროფ. ირინა მოდებაძე, ბიოლოგიის დოქტორი

თბილისი

2019 წ.

ანოტაცია

შესწავლილია ზრდასრული ვირთაგვას სათესლედან გამოყოფილი თერმოსტაბილური ცილოვანი კომპლექსის (თცკ) მოქმედება მოზარდი ვირთაგვების ჰომოლოგიური უჯრედების გამრავლებაზე. გამოკვლევებით დადგინდა, რომ სპერმატოზოიდების თცკ მზარდი ვირთაგვას სათელის ქსოვილის უჯრედების მიტოზური აქტიურობის ინჰიბირებას იწვევს. მოზარდი ვირთაგვას სათესლის კლაკნილი მილაკების 3D რეკონსტრუქციიის საფუძველზე გამოვლინდა აგრეთვე, ერთი მილაკის ფარგლებში სპერმატოგენულად აქტიური და არააქტიური უბნების მონაცვლეობა, რაც კანონზომიერი მოვლენაა და ასაკობრივ თავისებურებად შეიძლება ჩაითვალოს.დადგინდა, რომ მოზარდი ვირთაგვის სათესლეში სპერმატოგენულად აქტიური და არააქტიური უბნების მონაცვლეობა ვასკულარიზაციასთან არ არის დაკავშირებული და სავარაუდოდ შეიძლება განპირობებული იყოს სათესლეში სისხლის მიდინების შერჩევითი რეგულაციით.

Study of the correlation of capillary network formation and spermatogenesis in the seminiferous tubules of the adolescent rats

Summary

The impact of thermostabile protein complex (TPC) identified from adult rats spermatosoa was studied on homologius cells prolipheration .The inhibition of mitotic activity of adolecent rat spermatozoa has been shown. Based on 3D reconstruction of adolescent rat seminiferous tubule, it was found that the alternating spermatogeneticaly active and inactive areas within a single tubule can be considered as the regular phenomenon and the age peculiarity. The alternating of spermatogeneticaly active and inactive areas of seminiferous tubules is not connected to distribution of vasculature.

სარჩევი

შესავალი---------- 4

თავი1. ლიტერატურის მიმოხილვა

1.1. სპერმატოგენეზის ზოგადი დახასიათება----------6

1.2. ზრდის ფაქტორების ზოგადი დახასიათება----------13

1.2.1. სპერმატოგენეზის რეგულაციის გზები----------17

თავი2. მასალა და მეთოდები

2.1 კვლევის ობიექტი და მასალა---------- 21

2.2. ვირთაგვას სპერმატოზოიდების თერმოსტაბილური ცილოვანი

კომპლექსის სპირტული ექსტრაქცია---------- 22

2.3 კოლხიცინური მიტოზური ინდექსის განსაზღვრა ---------- 22

2.4 სინათლის მიკროსკოპში შესწავლილი მასალის ფიქსაცია, პარაფინის

ანათლების და პრეპარატების მომზადება---------- 23

2.5. სათესლე მილაკის 3D რეკონსტრუქცია---------- 23

თავი 3. კვლევის შედეგები და მათი განხილვა

3.1. ზრდასრული ვირთაგვას სათესლეს თერმოსტაბილური ცილოვანი კომპლექსის მოქმედება მოზარდი ვირთაგვების ჰომოლოგიური უჯრედების გამრავლებაზე------ 24

3.2. 3D რეკონსტრუქციით მოზარდი ვირთაგვების სათესლეს ერთი მილაკის ფარგლებში სპერმატოგენულად აქტიური და არააქტიური უბნების მონაცვლეობა შესწავლა ---------- 26

3.3. 3D რეკონსტრუქციით მოზარდი ვირთაგვის სათესლეს მილაკების ვასკულარიზაციის თავისებურებების შესწავლა---------- 29

დასკვნები ---------- 31

გამოყენებული ლიტერატურა---------- 32

შესავალი

მრავალწლიანი კვლევებით დადგენილი იქნა, რომ ძუძუმწოვრებში არსებობს ინტრატესტიკულარული ჰორმონების (ანდროგენები და ფოლიკულამასტიმულირებელი ჰორმონები) და ზრდის ფაქტორების თანაბრადმნიშვნელოვანი ქსელი, რომელიც მოქმედებს პარაკრინული და/ან აუტოკრინული გზებით. ასე მაგალითად, ერთერთი ყველაზე კარგად შესწავლილი ეპიდერმული ზრდის ფაქტორი (ე.წ.ციტოკინი), რომლის დეფიციტი სპერმატოგენეზის რეგულაციის დარღვევებს იწვევს და ძირითადად სათესლეში ლეიდიგის უჯრედებიით სეკრეტირდება, სქესობრივი მომწიფების შემდეგ სასქესო უჯრედებშიც იწყებს გამომუშავებას (1). უკანასკნელ წლებში გამოვლინდა ასევე, რომ ძუძუმწოვრებში სპერმატოგენეზის და სპერმატოზოიდების მოძრაობის რეგულაციაში აქტიურად მონაწილე ფიბრობლასტების ზრდის ფაქტორის (FGF-2) და მისი რეცეპტორების (FGFR) ჭარბი ექსპრესია უშუალოდ სათესლესა და სპერმატოზოიდებში (2)

დღეისათვის შეზღუდული ინფორმაცის მიუხედავად ქიმიო-, და/ან სხიური თერაპიის გამოყენებით კიბოს მკურნალობაში მიღწეული მნიშვნელოვანი შედეგების (თერაპიის შემდეგ არ აღინიშნება ხანგრძლივი ტოქსიკური მოქმედება, იზრდება პაციენტების სიცოცხლის ხანგრძლივობა და გადარჩენა) მიუხედავად, პრობლემად რჩება აღნიშნული თერაპიის ისეთი გვერდითი ეფექტები, როგორებიცაა მამაკაცის უნაყოფობა, გონადების დისფუნქცია და ხანგრძლივი აზოსპერმია (3). გამომდინარე იქიდან, რომ მამაკაცებში უნაყოფობის მაჩვენებლის ნახევარი მოდის სპერმატოზოიდების წარმოებისა და მათი ფუნქციის დარღვევაზე, დღემდე აქტუალურია გერმინატიული უჯრედების განვითარების, დიფერეცირების და ფუნქციური აქტიურობის რეგულაციის მექანიზმების და ენდოგენური ფაქტორების კვლევა.

ამ თვალსაზრისით, ყურადღებას იმსახურებს ძუძუმწოვრების, მათ შორის ადამიანის სხვადასხვა ქსოვილის უჯრედებში იდენტიფიცირებული თერმოსტაბილური ცილების ჯგუფი, რომელთაც ჰომოლოგიური უჯრედების გამრავლების ინჰიბირების უნარი აქვს. სხვადასხვა უჯრედებიდან აღნიშნული ცილოვანი ფრაქციების შედარებითი ელექტროფორეზული ანალიზით გამოვლინდა აქტიური საწყისი ცილოვანი კომპონენტი მოლეკულური მასით 12-14კდ. დღემდე ბოლომდე არ არის ასევე, გარკვეული სათესლეს კლაკნილ მილაკებში სპერმატოგენზის ტალღისებური გავრცელების მოლეკულური მექანიზმები.

ზემოთ თქმულიდან გამომდინარე სამუშაოს მიზანი იყო მოზარდ ვირთაგვებში სპერმატოგენეზის სივრცითი ორგანიზაციის თავისებურებებისა და ჰომოლოგიური უჯრედების გამრავლებაზე სპერმატოზოიდების ცილოვანი კომპლექსის ზემოქმედების შესწავლა.

თავი 1. ლიტერატურის მიმოხილვა

1.1. სპერმატოგენეზის ზოგადი დახასიათება

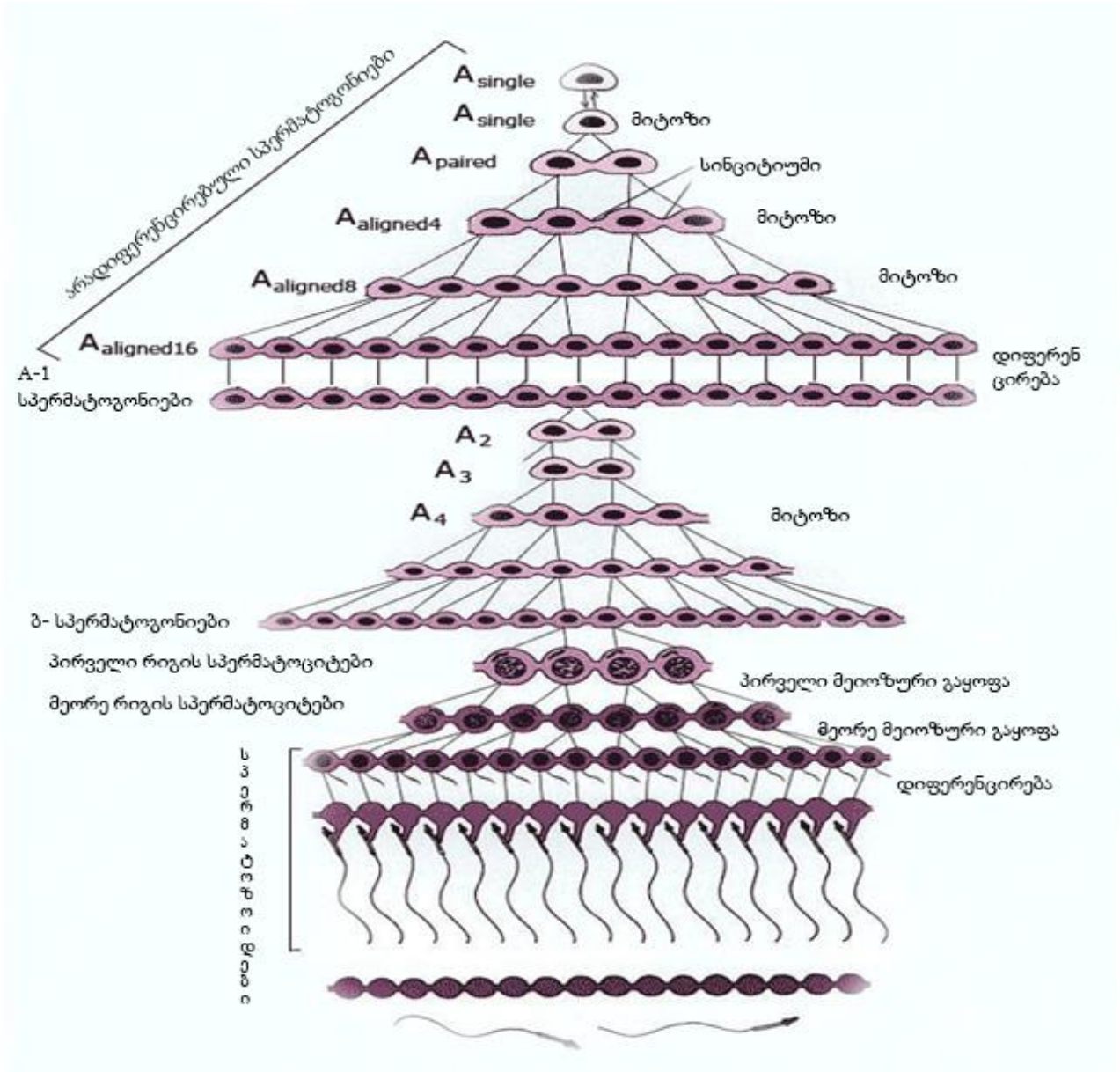
იწყება ინდივიდის სქესობრივი მომწიფების ასაკიდან და გრძელდება პრაქტიკულად მთელი სიცოცხლის მანძილზე. სპერმატოგენეზის დროს მეიოზის შედეგად ერთი უჯრედიდან ოთხი სრულყოფილი ტოლფასოვანი სპერმატოზოიდი მიიღება. სპერმატოგენული რიგის უჯრედების როგორც მიტოზური, ასე მეიოზური გაყოფის დროს ადგილი აქვს არასრულ ციტოკინეზს, რის შედეგადაც წარმოქმნილი უჯრედები ერთმანეთთან ციტოპლაზმური ხიდაკებით უკავშირდება, წარმოიქმნება უჯრედების კლონი – სინციტიუმი ანუ უჯრედული ასოციაცია. სინციტიური კავშირი, ერთის მხრივ, უზრუნველყოფს კლონის უჯრედების განვითარების სინქრონულობას, ხოლო მეორეს მხრივ კი სპერმატოგენული რიგის უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას. ნაჩვენებია, რომ სპერმატოზოიდების სრულყოფილი დიფერენცირებისთვის მთელი დიპლოიდური ნაკრები (X და Y ქრომოსომების ჩათვლით) და მისი პროდუქტებია საჭირო. სწორედ ამ პირობის შესრულებას ემსახურება უჯრედების ერთმანეთთან შემაკავშირებელი ციტოპლაზმური ხიდაკების არსებობა.

