ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო
უნივერსიტეტი
მედიცინის ფაკულტეტი

სტრუქტურირებული სადოქტორო პროგრამა ტრანსლაციური ბიომედიცინა (მიმართულება - “ჰეპატოლოგია“)“

ქეთი ცომაია

ღვიძლის სტრუქტურული გარდაქმნები რეზექციისა და განმეორებითი რეზექციის შემდეგ (ექსპერიმენტული კვლევა)

მედიცინის დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად
წარდგენილი დისერტაციის

ავტორეფერატი

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: პროფესორი დიმიტრი კორძაია

2021 წელი
თბილისი

ღვიძლის რეზექციის შემდგომი ღვიძლის რეგენერაცია ერთ-ერთი ყველაზე ინტენსიურად შესწავლადი პროცესია. ამ ინტერესის გამძაფრება გამოწვეულია უკანასკნელ ათწლეულებში ღვიძლის რეზექციის საჭიროების მომატებით. კლინიკაში ღვიძლის რეზექციების გახშირებას საფუძველს უქმნის ისიც, რომ ღვიძლის რეზექციის სხვადასხვა მოდიფიკაცია ადვილად მოდელირებად ოპერაციას წარმოადგენს ექსპერიმენტულ კვლევებში, განსაკუთრებით მცირე ლაბორატორიულ ცხოველებში (მღრღნელებში). ექსპერიმენტულად დადასტურებულია, რომ ჰეპატექტომიის (პჰ) შემდგომ მე-7 - მე-8 დღეს (ზოგი ავტორის მონაცემით კი - 2 კვირის თავზე) ვირთგვის ღვიძლი პრაქტიკულად სრულად აღიდგენს თავის ზომებს და მასას. რეზექციის შემდგომი ღვიძლის რეგენერაციის ფენომენის შესწავლა მოიცავს რამდენიმე მიმართულებას: 1) ღვიძლის რეგენერაციის აღმძვრელი სტიმულების კვლევა; 2) ღვიძლის რეგენერაციის წარმმართველი, ხოლო ღვიძლის მასის აღდგენის შემდეგ - მისი შემწყვეტი მექანიზმების კვლევა; 3) ღვიძლის რეგენერაციისას სტრუქტურული (უჯრედული და ქსოვილოვანი) ტრანსფორმაციის კვლევა. ღვიძლის რეგენერაციის მექანიზმების კვლევისადმი მიძღვნილ ნაშრომთა სიმრავლის ფონზე გარკვეულწილად პარადოქსულია ის ფაქტი, რომ პრაქტიკულად შეუსწავლელია პჰ-ის შემდგომი ღვიძლის რეგენერაციის სტრუქტურული მხარე: - როგორი შენებისაა რეგენერირებული ღვიძლი და რითი განსხვავდება ის ნორმული ღვიძლისაგან?

კოროზიული პრეპარატების მეთოდებით მორეგენერაციე ღვიძლის მილოვანი სტრუქტურების დინამიკაში გამოკვლევას შეუძლია დასაბუთებული პასუხი გასცეს ზემოთ დასმულ კითხვას. ამრიგად, პჰ-ის შემდგომ ღვიძლის რეგენერაციის სტრუქტურული თავისებურების ადეკვატურად შეფასებისათვის, საჭიროა გაირკვეს:

1. რას ნიშნავს ღვიძლის რეგენერაცია უჯრედულ დონეზე? (ანუ ხდება ჰეპატოციტების პროლიფერაცია თუ ჰიპერტროფია? თუ ორივე ერთად? თუ ერთი პროცესი დინამიკაში ჩანაცვლდება მეორით?).

2. რას ნიშნავს ღვიძლის რეგენერაცია წილაკების დონეზე? პჰ-ის შემდეგ ღვიძლის დარჩენილი ქსოვილის მოცულობაში ზრდა განპირობებულია წილაკების რაოდენობის მატებით ანუ ახალი

წილაკების წარმოქმნით, თუ არსებული წილაკების მოცულობაში მატებით? თუ უკანასკნელით, რის ხარჯზე ხდება ეს მატება, ჰეპატოციტების რაოდენობის თუ ზომაში მომატების ხარჯზე?

3. რას ნიშნავს ღვიძლის რეგენერაცია პორტული და კავალური ტრაქტების მილოვანი სტრუქტურების და მათი გამომფენი უჯრედების დონეზე? როგორ „მიჰყვება“ ორგანოს მოცულობაში ზრდას კარის და ღვიძლის ვენის, არტერიისა და ნაღვლის სადინარის ტოტები, ასევე ლიმფური მილები - „ახალი დატოტიანების“ შექმნით, თუ ძველი ტოტების „დაგრძელებით“?

4. რა განსხვავებაა ნორმული და რეგენერირებული ღვიძლის არქიტექტონიკას შორის?

ასეთი კითხვების არსებობა ადასტურებს წარმოდგენილი ღვიძლის რეგენერაციის შემდგომი კვლევის მნიშვნელობასა და აქტუალურობას.

წინამდებარე ნაშრომი ემსახურება ღვიძლის რეგენერაციის რთული მოზაიკური სურათის იმ ფრაგმენტებით შევსებას, რომლის გარეშეც შეუძლებელია ამ სურათის მთლიანობაში წარმოდგენა.

მეცნიერული სიახლე: ვირთაგვის ღვიძლის რეგენერაციის პროცესი არ მთავრდება მისი 2/3-ის რეზექციიდან ახლო ვადებში. პერმანენტულად გრძელდება ტრანსფორმაციები, რომლებიც საფუძვლად უდევს ღვიძლის წილაკების სივრცული არქიტექტონიკის ცვლილებებს, მათ შორის, „მეგაწილაკების“ ფორმირებას, კერძოდ:

1. სისხლძარღვოვანი ქსელის გარდაქმნა, როგორც არსებული სტრუქტურების ფორმისა და ზომის ცვლილებით, ისე ახალი სინუსოიდური კაპილარების და ვენულების ფორმირებით;

2. ჰეპატოციტთა ფორმისა და ზომის ცვლილებები, რასაც თან ახლავს ახალი უჯრედშორისი კავშირების ჩამოყალიბება, მათ შორის, ფორმაშეცვლილი მეზობელი ჰეპატოციტების ატიპიური მემბრანული მორჩების ჩართულობით.

კვლევის მიზანი: კვლევის მიზანს წარმოადგენს ღვიძლის ქსოვილის რეზექციისშემდგომი სტრუქტურული ცვლილებების გამოკვლვა ოპერაციიდან ადრეულ და შორეულ ვადებზე და რეგენერირებული და ნორმული ღვიძლების არქიტექტონიკის შედარებითი ანალიზი.

კვლევის მეთოდოლოგია

<u>მასალა</u>

კვლევა ჩატარდა თსუ ალექსანდრე ნათიშვილის სახელობის მორფოლოგიის ინსტიტუტში, Wistar-ის ჯიშის 64 ზრდასრულ მამრ ალბინოს ვირთაგვაზე, წონით 150-300 გრამი.

<u>კვლევის დიზაინი</u>

ერთი და იმავე ასაკის (4 თვის) ცხოველები დაყოფილი იყო სამ საკვლევ - SG1, SG2 და SG3 - ჯგუფად. საკონტროლო ჯგუფის ვირთაგვები წარმოადგენდნენ თითოეული ჯგუფისთვის ასაკობრივად იდენტურ ცხოველებს, რომელთაც იმავე ვადებში ჩატარებული ქონდათ ე.წ. ცრუ ოპერაცია.

SG1-ში შემავალი ვირთაგვების ღვიძლის რეგენერაციას ვიკვლევდით ღვიძლის 70%-იანი რეზექციიდან პირველი ორი კვირის განმავლობაში - სხვადასხვა საათობრივ-დღიურ რეჟიმში. კონტროლად ვიღებდით იმავე ვირთაგვების რეზეცირებული ღვიძლის ქსოვილს და პირველი საკონტროლო ჯგუფის - CG1-ის - ვირთაგვების ღვიძლს.

SG2-ში შემავალი ვირთაგვების ღვიძლის რეგენერაციას ვიკვლევდით ღვიძლის 70%-იანი რეზექციიდან 9 თვის შემდეგ. კონტროლად ვიღებდით მეორე საკონტროლო ჯგუფის - CG2-ის - ვირთაგვების ღვიძლს.

SG3-ში, ღვიძლის რეზექციიდან 9 თვის თავზე ცხოველებს ვუტარებდით განმეორებით რეზექციას - რე-რეზექციას. ღვიძლის რეგენერაციას ვსწავლობდით რე-რეზექციიდან 6 თვის შემდეგ.

ვირთაგვების ღვიძლის ქსოვილს ვიკვლევდით ჰისტოლოგიური, ჰისტოქიმიური, იმუნოჰისტოქიმიური, კონტრასტირებული გამჭირვალე პრეპარატების და მორფომეტრიული მეთოდებით, ასევე ღვიძლის ტუბლური სტრუქტურების კოროზიული ტვიფრების მასკანირებელი ელექტრონული მიკროსკოპიის მეთოდით.

ოპერაციული მოდელი

ღვიძლის 70%-იანი რეზექცია

ქირურგიული ოპერაციები ცხოველებზე ტარდებოდა დილით, უზმოზე, დიეთილეთერის ზოგადი ანესთეზიის ქვეშ. ცხოველთა მოვლის პროტოკოლი ითვალისწინებდა National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals-ის რეკომენდაციებს. ექსპერიმენტებამდე და ოპერაციის შემდეგ ცხოველები იმყოფებოდნენ მათთვის კომფორტულ ლაბორატორიულ პირობებში.

ოპერაციის მსვლელობა: საოპერაციო მაგიდაზე დამაგრებულ გამათბობელ ლეიბზე ოთხივე კიდურით ფიქსირებული ვირთაგვის მუცელი სუფთავდებოდა თმიანი საფარველისგან ქირურგიული მოხრილი მაკრატლით, მუშავდებოდა სპირტით და ბეტადინით. მუცლის ღრუ იხსნებოდა შრეობრივად. მუცლის ღრუს გახსნის შემდეგ ფართოვდებოდა ჭრილობის კიდეები. ჰემიჰეპატექტომია ხორციელდებოდა Claudia Mitchell & Holger Willenbring- ის ორკვანძოვანი მეთოდის გამოყენებით. პირველი კვანძის დადების შემდეგ, იკვეთბოდა მარცხენა ლატერალური წილი (ღვიძლის მასის ~ 26%), მეორე კვანძის დადების შემდეგ - ღვიძლის მედიანური წილი (ღვიძლის მასის 38-42 %).

ამოკვეთილი წილები ფიქსირდებოდა 10%-იან ფორმალინის ხსნარში. ისინი წარმოადგენდნენ კონტროლს რეგენერაციის შემდგომი ღვიძლის ქსოვილთან შესადარებლად.

განმეორებითი ჰემიჰეპატექტომია

რეგენერირებული ღვიძლის რე-რეზექცია ხორციელდებოდა პირველი ოპერაციიდან 9 თვის შემდეგ. ნარჩენი ღვიძლი, წარმოდგენილი იყო მარჯვენა ლატერალური წილის ზემო და ქვემო სეგმენტებით და წინა და უკანა კაუდალური წილებით. „ერთკვანძოვანი მეთოდით“ ვახდენდით მარჯვენა ლატერალური წილის ორივე სეგმენტის სისხლძარღვების ლიგირებას. ღვიძლის რეზეცირებული ქსოვილი შეესაბამებოდა ნარჩენი ღვიძლის 70%-ს.

კვლევის მეთოდები

ოპერაციიდან განსაზღვრულ ვადებზე ცხოველს ვაძინებდით ეთერის ნარკოზით და ვაფიქსირებდით საოპერაციო მაგიდაზე. იხსნებოდა მუცლის ღრუ. აღინიშნებოდა ზომიერი შეხორცებები ღვიძლის ნარეზექციებ ადგილებთან. შეხორცებების გათიშვის შედეგად იდენტიფიცირდებოდა ღვიძლის ნორმულთან შედარებით მკვეთრად გადიდებული წილები (SG1და SG2 -ში)/წილი (SG3-ში).

მასალის აღებიდან 24-საათში ხდებოდა მასალის მაკრომორფოლოგიური დამუშავება ჰისტომორფოლოგიური გამოკვლევისათვის. თითო წილიდან ვიღებდით 3-3 ნიმუში.

<u>ჰემატოქსილინ-ეოზინი (H&E)</u>

ჰისტოლოგიური კვლევისთვის ხდებოდა მაკრომოროფლოგიურად დამუშავებული ღვიძლის ქსოვილიდან 3-μm ანათლების აღება და ჰემატიქსილინითა და ეოზინის სტანდარტული მეთოდით შეღებვა.

<u>ჰისტოქიმია</u>

ღვიძლის ქსოვილი იჭრებოდა 3-5 μm ანათლებად და იღებებოდა მასონის ტრიქრომით (Sigma Aldrich Catalog Number: C970D37) მწარმოებლის მიერ მითითებული ინსტრუქციის შესაბამისად.

<u>იმუნოჰისტოქიმია</u>

იმუნოჰისტოქიმიური კვლევისთვის გამოყენებული იქნა MyBiosourse-ის ანტისხეული Keratin-8 (კატალოგის ნომერი #MBS8510691). განზავების დონე: 1:200 0,01M ფოსფატურ ბუფერში (PBS) pH7.4 (Sigma Aldrich).

ჰისტოლოგიურ პრეპარატები შემოწმდა Primo star ZEISS-ის სინათლის მიკროსკოპით (გერმანია), რომელიც აღჭურვილია ციფრული კამერით (ZEN 2.3 SP1).

<u>მორფომეტრია</u>

მორფომეტრიული ანალიზისათვის ჩვენს მიერ შერჩეულ იქნა:

ა) ღვიძლის აცინუსის პირველი ზონის ის ჰეპატოციტები, რომელიც განლაგებულია მეზობელი პორტული ტრიადების დამაკავშირებელი ხაზის მიმდებარედ (ორივე მხარეს);

ბ) ღვიძლის აცინუსის მესამე ზონის ის ჰეპატოციტები, რომლებიც განლაგებულია ღვიძლის წილაკის ცენტრალური ვენის ირგვლივ;

კვლევის მორფომეტრიული ანალიზისთვის ვიყენებდით CK8 მარკერით შეღებილ ჰისტოლოგიურ პრეპარატებს.