სპერმატოგენეზის ხანგრძლივობა ადამიანში 72-74 დღეს შეადგენს. ამ პერიოდის განმავლობაში სპერმატოგენული რიგის ღეროვანი უჯრედები (სპერმატოგონიები), რომლებიც სათესლის დაკლაკნილი მილაკების კედლებშია ლოკალიზებული, გადის დიფერენცირების გრძელ გზას და საბოლოოდ ყალიბდება, როგორც მომწიფებული, ქრომოსომთა ჰაპლოიდური ნაკრების შემცველი, ციტოპლაზმის პრაქტიკულად მოკლებული სპერმატოზოიდები.

სპერმატოგენეზის პროცესში არჩევენ ორ - ტესტიკულურ და ეპიდიდიმურ ფაზას. ტესტიკულური ფაზის დროს ხდება სპერმატოგონიების სპერმატოზოიდებად დიფერენცირების ძირითადი ეტაპები, ხოლო ეპიდიდიმური ფაზის დროს კი სპერმატოზოიდების მომწიფების დასრულება, კერძოდ მუკოპოლისაქარიდების, ქოლესტერინისა და დამცველი ცილების დაგროვების ხარჯზე იცვლება სპერმატოზოიდების გარეთა მემბრანის თვისებები, სპერმატოზოიდები მოძრაობის უნარს იძენს.

ჩანასახის მამრობით სასქესო უჯრედებს, რომლებიც შესახლდება გონადის ტვინოვან შრეში, პროსპერმატოგონიები ეწოდება. პროსპერმატოგონიები რამდენჯერმე

მიტოზურად იყოფა, რის შემდეგაც სპერმატოგენეზის პროცესი წყდება და განახლდება მხოლოდ სქესობრივი მომწიფების ასაკიდან. ზრდასრული ორგანიზმის მიტოზურად პროლიფერირებად უჯრედებს სპერმატოგონიები ეწოდება. ადამიანის სათესლეში სპერმატოგონიების საერთო რაოდენობა მილიარდს აღწევს. სპერმატოგონიებს შორის გამოყოფენ A მუქ, A ნათელ, A მკრთალ და B სპერმატოგონიებს. რთულია იმის თქმა, თუ რომელი წარმოადგენს ჩამოთვლილი ადამიანის A უჯრედების პოპულაციებიდან ღეროვანი უჯრედების პულს. ზოგიერთი მკვლევარი თვლის, რომ მუქი A სპერმატოგონიები არ იყოფა და უჯრედების ერთგვარ რეზერვს წარმოადგენს. ამ დროს A single (იზოლირებული), A paired (შეწყვილებული), A aligned (გასწორებული) ნათელი უჯრედების თაობები კი არადიფერენცირებული პროლიფერირებადი ღეროვანი უჯრედებია. ეს უჯრედები იყოფა ნებისმიერ დროს და ხშირად უბრუნდება უჯრედების წინა სტადიას (მაგ. A paired გარდაიქმნება A single უჯრედად, რაც უზრუნველყოფს ღეროვანი უჯრედების პოპულაციის შენარჩუნებას და ამავე დროს გამოიყენება, როგორც სპერმატოზოიდების საბოლოო რაოდენობაზე კონტროლის მექანიზმი). A უჯრედების შემდეგი თაობები (A1-4) დიფერენცირების შემდგომ საფეხურზე მდგომი უჯრედებია, რომლებიც იყოფა მკაცრად განსაზღვრულ დროს (ე.წ. სათესლის ეპითელიუმის ციკლის სტადიები), ამ ეტაპზე აგრეთვე აღინიშნება უჯრედების ზოგიერთი კლონის მასიური დაღუპვა. გარდამავალი სპერმატოგონიების სტადიის გავლით A სპერმატოგონიები B სპერმატოგონიებს იძლევა.(სურ. 1)



სურათი 1. სპერმატოგენეზის სქემატური გამოსახულება

სპერმატოგონიების გაყოფა არასრული ციტოკინეზის ფონზე მიმდინარეობს, შედეგად ერთი თაობის სპერმატოგენული რიგის უჯრედები უჯრედულ ასოციაციებში, უჯრედულ ჯგუფებში არის გაერთიანებული, მათ შორის შემორჩენილი ციტოპლაზმური ხიდაკების მეშვეობით. ასეთ უჯრედთა ასოციაციებს სინციტიუმი ეწოდება. ამრიგად, სპერმატოგენული რიგის უჯრედები სპერმატოგონიების სტადიიდან სპერმატიდების სტადიის ჩათვლით სინცი-ტიუმითაა წარმოდგენილი (4)

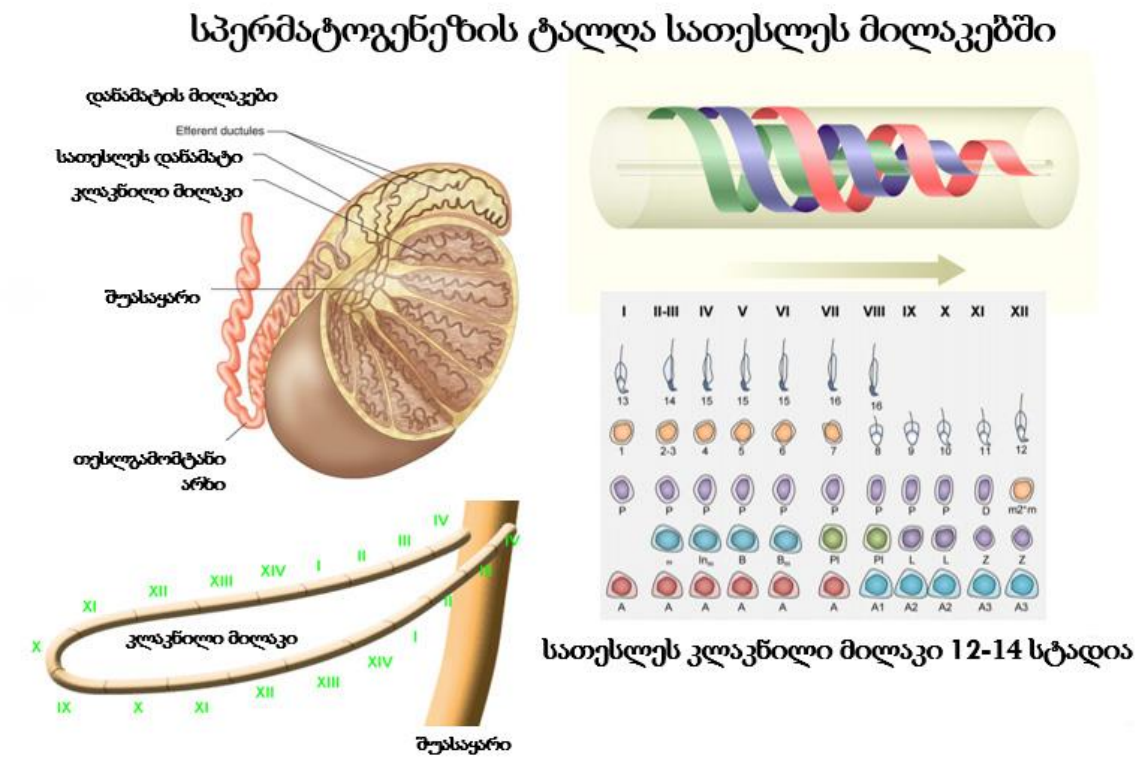
პირველ მეიოზში შესულ უჯრედებს I რიგის სპერმატოციტები ეწოდება. I მეიოზის პროფაზაში იწყება ხანმოკლე ზრდის ფაზა, რომლის დასასრულს უჯრედების ზომა დაახლოებით 4ჯერ მატულობს. I მეიოზური გაყოფის შედეგად ორი II რიგის

სპერმატოციტი წარმოიქმნება. ეს უკანასკნელები მეორე მეიოზის გაყოფის ფაზაში შედის. ადამიანში პირველი მეიოზური გაყოფა რამდენიმე კვირა გრძელდება, მაშინ როდესაც მეორე მეიოზური გაყოფა დაახლოებით 8 საათის განმავლობაში მიმდინარეობს. სწორედ ამით არის განპირობებული ის ფაქტი, რომ სათესლის პრეპარატებში რთულია II რიგის სპერმატოციტების აღმოჩენა. მეორე მეიოზური გაყოფის შედეგად წარმოიქმნება 4 ჰაპლოიდური სპერმატიდი, რომლებიც რთული სტრუქტურული ტრანსფორმაციების შედეგად (Sa, Sb, Sb2, Sc, Sd1 და Sd2 სპერმატიდები) სპერმატოზოიდებად (ფორმირების ფაზა ანუ სპერმიოგენეზი) გარდაიქმნებიან. ასეთ სტრუქტურულ გარდაქმნებს მიეკუთვნება: ქრომატინის კონდენსაციის ზრდა, რასაც განაპირობებს ქრომატინის ჰისტონების პროტამინული, არგინინით მდიდარი მჟავე ცილებით ჩანაცვლება; ციტოპლაზმის ძირითადი ნაწილის დაკარგვა; გოლჯის კომპლექსის გარდაქმნა აკროსომად და შოლტის წარმოქმნა.

ყოველდღიურად აქტიური რეპროდუქციული ასაკის მამაკაცის სათესლეებში 10 მილიონზე მეტი სპერმატოზოიდი წარმოიქმნება. სპერმატოზოიდების კონცენტრაცია სპერმის 1 მლ–ში ჩვეულებრივ 100 000 000 უჯრედს აღწევს. ყოველი ეაკულაციის დროს 2-4 მლ სპერმა გამოიყოფა. თუ სპერმატოზოიდების კონცენტრაცია სპერმაში

50 000 000/მლ არ აღემატება (ოლიგოსპერმია), იზრდება უშვილობის რისკი, ხოლო თუ ის 20 000 000/მლ შეადგენს - ასეთი მამაკაცი სტერილურად ითვლება (ამ შემთხვევაში განაყოფიერების შანსი 20%-ზე ნაკლებია). მთელი სიცოცხლის მანძილზე ადამიანის სათესლეებში წარმოიქმნება საშუალოდ 800-1800 ტრილიონი სპერმატოზოიდი.

ცნობილია, რომ სათესლეს მილაკებში სპერმატოგენეზის მიმდინარეობას აქვს ტალღისებური ხასიათი, რაც გულისხმობს იმას, რომ ერთი მილაკი მოიცავს უბნებს (ვირთაგვას შემთხვევაში 12-14 უბანს და რომელიც სტადიებადაა ცნობილი), რომლებიც განსხვავდებიან სპერმატოზოიდების დიფერონში არსებული უჯრედების შემადგენლობით. მილაკის თითოეული სტადია გრძელდება დაახლოებით 0,5-2,5 დღე.ხოლო ამ სტადიების ერთმანეთში თანამიმდევრული გარდაქმნა იძლევა ტალღისებურ ხასიათს (5) (სურ. 2)



სურათი 2. სპერმატოგენეზის ტალრისებრი გავრცელება

სპერმატოზოიდის დიფერონი:

გონოციტი → პროსპერმატოგონია (პროსპერმატოგონიუმი) → A-სპერმატოგონია → გარდამავალი სპერმატოგონია → B-სპერმატოგონია → I რიგის სპერმატოციტი → II რიგის სპერმატოციტი → სპერმატიდი → სპერმატოზოიდი

სპერმატოზოიდის თავი; სომატური უჯრედის და სპერმატიდის ქრომატინის თავი (დამშლელი ფერმენტების შემცველი აკროსომა, ბირთვი);ყელი (პროქსიმალური და დისტალური (ბაზალური სხეული) ცენტრიოლი); შუამდებარე ნაწილი (სპირალურად დახვეული მრავალი მიტოქონდრია); კუდი (შოლტი, რომლის მამოძრავებელ აპარატს აქსონემა ეწოდება).

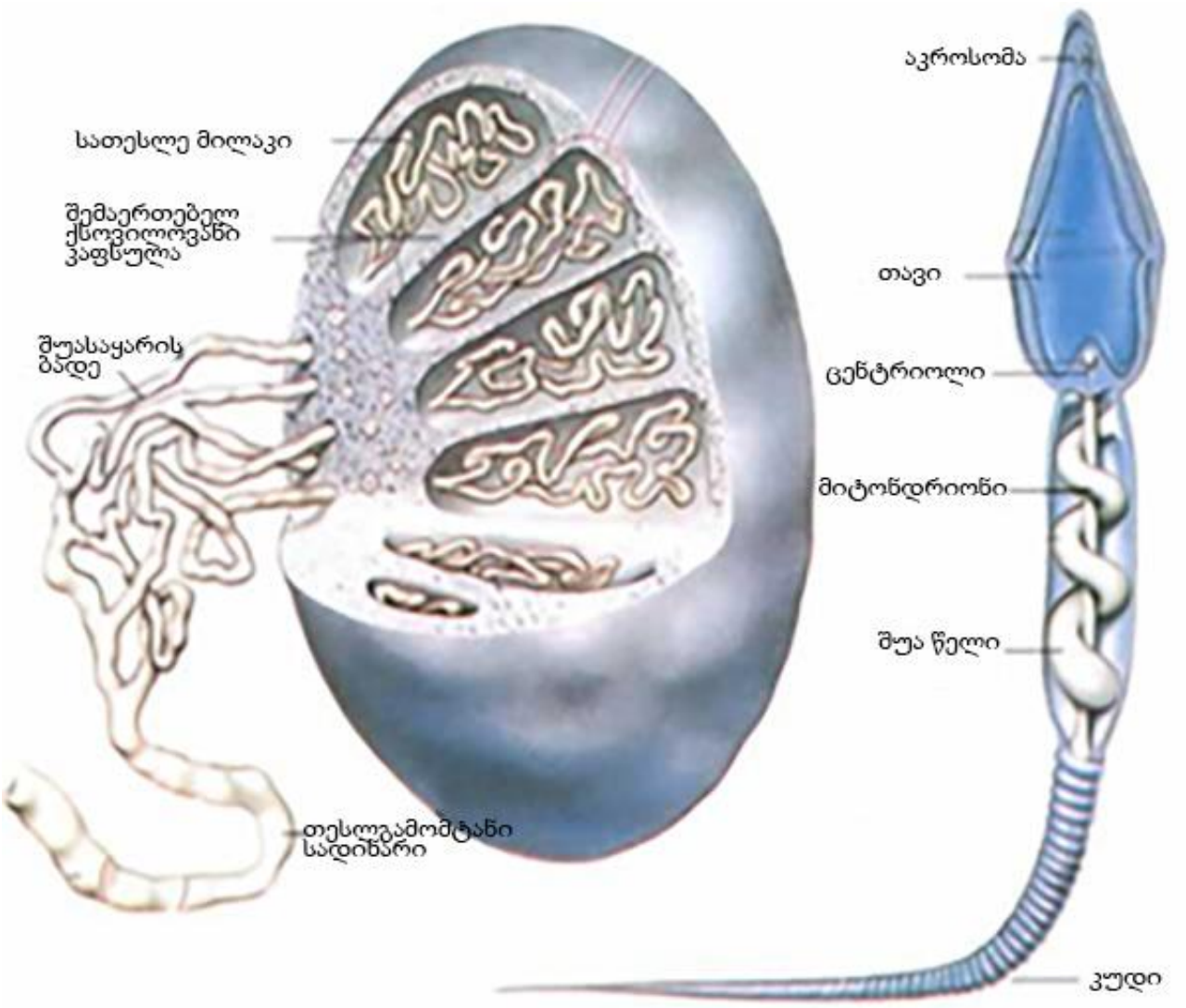
სპერმატოზოიდის აქსონემა

სპერმატოზოიდის შოლტის აქსონემის ფორმულაა 9+9x2+2. ის შედგება ორი ცენტრალური და 9 წყვილი პერიფერიული მიკროტუბულისაგან. პერიფერიული მიკროტუბულების ერთი წევრი სრულია და განივ ანათალზე შეკრული წრის სახეს იღებს, ხოლო მეორე კი არასრულია. ცენტრალური და პერიფერიული წყვილების სრული

წევრები 13 ტუბულინის პროტოფილამენტისგან შედგება, წყვილების არასრული წევრები კი 10-11 პროტოფილამენტს შეიცავს. დუპლეტების სრულ წევრებს აქვთ გამონაზარდები – ე.წ. დინეინის მხრები. ცილა დინეინი კუნთების მიოზინის მსგავსად ატფ-ის მოლეკულებს შლის. ძუძუმწოვრების სპერმატოზოიდებში პერიფერიული დუპლეტების გარდა არის 9 გარეთა მკვრივი კერატინიანი მიკროტუბულა, რომლებიც შოლტის გარეთა "ჩონჩხს" წარმოქმნის.

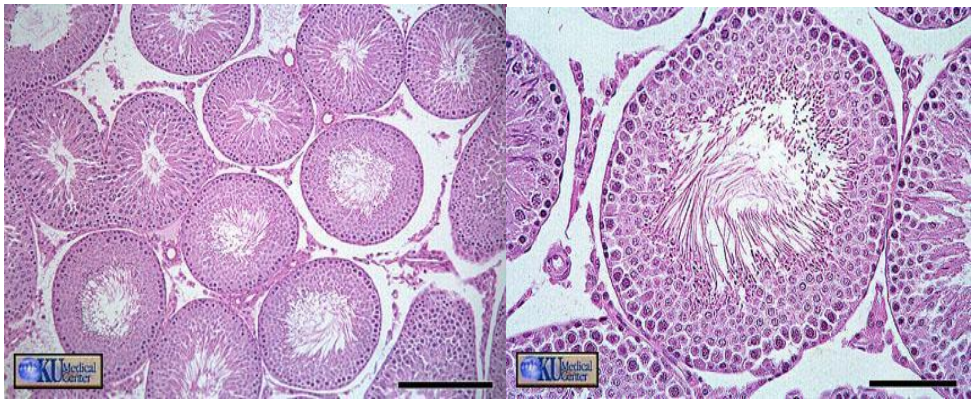
სათესლის აგებულება

სათესლე სათესლის პარკში მოთავსებული წყვილი ორგანოა, რომლის ზომაა 4x3x2სმ. გარედან სათესლე შემაერთებელქსოვილოვანი ცილოვანი გარსითაა (tunica albuguinea) დაფარული. შემაერთებელი ქსოვილი სეპტების ანუ ტიხრების სახით იჭრება სათესლის სიღრმეში და ყოფს მას კონუსისებურ წილებად ანუ კამერებად. სათესლეში სულ 200-300 ასეთი კამერაა. კამერაში განთავსებულია სათესლის დაკლაკნილი მილაკები, რომელთა სიგრძე 30-80 სმ აღწევს. სწორედ დაკლაკნილი მილაკების კედლებში მიმდინარეობს სპერმატოგენეზის პროცესი. დაკლაკნილ მილაკებს შორის სივრცეები ამოვსებულია ფაშარი შემაერთებელი ქსოვილით, რომელიც შეიცავს სისხლძარღვებს, ლიმფურ ძარღვებსა და ნერვულ დაბოლოებებს. ფაშარი შემაერთებელი ქსოვილის უჯრედული ელემენტებიდან აღსანიშნავია დიდი ზომის მომრგვალო ინტერსტიციული უჯრედები ანუ ლეიდიგის უჯრედები, რომლებშიც მიმდინარეობს მამრობითი სასქესო ჰორმონის ტესტოსტერონის წარმოქმნა. სათესლის დაკლაკნილი მილაკები უერთდება სწორ მილაკებს, რომლებიც წარმოქმნის ე.წ. შუასაყრის ბადეს, საიდანაც სპერმა გამომტანი მილაკების საშუალებით საკოპულაციო ორგანოში გადადის (სურ. 3).



სურათი 3. სათესლის აგებულება

გარედან დაკლაკნილი მილაკი შემოსაზღვრულია ბაზალური მემბრანით. ბაზალურ მემბრანას უკავშირდება ე.წ. სერტოლის უჯრედები. ეს დიდი ზომის დატოტვილი უჯრედები მთლიანად განჭოლავს მილაკების კედლებს. სერტოლის უჯრედების გამონაზარდებს შორის დარჩენილ სივრცეებს (ჯიბეებს) სპერმატოგენული რიგის უჯრედები იკავებს. სერტოლის უჯრედები საკვერცხეების ფოლიკულური უჯრედების ფუნქციური ანალოგია. ისინი მრავალ ფუნქციას ასრულებს, მათ შორის ტროფიკულს, ციტოპლაზმის ნარჩენების (ე.წ. ნარჩენი სხეულაკების) უტილიზაციის, ჰორმონ ინჰიბინის სინთეზის (თრგუნავს გონადოტროპინის სინთეზს), სტეროიდული ჰორმონების გადამუშავების, სპერმატიდების გამოთავისუფლებისა და სხვ. (სურ.4)



სურათი 4. სათესლის დაკლაკნილი მილაკების განივი ჭრილი

სპერმატოგენეზი ტალღისებური პროცესია, რაც მართებულია მილაკის როგორც სიგრძივი, ასევე განივი კვეთებისთვის. სწორედ ამიტომ მილაკების სხვადასხვა სეგმენტის ანათლებში ზოგჯერ შეუძლებელია ყველა უჯრედული ფორმის დანახვა.

ადამიანის სპერმატოგენეზის ციკლის 6 სტადია. გერმინატული ეპითელიუმის უჯრედების განვითარების სტადიები წარმოდგენილია, როგორც მზარდი რადიუსის Ad, Ap და B - შესაბამისად მუქი (dark), ნათელი (pale) A და B სპერმატოგონიები. PL, L, Z, P и II - სპერმატოციტები პრელეპტოტენას (preleptotene), ლეპტოტენას (leptotene), ზიგოტენას (zygotene), პაქიტენას (pachytene) ფაზაში, მეიოზის II გაყოფა. Sa, Sb1, Sb2, Sc, Sd1 и Sd2 - სპერმიოგენეზის სტადიები. Rb - ნარჩენი სხეულაკები ციტოპლაზმაში. ამასთან ერთად, მილაკის კედლის სიღრმეში უჯრედები ლაგდება თავისი მომწიფების ხარისხის მიხედვით – ნაკლებად მომწიფებული ფორმები პერიფერიაზეა განლაგებული, მაშინ როდესაც მომწიფებული უჯრედები ცენტრალური სადინრის სიახლოვეშია განთავსებული (6) (7)

1.2.ზრდის ფაქტორების ზოგადი დახასიათება

ეუკარიოტული ორგანიზმების სხვადასხვა ქსოვილების უჯრედების პროლიფერაციის რეგულაცია ბიოლოგიის აქტუალურ საკითხად რჩება.იგი საფუძვლად უდევს ისეთ სასიცოხლო პროცესებს, როგორიცაა დიფერენცირება, ნორმალური და ადაპტაციური ზრდა და ა.შ.