ჰისტოლოგიური პრეპარატები სკანერდებოდა Motic Digital Slide Scanner-ზე და ანალიზი ტარდებოდა Motic Digital Scanner Assistant Software Motic VM 3.0.-ის საშუალებით. სამუშაო არე დიდდებოდა 40 ჯერ და უჯრედების მემბრანების მოხაზვა ხდებოდა მანუალურად. მორფომეტრიული ანალიზისთვის ვარჩევდით იმ უჯრედებს, რომელთა მემბრანა და ბირთვი სრულად ვიზუალიზდებოდა.

<u>კონტრასტირებული გამჭირვალე პრეპარატები</u>

ტუშ-ჟელატინის ნარევის (1:3) ინიექცია ხორციელდებოდა მანომეტრთან კომუტირებული შპრიცით.

<u>კოროზიული ტვიფრების მასკანიერებელი ელექტრონული მიკროსკოპია</u>

საინექციო გამყარებადი მასის შემუშავება

კოროზიული მიკროპრეპარატების მისაღებად ჩვენ გამოვიყენეთ Protacryl -M, რომელიც ფართოდ გამოიყენება სტომატოლოგიურ პრაქტიკაში. Protacryl -M წარმოადგენს ფხვნილოვანი (პოლიმეთილმეტაკრილატი) და თხევადი (აკრილის ჯგუფის მონომერი) კომპონენტების კომბინაციას. Protacryl-M-ის ფხვნილოვანი კომპონენტს ვანაცვლებდით დისპერსიის უფრო მაღალი ხარისხის მქონე MAYCRYL C.C. Powder-ით. მიღებული ნარევის ვალიდაციას ვახდენდით ინ-ვიტრო (სტენდური) და ინ-ვივო ექსპერიმენტებში.

სტენდურ ცდებს ვატარებდით საინექციო გამყარებადი მასის (სგმ) ისეთი მახასიათებლების განსაზღვრისათვის, როგორებიცაა: ა) სგმ-ის ჰომოგენურობა გამყარებამდე და გამყარების (პოლიმერიზაციის) შემდეგ; ბ) გამყარების დაწყების დრო; სრული გამყარების დრო; გ) გამყარების ტემპერატურა; გამყარების პროცესში „შედგომის“ (shrinkage) ხარისხი; დ) (კოროზიული აგენტების (მჟავა ან ტუტე) მიმართ სენსიტიურობა/მდგრადობა; ე) კოროზიის დრო; ვ) ტვიფრის სიმყარე; ზ) შეღებვადობა (ფერის სიმკვეთრე და მდგრადობა წყლისა და ტუტის მიმართ); თ) სინათლის მიკროსკოპით გამოკვლევის შესაძლებლობა; ი) ელექტროგამტარი მასალით ხარისხიანად დაფარვის (coating) შესაძლებლობა ელექტრონული მასკანირებელი მიკროსკოპით გამოკვლევისათვის; კ) მასკანირებელ ელექტრონულ მიკროსკოპში ელექტრონებით დაბომბვისადმი მდგრადობა; ლ) მასკანირებელ ელექტრონულ მიკროსკოპში როგორც მაღალი, ისე დაბალი ვაკუუმის პირობებში გამოკვლევის შესაძლებლობა; მ) მასკანირებელ ელექტრონულ მიკროსკოპში სხვადასხვა გაზომვისა და რენტგენოსპექტრული ანალიზის ჩატარების შესაძლებლობა; ნ) წვრილ ტუბულებში გაღწევის და მათი რეპლიკაციის უნარი; ო) ტუბულური სტრუქტურის სანათურისმხრივი ზედაპირის რეპლიკაციის უნარი; პ) „ნაჟღენთის“ წარმოქმნის და ლიმფური მილების ინიცირების უნარი; ჟ) ქსოვილოვანი სივრცეების რეპლიკაციის უნარი.

ინ-ვივო ვალიდაცია მოვახდინეთ ვისტარის ჯიშის ზრდასრულ 14 თეთრ მამრ ვირთაგვებში, წონით 180-220 გ. ინიექცია ხორციელდებოდა დიეთილ ეთერის ინჰალაციური ნარკოზის ქვეშ, სისხლის კალაპოტის წინასწარი გამორეცხვის შემდეგ 0.1 მლ. ჰეპარინის შემცველი 0,9%-იანი ფიზიოლოგიური ხსნარით (გამორეცხვის დრო - 20 მლ/წთ -ში).

მანიპულაციები ტარდებოდა ქირურგიული სათვალის გამოყენებით. სამ ვირთაგვაში გსმ-ის ინიექცია განხორციელდა გულმკერდის აორტიდან, 2 შემთხვევაში პორტული ვენიდან და 2 შემთხვევაში ერთროულად კარის ვენიდან და აორტიდან .

პოლიმერიზაცია ხდებოდა ოთახის ტემპერატურაზე.

<u>კოროზიული მიკრო-პრეპარატების მასკანირებელი ელექტრონული მიკროსკოპია</u>

ინიექციებული მასის პოლიმერიზაციის შემდეგ ქსოვილების დაშლა ხორციელდებოდა 20%-იანი KOH-ის ხსნარით, ოთახის ტემპერატურაზე. ნიმუშები ყოველი 2 საათის შემდეგ გადაგვქონდა გამოხდილ წყალში, რომელსაც სამჯერ ვცვლიდით ყოველ 10 წუთში.

მაცერაციის დასრულების შემდეგ ნიმუშები 10 წუთით თავსდებოდა Triton X-100-ის ხსნარში და შემდეგ ირეცხებოდა გამდინარე წყლის მსუბუქ ნაკადში - 10 წუთის განმავლობაში.

კოროზიულ ტვიფრებს ვიკვლევდით ProScope დიგიტალური კამერით და მასკანირებელი ელექტრონული მიკროსკოპით [JEOL-JSM-6510LV და Hitachi S-570). კვლევისათვის კოროზიული ტვიფრები იფარებოდა ოქროს ფენით, JEC-3000FC (Tokyo BOEKI Group, Japan აპარატის გამოყენებით (ვაკუუმი = 3.2 პა, დაფარვის დრო = 180 წმ)).

<u>სტატისტიკური ანალიზი</u>

ჰეპატოციტების ფართობისა და პერიმეტრის გაზომვის შედეგები, როგორც რაოდენობრივი ცვლადები, წარმოდგენილია მედიანის სა-

ხით.რაოდენობრივი ცვლადები შედარდა t ტესტის გამოყენებით.

ყველა P სიდიდე იყო ორმხრივი და მნიშვნელოვნების დონე იყო და ყენებული 0.05-ზე.

სტატისტიკური ანალიზისათვის გამოყენებულ იქნა პროგრამა SAS 9.2.

კვლევის შედეგები და განხილვა

<u>კოროზიული მიკროპრეპარატების მისაღებად გამყარებადი საინიექციო მასის აპრობაცია</u>

ჩვენს მიერ ზემოთ ჩამოყალიბებულ მოთხოვნებს ყველაზე მეტად აკმაყოფილებს გამყარებადი საინიექციო მასა ზემოაღნიშნული კომპონენტების შემდეგი პროპორციებით: 0.25 გ გაცრილი MAYCRYL C. C. ფხვნილი (მთლიანი მასის 4.7%) + 0.08 გ ბენზოილის ზეჟანგი (მთლიანი მასის 1.5 %) + 5 მლ Protacryl M + 0,2 მლ საღებავი Redont Colour

(dye concentrate). ამ შემადგენლობით მიღებული გამყარებადი მასით მზადდებოდა სხვადასხვა ორგანოების კოროზიული პრეპარატები, რომელთა გამოკვლევაც ხორციელდებოდა Proscope დიგიტალური კამერით და მასკანირებელი ელექტრონული მიკროსკოპით.

კვლევის შედეგებმა დაადასტურა, რომ ჩვენს მიერ მომზადებული სგმ-ის ინიექციის ადეკვატური კონტროლი შესაძლებელია ინიექციის პროცესში პარენქიმულ ორგანოებზე (ღვიძლი, თირკმელი) დაკვირვებით, რადგანაც მათი კაფსულის ქვეშ კარგად განირჩევა სგმ-ის მიერ ზედაპირული მიკროცირკულაციური კალაპოტის შევსება. ინიექციებული სტრუქტურების ფერი დამოკიდებულია სგმ-ში შერეული პიგმენტის ფერზე.

კოროზიის შემდგომ მიღებული ტვიფრების გამოკვლევა სინათლის მიკროსკოპით ადასტურებს, რომ სგმ-ის ინიქციით შესაძლებელია როგორც ცალკე, მხოლოდ პორტული ცირკულაციური კალაპოტის, ისე პორტული და ღვიძლის ვენების კალაპოტების ერთდროულად რეპროდუქცია, თანაც ისე, რომ დასახელებულ კალაპოტებში შეყვანილი იყოს სხვადასხვა ფერის სგმ-ი. Protacryl M-ის ბაზაზე მომზადებული სგმ-ის გამოყენებით მიღებული ტვიფრები კარგად ექვემდებარებიან ოქროთი „დამტვერვას“ - მაღალი ვაკუუმის პირობებში ელექტრონული მასკანირებელი მიკროსკოპით გამოკვლევისათვის. სკანოგრამებზე განირჩევა ერთმანეთთან დაკავშირებული უსწორმასწორო ცილინდრის მსგავსი ფორმების სხვადასხვა დიამეტრის სისხლის მილების ტვიფრები, მკვეთრი კონტურებით. ტვიფრების ზედაპირი „დაჭიმულია“. მათზე განირჩევა შესაბამისი ტუბულური სტრუქტურებისათვის დამახასიათებელი შედარებითი შევიწროებისა და გაფართოების ზონების მონაცვლეობა, ასევე ენდოთელიოციტთა ბირთვისშემცველი ზონების ანაბეჭდები. ყველა ეს თავისებურება სრულად არის შენარჩუნებული ტვიფრების მასკანირებელი ელექტრონული მიკროსკოპით დაბალი ვაკუუმის პირობებში ოქროთი დაფარვის გარეშე გამოკვლევის დროსაც. სგმ ერთნაირი წარმატებით ავსებს ცირკულაციური კალაპოტის, როგორც მსხვილი კალიბრის, ისე უწვრილეს (ერთ მიკრონზე მცირე) ტოტებს. ამასთანავე, ტვიფრები ექვემდებარება არა მხოლოდ სიგრძისა და დიამეტრის, არამედ

დატოტვის კუთხეთა გაზომვებსაც, ასევე, სგმ-ის შემადგენლობის რენტგენოსპექტრულ ანალიზს. კოროზიული მიკროპრეპარატების ნაწილზე აღინიშნება სგმ-ის ტუბულური სტრუქტურებიდან „გამოსვლის“, ე.წ. „ექსტრავაზაციის“ უბნები, სადაც ეს „ექსტრავაზატები“ ქმნიან ტიპურ კონგლომერატებს ან ფირფიტებს. ზოგი ნაჟღენთიდან სათავეს იღებს 10-25 მკმ სიგანის ლიმფური მილების ტვიფრები, რომლებიც ხასიათდება ტიპური შებრტყელებული ფორმით, ყრუდ დაბოლოებული განტოტებებით და შევიწროვებების უბნების არსებობით (რაც შეესაბამება სარქველების განლაგების ადგილებს). ლიმფური მილების ტვიფრების ზედაპირზე აღინიშნება ლიმფოენდოთელიოციტების ბირთვების შემცველი ზონების ტიპური ანაბეჭდები. კოროზიული ტვიფრების მეთოდით კვლევისას სგმ-ის სიიაფე ფრიად მნიშვნელოვანია იმდენად, რამდენადაც ის ხშირად გამოიყენება არა მხოლოდ მიკროპრეპარატების, არამედ მაკროპრეპარატების დასამზადებლადაც, რაც მკვეთრად ზრდის მის დანახარჯს. ჩვენს მიერ მოწოდებული სგმ ხასიათდება ისეთი სიბლანტით, რომ წარმატებით ახერხებს როგორც მსხვილი, ისე წვრილი კალიბრის (1-მკმ-მდე დიამეტრის) ტუბულების რეპლიკაციას. აღსანიშნავია, რომ ზემოაღნიშნული, სტომატოლოგიურ პრაქტიკაში ფართოდ გამოყენებული ფისები გამოიყენება მრავალ ქვეყანაში (ISO 9001, ISO 13485; GMP), რაც მათ არატოქსიკურობას ადასტურებს. ჩვენს მიერ რეკომენდებული სგმ თავის სიბლანტეს ინარჩუნებს ათი წუთის განმავლობაში, რაც საშუალებას იძლევა საკვლევი ტუბულარული სტრუქტურების ინიექცია განხორციელდეს აჩქარების გარეშე. ამასთანავე, როგორც ზემოთ იქნა ნაჩვენები, სგმ გაბლანტებას იწყებს მე-10 წუთიდან, რაც ახდენს ინიექციებული მასის „უკუქცევის“ პრევენციას და ხელს უწყობს სრულფასოვანი ტვიფრების მიღებას. აღსანიშნავია ისიც, რომ გამყარების პროცესში ჩვენი სგმ პრაქტიკულად არ ექვემდებარება შეკუმშვას რაც საფუძველს იძლევა, რომ ტვიფრების გაზომვით მიღებული მონაცემები ჩაითვალოს შესაბამისი ტუბულური სტრუქტურების სანათურების ნატურალურ ზომებად. ჩვენს შემთხვევაში საღებავად გამოყენებული პიგმენტები, არ ქმნის ბარიერს მასკანირებელი ელექტრონული მიკროსკოპით გამოკვლევისათვის, ამასთანავე, ხელს

უწყობს სხვადასხვა ტუბულური სისტემების ცალ-ცალკე, ისე ერთდროულად გამოკვლევას. ამავდროულად, ის იძლევა საშუალებას, ინიექციის პროცესში, ორგანოებზე (განსაკუთრებით, პარენქიმულ ორგანოებზე - ღვიძლზე, თირკმელზე) დაკვირვებით შევაფასოთ მიკროცირკულაციური კლაპოტის ადექვატურად შევსების ხარისხი. ჩვენს მიერ მიღებული ტვიფრების გამძლეობას მასკანირებრლ ელექტრონულ მიკროსკოპში ელექტრონებით „დაბომბვისადმი“ ადასტურებს ის ფაქტი, რომ მიკროსკოპიის ხანგრძლივი, 1-2 საათიანი სეანსების დროს არ აღნიშნულა ტვიფრების ზედაპირზე ის ტიპური აფეთქებები, რომლების აღინიშნება ისეთ შემთხვევებში, როდესაც საკვლევი ზედაპირი სენსიტიურია ელექტრონული ნაკადის მიმართ. წვრილი მილოვანი სტრუქტურების ტვიფრების უწყვეტობა, მათი ზედაპირების „დაჭიმულობა“ და მათზე შესაბამისი ტუბულების სანათურისმხრივი ზედაპირების რელიეფის ნეგატიური ასახვა, ადასტურებს, რომ ჩვენს მიერ დამზადებული კოროზიული ტვიფრების მასკანირებელი ელექტრონული მიკროსკოპიით მიღებული გამოსახულებები არ ჩამოუარდება საერთაშორისოდ აღიარებული სგმ-ების საშუალებით მიღებული ტვიფრების ანალოგიურ გამოსახულებებს. მნიშვნელოვანია, რომ ჩვენს მიერ მიღებული სგმ-ის გამყარების ტემპერატურაც არ აღემატებოდა 45^{0}C-ს. ამდენად, ნარევი აკმაყოფილებს კოროზიული პრეპარატების მოსამზადებელი საინექციო მასების მიმართ წაყენებულ ყველა ძირითად მოთხოვნას.