იდენტიფიცირებულია მრავალი ცილოვანი ფაქტორი, რომელთაც უდიდესი მნიშვნელობა გააჩნია უჯრედთა პროლიფერაციაში, დიფერენცირებაში, აპოპტოზის და

გადარჩენისთვის. ყველა სიმსივნის ზრდისა და პროგრესირებისათვის მნიშვნელოვანი და ზრდის ფაქტორებით რეგულირებადი მოლეკულური პროცესები,მაგალითად: უჯრედული ციკლის რეგულაცია, უჯრედგარე მატრიქსის რემოდელირება, მიგრაციის უნარი, ინვაზიის ინდუქცია ან ნეოანგიოგენეზი,სრულყოფილადარ არის შესწავლილილი და გამომდინარე მათი მნიშვნელობიდან, საჭიროა მათზე დამატებითი ინფორმაციის მოპოვება. (8)

ზრდის ფაქტორები- მასა 5-50 კდ ს შეადგენს. ისინი ჰორმონების მსგავსად, ფლობენ ფართო სპექტრის ბიოლოგიური ზემოქმედების უნარს ბევრ უჯრედზე. ასტიმულირებენ ან აინჰიბირებენ მიტოზს. ზრდის ფაქტორები, ჰორმონებისაგან განსხვავებით, როგორც წესი, პროდუცირდება არასპეციალიზირებულ უჯრედებში, რომლებიც ყველა ქსოვილში გვხვდებიან და ფლობენ ენდოკრინულ, აუტოკრინულ და პარაკრინულ მოქმედების უნარს. ენდოკრინული ფაქტორები გამომუშავდებიან და ტრანსპორტირდებიან სამიზნე უჯრედებამდე სისხლის საშუალებით. მიაღწევენ რა თავიანთ მიზანს, ურთიერთქმედებენ სამიზნე უჯრედების სპეციფიკურ რეცეპტორებთან. პარაკრინული ფაქტორები განსხვავდებიან იმით, რომ ვრცელდებიან დიფუზიის გზით. სამიზნე უჯრედების რეცეპტორები ჩვეულებრივ განლაგებულნი არიან, მასინთეზირებელ უჯრედებთან ახლოს. ზრდის ფაქტორების უმრავლესობა მოქმედებს პარაკრინული ან აუტოკრინული გზით. (9)

დღეისათვის ცნობილია უამრავი ზრდის მარეგულირებელი ფაქტორი. ისინი გამოყოფილია თითქმის ყველა ქსოვილიდან და ორგანოდან, მაგ: სანერწყვე ჯირკვლებში სინთეზირდება არამარტო საჭმლის მომნელებელი ენზიმები, არამედ მრავალი უჯრედის ზრდის ფაქტორი. მღრღნელების ყბისქვეშა ჯირკვალში ნანახი იქნატრანსფორმაციური ზრდის ფაქტორი β (TGF-β), ინსულინის მსგავსი ზრდის ფაქტორი I (IGF-I), ჰეპატოციტური ზრდის ფაქტორი (HGF), და ფიბრობლასტური ზრდის ფაქტორი (FGF-2) (10)

ზრდის ფაქტორების უმრავლესობა არის მრავალფუნქციური და მოქმედებს არა მარტო ერთი ქსოვილის რომელიმე უჯრედზე არამედ მოქმედებს ისეთ ფართო სპექტრის გარდაქმნებზე როგორებიცაა დიფერენცირება ემბრიოეგენეზი, ანთება, რეგენერაცია და იმუნური რეაქციები(11)

ზოგიერთი ზრდის ფაქტორი ახდენს ზოგად ეფექტს, სტიმულირებენ უჯრედების დაყოფას მრავალ სხვადასხვა ტიპის ქსოვილებში, მაშინ როცა ზოგიერთი არის სპეციფიკური და მოქმედებს მხოლოდ ერთი კონკრეტული ტიპის უჯრედზე.

1. ლოკალიზაციის მიხედვით ზრდის ფაქტორები შეიძლება დაიყოს ბირთვულ, ციტოპლაზმურ და მოცირკულირე ფორმებად, ამის გამო განსხვავებულია მათი მოქმედების ეფექტებიც. კერძოდ, ფიბრობლასტური ზრდის ფაქტორი-3 (FGF3) გვხვდება სეკრეტორული და ბირთვული ფორმით, აქედან სეკრეტორული ფორმა ასტიმულირებს უჯრედების ზრდასა და ტრანსფორმაციას, მაშინ როცა, ბირთვული ფორმა აინჰიბირებს უჯრედების პროლიფერაციას და დნმ-ს სინთეზს (12). FGF3თავიდან ლოკალიზდება ციტოპლაზმაში, ხოლო შემდგომ გადაინაცვლებს ბირთვში (13) ბირთვში ასევე ლოკალიზდება შემაერთებელი ქსოვილის ზრდის ფაქტორი (CTGF), რომელიც პირდაპირ მოქმედებს ტრანსკრიფციაზე (14).IGF გვხვდება როგორც უჯრედული, ასევე მოცირკულირე ფორმებით, იგი წარმოადგენს ფეტალურ ზრდის ფაქტორს

ზრდის ფაქტორების უმეტესობას სამიზნე უჯრედების ზედაპირზე გააჩნია რეცეპტორები, მათთან დაკავშირების შემდეგ ხდება უჯრედების პროლიფერაციის ან დიფერენცირების აქტივაცია. ასე მაგალითად EGF ფაქტორების ოჯახს გააჩნია 4 რეცეპტორი ErbB1, ErbB2, ErbB3 და ErbB4 მოლეკულური წონით დაახლოებით 170 კდ, ახასიათებთ თიროზინკინაზული აქტივობა (11)

ზრდის ფაქტორებს გააჩნიათ განსხვავებული მოქმედების ეფექტი სხვადასხვა ორგანოებსა და ქსოვილებში. მაგ: ადამიანის EGF კუჭის წვენის სეკრეციას აინჰიბირებს. თაგვის EGF ასტიმულირებს თაგვებში ადრეულ ასაკში კბილებისამოსვლას დათვალის გახელას . იგი წარმოადგენს მიტოგენს უჯრედთა მრავალი ტიპისათვის, კერძოდენდოთელური ეპითელური, და ფიბრობლასტური უჯრედებისათვის. EGF-ის სისტემატური შეყვანაახალშობილ ვირთაგვებში იწვევს სიხლში მოცირკულირე IGF-I დონის შემცირებას და სომატური ზრდის დაყოვნებას (15)

2. TGF-α სინთეზირდება როგორც ტრანსმემბრანული წინამორბედი ცილა (160 ამინომჟავა). შემდგომ იგი იშლება პეპტიდად, რომელიც შეიცავს 50 ამინომჟავურ ნაშთს. (მოლ. წონა 5.7 კდ), TGF-β ფაქტორი მომწიფებულ ფორმაში წარმოადგენს ჰომოდიმერულ პროტეინს (მოლ. წონა 25 კდ) და თითოეული შედგება ორი სუბერთეულისაგან 12500 კდ. TGF-α-ს გააჩნია უნარი

გამოიწვიოსაგარზევირთაგვისნორმალური ფიბრობლასტების კულტურის არარეგულირებადი ზრდა, აქედან გამომდინარე ფიქრობენ, რომ TGF-α იწვევს მალიგნიზირებელ ტრანსფორმაციას. ამ აზრს ადასტურებს მისი არსებობა ადამიანის სიმსივნეებში ქიმიური კანცეროგენით ტრანსფორმირებულ უჯრედებში (16)

TGF-β თრგუნავს ჰეპატოციტების პროლიფერაციას, აჩერებს რა ამ უჯრედებს G_1 ფაზაში. იგი მოქმედებს რა გვიან G_1 ფაზაზე ასევე აინჰიბირებს ეპითელური უჯრედების პროლიფერაციას, TGF-β ახასიათებს მრავალგვარი ეფექტი, რაც თავის მხრივ დამოკიდებულია უჯრედების ან ქსოვილის ტიპზე, აგრეთვე სხვა ზრდის ფაქტორების არსებობა-არარსებობაზე (11)

TGF-β1 ზრდის კონტროლი დამოკიდებულია უჯრედების ასაკზე, სიმკვრივეზე და სხვა ზრდის ფაქტორების არსებობაზე. იგი აკავებს FGF-ის მოქმედებით გამოწვეულ ენდოთელურ ზრდას (17)

ეპიდერმული ზრდის ფაქტორი ნანახი იქნა სხვადასხვა ქსოვილებსა და უჯრედულ ხაზებში. მისი რაოდენობა მკაცრად კორელირებს ქსოვილების მაღალ პროლიფერაციულ აქტიურობასთან. გარკვეული ზემოქმედების საპასუხოდ (რეცეპტორებზე EGF მოქმედებაანულტრაიისფერი დასხივება,) EGF რეცეპტორებისგან ფორმირდება ჰომო- ან ჰეტერო დიმერები. ყოველი ასეთი დიმერი განიცდის შემდგომ ფოსოფრილირებას და ააქტიურებს სხვადასხვა სასიგნალო გზებს სხვადასხვა Src ჰომოლოგიური (SH2) ეფექტორული ცილების დახმარებით, რასაც მოყვება კასკადის ჩართვა, საბოლოოდ კი უჯრედი პასუხობს პროლიფერაციით და (ან) აპოპტოზით (18)

FGF-ს მოქმედება სპეციფიკური ზედაპირული რეცეპტორების მეშვეობით ხორციელდება. იდენტიფიცირებულია ოთხი ტიპის რეცეპტორი FGFR1 - FGFR4. ყოველი მათგანი შეიცავს იმუნოგლობულინების მსგავს ორ ან სამ დომენს. ამ რეცეპტორებს თიროზინკინაზული აქტიურობა ახასიათებს. ამგვარი რეცეპტორების ოჯახს გააჩნია ჰომოლოგი პროტოონკოგენი FLG. FGFR1 რეცეპტორი წარმოადგენს აგრეთვე უჯრედებში ჰერპესის ვირუსის შეღწევის ადგილს. (11)

PDGF-ს გააჩნია რეცეპტორების ორი კლასი, ერთი მათგანი სპეციფიკურია AA ჰომოდიმერისათვის, ხოლო მეორე კი უკავშირდება AB და BB ტიპის დიმერებს. EGF-ის რეცეპტორების მსგავსად PDGF-ს რეცეპტორს გააჩნია შინაგანი თიროზინკინაზული აქტივობა. PDGF წარმოადგენს პოტენციურ მიტოგენს მეზენქიმიური

წარმოშობისუჯრედებისათვის, როგორებიცაა ფიბრობლასტები და გლუვი კუნთოვანი უჯრედები, თუმცა იგი არ ავლენს ზრდის ეფექტს ეპითელურ და ენდოთელურ უჯრედებში, რომელთაც არ გააჩნიათ PDGF- რეცეპტორები (19)

ინსულინის მსგავსი ზრდის ფაქტორი (IGF)-I, IGF-II და ეპიდერმული ზრდის ფაქტორის EGF ოჯახის ლიგანდები, EGF და ტრანსფორმაციის ზრდის ფაქტორი ალფა, ცნობილია რომ თამაშობენ მნიშვნელოვან როლს ნაყოფის და პოსტნატალურ განვითარებაში. ცნობილია რომ მათი წარმოება ხდება რამოდენიმე ქსოვილში მათ შორის სათესლეში. ჩვენს სისტემაში ისინი სტიმულირებენ სპერმატოგონიების პროლიფერაციას. (20)