<u>ღვიძლის 2/3 რეზექციისშემდგომი რეგენერაციის თავისებურებები ოპერაციიდან ორი კვირის განმავლობაში</u>

ღვიძლის რეზექციიდან 24, 48 და 96 საათის შემდეგ ჰეპატოციტების ფართობი და პერიმეტრი კონტროლთან შედარებით მომატებულია აცინუსის როგორც პირველ, ასევე მესამე ზონებში ($p<0.001$). რეზექციიდან 1 კვირის შემდეგ აცინუსის მესამე ზონის ჰეპატოციტების ფართობი და პერიმეტრი ნორმასთან შედარებით ნაკლებია ($p<0.05$), ხოლო პირველი ზონის ჰეპატოციტების პერიმეტრი და ფართობი აღემატება ნორმის ანალოგიურ მაჩვენებლებს ($p=0,05$). ამასთანავე, ამ ვადაზე ღვიძლის აცინუსის როგორც პირველი, ასევე

მესამე ზონის ჰეპატოციტების პერიმეტრი და ფართობი ნაკლებია რეგენერაციის წინა ვადების ანალოგიურ მონაცემებთან შედარებით ($p<0,05$). რეზექციიდან 2 კვირის შემდეგ, რეგენერირებული ღვიძლის ჰეპატოციტების ფართობი და პერიმეტრი, აცინუსის როგორც პირველ, ასევე მესამე ზონებში, აღემატება ნორმის და რეზექციიდან ერთი კვირის თავზე მიღებულ ანალოგიურ მაჩვენებლებს ($p<0.001$). ერთსა და იმავე ვადაზე ზონების მიხედვით ჰეპატოციტების ფართობებისა და პერიმეტრების შედარება უჩვენებს, რომ, როგორც ნორმაში, ისე რეგენერაციის 24-ე და 96-ე საათზე, მესამე ზონის ჰეპატოციტების ფართობი აღემატება პირველი ზონის ჰეპატოციტების ფართობს (შესაბამისად $p=0.01$; $p=0.005$; $p=0.03$), ხოლო ჰეპატოციტების პერიმეტრებს შორის სარწმუნო სხვაობა არ ვლინდება (შესაბამისად $p=0.06$; $p>0.9$ $p=0.5$).

ვითარება შეცვლილია რეგენერაციის 48-ე საათზე, როდესაც აცინუსის პირველი ზონის ჰეპატოციტების ფართობი და პერიმეტრი აღემატება მესამე ზონის ჰეპატოციტების ფართობს და პერიმეტრს ($p<0,05$).

რეგენერაციის ერთი კვირის შემდეგ პირველი ზონის ჰეპატოციტების ფართობი სარწმუნოდ მეტია ვიდრე მესამე ზონის ჰეპატოციტების ფართობი ($p=0.009$), ხოლო პერიმეტრებს შორის სხვაობა არ არის სარწმუნო ($p=0.1$). რეგენერაციის ორი კვირის შემდეგ აცინუსის პირველი ზონის ჰეპატოციტების ფართობი და პერიმეტრი სარწმუნოდ არ განსხვავდება მესამე ზონის ჰეპატოციტების ფართობისა და პერიმეტრისაგან ($p=0.5$; $p=0.2$). ნორმული ვირთაგვების ღვიძლის ჰისტოლოგიური კვლევით ხშირად შესაძლებელია წილაკების იდენტიფიცირება, სადაც ჰეპატოციტები განლაგებულია რადიალურად, ჰეპატოციტების ერთი (იშვიათად ორი) რიგისაგან შემდგარი ფირფიტების სახით, რომელთა შორის არსებული სინუსოიდები მეტ-ნაკლებად თანაბარი ზომისაა. რეგენერაციის 24 და 48 საათის შემდეგ გართულებულია წილაკების იდენტიფიცირება, ხოლო იმ წილაკების ზომები, რომელთა კონტურების იდენტიფიკაციაც შესაძლებელია, მომატებულია. ჰეპატოციტების ფირფიტების რადიალური განლაგება და არქიტექტონიკა დარღვეულია. ისინი ჩანაცვლებულია ღვიძლის უჯრედებისა და სინუსოიდური კაპილარებისაგან შედგენილი კონგლომერატით, რომლის სხვადასხვა უბანშიც სხვადასხვა

ინტენსივობით აღინიშნება უსინუსოიდო (უსისხლძარღვო) უბნები, ასევე უბნები, სხვადასხვა ზომის და ფორმის სინუსოიდებით (რომელთა ნაწილი მკვეთრად დილატირებულია). ჰეპატოციტების ციტოპლაზმური მებრანის ტიპური კონტურები შეცვლილია, ზოგიერთ ჰეპატოციტზე ჩნდება ციტოპლაზმური წანაზარდები. რეგენერაციის 48-ე საათზე აღინიშნება მრავლობითი მიტოზური ფიგურები. 96-ე საათზე მიტოზური ფიგურები გვხვდება ერთეული რაოდენობით. ჰეპატოციტთა ნაწილი განიცდის დესტრუქციულ-ნეკროზულ ცვლილებებს. ასეთი ნეკროზული ჰეპატოციტები ხშირად ესაზღვრებიან ორბირთვიან, დიდი ზომის ან მიტოზურ ჰეპატოციტებს. ნეკროზული ჰეპატოციტები ასევე ხშირად გვხვდება ე.წ. უსისხლძარღვო უბნებში. რეგენერაციიდან 1 კვირის თავზე ღვიძლის ქსოვილი იბრუნებს მეტ-ნაკლებად ტიპურ არქიტექტონიკას, ამასთანავე, იმ წილაკების ზომა, რომელთა იდენტიფიცირებაც შესაძლებელია ჰისტოლოგიურ პრეპარატებზე, უფრო დიდია ვიდრე ნორმაში. სინუსოიდთა ნაწილი დილატირებულია, ამასთნავე ცალკეულ უბნებში აღინიშნება მკვეთრად უსწორმასწორო სინუსოიდები გაკვირტული ტოტის შესახედაობით. ასეთი სინუსოიდების მიმდებარე ჰეპატოციტების პლაზმური მემბრანაც მკვეთრად უსწორმასწოროა, ზოგჯერ იმდენად, რომ ღვიძლის უჯრედებს ერთგვარი ვარსკვლავისებური ფორმა აქვთ. რეგენერაციის 24-ე, 48-ე და 96-ე სთ-ზე ჰეპატოციტები თავიანთი ფორმით მკვეთრად განსხვავდება ნორმული ჰეპატოციტების ზომისაგან. ჰეპატოციტების ნორმისთვის ტიპური, მეტ-ნაკლებად მსგავსი ზომების მქონე მრავალკუთხა პარალელეპიპედის მსგავსი ფორმები ჩანაცვლებულია მკვეთრად განსხვავებული ფორმისა და ზომის ჰეპატოციტებით, რომლებიც ერთმანეთს უკავშირდებიან უჩვეულიო ფორმის პლაზმური მემბრანის მორჩისებრი წანაზარდების საშუალებით, ისე, რომ მთელი პლასტის ჰისტოლოგიური სურათი წააგავს აწყობილი პაზლის კონსტრუქციას. წანაზარდების საშუალებით ჰეპატოციტების ერთმანეთთან დაკავშირება უნდა მიუთითებდეს მათ შორის ახალი კავშირების შექმნას და ჰეპატოციტების ფირფიტების რემოდელინგს, იმის ანალოგიურად, როგორც ეს ნაჩვენებია Gusev et al., 1991-ის მიერ აორტის ენდოთელიოციტების პლასტისათის სისხლის წნევის ცვლილების

პირობებში. აღსანიშნავია, რომ რეგენერაციიდან ერთი კვირის თავზე ზოგიერთ უბნებში აღინიშნება ინტენსიური სინუსოიდიზაცია და ღვიძლის ვენების წვრილი შენაკადების (ცენტრალური და სუბლობულური ვენების) სიმრავლე პორტული ტრიადების სიმწირის ფონზე. ამავე ვადაზე კოროზიული პრეპარატების მასკანირებელი ელექტრონული მიკროსკოპით გამოკვლევისას ვლინდება სინუსოიდთა ქსელი, რომელიც სივრცულად მოსაზღვრავს სხვადასხვა ფორმისა და ზომის წილაკებს, მათ შორის ისეთებსაც, რომლებიც, თითქოსდა შექმნილია ორი „ნორმული“ წილაკის გაერთიანებით (მეგაწილაკი). სინუსოიდთა დიამეტრი ზოგჯერ მკვეთრად განსხვავებულია. განსაკუთრებით გაგანიერებულია ზედაპირულად მდებარე სინოსოიდები. ცალკეულ უბნებში აღინიშნება წვრილ (მცირე დიამეტრის) სინუსოიდთა ტვიფრები, რომელთაც გააჩნიათ უსწორმასწორო ხორკლიანი ზედაპირი მცირე ზომის კვირტისებური წანაზარდებით რაც ამ ტვიფრების კონტურს ზიგზაგისებურ ფორმას აძლევს, ზოგიერთ უბანში აღინიშნება ღვიძლის ვენების შენაკადებისა და მათთან დაკავშირებული მსხვილი სინუსოიდების ისეთი ტვიფრები, რომლებიც დამახასიათბელია სისხლძარღვთა სპრუტინგისთვის. ასეთი სპრუტინგული ტვიფრები ზოგჯერ ერთმანეთს ეანასტომოზება. ჩვენს მიერ მიღებული ჰისტოლოგიური და კოროზიული პრეპარატების შედეგების შედარებითი ანალიზი ადასტურებს, რომ კოროზიული პრეპარატების მასკანირებელი მიკროსკოპიით გამოვლენილი უსწორმასწორო, დაკლაკნილი, სხვადასხვა ზომის „გაკვირტული“ სინუსოიდები რეალობაა და არა მეთოდის ტექნიკური ხარვეზის შედეგი. რეზექციიდან 2 კვირის შემდეგ მატულობს ისეთი უბნების რადენობა, რომელთა კონსტრუქციაც წააგავს ნორმულს. ამასთანავე, კვლავ ვლინდება უბნები ციტოპლაზმური წანაზარდების მქონე ჰეპატოციტებით და სხვადასხვა დიამეტრის სინუსოიდებით. ასევე აღინიშნება ე.წ. უსინუსოიდი რეგენერაციული ნოდულები, რაც მიუთითებს, რომ სინუსოიდიზაციის პროცესი დასრულებული არ არის. ჩვენს მიერ მიღებული ჰეპატოციტების ფართობების და პერიმეტრების მონაცემთა ცვლილებები არ ხასიათდება ერთი საერთო ტენდენციით. თუ გავითვალისწინებთ, რომ ჩნდება უცნაური (არასტანდარტული) ფორმის

ჰეპატოციტები ერთგვარი ციტოპლაზმური მორჩებით, უნდა ვივარაუდოთ, რომ ტრანსფორმაციას ექვემდებარება არა მხოლოდ სისხლძარღვთაქსელი და, შესაბამისად, წილაკების ფორმები და ზომები, არამედ ჰეპატოციტების პოპულაციაც. კოროზიულ პრეპარატებზე ნანახი ღვიძლის ვენების შენაკადების (სუბლობულური ვენულების) სპრუტინგი ადასტურებს, რომ პროლიფერაციული პროცესები არ არის დასრულებული და შესაბამისად გრძელდება ღვიძლის/წილაკის რემოდელირების პროცესი, ზემო აღნიშნული ვენულების სპრუტინგი შეესაბამება ჰისტოლოგიურ პრეპარატებზე საკმაოდ ხშირად აღმოჩენილ ისეთ უბნებს, სადაც ჩანს ცენტრალური ვენების და სუბლობულური ვენების სიმრავლე შესაბამისი რაოდენობის ტრიადების გარეშე. ვენების მსგავსი გამრავლება შეიძლება გარკვეული მინიშნება იყოს ახალი წილაკების ფორმირების თაობაზე.

<u>ღვიძლის 2/3 რეზექციის შემდგომი რეგენერაციის თავისებურებები ოპერაციიდან 9 თვის შემდეგ (SG2)</u>

ვირთაგვების ღვიძლის ქსოვილი ორგანოს 2/3-ის რეზექციიდან 9 თვის შემდეგ (მე-2 საკვლევი ჯგუფი) შესწავლილი იქნა კომპლექსური მორფოლოგიური მეთოდებით. მორფომეტრიული კვლევის შედეგები ადასტურებს, რომ მე-2 საკვლევი ჯგუფის ცხოველებში ჰეპატოციტების ფართობი და პერიმეტრი განსხვავდება საკონტროლო ჯგუფის ანალოგიური მონაცემებისგან. კერძოდ: ა) საკონტროლო ჯგუფში აცინუსის I ზონაში (პერიპორტულად) განლაგებული ჰეპატოციტების ფართობი ჩამორჩება აცინუსის III ზონაში (პერიცენტრულად) განლაგებული ჰეპატოციტების ფართობს ($P<0,05$), მაშინ როდესაც შესაბამის უჯრედთა პერიმეტრები ერთმანეთისგან არ განსხვავდება ($P>0,05$); ბ) მე-2 საკვლევ ჯგუფში I და III ზონის ჰეპატოციტების პერიმეტრები და ფართობები სარწმუნოდ არ განსხვავდებიან ერთმანეთისგან ($P>0,05$); გ) მე-2 საკვლევ ჯგუფში საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით მატულობს როგორც აცინუსის I ზონაში, ისე III ზონაში განლაგებული ჰეპატოციტების ფართობიცა და პერიმეტრის სიგრძეც ($P<0,05$);

მე-2 საკონტროლო ჯგუფის ცხოველების ღვიძლის ჰისტოლოგიურ პრეპარატებზე რეგულარული ფორმის წილაკები წარმოდგენილია წრიული, ან წრესთან მიახლოებული მრავალწახნაგა გეომეტრიის კონსტრუქციის სახით, რომლის ცენტრშიც შესაძლებელია ცენტრალური ვენის იდენტიფიკაცია. ასეთი წილაკების იდენტიფიკაცია შედარებით ადვილია სისხლის კალაპოტის ტუშ-ჟელატინით ინიეცირების შემდეგ დამზადებულ გამჭვირვალე ჰისტოლოგიურ პრეპარატებზე. აღსანიშნავია, რომ ასეთი „კლასიკური“ წილაკების დიამეტრი საკმაოდ მერყეობს და იცვლება 300 მკმ-დან 600 მკმ-მდე.

პარციული ჰეპატექტომიიდან 9 თვის შემდეგ ჰისტოლოგიურ პრეპარატებზე იმ წილაკების ზომები, რომელთა კონტურების იდენტიფიკაციაც შესაძლებელია, ნორმულთან შედარებით მომატებულია. სინუსოიდების ნაწილი ასიმეტრიულად არის გაგანიერებული. ეს ასიმეტრია ზოგჯერ მეტად არის გამოხატული პერიპორტულად, ზოგჯერ კი პერიცენტრალურად. აღნიშნულის გამო ღვიძლის ქსოვილი არაჰომოგენური შესახედაობისაა. სინუსოიდთა არათანაბრობა უკეთ შეიმჩნევა მათი კალაპოტის ტუშ-ჟელატინით ინიექციის შემდეგ დამზადებულ გამჭვირვალე ჰისტოლოგიურ პრეპარატებზე. ამავე პრეპარატებზე კარგად ჩანს რამდენიმე მომიჯნავე წილაკის შერწყმით მიღებული კონგლომერატი - „მეგაწილაკი“, რომლის გაერთიანებული სინოსოიდური ქსელი სათავეს იღებს რამოდენიმე პორტული ვენულიდან, ცალკეულ წილაკებსა და მეგაწილაკებს შორის საზღვრებიც („უსისხლძარღვო ზონები“) ასევე გაგანიერებულია და ამოვსებულია შემაერთებელი ქსოვილით. საკონტროლო ჯგუფის კოროზიული პრეპარატების ანალიზის საფუძველზე, რომელიც ემყარება 300 მკმ დიამეტრზე ნაკლების სისხლძარღვის შემცველი ღვიძლის კოროზიული ტვიფრების ელექტრონულ მასკანირებელ მიკროსკოპიას, დადგინდა, რომ სინუსოიდები ქმნიან მეტნაკლებად უნიფორმულ სამგანზომილებიან ქსელს და ასევე ქსელს, რომელიც ძნელია მიაკუთვნო რომელიმე გეომეტრიულ ფიგურას. ნორმაში, ღვიძლის ქსოვილში აღნიშნული მასალის ანალიზის საფუძველზე შესაძლებელია ვიმსჯელოთ სამი ტიპის წილაკების არსებობაზე: ზედაპირული წილაკები, ღრმა წილაკები და წილაკების მსგავსი კონსტრუქციები.

სინუსოიდების დიამეტრები ფართოდ ვარირებს (6μm-დან - 20μm-მდე). სინუსოიდების ცალკეული მონაკვეთბის სიგრძეები ასევე ვარირებს 6μm-დან - 50μm მდე. საკონტროლო ჯგუფის ცხოველების ღვიძლის პორტული კალაპოტის კოროზიული პრეპარატების ზოგიერთ უბანში ჩვენს მიერ ნანახი იქნა სინუსოიდების ტვიფრებთან დაკავშირებული წვრილი კაპილარებისაგან შემდგარი ქსელები, ე.წ. „პერიპორტული ქსელი“, რომელიც ზოგჯერ ერთმანეთთან აკავშირებს კარის ვენის ტოტის მოპირდაპირე მხარებზე განლაგებული წილაკების სინუსოიდებს, თუმცა, ამასთანავე ამ წილაკებს შორის საზღვარი მკაფიოდ გამოხატული რჩება.

რეგენერირებული ღვიძლის წილაკების სინუსოიდთა ტვიფრების დიამეტრი ხშირად სჭარბობს საკონტროლო ჯგუფის ღვიძლის სინუსოიდთა ტვიფრების დიამეტრს. სინუსოიდთა ქსელში, ისევე როგორც საკონტროლო ჯგუფში, განირჩევა ორი ტიპის უბნები - პარალელური, ერთმანეთთან იშვიათი კავშირების მქონე ტვიფრებით და დაკლაკნილი, ხშირად „მოანასტომოზე“ ტვიფრებით. სინუსოიდთა ტვიფრები, 30-50 მიკრომეტრამდე შიდა დიამეტრის მქონე მარყუჟების გარდა (რაც ნორმულადაც გვხვდება) ხშირად ქმნიან მარყუჟებს, რომელთა შიდა დიამეტრიც შეადგენს 2-4 მიკრომეტრს.

სინუსოიდების ტვიფრების დიდი გადიდებით გამოკვლევა უჩვენებს, რომ მათი ზედაპირი გლუვი არ არის. გარდა ენდოთელიოციტების ბირთვისშემცველი ზონების ანაბეჭდებისა (რაც გვხვდება საკონტროლო ჯგუფის ნიმუშებზეც), პარციული ჰეპატექტომიიდან 9 თვის შემდგომ ტვიფრებზე აღინიშნება ბუსუსებისებრი წანაზარდები, რაც საკონტროლო ჯგუფის ტვიფრებისათვის არ არის დამახასიათებელი. ასეთი ბუსუსების არსებობა სინუსოიდთა ტვიფრებს „ხიჭვიან“ შესახედაობას აძლევს.

ღვიძლის 2/3-ის რეზექციიდან 2 კვირის და 9 თვის შემდეგ მორფომეტრიული გამოკვლევით მიღებული მონაცემების შედარება მიუთითებს, რომ მე-2 საკვლევი ჯგუფის ცხოველების ღვიძლის I და III ზონების ჰეპატოციტების ფართობი ნაკლებია 1-ლი საკვლევი ჯგუფის ანალოგიურ მონაცემებთან შედარებით.

ღვიძლის განმეორებითი რეზექციის შემდგომი სტრუქტურული ტრანსფორმაციის თავისებურებები ოპერაციიდან 6 თვის შემდეგ (SG3)

ღვიძლის 2/3-ის რეზექციის შემდეგ 9 თვის მანძილზე რეგენერირებული ღვიძლის რე-რეზექციიდან 6 თვეში (მე-3 საკვლევი ჯგუფი) ღვიძლის სტრუქტურული თვისებურებები შესწავლილ იქნა კომპლექსური მორფოლოგიური მეთოდებით. მიღებული მონაცემები შედარდა შესაბამისი საკონტროლო ჯგუფის ცხოველების ასევე, პირველი და მე-2 საკვლევი ჯგუფების გამოკვლევის შედეგებს. მე-3 საკვლევი ჯგუფის ცხოველების ღვიძლის ქსოვილის მორფომეტრიული კვლევის შედეგები მიუთითებს, რომ: ა) საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით მესამე საკვლევ ჯგუფში მატულობს როგორც აცინუსის პირველ ზონაში, ისე მესამე ზონაში განლაგებული ჰეპატოციტების ფართობიცა და პერიმეტრის სიგრძეც ($P<0,05$); ბ) მე-2 და მე-3 საკვლევ ჯგუფებში აცინუსის პირველ ზონაში განლაგებული ჰეპატოციტები არ განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან არც ფართობით და არც პერიმეტრის სიგრძით ($P>0,05$); გ) მე-3 საკვლევ ჯგუფში აცინუსის მესამე ზონაში განლაგებული ჰეპატოციტების ფართობი აღემატება მე-2 საკვლევი ჯგუფის შესაბამის ჰეპატოციტთა ფართობს ($P<0,05$). მე-3 საკვლევი ჯგუფის ცხოველების ღვიძლის სინუსოიდთა დიამეტრები უთანაბრობა, ცალკეულ წილაკებსა და მეგაწილაკებს შორის საზღვრები უფრო მკვეთრად არის გამოხატული. რე-რეგენერირებულ ღვიძლის კოროზიული პრეპარატების მასკანირებელი ელექტრონული მიკროსკოპია მიუთითებს, რომ წილაკთა შერწყმით მიღებული მეგაწილაკების რაოდენობა და ზომები მატულობს (ხშირად აღემატება 1 მმ-ს). ეს მეგაწილაკები არქიტექტონიკით საკმაოდ განსხვავდება საკონტროლო ჯგუფის წილაკებისაგს არქიტექტონიკისაგან. ამასთანავე, მეგაწილაკების შემქმნელ სტრუქტურათა შორის საზღვრების იდენტიფიცირება გაძნელებულია, ხოლო მომიჯნავე მეგაწილაკებს შორის საზღვრები მკვეთრად არის გამოხატული. სინუსოიდთა და მათთან დაკავშირებულ სისხლძარღვთა დიამეტრები აღემატება საკონტროლო და რეგენერირებული ღვიძლების ანალოგიური სისხლის მილების შესაბამის ზომებს. მე-3 საკვლევი ჯგუფის ცხოველების

ღვიძლის სინუსოიდთა ტვიფრების ქსელში ხშირია ბრმად დაბოლოებული უბნები; ამასთანავე, გვხვდება 3-4 სინუსოიდის შერწყმით შექმნილი ლოკალური გაგანიერებები. სინუსოიდების ტვიფრები ქმნიან სხვადასხვა შიდა დიამეტრის მარყუჟებს (5 – 30 მკმ). ტვიფრების ნაწილზე აღინიშნება მიმდებარე უჯრედთა და/ან მათი ბირთვისშემცველი ზონების ანაბეჭდები. სინუსოიდების ტვიფრთა ნაწილზე აღინიშნება იმის მსგავსი ბუსუსებისებრი წანაზარდები, როგორიც აღწერილი იყო რეგენერირებული ღვიძლის სინუსოიდთა ტვიფრებზე, თუმცა რე-რეგენერაციის ჯგუფში ამ წანაზარდების ზომაც და სიხშირეც გაცილებით მეტია.

მე-2 საკონტროლო ჯგუფის ცხოველთა ღვიძლებში პერიპორტული და პერიცენტრული ჰეპატოციტების ერთი და იგივე სიგრძე და განსხვავებული ფართობი მიუთითებს აღნიშნულ უჯრედთა ჭრილების ფორმების განსხვავებას. პერიპორტულად განლაგებული ჰეპატოციტები უფრო ხშირად წარმოდგენილია კვადრატში ჩახაზული მრავალწახნაგა ფიგურების სახით, ხოლო პერიცენტრულად განლაგებული ჰეპატოციტები უფრო წაგრძელებული ფორმისაა (შეესაბამება მართკუთხედში ჩახაზულ მრავალწახნაგა ფიგურებს). რეზექციის და რე-რეზექციის შედეგად განვითარებული ღვიძლის რეგენერაცია ასოცირდება როგორც აცინუსის I ზონაში ისე აცინუსის III ზონაში განლაგებული ჰეპატოციტების ჰიპერტროფიასთან. ამასთანავე, ჰეპატოციტების ჭრილები უფრო უნიფორმულია. აღსანიშნავია, რომ ჰიპერტროფია უფრო მეტად არის გამოხატული განმეორებითი რეზექციის შემდეგ „რე-რეგენერირებული“ ღვიძლის აცინუსის III ზონაში (პერიცენტრულად) განლაგებულ ჰეპატოციტებში.

ჩვენს მიერ ღვიძლის ქსოვილის სტრუქტურის კვლევა ხორციელდება იმ ვადებზე, როდესაც, ლიტერატურის მონაცემებით ღვიძლის რეგენერაციის პროცესები დასრულებულია. ეს მიუთითებს, რომ არსებული კონსენსუსის გათვალისწინებით, რეზექციის შემდგომი რეგენერაციით მიღწეულია ის მდგომარეობა, როდესაც, ერთი მხრივ, ღვიძლი აკმაყოფილებს მისი მეტაბოლიზმის მიმართ ორგანიზმის მოთხოვნილებას, ხოლო მე-2 მხრივ, ნიველირებულია პორტული ჰიპერტენზია.

ჩვენი მონაცემების საფუძველზე, შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ პირველის, ანუ მეტაბოლიზის მიმართ ორგანიზმის მოთხოვნილების, უზრუნველყოფას ახდენს პჰ-ის შემდეგ გააქტიურებული მიტოზების შედეგად წარმოქმნილი (რეპოპულაციური) ჰეპატოციტების ჰიპერტროფია, ხოლო მეორისას - პორტული წნევის ნიველირებას - სისხლძარღვთა ზომაში მომატება და სინუსოიდთა ნაწილის დილატაცია. ჩვენს მიერ ჩატარებული მორფომეტრიის შედეგებიც ადასტურებს, რომ პჰ-ის შემდეგ რეგენერირებული ღვიძლი (რეგენერირებული წილები) უნდა შეიცავდეს ჰიპერტროფირებული ჰეპატოციტების გაზრდილ რაოდენობას. მაგრამ ამ შემთხვევაში, რეგენერირებული ღვიძლის ყველა წილაკის ზომა უნდა აღემატებოდეს საკონტროლო ჯგუფის წილაკების ზომას. ჩატარებული ჰისტოლოგიური და კოროზიული პრეპარატების გამოკვლევის შედეგების შეჯერება ადასტურებს, რომ სხვადასხვა ხარისხით ჰიპერტროფირებულ და ე.წ. მეგა-წილაკებთან ერთად, როგორც რეგენერირებულ, ისე რე-რეგენერირებულ ღვიძლში გვხვდება საკონტროლო ცხოველების წილაკების ზომის და ფორმის წილაკებიც. მათი არსებობა მიუთითებს, რომ ჰიპერპლაზია-ჰიპერტროფიის პროცესი არ შეეხო ყველა ჰეპატოციტს, და შესაბამისად, ყველა წილაკს.

იმ ჰეპატოციტებმა, რომლებიც დაექვემდებარნენ პროლიფერაციასა და ჰიპერტროფიას, განიცადეს რემოდელირება გაზრდილი ზომის (ჰიპერტროფირებულ), მათ შორის არასტანდარტული ფორმის წილაკებში - „მეგაწილაკებში“.

მიუხედავად იმისა, რომ პარციული ჰეპატექტომიიდან 9 თვის შემდგომ დამზადებულ კოროზიულ და ტუშით ინიეცირებულ პრეპარატებზე კარგად ჩანს „მეგაწილაკების“ სისხლძარღვთა რაოდენობის მატება, მაინც ვამჯობინებთ ფრთხილი ტერმინის - „წილაკთა რე-მოდელირების და არა „წილაკთა პროლიფერაციის“ გამოყენებას.