ინსულინის მსგავსი ზრდის ფაქტორი I და II წარმოადგენს პოტენციურ ანაბოლურ ჰორმონს, IGF-I ზრდის ფაქტორია, რომელიც სტრუქტურულად ინსულინის მსგავსია. მისი რეცეპტორი ანალოგიურია ინსულინის რეცეპტორისა. იგი შედგება ორი პოლიპეპტიდისგან მოლ. წონით 135000 და 95000 კდ. IGF-II რეცეპტორი არის ერთი პოლიპეპტიდი, განსხვავდება ინსულინის რეცეპტორისაგან და მისი მოლ. წონა არის 250000 კდ. (11) (16)

სისხლძარღვთა ენდოთელიუმის ზრდის ფაქტორი (VEGF) მეტად საინტერესო მოლეკულაა ანგიოგენეზში, რაც განპირობებულია იმით რომ VEGF არის ძლიერ სპეციფიკური მიტოგენური ფაქტორი, რომელიც გარდა ენდოთელური უჯრედების პროლიფერაციისა, განაპირობებს მათ მიგრაციას და ხელს უწყობს ახალი სისხლძარღვების ფორმირებას. ამგვარად, VEGF-ფაქტორი მონაწილეობს ორგანიზმში მიმდინარე როგორც ფიზიოლოგიურ, ასევე პათოლოგიურ პროცესებში, რის გამოც მისი სეკრეციის კონტროლირება, პათოლოგიური პროცესების მიმდინარეობის მართვის შესაძლებლობას იძლევა (21)

1.2.1 სპერმატოგენეზის რეგულაციის გზები

მამრობითი სასქესო უჯრედების მომწიფება ანუ სპერმატოგენეზი რეგულირება მრავალი ფაქტორით. სპერმატოგენეზის რეგულაცია შეიძლება ხორციელდებოდეს როგორც შინაგანი ასევე გარეგანი მექანიზმებით. შინაგანი მექანიზმი: ერთ-ერთი უჯრედი, რომელიც მარეგულირებელ ფაქტორებს ასინთეზირებს არის სათესლის შემაერთებელ ქსოვილში წარმოდგენილი ლეიდიგის უჯრედი. ლეიდიგის უჯრედები ასეკრეტირებენ ჰორმონს (ტესტოსტერონი), ნეიროტრანსმიტერებს (ნეიროენდოკრინული

სუბსტანცია) და ზრდის ფაქტორებს, რომლებიც ხვდებიან სისხლძარღვებში, საკუთრივ სათესლის მილაკში და სერტოლის უჯრედებში. ისინი უზრუნველყოფენ სერტოლის უჯრედების ტროფიკას, ასევე სათესლის მილაკების პერისტალტიკურ მოძრაობას და სპერმატოზოიდების ტრანსპორტს. გარდა ამისა ლეიდიგის უჯრედები არეგულირებენ სისხლის მიმოქცევას მილაკთაშორის სივრცეში. ამასთან ერთად სერტოლის და სპერმატოგენური უჯრედები გამოყოფენ სხვადასხვა ზრდის ფაქტორებს რომლებიც მონაწილეობენ სპერმატოგენური უჯრედების განვითარებასა და რეგულაციაში. ეს მარეგილურებელი ფაქტორი წარმოადგენს სპერმატოგენეზის რეგულაციის დამოუკიდებლ ინტრატესტიკულარულ სისტემას. (22)

სპერმატოგენეზის გარეგანი რეგულაციის მექანიზმი: სპერმატოგენეზის ლოკალურ რეგულაციას აკონტროლებს ჰიპოთალამუსი და ჰიპოფიზი. GRh-ის იმპულსური სეკრეცია ჰიპოთალამუსის მიერ ინიცირებს LH-ს გამოთავისუფლებას ჰიპოფიზის მიერ. LH-ს მოქმედების საპასუხოთ ლეიდიგის უჯრედები ასეკრეტირებს ტესტოსტერონს. ეს უკანასკნელი არამარტო სპერმატოგენეზის პროცესზე, არამედ მთელს ორგანიზმზე მოქმედებს. ამგვარად იგი უზრუნველყოფს უკუკავშირს ჰიპოფიზთან რომლის მექანიზმითაც რეგულირდება ლეიდიგის უჯრედების მოქმედება. FSH-ს სტიმულაცია სერტოლის უჯრედებში აუცილებელია სპერმატოგენური უჯრედების მოსამწიფებლად. სრულფასოვანი, ხარისხიანი სპერმატოგენეზი მოითხოვს როგორც FSH ასევე LH-ს.

ენდოკრინულ და პარაკრინულ ურთიერთქმედება განსაზღვრავს სათესლის ფუნქციონირებას. ინჰიბინი, რომელიც სეკრეტირდება სერტოლის უჯრედების მიერ მონაწილეობს ჰიპოფიზთან უკუკავშრის მექანიზმში. მსგავსი ექსტრატესტიკულური ზემოქმედება მნიშვნელოვანია სათესლის ფუნქციური რეგულაციისთვის. სხვაგვარად რომ ვთქვათ სათესლის სპერმატოგენური უჯრედების ზრდა და დიფერენცირება რეგულირდება როგორც სომატური ასევე ტერმინალური ელემენტების კომპლექსური ურთიერთქმედების ხარჯზე.

იმუნიტეტის მოქმედება სათესლეზე:

სპერმატოზოიდები, სპერმატოციტები გვიან პაქიტენაში, ასევე სპერმატიდები გამოიმუშავებენ სპეციფიურ ანტიგენებს. სქესობრივ მომწიფებამდე ეს ანტიგენები არ წარმოიქმნებიან, ამიტომ იმუნური ტოლერანტობა ამ დროს არ ვითარდება.

ჰემატოტესტიკულური ბარიერი ფორმირდება მას შემდეგ რაც წარმოიქმნება აუტო ანტიგენები.

სათესლე წარმოადგენს იმუნური ტოლერანტობის (უცხო ქსოვილმა გადანერგვისას შეიძლება შეინარჩუნოს სიცოცხლისუნარიანობა გარკვეული პერიოდით იმუნური შეუთავსებლობის გარეშე) ზონას. იმუნური ზემოქმედება ხორციელდება სათესლეში და მის დანამატში, რაც მიუთითებს აქტიურ იმუნორეგულაციაზე, რომელიც იმუნური რეაქციის განვითარებას აფერხებს.

შესაძლებელია როგორც სპერმატოგენური უჯრედების პროლიფერაცის და დიფერენცირების, ასევე ინტრა და ექსტრატესტიკულური მექანნიზმის რეგულაციის დარღვევა. ეს დაზიანებები შეიძლება განვითარდეს გარემო ფაქტორების ზემოქმედებით ან ავადმყოფობით, სპერმატოგენეზის პროცესზე პირდაპირი ან არაპირდაპირი ზემოქმედებით. სპერმატოგენეზის შემცირება ან შეწყვეტა შეიძება გამოიწვიოს კვების პროდუქტებმა, სამკურნალო პეპარატებმა, ჰორმონებმა ან მათმა მეტაბოლიტებმა, სათესლის პარკის მომატებულმა ტემპერატურამ, ტოქსიურმა ნივთიერებებმა, რენდგენის დასხივებამ. (22)

დაწყებული I რიგის სპერმატოციტების სტადიით, როდესაც კროსინგოვერი მიმდინარეობს, სასქესო უჯრედები ორგანიზმისთვის უცხო ანტიგენების მატარებლები ხდება, ამიტომ იმუნური რეაქციების თავიდან აცილების მიზნით აუცილებელია ამ უჯრედების იზოლირება სისხლისა და ლიმფის სისტემებისაგან. ამას ემსახურება ე.წ. ჰემატოტესტიკულური ბარიერი (ჰტბ), რომლის წარმოქმნაში მონაწილეობს სერტოლის უჯრედების მჭიდრო კონტაქტები, ბაზალური მემბრანა, კაპილარების კედლების ენდოთელური უჯერედები და სხვა.

მჭიდრო კონტაქტი სერტოლის უჯრედებს შორის განლაგებულია ისე, რომ ის ერთმანეთისგან გამოყოფს არადიფერენცირებულ ღეროვან უჯრედებს და დიფერენცირების პროცესში მყოფ უჯრედებს.

ღეროვანი უჯრედის სტატუსის შესანარჩუნებლად საჭიროა სპეციფიკური მიკროგარემო .ასეთ მიკროგარემოში დიფერენცირებადი უჯრედის მოხვედრა შეაჩერებს დიფერენცირების პროცესს და უჯრედს ღეროვან სტატუსში დააბრუნებს. ასევე ღეროვანი უჯრედები დაიწყებეს დიფერენცირებას, თუ ისინი მოხვდება დიფერენცირებადი უჯრედებისთვის დამახასიათებელ გარემოში. შესაბამისად, ჰემატოტესტიკულური

ბარიერი (ჰტბ) უზრუნველყოფს ამ ორი სხვადასხვა ტიპის უჯრედების განცალკევებას. საინტერესოა ის მექანიზმი, თუ როგორ გადალახავს პირველი რიგის სპერმატოციტები სერტოლის უჯრედებს შორის არსებულ მჭიდრო კონტაქტებს. მჭიდრო კონტაქტების ერთ-ერთი მთავარი კომპონენტია ცილა კლაუდინ 11.

სპერმატოციტები, რომლებიც ლახავს ჰემატესტიკულურ ბარიერს. ყვითელი ფერი - შეღებვა. ცილა კლაუდინ 11-ზე (ამ ცილის ლოკალიზაცია შეესაბამება ბარიების ადგილმდებარეობას); წითელი - შეღებვა TEX14 ცილაზე (უჯრედშორისი ციტოპლაზმური ხიდაკების კომპონენტი), მისი ლოკალიზაცია შეესაბამება სპერმატოციტების ჯაჭვების (სინციტიუმის) ლოკალიზაციას; ლურჯი - DAPI საღებავით შეღებილი უჯრედების ბირთვები; S — სერტოლის უჯრედბი. ისარი მიანიშნებს სამი სერტოლის უჯრედის შეერთების ადგილს.

როდესაც სპერმატოციტები უახლოვდება ჰტბ-ს სერტოლის უჯრედებში იწყება ცილა კლაუდინ-3-ის (CLDN3) სინთეზი. კლაუდინ-3-ის მონაწილეობით სპერმატოციტების ბაზალურ ნაწილში წარმოიქმნება ბარიერის მეორე შრე ისე, რომ სპერმატოციტები ყველა მხრიდან ბარიერით შემოსაზღვრული ხდება. ბარიერის ძველი შრე იშლება და სპერმატოციტები ღრმა შრეებში გადადის. ახალ ბარიერში კი ხდება კლაუდინ -3-ის კლაუდინ-11-ით ჩანაცვლება და, ამრიგად, ბარიერის სრული აღდგენა.

სპერმატოციტების ჰემატესტიკულურ ბარიერში მოძრაობის სქემა. ვარდისფერი სერტოლის უჯრედები; ცისფერი - სპერმატოციტების ჯაჭვები; ყვითელი - ბარიერი A — სპერმატოციტები უახლოვდება ბარიერს, რაც სერტოლის უჯრედებში ცილა კლაუდინ 3-ის (წითელი) სინთეზს იწვევს; B — კლაუდინ 3-ის მონაწილეობით ფორმირდება ბარიერის ახალი შრე; C — სპერმატოციტები უფრო ღრმად გადაინაცვლებს, ბარიერის ძველი შრე დეგრადირებს, ახალ ბარიერში ხდება კლაუდინ 3-ის კლაუდინ11-ით ჩანაცვლება. (7) (6)

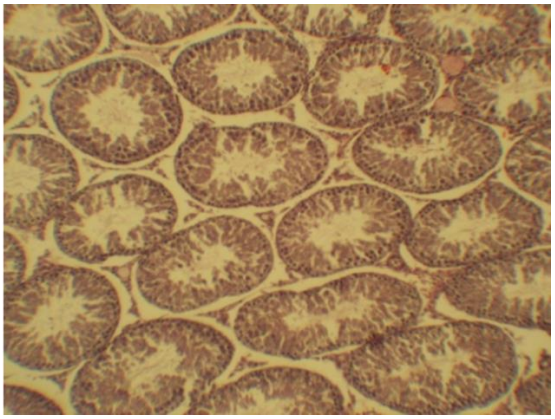
თავი 2. მასალა და მეთოდები

2.1. კვლევის ობიექტი და მასალა

ექსპერიმენტში გამოყენებული იყო ზრდასრული (150გ) და მზარდი (8-10გრ) თეთრი არახაზოვანი ვირთაგვა. კვლევის მასალად გამოყენებულ იყო ზრდასრული ვირთაგვას (200გ) სპერმატოზოიდები. აღნიშნული უჯრედებიდან სპირტული ექსტრაქციის მეთოდით მიღებული იყო თერმოსტაბილური ცილების ფრაქციები (თცკ). ჩატარდა აღნიშნული ფრაქციების შედარებითი ელექტროფორეზული ანალიზი (პოლიაკრილამიდის გელში) და მზარდ ვირთაგვების პროლიფერად უჯრედების გამრავლებაზე მათი მოქმედების შესწავლა.