პარციული ჰეპატექტომიის შემდეგ რეგენერირებული ღვიძლის კოროზიულ პრეპარატებზე ჩვენს მიერ ნანახია ისეთი წილაკებიც, რომლებიც ზომით ჩამორჩებიან საკონტროლო ცხოველების (ნორმული) წილაკების ზომებს. ამდენად, პარციული ჰეპატექტომიის შემდეგ ახალი

წილაკების გაჩენის თაობაზე დებულების დადასტურება ან უარყოფა დამატებით კვლევებს მოითხოვს.

პარციული ჰეპატექტომიის შემდეგ, ღვიძლის წილაკების რემოდელირებას თან ახლავს შემაერთებელქსოვილოვანი სტრუქტურების რაოდენობის მატება და არა მხოლოდ მსხვილი სისხლის მილების გარშემო, არამედ მათი წვრილი განტოტებების გარშემოც და, მეტიც, დისეს სივრცეებშიც, რაც მიუთითებს, რომ, როგორც რემოდელირებული უჯრედები, ისე მთელი წილაკები, მე-2 და მე-3 საკონტროლო ჯგუფის ღვიძლებთან შედარებით, უფრო მტკიცედაა ჩაყალიბებული ღვიძლის შემაერთებელქსოვილოვან ჩონჩხში. ასეთი ჩაყალიბება, სავარაუდოდ, განმეორებითი პარციული ჰეპატექტომიის შემდგომ, უნდა განაპირობებდეს რემოდელირების ახალი ტალღის ნაკლებ ინტენსიურობას. ეს ვარაუდი დასტურდება როგორც ჰისტოლოგიური, ისე კოროზიული პრეპარატების გამოკვლევითაც. ამასთანავე, განმეორებითი პარციული ჰეპატექტომიის შემდგომ, მასონის ტრიქრომით შეღებილ პრეპარატებზე კარგად ჩანს შემაერთებელქსოვილოვანი ბოჭკოების მატება პირველადი რეზექციის შემდგომ მდგომარეობასთან შედარებით. კოლაგენური ბოჭკოები თან ახლავს რემოდელირებული წილაკების (მეგაწილაკების) შემომსაზღვრელ პერილობულურ სისხლძარღვებსაც, რაც ღვიძლის პარენქიმას ნოდულურ შესახედაობას აძლევს. აღნიშნულის გამო, სავარაუდოა, რომ კიდევ ერთხელ (მესამედ) ჰეპატექტომიის შესრულების შემდეგ წილაკებს კიდევ ნაკლები რემოდელირების საშუალება ექნებათ.

მომიჯნავე წილაკების სინუსოიდთა ქსელებს შორის უხვი ანასტომოზების არსებობა საფუძველს იძლევა, რომ ღვიძლის მთელი სინუსოიდური ქსელი წარმოვიდგინოთ ერთიანი ბადის სახით, რომელიც მარაგდება და დრენირდება მრავალი სისხლისძარღვით. მომმარაგებელი სისხლძარღვები წარმოდგენილია არა მხოლოდ წილაკთაშორისი ვენულით, არამედ „ჩართული“ ვენულებითაც, რომლებიც უფრო მსხვილი კალიბრის სისხლძარღვებს გამოეყოფიან ყოველ 300-600 მიკრომეტრში, ორ მოპირდაპირე მხარეს. ჩართულ ვენულობს შორის დისტანცია შეესაბამება წილაკების ზომებს, ხოლო

ცენტრალურ და/ან სუბლობულურ ვენულებში სინუსოიდების ჩართვის უბნებს შორის დისტანცია - შეესაბამება პერიცენტრული ჰეპატოციტების ზონებს, იმის გათვალისწინებით, რომ ორ მომიჯნავე სინუსოიდს შორის შეიძლება განთავსებული იყოს ერთი ან ორი ჰეპატოციტი. სინუსოიდების ქსელს გააჩნია დამატებითი სპეციფიკური შენაკადები პერიპორტული და პერიბილიური ქსელების სახით, რომლებიც, თავის მხრივ სათავეს იღებენ პორტული ვენის და ღვიძლის არტერიის განტოტებებისაგან.

პარციული ჰეპატექტომიის, ასევე განმეორებითი პარციალური ჰეპატექტომიის შემდეგ ღვიძლის ქსოვილში მიმდინარე რემოდელირებისას ე.წ. მეგაწილაკების წარმოქმნით სინუსოიდური კაპილარები მონაწილეობენ დილატაციით, პროლიფერაციითა და სივრცული ბადის ახალი კონსტრუქციის შექმნით. ამასთანავე ეს რემოდელირება, ისევე როგორც ჰეპატოციტების შემთხვევაში, სინუსოიდთა ქსელის ყველა მონაკვეთს თანაბრად არ ეხება. მართალია, საკონტროლო ჯგუფის მსგავსად, სინუსოიდთა ქსელში განირჩევა ორი ტიპის უბნები - პარალელური, ერთმანეთთან იშვიათი კავშირებით, და დაკლაკნილი, ხშირი ანასტომოზებით, მაგრამ მათი წილაკშიდა ტოპოგრაფია, ნორმისგან განსხვავებით, კანონზომიერებას ნაკლებად ამჟღავნებს. სინუსოიდთა ტვიფრების გაგანიერება, დაგრძელება, „ბრმა“ მორჩების გაჩენა და მარყუჟების რაოდენობის მატება ადასტურებს პროლიფერაციული პროცესის არსებობას, რაც უნდა ეფუძნებოდეს სინუსოიდთა გამომფენი ენდოთელიოციტების როგორც ჰიპერტროფიას, ისე პროლიფერაციას. ამ უკანასკნელს ადასტურებს ტვიფრების ნაწილზე ენდოთელიოციტთა და მათი ბირთვისშემცველი ზონების ანაბეჭდების არსებობა, რომელთა ზომებიც აღემატება ნორმულად აღწერილს.

სინუსოიდთა ტვიფრებზე ბრმა მორჩების გაჩენა სინუსოიდური კაპილარების დაკვირტვით გამრავლების დადასტურებად უნდა განვიხილოთ. ზოგიერთი მარყუჟის მცირე შიდა დიამეტრი (მაგალითად, 2-4 მიკრომეტრი) გვაფიქრებინებს, რომ აქ ყოველთვის ჰეპატოციტი არ უნდა იყოს განთავსებული (ფიზიკურად ვერ იქნება განთავსებული - „ვერ დაეტევა“).

ცალკე გამოყოფის ღირსია კიდევ უფრო მცირე შიდა დიამეტრის მქონე ის მარყუჟები, რომლებიც შექმნილია სინუსოიდთა ტვიფრის მცირე ზომის ფრთისებრი მორჩების (წანაზარდების) ერთმანეთთან დაკავშირების შედეგად. სავარაუდოდ, ასეთი წანაზარდებისა და მარყუჟების არსებობა უნდა მიუთითებდეს რომ სინუსოიდთა პროლიფერაციაში მონაწილეობს ე.წ. კაპილარების „სპლიტინგის“ მექანიზმი - მათ სანათურში „ენდოთელიური ფარდის“ (“ტიხრის“) შექმნით და ამ სანათურის ორ, ხშირად არათანაბარ, ნაწილად დაყოფით.

სინუსოიდთა რემოდელირების შემდგომ საფეხურს ადასტურებს აგრეთვე პარციული ჰეპატექტომიიდან 9 თვის თავზე რეგენერირებული ღვიძლის განმეორებითი რეზექციიდან 6 თვის შემდეგ დამზადებული კოროზიული პრეპარატების მასკანირებელი ელექტრონული მიკროსკოპია. გარდა იმისა, რომ მატულობს სინუსოიდთა ტვიფრების ბრმა მორჩების რაოდენობა, როგორც აღვნიშნეთ, გვხვდება 3-4 სინუსოიდის შერწყმით შექმნილი ლოკალური გაგანიერებები (სინუსოიდური ტბები), რომელთა შემცველი უბნებიც, ჰისტოლოგიურ პრეპარატებზე არც თუ იშვიათად ძნელად გასარჩევია ცენტრალური ვენებისაგან.

რეგენერირებული ღვიძლის სინუსოიდების ტვიფრებზე აღინშნული წვრილი ბუსუსებისებრი წანაზარდების არსებობა უნდა მიუთითებდეს სინუსოიდთა გამომფენი ენდოთელიოციტების ფენესტრების გაგანიერებას და მათში ტვიფრების მისაღებად გამოყენებული სგმ „შეღწევის“ შესაძლებლობის გაჩენას. რე-რეგენერირებული ღვიძლის სინუსოიდთა ტვიფრებზე ასეთი წანაზარდების როგორც ზომების, ისე სიხშირის მატება, სავარაუდოდ, დაკავშირებულია სინუსოიდთა გამომფენი ენდოთელიოციტების ფენესტრების კიდევ უფრო გაგანიერებასთან. ფენესტრაციის მატება კი, თავის მხრივ, კავშირში უნდა იყოს აღნიშნულ ენდოთელიოციტთა ჰიპერტროფიასთან, რომელიც ვითარდება რეზექციის შემდეგ და კიდევ მეტად ძლიერდება განმეორებითი რეზექციის შემდეგ.

შეჯამება

ჩვენს მიერ შექმნილი სგმ-ის მახასიათებლების, ასევე მისი საშუალებით შექმნილი კოროზიული ტვიფრების სინათლის და მასკანირებელი ელექტრონული მიკროსკოპიით გამოკვლევის შედეგები ადასტურებს, რომ ეს ნარევი აკმაყოფილებს Corrosion cats media-ს მიმართ წაყენებულ ყველა ძირითად მოთხოვნას და წარმატებით შეიძლება იქნას გამოყენებული შესაბამისი კვლევების ჩატარებისათვის.

თუ შევადარებთ პარციალური ჰეპატექტომიიდან ორ კვირაში ჰეპატოციტთა მორფომეტრიის შედეგად მიღებულს პარციალური ჰეპატექტომიიდან 9 თვის თავზე მიღებულ მონაცემებს, აღმოჩნდება, რომ ისინი ერთმანეთისგანაც განსხვავდება. ეს საფუძველს გვაძლევს ვივარაუდოთ, რომ ღვიძლის სტრუქტურული ტრანსფორმაცია 2/3-ის რეზექციის შემდეგ ხანგრძლივ პროცესს წარმოადგენს. ამ მონაცემებს კორექცია შეაქვს იმ დებულებაში, რომ მღრღნელების ღვიძლში რეგენერაციული პროცესები 2/3-ის რეზექციის შემდეგ მთავრდება მე-7 - მე-10 (Kandilis et al. 2014; Nagy 2001; Saito et al. 2006). ჩვენი კვლევის შედეგებიდან გამომდინარე, უფრო სწორად მიგვაჩნია ასეთი ფორმულირება: 2/3-ის რეზექციის შემდეგ ღვიძლი რეგენერირებს და 7-10 დღეში აღიდგენს თავის მასასა და მოცულობას, თუმცა როგორც მისი უჯრედული, ასევე სისხლძარღვოვანი სტრუქტურების ტრანსფორმაცია, რაც თავის მხრივ იწვევს ღვიძლის წილაკების სივრცულ ტრანსფორმაციას, გრძელდება რეზექციიდან შორეულ ვადებზეც.

საკითხავია, ღვიძლის არქიტექტონიკის პერმანენტული ტრანსფორმაცია გამოწვეულია მხოლოდ პარციალური ჰეპატექტომიით, თუ წარმოადგენს ღვიძლისთვის ტიპიურ ფენომენს, რომელსაც ადგილი აქვს მთელი ონტოგენეზის განმავლობაში. პოსტნატალური ზრდის დასრულების შემდგომ, ღვიძლის არქიტექტონიკის შესაძლო ცვლილებების დადასტურება ან უარყოფა. მნიშვნელოვანი იქნებოდა ღვიძლის სტრუქტურის, როგორც მთლიანის, ასევე მისი ცალკეული კომპონენტების, პლასტიკურობის შესწავლისათვის ონტოგენეზის დინამიკაში.

ვირთაგვის ღვიძლის რეგენერაციის პროცესი არ მთავრდება ერთ და ორ კვირაში. მიუხედავად ღვიძლის მოცულობისა და მასის აღდგენისა, რაც ძირითადად ეფუძნება ჰეპატოციტების მიტოზებს, რეგენერირებულ ღვიძლში ადგილი აქვს ჰეპატოციტთა ფორმისა და ზომის, ასევე სისხლძარღვოვანი ქსელის ტრანსფორმაციის პერმანენტულ პროცესს. ფორმირდება ახალი უჯრედშორისი კავშირები, მათ შორის ფორმაშეცვლილი მეზობელი ჰეპატოციტების ატიპიური მემბრანული მორჩების ჩართულობით. სისხლძარღვთა ქსელი ასევე განიცდის ტრანსფორმაციას - როგორც არსებული სტრუქტურების ფორმისა და ზომის ცვლილებით, ისე ახალი სინუსოიდური კაპილარების და ვენულების წარმოქმნით.

აღნიშნული ტრანსფორმაციები საფუძვლად უდევს ღვიძლის წილაკების სივრცული არქიტექტონიკის ცვლილებებს.

ღვიძლის რეგენერაციისა და რე-რეგენერაციის პროცესი კომპლექსური მორფოლოგიური ცვლილებების ფონზე/ხარჯზე მიმდინარეობს. ცვლილებების ეხება ორგანოს როგორც პარენქიმულ, ასევე სტრომულ კომპონენტს.

ჩვენი კვლევებით მიღებული ანალიზის საფუძველზე, შესაძლებელია დავასკვნათ, რომ რეზექციის შემდეგ ღვიძლის მასის აღდგენა ხდება ჰეპატოციტების ჰიპერტროფიის, სინუსოიდთა დილატაციის და პროლიფერაციის, ასევე არსებული სისხლმილთა დაგრძელების, დუქტულების რაოდენობისა და წილაკთშორისი შემართებელქსოვილოვანი კომპონენტის გამრავლების ხარჯზე, რაც თავის მხრივ იწვევს წილაკის აგებულების შეცვლას - რემოდელირებას. ამასთნავე უნდა აღინიშნოს, ცვლილებები მიმდნარეობს არა მხოლოდ ერთი კლასიკური წილაკის შიგნით, არამედ მომიჯნავედ მდებარე წილაკების გაერთიანებით და „მეგაწილაკის“ წარმოქმნით.

თუმცა ჩვენს მიერ ნანახი მცირე ზომის წილაკების არსებობა მოითხოვს დამატებით კვლევებს ამ მიმართულებით, რათა დავრწმუნდეთ რომ რეგენერაციის პროცესი გარდა წილაკების გადიდებისა და რემოდელირებისა, მიმდინარეობს ასევე მათი გამრავლების ხარჯზე.

დასკვნები

- ჩვენს მიერ შემუშავებული გამყარებადი საინექციო მასის ნარევი - 0.25 გ გაცრილი MAYCRYL C. C. ფხვნილი (მთლიანი მასის 4.7%) + 0.08 გ ბენზოილის ზეჟანგი (მთლიანი მასის 1.5 %) + 5 მლ Protacryl M + 0,2 მლ საღებავი Redont Colour - წარმატებითშეიძლება იქნას გამოყენებული, ღვიძლის მილოვანი სტრუქტურების (სისხლის ძარღვები) რეპლიკაციისათვის. აღნიშნული მასის გამოყენებით მიღებული კოროზიული პრეპარატები კარგად ექვამდებარება როგორც სინათლის, ისე მასკანირებელი ელექტრონული მიკროსკოპით გამოკვლევას;

- ღვიძლის რეგენერაცია მისი 2/3-ის რეზექციის შემდგომ წარმოადგენს კომპლექსურ პროცესს, რომელიც გრძელდება თვეების მანძილზე; პირველი ორი კვირის განმავლობაში ღვიძლის „ზრდა“ განპირობებულია უჯრედთა ჰიპერტროფია/პროლიფერაციით; შემდგომ ვადებზე კი ხდება ღვიძლის ქსოვილის რემოდელირება - უჩვეულო ფორმის და დიდი ზომის წილაკების („მეგაწილაკების“) გენერაციით, რაც ეფუძნება სინუსოიდური ქსელის არქიტექტურის და ჰეპატოციტების ფორმის რემოდელირებას;

- როგორც ღვიძლის რეზექციის, ასევე რე-რეზექციის შემდეგ წილაკშიდა სისხლის კალაპოტის - სინუსოიდთა ქსელის - რემოდელირება გამოიხატება სინუსოიდთა „დაკვირტვითი“ და „დატიხვრითი“ პროლიფერაციით მიმდინარე სივრცული არქიტექტონიკის ტრანსფორმაციით; ტრანსფორმირებული ქსელი შედგება სხვადასხვა დიამეტრისა და დატოტიანების სინუსოიდებისაგან, რომელთა ნაწილი ავლენს „ვენიზაციის“ ნიშნებს;

- ჰეპატოციტთა რემოდელირება გამოიხატება მათი ფორმისა და დიამეტრის ცვლილებით, პლაზმური მემბრანის კონტურის დაკბილვით და ფსევდოპოდიების მსგავსი მორჩების განვითარებით, რაც, თავის მხრივ, ადასტურებს ახალი უჯრედთაშორისი კავშირების განვითარების შესაძლებლობას.

გამოქვეყნებული ნაშრომების სია

1. Tsomaia K, Inauri N, Patarashvili L, Karumidze N, Azmaipharashvili E, Bebiashvili I, Kordzaia M, Kakabadze M, Dzidziguri D, Kordzaia D. To fill the missing fragments of a complex mosaic of liver regeneration. Transl Clin Med-Georg Med J. 2018 Apr 22;3:32-7.
2. Tsomaia K, Patarashvili L, Bebiashvili I, Azmaiparashvili E, Kakabadze M, Jalabadze N, Sareli M, Gusev S, Kordzaia D. New corrosion cast media and its ability for SEM and light microscope investigation. Microscopy research and technique. 2020 Jul;83(7):778-89.
3. Tsomaia K, Patarashvili L, Karumidze N, Bebiashvili I, Azmaipharashvili E, Modebadze I, Dzidziguri D, Sareli M, Gusev S, Kordzaia D. Liver structural transformation after partial hepatectomy and repeated partial hepatectomy in rats: A renewed view on liver regeneration. World Journal of Gastroenterology. 2020 Jul 21;26(27):3899.
4. Tsomaia K, Azmaipharashvili E, Gvidiani S, Bebiashvili I, Gusev S, Kordzaia D. Structural changes in rats'liver during the first 2 weeks following 2/3 partial hepatectomy. Georgian Medical News. 2021 Jan 1(310):134-41.
5. Azmaiparashvili E, Bebiashvili I, Karumidze N, Tsomaia K, Kordzaia D. Ductular reaction at the early and late stages of biliary obstruction: is the mechanism the same?. Georgian medical news. 2019 Jan 1(286):100-6.
6. Patarashvili L, Tsomaia K, Kakabadze M, Kordzaia D, Chanukvadze I. Perivascular connective tissue sheath and portal tracts in mammals. Translational and Clinical Medicine-Georgian Medical Journal. 2019 Feb 24;4(1):4-7.
7. Patarshvili LG, Tsomaia KB, Bebiashvili IS, Kordzaia DJ, Gusev SA. Spatial Organization of the Transport of Interstitial Fluid and Lymph in Rat Liver (Scanning Electron Microscopy of Injection Replicas). Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2021 Jan;170(3):395-9.
8. Patarashvili L, Azmaipharashvili E, Jandieri K, Gvidiani S, Tsomaia K, Kikalishvili L, Sareli M, Chanukvadze I, Kordzaia D. Liver extracellular matrix peculiarities in mammals and avians. Georgian Medical News. 2021 Jan 1(310):124-33.
9. Azmaiparashvili E, Patarashvili L, Bebiashvili I, Tsomaia K, Gvidiani S, Tananashvili D, Kakabadze M, Gusev S, Kordzaia D. Spatial architecture of biliary tree in mammals: Fractal and Euclidean geometric features. Journal of Anatomy. 2021 Apr 4.

მოხსენებები ნაშრომის თემაზე

1. Protacryl M–based corrosion casting of liver blood, lymph and biliary pathways; XXIV National Congress of The Bulgarian Anatomical Society, Bulgaria 2019
2. Newel view on liver regeneration after partial hepatectomy; XXIV National Congress of The Bulgarian Anatomical Society Bulgaria, 2019
3. For filling the missing fragments of complex mosaic of liver regeneration; XXVI International Symposium on Morphological Sciences (ISMS), Prague, Czech Republic; 2018

კვლევა განხორციელდა „შოთა რუსთაველის საქართველოს ეროვნული სამეცნიერო ფონდის მხარდაჭერით [გრანტის ნომერი DP2016_22]“

Ivane Javakhishvili Tbilisi State University
Faculty of Medicine

Structured Doctoral Program Translational Biomedicine
(Direction - "Hepatology") "

Keti Tsomaia

Structural Transformations of the Liver after Resection and Repeated Resection (Experimental Study)

Theses of the dissertation submitted for the academic degree of
Doctor of Medicine

Scientific Supervisor: Professor Dimitri Kordzaia

2021 year
Tbilisi

Liver regeneration following liver resection is one of the most intensively studied processes. The intensification of this interest is caused due to increase need for liver resection in last two decades. This is defined by to the increased number of liver pathologies on the one hand, and increased the frequency of transplantation of part of the liver from living donor, on the other. The increase in the frequency of liver resections in the clinic is also due to the fact that various modifications of liver resection are easily modeled surgery in experimental studies, especially in small laboratory animals (rodents). It is experimentally proven that on 7th-8th days (according to some authors, on the end of the 2nd week) after the liver resection (partial hepatectomy – PH), liver regains its size and mass almost completely. The study of post-resection liver regeneration phenomenon involves: 1) Research of triggers and stimuli of regeneration; 2) Research of molecular pathways of regeneration and its termination after the liver mass is restored; 3) Research of structural changes (cellular and tissue) during regeneration process;

Considering a plethora of papers dedicated to the study of liver regeneration, the fact that the structural side of the liver regeneration, following PH, is not studied is a paradox. Examination of the liver tubular structures of regenerated liver by the methods of corrosion casts can provide a valid answer to the above-mentioned question. Thus, in order to adequately assess the structural features of liver regeneration after PH, it is necessary to find out:

1. What does the liver regeneration at the cellular level mean? (Do hepatocytes proliferate or occurs hypertrophy? Or both together? Or one process is replaced by another in dynamics?).
2. What does liver regeneration at the lobular level mean? Is enlargement of liver remnant after PH is caused by the development of new lobules or increase in the volume of existed ones? If the latter happens, on what basis does this increase occur, by increasing the number of hepatocytes or by the increasing their size?
3. What is the meaning of regeneration at the level of portal and caval tubular structures and their lined cells? How do the branches of vena cava, hepatic vein, artery and bile duct (also lymphatic vessels) “follow” liver’s

growth – by “developing of new branches” or “extension/elongation” of old ones?

4. What are the differences between architectonics of normal and regenerated liver?

The existence of such questions proves the importance of further investigation of liver regeneration. The presented research serves to fill the missing fragments of the complex mosaic of liver regeneration, without which it is impossible to imagine this process in whole.

Scientific News: The process of regeneration of rat liver does not end in the near term after resection of its 2/3 part. Transformations continue permanently, which is the basis of changes the spatial architecture of the liver lobules, including the formation of "megalobules", namely:

1. Transformation of the vascular network, both by changing the shape and size of existing structures and by forming new sinusoidal capillaries and venules;

2. Changes in the shape and size of hepatocytes, accompanied by the formation of new intercellular connections, including the involvement of atypical membrane protrusions of deformed neighboring hepatocytes.

Aim of the study: The aim of the study presents to investigate the structural changes following liver tissue resection in the early and long term after surgery and to make a comparative analysis of the architecture of regenerated and normal livers.

Research Methodology

Material

The study was conducted at TSU Alexander Natishvili Institute of Morphology on 64 adult male albino rats of Wistar breed, weighing 150-300 grams.

Research design

Animals of the same age (4 months) were divided into three study groups - SG1, SG2 and SG3. The rats in the control group were age-identical animals for each group, which carried out so-called False surgery.

In SG1 - We studied the liver regeneration of rats during the first two weeks after 70% resection of the liver - at different hourly and daily rates. As a control, we used the resected liver tissue of the same rats and the liver of the first control group - CG1.

In SG2 - We studied the liver regeneration of rats after 9 months following 70% liver resection. As a control, we used the liver of the rats from the second control group - CG2.

In SG3, 9 months after primary liver resection, the animals underwent repeated resection - re-resection. We studied liver regeneration 6 months following re-resection.

Histological (H&E, Masson trichrome, CK8 Immunohistochemical marker, transparent slides after Indian Ink injection), morphometrical (hepatocytes areas and perimeters) and Electron Microscopical (Scanning Electron Microscopy of corrosion casts) methods were used for the investigation of liver architecture.

Surgery procedures

The surgical operations were performed on animals in the morning, in the fasting state, under diethyl ether general anesthesia. The animals were cared according to the National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals recommendations to minimize pain or discomfort to the animals during the operation as well as in post-operative periods.

Partial hepatectomy: PH was performed according to the Claudia Mitchell & Holger Willenbring protocol with the application of double knot surgery. After opening the abdominal cavity of the rat, the liver was mobilized by sectioning the liver ligaments. The first ligature was followed by the excision of the left lateral lobe (about 26% -30% of the liver mass), while the second ligature by the excision of the medial lobe of the liver (about 38-40% of the liver mass). The resected liver tissue was fixed in 10% buffered formaline. They represented control for liver regeneration.

Repeated partial hepatectomy: Repeated PH was performed 9 months after the first surgery. The laparotomy and abdominal cavity revision were carried out. The remnant liver was represented by the regenerated upper and lower segments of the right lateral lobes and the anterior and posterior caudal lobes. The blood vessels of both segments of the right lateral lobe were ligated by applying the "single-knot method" so as not to hinder the blood flow in the lower vena cava. The resected liver tissue corresponded toabout 70% of the remnant liver.

Research methods

At the specified time after the surgery, we put the animal to sleep under ether general anesthesia and fixed it on the surgery table. The abdominal cavity was opened. Moderate adhesions were observed at sites of liver resection. After transections of adhesions we identified sharply increased lobes (in SG1 and SG2) / lobe (in SG3) in comparison to normal liver.

Macromorphological processing of the material for histomorphological examination was performed within 24 hours after taking the material. We took 3-3 samples from each share.

Hematoxylin and Eosin staining:

Liver tissue sections of 3-μm were stained by the standard H&E method and studied microscopically with different magnification.

Histochemistry:

Liver tissue sections of 3-5 μm were stained using Masson's Trichrome kit (Sigma Aldrich Catalog Number: C970D37) according to the recommendation of the manufacturer.

Immunohistochemistry:

For immunohistochemical analysys Rabbit antibody keratin-8 (KRT8) produced by MyBiosourse (Catalog #MBS8510691) was used. The antibody was diluted 1:200 in 0.01 mol/L phosphate buffered saline pH 7.4 (Sigma Aldrich).

All light microscopy was conducted by Primo star ZEISS, Jena, Germany equipped with a digital video camera - ZEN 2.3 SP1

Morphometry:

The morphometrical analysis was conducted ონ:

(a) Hepatocytes of the first zone of the liver acinus, located periportally on both sides of the line connecting neighboring portal triads.

(b) Hepatocytes of the third zone of the liver acinus, which are located around the central vein of the classic liver lobule.

The histological slides stained with CK8 marker were used for morphometric analysis

Histological slides were scanned on a Motic Digital Slide Scanner and analyzed using motic digital scanner assistant software, Motic VM 3.0. The work area was enlarged 40 times and cell membranes were outlined manually because the shape of the hepatocytes does not fit any geometric figure as a rule.

Histology after Indian-ink/gelatin injection:

Histological "transparent" slices of liver tissue were prepared after injection of the Indian-ink and gelatin (1:3) mixture into the portal vein.

Scanning Electron Microscopy of Corrosion Casts (CC)

Preparation of Injectable Solidifying Mass (ISM)

A series of the bench tests were done with different ratios of liquid components of Protacryl-M and/or Aycryl C, powder components of Protacryl-M and/or Mycryl, initiator of the polymerization (Benzoyl Peroxide) and dye ("Redont Kolir" [STOMA, Kharkiv, Ukraine])—for obtaining ISM with the optimal features in relation with homogeneity of ISM before and after solidification (was assessed visually), time to start solidification, time for full solidification, temperature of solidifica- tion, shrinkage degree during solidification, sensitivity/resistance toward corroding agents (acid/alkaline), time of corrosion; ability of coloring (color resistance to water and acid), possibility of high-quality coating (by metals or carbon) for SEM; resistance to

electron bombing in the SEM; suitability for SEM in high and low vacuum conditions; possibility to identify the tubular structures filled with differently col- ored ISM by X-ray spectroscopy during SEM); ability to penetrate into—and casting small tubules (capillary networks); ability to imprinting the luminal surface of the tubular structure; ability to produce “leakages” and fill lymphatic vessels; ability to replicate tissue spaces

Injection of the selected ISM with the proved optimal ratio of the above-mentioned components was done in adult Wistar (second post-pubertal period) male rats, weighing 180–220 g. The injection was carried out under diethyl ether deep general anesthesia, after washing-out of the blood vessels with 0.1 ml. Heparin (5,000 U/ml) mixed in 0.9% NaCl solution (washing-out speed—20 ml/min). The manipulations were performed using surgical glasses, or microsurgical microscopy.