სათესლის, მიტოზური აქტივობის შესაფასებლად მზარდ ვირთაგვებში შეგვყავდა სპერმატოზოიდის თცკ (200მკგ). ინექცია კეთდებოდა ინტრაპერიტონიალურად. მასალის ვიღებდით კოლხიცინის ხსნარის შეყვანიდან 2 საათით შემდეგ, რომელიც გაანგარიშებული იყო ცხოვრელის წონაზე (1მკგ/1გ). მიტოზური ინდექსის დასადგენად ვითვლიდით არანაკლებ 3000-5000 უჯრედისა.

ცდაში ვიყენებდით ერთი დედის ცხოველებს, სადაც სტატისტიკური გაბნევის მაჩვენებელი მინიმალურია. მიღებულ მონაცემებს ვამუშავებდით სტანდარტული ვარიაციული სტატისტიკის მეთოდით. მონაცემების სარწმუნოების დასადგენად ვიყენებდით სტიუდენტის კრიტერიუმი. მონაცემების სარწმუნოება 95-99% შეადგენს (სურ.5).



სურათი 5. მოზარდი ვირთაგვას სათესლის ჰისტოლოგიური პრეპარატი

2.2. ზრდასრული ვირთაგვას სპერმატოზოიდებიდან თერმოსტაბილური ცილების სპირტული ექსტრაქცია

თეთრი ვირთაგვას სპერმატოზოიდებიდან ცილების ექსტრაქციას ვახდენდით ბულოოს და თანავტორთა მეთოდით (23) სპერმატოზოიდებს ვრეცხავდით ფიზიოლოგიური ხსნარით, ვამატებდით ცივ დისტილირებულ წყალს 1:8 და ვაჰომოგენიზირებდით დაუნსის ტიპის ჰომოგენიზატორში. ჰომოგენატს სწრაფად ვყინავდით თხევად აზოტში ქსოვილოვანი მასის სრულ გაყინვამდე და შემდეგ ვალღობდით ოთახის ტემპერატურაზე. მიღებულ მასალას ვფილტრავდით ოთხკეცა დოლბანდში, ფილტრატს ვამატებდით 96^0 ეთილის სპირტს საბოლოო კონცენტრაციამდე 50^0 ხსნარს ვათავსებდით $+4^0C$ ერთი საათის განმავლობაში, შემდეგ ვაცენტრიფუგირებდით 600გ 10 წუთის განმავლობაში K-23 ტიპის ცენტრიფუგაზე. მიღებულ სუპერნატანტს ვამატებდით 96^0 ეთილის სპირტს ისეთი რაოდენობით, რომ საბოლოო კონცენტრაცია ყოფილიყო 81^0, ხსნარს ვათავსებდით $+4^0C$ ერთი საათის განმავლობაში და ვაცენტრიფუგირებდით იმავე რეჟიმზე. მიღებულნალექს ვხსენიდით წყალში და ვადუღებდით 100^0C-ზე წყლის აბაზანაში 20 წუთის განმავლობაში, შემდეგ ვაცენტრიფუგირებდით, სუპერნატანტს ვყინავდით თხევად აზოტში და ვახდინენდით ლიოფილიზაციას ადსორბციულ-კონდენსაციურ ლიოფილიზატორში. ლიოფილიზატორში ცილის რაოდენობას ვსაზღვრავდით ლოურის მეთოდით.

2.3. კოლხიცინური მიტოზური ინდექსის განსაზღვრა

სათესლის, მიტოზური აქტივობის შესაფასებლად მზარდ ვირთაგვებში შეგვყავდა სპერმატოზოიდის თცკ (200მკგ). ინექცია კეთდებოდა ინტრაპერიტონიალურად. მასალის ვიღებდით კოლხიცინის ხსნარის შეყვანიდან 2 საათით შემდეგ, რომელიც გაანგარიშებული იყო ცხოვრელის წონაზე (1მკგ/1გ). მიტოზური ინდექსის დასადგენად ვითვლიდით არანაკლებ 3000-5000 უჯრედისა.

ცდაში ვიყენებდით ერთი დედის ცხოველებს, სადაც სტატისტიკური გაბნევის მაჩვენებელი მინიმალურია. მიღებულ მონაცემებს ვამუშავებდით სტანდარტული ვარიაციული სტატისტიკის მეთოდით. მონაცემების სარწმუნოების დასადგენად ვიყენებდით სტიუდენტის კრიტერიუმი. მონაცემების სარწმუნოება 95-99% შეადგენს.

2.4. სინათლის მიკროსკოპში შესწავლისათვის მასალის ფიქსაცია პარაფინის ანათლების და პრეპარატების მომზადება

სინათლის მიკროსკოპში ქსოვილების შესასწავლად მასალის ფიქსაციას ვახდენდით Na/K ფოსფატურ ბუფერზე დამზადებულ ფორმალდეჰიდის 4%-იან ხსნარში. ფიქსაციის შემდეგ მასალის გაუწყლოება მიმდინარეობდა სხვადასხვა კონცენტრაციის სპირტების მზარდ რიგში. ქსოვილს ვაყალიბებდით ცვილ-პარაფინის ნარევში. 5-7 მკმ-ის სისქის ანათლებს ვღებავდით ჰემატოქსილინ-ეოზინით. პრეპარატებს ვსწავლობდით სინათლის მიკროსკოპში "ЛОМО".

2.5. სათესლე მილაკის 3D რეკონსტრუქცია

ფიქსირებული სათესლეს ქსოვილიდან ვახდენდით ჰისტოლოგიური პრეპარატების მომზადებას და სინათლის მიკროსკოპში სათესლე მილაკის სერიული ანათლებიდან სხვადასხვა ზომის მონაკვეთების (2მმ,12 მმ) სივრცითი მოდელირებასა და ანალიზს 3Dmax პროგრამით.

თავი 3. მიღებული შედეგები და განხილვა

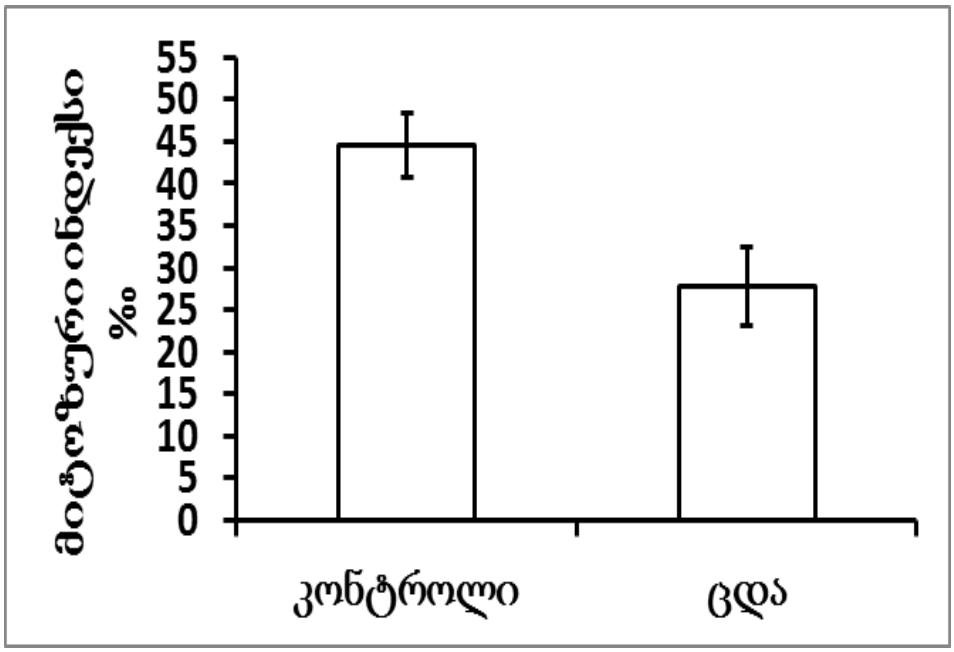
3.1. ზრდასრული ვირთაგვას სათესლედან გამოყოფილი თერმოსტაბილური ცილოვანი კომპლექსის მოქმედება მოზარდი ვირთაგვების ჰომოლოგიური უჯრედების გამრავლებაზე

ზრდასრული თეთრი ვირთაგვას სხვადასხვა ქსოვილების უჯრედები შეიცავს მსგავსი თვისების მქონე თერმოსტაბილური ცილების კომპლექსს. კომპლექსში შემავალ ცილებს , ჰომოლოგიურ ქსოვილების უჯრედებში ტრანსკრიპციის აქტიურობის დათრგუნვის გზით მათ უჯრედების გამრავლების ინჰიბირების უნარი გააჩნიათ ( ). მოცემულ ნაშრომში მიზნად დავისახეთ ექსტრაქციის ანალოგიური მეთოდით (სპირტული ექსტრაქცია) ზრდასრული ვირთაგვას სპერმატოზოიდებიდან ენდოგენური თცკ-ს გამოყოფა და მისი მოქმედების შესწავლა.

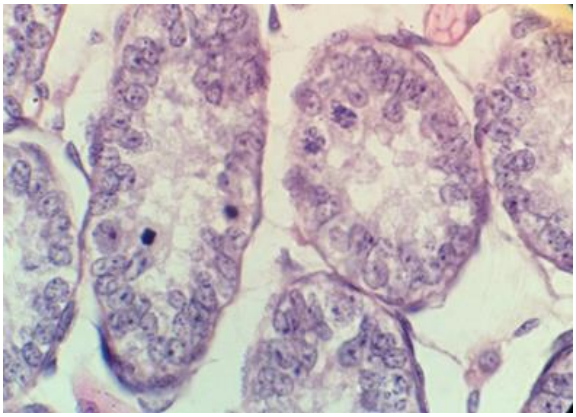
ვირთაგვას სპერმატოზოიდების თერმოსტაბილური ცილოვანი კომპლექსის ზემოქმედების შესასწავლად ცხოველები დავყავით ორ ჯგუფად: I საკონტროლო და II საცდელი ჯგუფები.