Polymerization of injected mass happened in the animal body placed in water-bath with the for 2 hr on room temperature.

Preparation of CC for Scanning Electron Microscopy

After polymerization of injected mass tissue was corroded in in 20% KOH solution, in-room temperature. After 2 hr fragments were removed from KOH solution and washed out in distilled water for 10 min three times. These KOH/water change was done three times which was quite enough for full corrosion of the soft tissues.

The CCs were studied by the “ProScope” digital camera (served as a light stereo-microscope) and SEM (JEOL-JSM-6510LV and Hitachi S-570) allowing the visualization of the sample by the both Secondary Electron Imaging (SEI) and Backscattered Electron Compo- sition (BEC) regimes. The microscope JEOL-JSM-6510LV was equipped with an X-ray spectroscope (Oxford instruments X-Max, Great Britan). For the investigation in high vacuum conditions, the CCs were preliminarily coated by the gold in equipment JEC-3000FC (Tokyo BOEKI Group, Japan; vacuum = 3.2 Pa; coating time = 180 s).

Statistical analysis

The results of measurements of hepatocyte area and perimeter, as quantitative variables, are represented as medians. Quantitative variables were compared using the t test. All P values were two-sided and the significance level was set to 0.05. The program SAS 9.2 was used for statistical analysis.

Research results and discussion

Approbation of a injectable solidified mass to obtain CCs

Analyzing the obtained results of our bench experiments, it was considered that the above requirements toward the injectable solidifying mass (ISM) is mostly met by the mixture with the following propor- tions of the components: 0.25 g MAYCRYL C. C. Powder (4.7% of whole mass) + 0.08 g Benzoyl Peroxide (1.5% of whole mass) + 5.0 mL Protacryl-M liquid component +0,2 Redont Colour (dye concentrate). The CCs obtained by the mixture was investigated by Proscope Digital Microscopy and Scanning Electron Microscopy.

The results confirm that casting media prepared by us gives possibility for visual control (monitoring) of parenchymal organs (liver, kidney) by observation, as filling the subcapsular microcirculatory vascular bed is easily noticeable. The color of the injected structures depends on the dye mixed with ISM.

The study of CCs using a stereo (digital) microscope shows the possibility of reproducing only the portal circulatory bed, as well as the portal and liver venous network simultaneously by using different colors ISMs. The CCs prepared on the basis of Protacryl – M are well subjected to coating with gold for scanning electron microscopy under high vacuum conditions. The scannograms reveal the intercommunicated uneven cylinder-like casts of blood vessels with different diameters and sharp contours. The surfaces of the casts are characterized by narrowing and expansion areas, as well as imprints of nuclear-containing zones of endothelial cells. t is worth to notice that all these characteristics of the CCs are preserved as well in case of their SEM investigation in a low- pressure vacuum condition—without gold coating. ISM

fills with equal success the large-caliber and tiniest (smaller than 1 μm) ramifications circulatory bed. In addition, the casts are subjected not only to the measurement of the lengths and the diameters but also to the angles of branching, also, Besides, X-ray spectral analysis of the molecular composition of the ISM. In some samples of the CCs, the "extravasation" (leakages) of ISM from the injected tubular structures was found. They have the forms of typical conglomerates or plates. From the parts of leakages originate the casts of lymphatic vessels with the diameter 10–25 μm, typically flattened form, with "blind-ended ramifica- tions" and narrowed areas corresponding to the zones of valves. On the surfaces of lymphatic vessels, there is a typical reflection of nuclear-containing zones of lymphoendoteliocytes.

Such cheapness of CM, when applying the method of CCs in research, is quite important as far as it is often used in the preparation of both micro- and macro-specimens, thus dramatically increasing its cost and therefore finances.

The ISM we have provided is characterized by such viscosity that successfully replicates both large and small caliber (with the diameter up to 1 μm) tubules. The above mentioned components of ISM is widely used in dental practice in many countries (ISO 9001, ISO 13485 and GMP) which is the clarification of its non-toxicity.

The ISM, recommended by us, retains its viscosity for up to 10 min, thus enabling injecting tubular structures, to be researched without hurry. In addition, as shown above, the ISM starts firming from the 10th minute, which prevents the "reversal" of the injected mass and assists the creation of the complete casts. It is also worth noting that during the process of solidification our ISM actually is not subjected to shrinkage, which allows considering the data of the cast measurements as the dimensions of the lumens of the corresponding tubular structures. Thus, the named paints do not create a barrier for scanning electron microscopy, facilitate the examination of different tubular systems (both, separately and simultaneously. At the same time, it allows, evaluation the degree of filling adequacy of microcirculatory bed in the process of injection by observing the organs (especially on parenchymal organs—liver, kidney. The resistance of our casts towards so-called "bombing" in thescanning electron microscope is confirmed by the fact that during pro-

longed, 1–2 hr sessions of microscopy, there were not observed typical explosions on the surface of the specimens as in the cases when the research surface was sensitive to electron flow.

The continuity of the casts of small tubular structures, the “stretching” of their surfaces and the negative reflec- tion of the lumenal surfaces of the corresponding tubules on them confirms that the images of our CCs, obtained by scanning electron microscopic study, are up there with the results of the casts obtained through the internationally recognized CCs media. It is important solidification (polymerization) temperature of ISM did not exceed 45°C.

Thus, the characteristics of the ISM created by us meets all modern requirements for the CCs media.

Peculiarities of regeneration during the first 2 weeks following 2/3 partial hepatectomy

24, 48, and 96 hours after liver resection, the area and perimeter of hepatocytes increased in the first and third zones of the acinus compared to normal ($p < 0.001$). 1 week after resection, the area and perimeter of hepatocytes in the third zone of the acinus were smaller than normal ($p < 0.05$), and the perimeter and area of hepatocytes in the first zone exceeded the normal values ($p = 0.05$). In addition, the perimeter and area of hepatocytes in the first and third zones of the acinus were smaller compared to similar data for previous regeneration terms ($p < 0.05$). 2 weeks after resection, the area and perimeter of the regenerated liver hepatocytes in the first and third zones of the acinus exceeded the normal values obtained one week after resection ($p < 0.001$).

Comparison of hepatocyte areas and perimeters by zones at the same terms shows that, at normal, at 24 h and at 96h of regeneration, the area of hepatocytes in the third zone exceeds the area of hepatocytes in the first zone ($p = 0.01$; $p = 0.005$, $p=0.03$ respectively), and no significant difference is

observed between the perimeters of the hepatocytes (respectively $p = 0.06$; $p > 0.9$; $p=0.1$).

The situation is changed at 48 hours after resection, when the area and perimeter of hepatocytes in the first zone of the acinus exceeded the area and perimeter of hepatocytes in the third zone ($p < 0.05$).

One week after 2/3 liver resection, the area of hepatocytes in the first zone was significant larger than the area of hepatocytes in the third zone ($p = 0.009$), and the difference between perimeters was not significant ($p = 0.1$). However, two weeks later, the area and perimeter of hepatocytes in the first zone of acinus do not differ from the area and perimeter of hepatocytes in the third zone ($p = 0.5$; $p = 0.2$).

By the histological examination of the normal rat liver can often identify lobules where the hepatocytes are arranged radially, in the form of plates of one or two hepatocytes, between which the sinusoids are more or less equal in size. On the 24th and 48th hours after 2/3 hepatectomy, it is difficult to identify the lobules, and the lobules whose outline can be identified are increased. The radial arrangement and architecture of the hepatocyte plates are disordered. They are replaced by conglomerates of liver cells and sinusoidal capillaries. In some areas of these conglomerates, zones without sinusoids, as well as with sinusoids of different sizes and shapes, are identified. In addition, some sinusoids are sharply widened. The typical configuration of the cytoplasmic membrane of hepatocytes are changed, cytoplasmic protrusions (procesus) appear on some hepatocytes. Multiple mitotic figures are observed On the 48th h of regeneration.

On the 96th h of regeneration mitotic figures are found in unit quantities. Part of hepatocytes undergo destructive-necrotic changes. Such necrotic hepatocytes are often bordered by binuclated, large, or mitotic hepatocytes. Necrotic hepatocytes are also often found in so-called, bloodless areas.

1 week after regeneration, the liver tissue returns to a more or less typical architecture, and the size of the lobules that can be identified on histological preparations is larger comparing to normal. Part of the sinusoids is dilated, and in some areas there are markedly irregular sinusoids with branching. The

plasma membrane of hepatocytes surrounding such sinusoids is also abruptly irregular, sometimes so much that the liver cells have a star-like shape.

On the 24th, 48th, and 96th hours of regeneration, hepatocytes differ markedly in size from normal hepatocytes. Typical form of the normal hepatocytes are replaced by hepatocytes with dramatically different shapes and sizes, which are connected to each other by an unusually shaped plasma membrane protrusion so that the histological picture of whole section resembles the puzzle construction. Connection of hepatocytes through these new "growths" (protrusions) indicates formations of new connections, and remodeling of hepatocyte cords, as it is shown in case of changes in aortic endothelial cell under pressure by Gusev et al 1991.

It is noteworthy that within a week after regeneration in some areas there is intense formation of sinusoid capillaries and an abundance of small tributaries of the hepatic veins (central and sublobular veins) against the background of the small amount of portal triads.

SEM examination of corrosion cats of the same term reveals a network of sinusoids that spatially lines lobules of different shapes and sizes, including those that appear to be a combination of two "normal" lobules (megalobules). Sometimes the diameter of sinusoids is markedly different. Particularly the superficial sinusoids. In some areas, small (narrow) diameter casts of sinusoids are observed, which have an irregular rough surface with small bud protrusions, which gives the contour of these casts a zigzag shape. These casts correspond to the sinusoids observed in some slides prepared on the same term and stained by H&E. SEM of corrosion casts reveals the replicas of the hepatic vein tributaries and associated with them large sinusoids which with the typical features of vascular sprouting. Such sprouting casts sometimes anastomose to each other.

After 2 weeks of liver resection, the number of areas whose construction looks like normal increases. In addition, areas with hepatocytes with cytoplasmic growths (protrusion) and sinusoids of different diameters are still detected. Regenerative nodules without sinusoids indicating that the sinusoidalization process is not complete.

Changes the data of hepatocyte area and perimeter obtained by us are not characterized by a single common tendency. Taking into account, that

hepatocytes of a strange (non-standard) shape appear with a kind of cytoplasmic protrusions, we must assume that not only the vascular network and, consequently, the shapes and sizes of the lobules, but also the population of hepatocytes are subject to transformation

Sprouting of the hepatic vein tributaries detected on corrosion casts confirms that the proliferative processes are not complete and therefore the liver / lobules remodeling process continues. The sprouting of the above-mentioned venules corresponds to areas quite commonly found on histological slides, where exists a lot of central veins and sublobular veins without a corresponding number of triads, this does not fit with the classical description of rat liver. In addition, a similar proliferation of veins may be some indication of the formation of new lobules.

Peculiarities of regeneration after 9 months following 2/3 partial hepatectomy (SG2)

Tissue of liver was investigated by complex morphological methods after 9 months following 2.3 PH (2nd study group). The results of the morphometric study of liver tissue reveal that the area and perimeter of the CG hepatocytes differ from the SG2. Namely, a) hepatocytes located in the first zone of the liver acinus is significantly less than the area of the hepatocytes in the third zone of the acinus ($P < 0.05$) while we could not find significant difference between the perimeters of the corresponding cells ($P > 0.05$). The cells of the first and third zones of the acini for the SG1 and SG2 do not differ significantly either by area or by the length of the perimeter ($P > 0.05$ in both cases). b) In the SG2 the area and of hepatocytes and perimeter of the 1st and 3rd zones of the acini do not differ from each other significantly ($P > 0.05$ in both cases); c) The area of the hepatocytes of the SG2 , located in the third zone of the acinus significantly exceeds the area of the corresponding hepatocytes of the CG2 ($P < 0.05$).

Regular shaped liver lobules of the histological slices (H&E) from the CG are represented by a circular or multi-dimensional geometrical structure close to the circle in the center of which the central vein can be identified. The

identification of such lobules is relatively easy on transparent histological slices, prepared after Indian Ink-Gelatin injection. It should be noted that the diameter of such "classical" lobules varies significantly and ranges from 300 μm to 600 μm.

Nine months after PH the sizes of those lobules of the histological slices, contours which can be identified, are higher than normal. Part of the sinusoids are dilated asymmetrically giving, to the liver tissue, a nonhomogenous view. The sinusoidal non-homogeneity is better seen on transparent histological slices prepared after Indian Ink - Gelatin injection: the "mega-lobules" formed by the aggregation of merging several adjacent lobules, a unified sinusoidal network of which originates from several portal venules, can be clearly seen in different areas. The boundaries between the adjacent lobules (including mega- lobules) are widened and filled by connective tissue fibers.

The results provided below are based on SEM investigation of the vascular casts of the normal liver containing blood vessels less than 300 μm in diameter. The sinusoidal vessels form three-dimensional meshwork of more or less uniform regular form as well as the mesh with difficultly described geometry. Three types of lobules can be distinguished in the liver tissue: Superficial lobules, deeply localized lobules and lobule-like structures.

The diameters of the sinusoidal replicas vary in a wide range (from 6 μm up to 20μm). The length of the sinusoidal vessels before the branching also varies (from 6 μm up to 50 μm). On some regions of the corrosion specimen, we have observed small capillary meshworks, connected to the sinusoidal casts – a so-called “periportal meshwork”, which sometimes connects the sinusoids of the lobules, located on the opposite sites of the portal vein branch. Although the border between these two lobules remains obvious.

The diameter of sinusoidal casts of the regenerated liver lobules often exceeds the diameter of sinusoidal casts in the control group. The sinusoidal casts, similar to the casts in the control group, create two types of meshwork – with parallel, rarely interconnected fragments and twisted, often "anastomosing" fragments. Sinusoidal casts, in addition to loops with an inner diameter of 30-50 μm (which are commonly found normally as well), often form loops with an inner diameter of 2-4 μm.