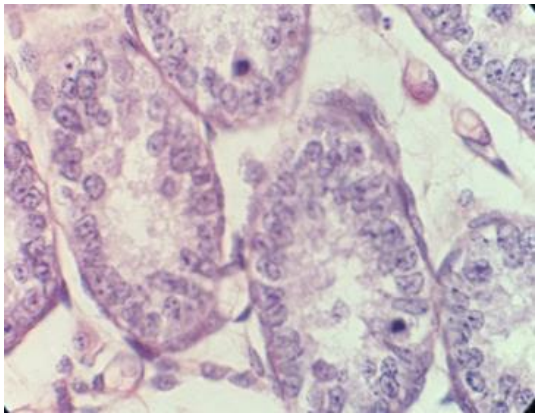
საცდელი ჯგუფის ცხოველებში ინტრაპერიტონეალურად შეგვყავდა სპერმატოზოიდების თცკ-ის 100 მკლ ხსნარი (200 მიკროგრამი ცილაზე გადათვლით თითოეულ ცხოვრელში). I ჯგუფის ცხოველებში ინტრაპერიტონიალურად შეგვყავდა 100მკლ გამხსნელი (გამოხდილი წყალი). აღნიშნული ინექციებიდან ერთი საათის შეემდეგ ორივე ჯგუფის ცხოეველებში ასევე ინტრაპერიტონეალურად შეგვყადა იმავე მოცულობის (100მკლ) კოლხიცინის ხსნარი (1მგ/1კგ-ზე). ინექციიდან 2 საათის შემდეგ ეთერის ნარკოზის პირობებში ვახდენდით ცხოველების დეკაპიტაციას და ვიღებდით სათესლეს ფიქსაციისთვის.

განვსაზღვრეთ მიტოზური ინდექსის მაჩვენებელი სათესლის ქსოვილში. მე-6 სურათზე წარმოდგენილი დიაგრამა გვიჩვენებს, რომ საცდელი ჯგუფის ცხოველების სათესლის ქსოვილის უჯრედების მიტოზური ინდექსის მაჩვენებელი დაახლოებით 38% -ით ქვეითდება სპერმატოზოიდების თცკ-ის ინექციის შემდეგ (სურათი 6). ამრიგდა ჩატარებული გამოკვლევებით დადგინდა რომ სპერმატოზოიდების თცკ მოზარდი ვირთაგვას სათელის ქსოვილის უჯრედების მიტოზური აქტიურობის ინჰიბირებას იწვევს(სურ.7).



სურათი 6. მზარდი ვირთაგვას სათესლის უჯრედების მიტოზური აქტიურობის ცვლილება ვირთაგვას სპერმატოზოიდების თცკ-ს ინექციიდან მე-3 საათზე (P< 0.002)

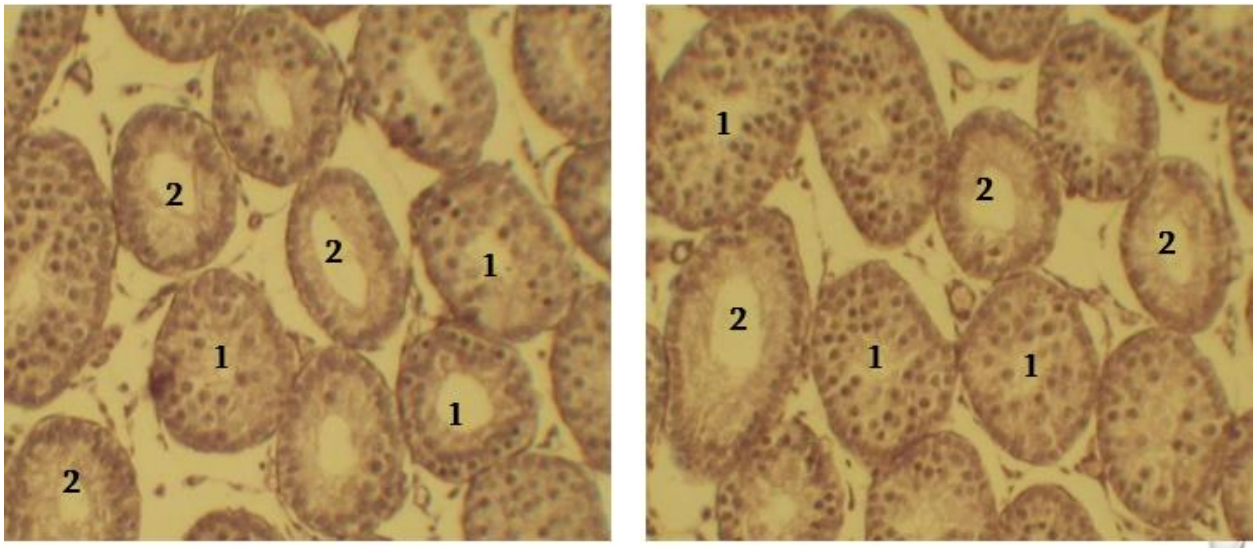




სურათი 7. მოზარდი ვირთაგვას (5-7 დღიანი) სათესლის ჰისტოარქიტექტონიკა (ა - 10x20; ბ - 10x40; H&E) მიტოზური ფიგურები მილაკის სანათურებში.

3.2. 3D რეკონსტრუქციით მოზარდი თეთრი ვირთაგვების სათესლეს ერთი მილაკის ფარგლებში სპერმატოგენულად აქტიური და არააქტიური უბნების მონაცვლეობის შესწავლა

სპერმატოზოიდების თცკ მოზარდი ვირთაგვას სათელის ქსოვილის უჯრედების მიტოზური აქტიურობის ზემოქმედების შესწავლისას, ჩვენს მიერ გამოვლინდა , რომ მოზარდი ცხოველების(7დღიანი) სათესლეს ჰისტოლოგიურ ანათალზე ვლინდება კლაკნილი მილაკები, განსხვავებული სპერმატოგენული აქტიურობის სანათურები , პირობითად აქტიური და არააქტიური. სპერმატოგენულად აქტიური მილაკის სანათუღშიში აღინიშნება გაყოფადი უჯრედები და დიფერონის რამდენმე რიგი (სურ.8/1). არააქტიური მილაკის სანათურში წარმოდგენილია სპერმატოგონიების ერთი რიგი და არ დაიმზირება გაყოფადი უჯრედები (სურ.8/2).

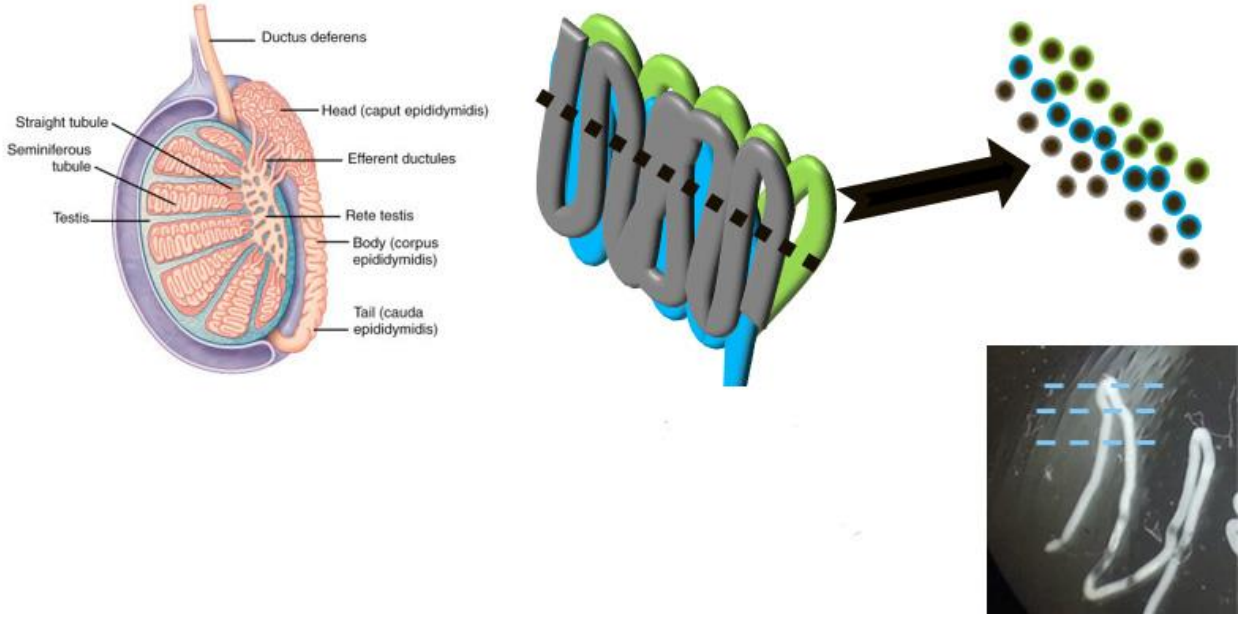


სურ 8. სპერმატოგენულად აქტიური მილაკის ჭრილი (1) და სპერმატოგენულად არააქტიური მილაკის ჭრილი (2).

ანალოგიური განაწილება გამოვლინდა 25 დღიანი ვირთაგვების სათესლეს მილაკებშიც. ექსპერიმენტების შემდეგ სერიაში გამოვიყენეთ ამ ასაკობრივი ჯგუფის ცხოველები. პირველად იქნა ნაჩვენები, რომ ფუნქციურად აქტიური სანათურები ერთნაირი თანაფარდობით ვლინდება სათესლეს ანათლის როგორც ცენტრალურ ნაწილში, ასევე მის პერიფერიაზე. ენდოგენური ზრდის შემაკავებელი ცილოვანი კომპლექსის ზემოქმედების შედეგად (ინტრაპერიტონული ინექცია 200მკგ/100 მკლ) ეს

თანაფარდობა ირღვევა. კერძოდ, ანათლის ცენტრალურ უბანში სპერმატოგენულად აქტიური სანათურების რაოდენობა მცირდება და მათი რაოდენობა იზრდება მის პერიფერიაზე (სურ.8).

კვლევის დროს გამოვლენილი სპერმატოგენულად აქტიური და არა აქტიური მილაკების სანათურების ასეთი განაწილება არ აღინიშნება ზრდასრული ვირთაგვას სათესლეებში. აქედან გამომდინარე, საინტერესოდ მივიჩნიეთ დაგვედგინა აქტიური და არაქტიური სანათურები ეკუთვნის ერთიდაიგივე სათესლე მილაკს, თუ შეიძლება ვხედავთ ერთი და თუ სხვადასვა მილაკს განსხვავებული სპერმატოგენული აქტიურობით? თუ გავიხსენებთ სათესლეს წილაკებში მილაკების განლაგებას, წილაკის განივ ჭრილზე დავინახავთ არა მხოლოდ ერთი მილაკის სანათურს არამედ სხვადასხვა მილაკების სანათურებს (სურ.9).



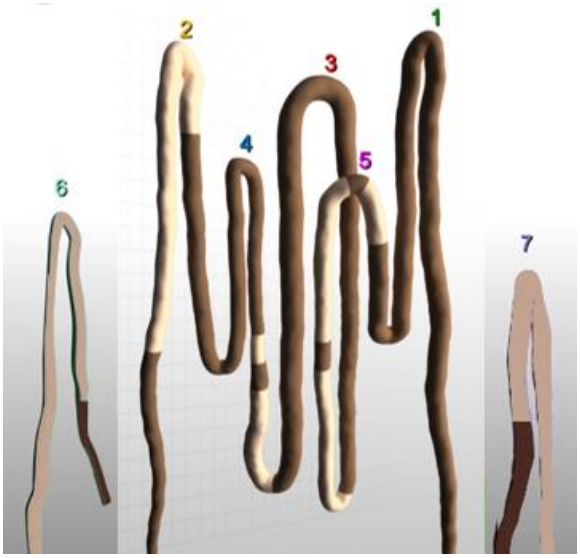
სურ. 9 სათესლეს მილაკების რეკონსტრუქციის მოდელი

გამომდინარე იქიდან, რომ ჩვეულებრივ ანათალზე შეუძლებელია შეფასდეს სპერმატოგენულად განსხვავებული სანათურები ერთი კლაკნილი მილაკის სხვადასხვა უბანია თუ სხვადასხვა მილაკებს ეკუთვნის, კვლევის ამ ეტაპზე მოვახდინეთ სათესლის კლაკნილი მილაკებისს 3D რეკონსტრუქცია.

დავამზადეთ მოზარდი ვირთაგვას სათესლეს 343 სერიული ანათალი. ჩავთვალეთ რომ მილაკის რეკონსტრუქციის ოპტიმალური მიდგომა იქნებოდა თუ

დავაკვირდებოდით უბანს, რომელიც წარმოადგენს მარყუჟს და რომელიც გაგრძელდებოდა 1 მილაკის 2 სანათურის სახით: ლათინური უ-ს მაგვარად. ასეთი 7 უბანი გამოირჩა.

სერიული ანათლების მიკროსკოპულმა ანალიზმა გვიჩვენა სათესლეს კლაკნილი მილაკის სხვადასხვა ზომის მონკვეთები(2მმ,12 მმ), რომლებშიდაც გამოვლინდა სპერმატოგენულად აქტიური და არააქტიური უბნების მონაცვლეობით განლაგება. მოზარდი ვირთაგვას სათესლის კლაკნილი მილაკების 3D რეკონსტრუქციის საფუძველზე დადგინდა, რომ ერთი მილაკის ფარგლებში სპერმატოგენულად აქტიური და არააქტიური უბნების მონაცვლეობა კანონზომიერი მოვლენაა და ასაკობრივ თავისებურებად შეიძლება ჩაითვალოს (სურ.10).

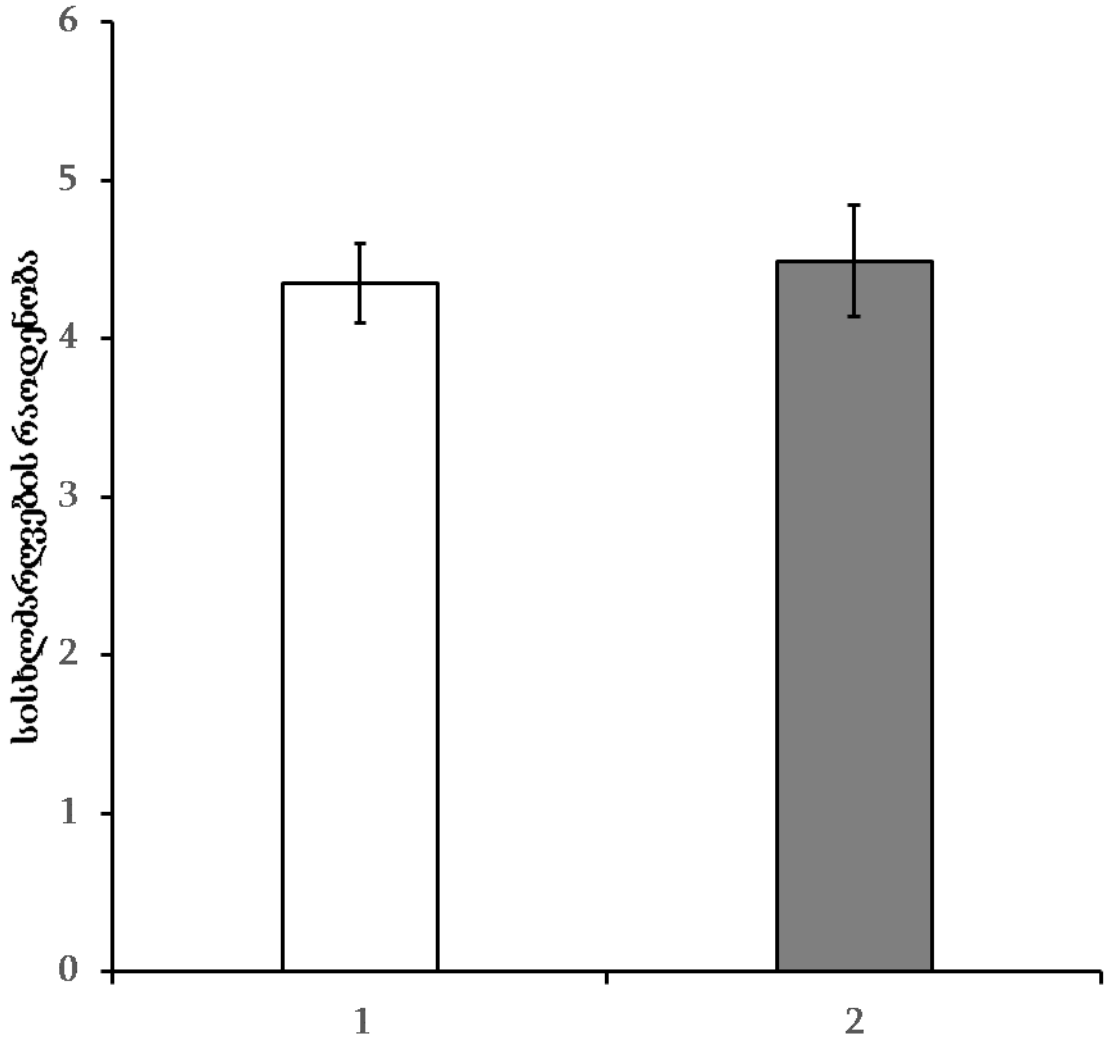


სურათი 10. მოზარდი ვირთაგვას რეკონსტრუირებული სათესლე მილაკი (მილაკის ფარგლებში 2, 6 7 სპერმატოგენულად არააქტიური უბნები; 1, 3, 4, 5 - სპერმატოგენულად აქტიური უბნები)

3.3. 3D რეკონსტრუქციით მოზარდი ვირთაგვის სათესლეს მილაკების ვასკულარიზაციის თავისებურებების შესწავლა

25 დღიანი ვირთაგვების სათესლეს ანათლის ცენტრსა და პერიფერიაზე, როგორც ზემოთ იყო აღნიშნული, გამოვლინდა სპერმატოგენულად აქტიური და არააქტიური სანათურების განსხვავებული განაწილება. ვივარაუდეთ რომ ეს შეიძლება დაკავშირებული იყოს სათესლეს სხვადასხვა უბნების სისხლის განსხვავებულ მომარაგებასთან. აქედან გამომდინარე, კვლევის პროცესში მილაკების რეკონსტრუქციასთან ერთად ვაკვირდებოდით სისხლძარღვების განაწილებას ინტერსტიციუმში მილაკების ირგვლივ. დაკვირვებისას არ გამოვლინდა სისხლძარღვების განაწილებაში განსხვავება. კერძოდ ანათლის ცენტრსა და პერიფერიაზე სისხლძარღვოვანი ქსელი ერთნაირად იყო წარმოდგენილი. ამასთანავე აღმოჩნდა, რომ კლაკნილი მილაკების როგორც აქტიურ ასევე, არააქტიურ უბანთან სისხლძარღვების განაწილება იყო თანაბარი.

ლიტერატურული მონაცემებით, მოზარდ ვირთაგვას მიკროსისხლძარღვების არქიტექტონიკა საბოლოოდ ფორმირდება მხოლოდ დაბადებიდან 35 დღისთვის. ეს ეხება სათესლე მილაკების და ასევე ინტერსტიციციალური უჯრედების მიმდებარ კაპილარულ ქსელებს. ზემოთ აღნიშნულიდან გამომდინარე, შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ სათესლეს არაორგანიზებული კაპილარული ქსელების არსებობით არის განპირობებული სპერმატოგენულად განსხვავებული აქტიურობის სათესლე მილაკების არსებობა მოზარდი ვირთაგვას სათესლე მილაკებში (სურ.11).



სურათი 11სურ. მოზარდი ვირთაგვას სათესლეში კლაკნილი მილაკების სპერმატოგენულად აქტიურ და არააქტიურ სანათურებთან სისხლძარღვების განაწილება

დასკვნები:

1. ზრდასრული ვირთაგვას სათესლეს უჯრედები შეიცავს თერმოსტაბილურ ცილოვან კომპლექსს (თცკ), რომელსაც მოზარდი ვირთაგვას სათესლეში ჰომოლოგიური უჯრედების გამრავლების ინჰიბირების უნარი აქვს.

2. მოზარდი ვირთაგვას სათესლის კლაკნილი მილაკების 3D რეკონსტრუქციის გზით გამოვლინდა სპერმატოგენეზის მიმდინარეობის ასაკობრივი თავისებურება, რომელიც ერთი მილაკის ფარგლებში სპერმატოგენულად აქტიური და არააქტიური უბნების მონაცვლეობაში გამოიხატება.

3. სპერმატოგენულად განსხვავებული სანათურების არსებობასა და მათთან სისხლძარღვების არათანაბარ განაწილებას შორის არ გამოვლინდა კორელაცია, რაც ამ ასაკობრივი ჯგუფისთვის დამახასიათებელი ფორმირებადი მიკროსისხლძარღვების არქიტექტონიკით შეიძლება აიხსნას.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. Yan YC[1], Sun YP, Zhang ML.Testis epidermal growth factor and spermatogenesis. . Arch Androl. 1998 Mar-Apr;40(2):133-4

1. Saucedo L[1], Rumpel R[2], Sobarzo C[3], Schreiner D[2], Brandes G[2], Lustig L[3], Vazquez-Levin MH[1], Grothe C[2], Marín-Briggiler C[1].Deficiency of fibroblast growth factor 2 (FGF-2) leads to abnormal spermatogenesis and altered sperm physiology. J Cell Physiol. 2018 Dec;233(12):9640-9651.
2. Ning Qu 1,2,* , Masahiro Itoh 2 and Kou Sakabe . Effects of Chemotherapy and Radiotherapy on Spermatogenesis: The Role of Testicular Immunology. 1 Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 957
3. B.Carlson Human Embryology and Developmental Biology , 5th ed. 2014
4. http://www.uwyo.edu/wjm/repro/spermat.htm
5. В.С.Баранов, Т.В. Кузнецова. Цитогенетика эмбрионального развития человека., 2007
6. ჩერქეზია ე.ლექციები განვითარების ბიოლოგიაში.
7. G.V. Sherbet. Growth Factors and Their Receptors in Cell Differentiation, Cancer and Cancer Therapy. // Elsevier, 2011.
8. Goustin AS, Leof EB, Shipley GD, Moses Hl -Growth factors and cancer, Cancer res. 1999 Mar;46(3):1015-29.
9. Satoshi Amano- Possible Involvement of Basement Membrane Damage in Skin Photoaging, 2009 The Society for Investigative Dermatology, Inc. Published by Elsevier Inc.
10. Dijke P.T, Goumans M., 2002 Regulation of cell proliferaiotn by Smad proteins. J. Cell biology 191, 1-16.
11. D.Dzidziguri, M. Iobadze, T. Aslamazishvili, G. Tumanishvili, V. Bakhutashvili, T. Chigogidze, L. Managadze. Comparative study of influence of endogenic kidney factors on the proliferative activity of epitheliocytes. Tsitologiya. 2005, 47(6): 497-500)
12. 13 Kiefer P, Peters G, and Dickson C. Retention of fibroblast growth factor 3 in the Golgi complex may regulate its export from cells. Mol Cell Biol 13: 5781-5793. 1995)
13. Wahab NA, Yevdokimova N, Weston BS, Roberts T, Li XJ, Brinkman H, Mason RMet al., 2001, Role of connective tissue growth factor in the pathogenesis of diabetic nephropathy, BIOCHEMICAL JOURNAL, Vol: 359, Pages: 77-87, ISSN: 0264-6021

14. Mandal M. et all 2003 Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. Moll cell biochem 253: 269-285.

15. King M.W. 1999 Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. Science 285, 418-422.

16. Parker T.G. et al. 1991 Growth factors, proto-oncogenes and plasticity of the cardiac phenotype

17. Lin SY[1], Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. Nat Cell Biol. 2001 Sep 3(9): 802-8.

18. Ross R. et al. 1990 Peptide growth factors and their receptros Science 248: 1009-101

19. (Wahlgren, Aida Growth factors in permatogenesis : 2003-06-06 Location: Skandiasalen, Astrid Lindgrens Barnsjukhus

20. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn A. - Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. Pharmacol Rev. 2004 Dec; 56(4): 549-80.

21. http://meduniver.com/Medical/Physiology/reguliacia_spermatogeneza.html

22. Bullough W. Hewett C. Laurence E. The epidermal chalone: a preliminary attempt at isolation. Exp. Cell Res. 36, 192-200)18