A large scale imaging of the sinusoidal casts shows that except for the imprints of the endotheliocytes and/or their nuclear-containing zones (which are also found in the control group samples). Unlike to the CG2, in SG1 the villous outgrowths are observed on the casts. The presence of such villi gives the sinusoidal casts a "scratchy" look.

Comparison the data obtained by morphometric investigation of SG1 and SG2 shows that after 9 months from PH the area of hepatocytes of the I and III zones are lesser compared to the similar data of the 2 weeks after PH. There was no significant difference between petameters.

Peculiarities of regeneration after 6 months following re-resection (SG3)

Peculiarities of regeneration after 6 months following re-resection were studied by complex morphological methods. The data obtained were compared with the examination results of relevant control group animals, as well as those of the first, and second study groups. Morphometric research findings of the liver tissue of animals from the 3rd study group reveal that: a) In the third study group, both the area and perimeter length ($P<0.05$) of hepatocytes located in the first and third zones of the acinus increase when compared to the control group; The hepatocytes in the first zone of acinus of the 2nd and 3rd study groups did not differ from each other in terms of either area or perimeter ($P>0,05$); c) In the 3rd study group, the area of hepatocytes in the third zone of acinus exceeds the similar area of hepatocytes in the 2nd study group. ($P<0,05$).

The diameters of the liver sinusoids of the 3rd study group animals are not the same, the boundaries between seperate lobules and mega-lobules are more clearly defined. The number and size of megalobules formed by lobule fusion has increased, according to a scanning electron microscope analysis of reregenerated liver corrosion specimens (often exceeding 1 mm). Architectonics of such megalobules is quite different from architectonics of control group lobules. At the same time, the boundaries between the structures that form meglobules are difficult to distinguish, whereas the limits between nearby megalobules are well defined. The diameter of the sinusoids and associated blood vessels exceeds the corresponding sizes of similar blood vessels in the

control and regenerated liver. In the network of hepatic sinusoidal casts of the 3rd study group animals, blind-ended areas were prevalent; In addition, there are local dilations, resulted by a combination of 3-4 sinusoids. Sinusoidal casts form loops with various inner diameters (5-30 μ). There are marked the imprints of adjacent cells and/or their nucleated zones on some of the casts. On the part of the sinusoidal casts, piliform processes identical to those described in regenerated liver sinusoidal casts have been observed. However, the size and occurrence frequency of these processes is much higher in the regeneration group.

The same length and varied area of periportal and pericentric hepatocytes in the liver of the 2nd control group animals indicates a difference in the section shape of these cells. Hepatocytes located in the periportal direction are more often polyhedral shapes within the square, and hepatocytes located in the pericentric direction have a more oblong. Regeneration of the liver as a result of resection and re-resection is associated with hepatocyte hypertrophy, located in both the I and III zones of the acinus. In addition, the hepatocyte are more uniform. It should be noted that hypertrophy is more pronounced in hepatocytes located in the III zone of the liver "reregenerated" after re-resection.

We studied the structure of the liver tissue at such terms when, the processes of liver regeneration are completed according to literature data. Considering the existing consensus, this indicates that post-resection regeneration has reached a state when, on the one hand, the liver satisfies the body's metabolic requirements, and on the other hand, portal hypertension is equalized.

According to our data, it may be assumed that hypertrophy of hepatocytes resulted from post PH activated mitoses (repopulatory) provides the first, i.e. body's requirements for metabolism, while the second, i.e. portal pressure equalization, is provided by an increase in the size of the blood vessels and dilation of part of the sinusoids. The results of our morphometry also confirm that the regenerated liver (regenerated lobes) following PH, should contain an increased number of hypertrophied hepatocytes. But in this case, the size of all lobules in the regenerated liver must be larger than the size of the lobules in the

control group. The findings of the histological and corrosion cast specimen studies reveal that, in addition to hypertrophy to varying degrees and to so-called megalobules, lobules of the size and shape of control animals are detected in both regenerated and reregenerated liver samples. Their presence indicates that the process of hyperplasia and hypertrophy did not affect all hepatocytes, and therefore all lobules.

The hepatocytes subjected to the proliferation and hypertrophy underwent remodeling into increased in size, including non-standard shape (hypertrophied) lobules, so called "Megalobules".

Despite the fact that corrosion and ink-injected specimens prepared 9 months after partial hepatectomy clearly show an increase in the number of "lobule" blood vessels, we prefer the careful term "lobule re-modeling" over "lobule proliferation". On the hepatic specimens regeneration after partial hepatectomy, we detected lobules that were smaller in size than the lobule sizes control group animals. Thus, more research is needed to confirm or disprove the assumption of the emergence of new lobules after partial hepatectomy.

After partial hepatectomy, remodeling of liver cells is accompanied by an increase in the number of connective tissue structures not only around large vessels, but also around their thin branches and, moreover, in Disse's spaces too. This indicates that both the remodeled cells and the whole lobules are more firmly embedded in the connective tissue skeleton of the liver compared to liver in the 2nd and 3rd control groups. Such embedding, supposedly after repeated partial hepatectomy, should result in less intensity of the new wave of remodeling. Studies of both histological and corrosion casts confirm this hypothesis. Furthermore, compared to the post-primary resection condition, masson's trichrome stained specimes indicate a significant increase in connective tissue fibers after repeated partial hepatectomy. Collagen fibers also accompany the peripheral blood vessels surrounding the remodeled lobules (megalobules), giving the liver parenchyma a nodular appearance. Due to the above, it may be assumed that after another (third) hepatectomy, the lobules will have less ability for remodeling.

The presence of numerous anastomoses between sinusoidal networks adjacent lobules allows us to imagine the entire sinusoidal network of the liver

as a single net that is supplied and drained by many blood vessels. Supplying blood vessels are represented not only by the interlobular venules, but also by the "involved" venules, which separate from the larger caliber blood vessels at every 300-600 micrometers, on two opposite sides. The distance between the involved venules corresponds to the size of the lobules, and the distance between the sinusoidal involvement sites in the central and/or sublobular venules corresponds to the zones of pericentral hepatocytes, given that one or two hepatocytes may be located between two adjacent sinusoids. The periportal and peribiliary networks, which emerge from the branching of the portal vein and hepatic artery, represent additional specific tributaries of the sinusoidal network.

After partial hepatectomy, as well as after repeated partial hepatectomy, during the ongoing liver tissue remodeling with the creation of so-called megalobules, the sinusoidal capillaries are involved by dilation, proliferation, and the formation of a new spatial network structure. However, this remodeling, as in the control group hepatocytes, does not apply to all sites of the sinusoidal network in the same way. Though, the sinusoidal network, like the control group, has two types of sites: parallel, with few connections to each other, and tortuous, with frequent anastomoses, but their intralobular topography is lethan that of the norm. The widening, lengthening of the sinusoidal folds, the appearance of "blind" extensions and increased loops confirm the existence of a proliferative process, which seems to be based on both hypertrophy and proliferation of sinusoidal endothelial cells. The latter is confirmed by the presence of imprints of endothelial cells, and their nucleated zones on part of the casts, the dimensions of which are larger than normally described.

Existance of blind extensions on the sinusoidal casts should be considered as confirmation of proliferation by gemmation of sinusoidal capillaries. The small inner diameter of some loops (for example, 2-4 micrometers) suggests that at that location hepatocyte should not be present always (it can not be placed, can not fit in).

The loops, with even smaller inner diameters, created as a result of interconnection of the small pterygoid extensions (processes) of the sinusoidal

cast, should be noted seperately. Presumably, the presence of such processes and loops should indicate that the so-called splitting mechanism of capillaries is involved in sinusoid proliferation, by creating an "endothelial curtain" ("partition") in their lumen and thus dividing this lumen into two, often unequal, parts.

Scanning electron microscopy of corrosion specimens prepared after 6 months from repeated resection of the regenerated liver, performed after 9 months from partial hepatectomy, also confirms the next stage of sinusoidal remodeling. There are local dilatations (sinusoidal lakuns) generated by a combination of 3-4 sinusoids, the sites of which are often difficult to separate from the central veins on histological specimens, in addition to the increased number of blind extensions of sinusoidal casts, as noted above.

The presence of fine piliform extensions on the regenerated liver sinusoidal casts should indicate the dilation of the sinusoidal endothelial cell fenesters and the possibility of penetration of ISM into them. Increased size and frequency of such processes on reregenerated liver sinusoidal casts is thought to be linked to greater dilatation of the sinusoidal endothelial cell fenestrae. Increased fenestration, in turn, must be related to endothelial cell hypertrophy, which occurs after resection and becomes more intensive after repeated resection.

Summary

The results of the light and scanning electron microscopy of our ISM characteristics, as well as corrosion casts made with it, confirm that this mass meets all the essential parameters for corrosion casts media and can be successfully used for relevant studies.

If we compare the data obtained from hepatocyte morphometry two weeks after partial hepatectomy to the data obtained nine months after partial hepatectomy, we'll find out that they differ as well. This allows us to assume that the structural transformation of the liver is a long process after resection of its 2/3. These data make corrections to the assumtion that regenerative processes in the liver of rodents after the resection of its 2/3 are over at the 7th - 10th day. Based on the results of our research, we consider this formulation to be

more accurate: after resection of its 2/3, liver regenerates and restores its mass and volume in 7-10 days, however the alteration of both its cellular and vascular structures, which in turn result in the spatial transformation of liver cells, continues even in the long term after resection.

The question is whether the permanent transformation of the liver architecture is caused only by partial hepatectomy, or is a regular phenomenon for the liver, occuringthroughout the entire ontogenesis. Confirmation or denial of possible changes in liver architecture after the completion of postnatal growth would be important for the study of the plasticity of liver structure, both as a whole or as its individual components, in the dynamics of ontogeny.

The process of regeneration of the rat liver does not end in one or two weeks. Despite the recovery of liver volume and mass, which is mainly based on hepatocyte mitosis, there is a permanent process of transformation of hepatocyte shape and size, as well as the vascular network in the regenerated liver. New intercellular connections are formed, including with the involvement of atypical membrane extensions of deformed adjacent hepatocytes. The vascular network also undergoes transformations both with changes in the shape and size of existing structures and with the formation of new sinusoidal capillaries and venules.

Changes in the spatial architecture of liver lobules are a result of these modifications.

The regeneration and re-regeneration of the liver occurs against a background of/due to complex morphological alterations. Both the parenchymal and stromal components of the organ are affected by alterations.

Data obtained from our studies suggest that after resection the liver mass is restored due to the hypertrophy of hepatocytes, dilatation and proliferation of sinusoids, as well as elongation of the existing blood vessels, increase of the number of ductules and multiplication of the interlobular connective tissue component, which in turn results in alteration of the structure of the lobule, i.e. remodeling. It should also be noted that changes occur not only within one classical lobule, but also due to the merging of adjacent lobules and the formation of a "megalobule".

The presence of observed minor lobules, however, necessitates additional research in this area to confirm that, in addition to enlarging and remodeling of the lobules, the regeneration process also occurs due to their multiplication.

Conclusions

- Mixture of solidified injection mass developed by us - 0.25 g of MAYCRYL CC powder (4.7% of the total mass) + 0.08 g of benzoyl peroxide (1.5% of the total mass) + 5 ml of Protacryl M + 0.2 ml of Redont Color dye - can be used successfully for replication of hepatic tubular structures (blood vessels). Corrosion casts obtained by using this mass are relevant for both light and scanning electron microscopy;
- Liver regeneration after 2/3 resection is a complex process that lasts for months; Liver "growth" during the first two weeks is due to cell hypertrophy / proliferation; In later stages, liver tissue is remodeled - by formation of unusually shaped and large lobules ("megalobules"), which is based on the remodeling of sinusoidal network architecture and the shape of hepatocytes;
- After liver resection, as well as after re- resection, remodeling of the intralobulular blood bed - sinusoidal network - is manifested by the transformation of spatial architecture, which is manifested by sinusoidal "budding" and "splitting" proliferation. Transformed network consists of sinusoids with different diameters and branching, some of which show signs of "veneration";
- Remodeling of hepatocytes is manifested by changes in their shape and diameter, serration of plasmic membrane, and the development of pseudopod-like protrusions, which in turn confirms the possibility of developing new intercellular connections.

Publications

1. Tsomaia K, Inauri N, Patarashvili L, Karumidze N, Azmaipharashvili E, Bebiashvili I, Kordzaia M, Kakabadze M, Dzidziguri D, Kordzaia D. To fill the missing fragments of a complex mosaic of liver regeneration. Transl Clin Med-Georg Med J. 2018 Apr 22;3:32-7.
2. Tsomaia K, Patarashvili L, Bebiashvili I, Azmaiparashvili E, Kakabadze M, Jalabadze N, Sareli M, Gusev S, Kordzaia D. New corrosion cast media and its ability for SEM and light microscope investigation. Microscopy research and technique. 2020 Jul;83(7):778-89.
3. Tsomaia K, Patarashvili L, Karumidze N, Bebiashvili I, Azmaipharashvili E, Modebadze I, Dzidziguri D, Sareli M, Gusev S, Kordzaia D. Liver structural transformation after partial hepatectomy and repeated partial hepatectomy in rats: A renewed view on liver regeneration. World Journal of Gastroenterology. 2020 Jul 21;26(27):3899.
4. Tsomaia K, Azmaipharashvili E, Gvidiani S, Bebiashvili I, Gusev S, Kordzaia D. Structural changes in rats'liver during the first 2 weeks following 2/3 partial hepatectomy. Georgian Medical News. 2021 Jan 1(310):134-41.
5. Azmaiparashvili E, Bebiashvili I, Karumidze N, Tsomaia K, Kordzaia D. Ductular reaction at the early and late stages of biliary obstruction: is the mechanism the same?. Georgian medical news. 2019 Jan 1(286):100-6.
6. Patarashvili L, Tsomaia K, Kakabadze M, Kordzaia D, Chanukvadze I. Perivascular connective tissue sheath and portal tracts in mammals. Translational and Clinical Medicine-Georgian Medical Journal. 2019 Feb 24;4(1):4-7.
7. Patarshvili LG, Tsomaia KB, Bebiashvili IS, Kordzaia DJ, Gusev SA. Spatial Organization of the Transport of Interstitial Fluid and Lymph in Rat Liver (Scanning Electron Microscopy of Injection Replicas). Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2021 Jan;170(3):395-9.
8. Patarashvili L, Azmaipharashvili E, Jandieri K, Gvidiani S, Tsomaia K, Kikalishvili L, Sareli M, Chanukvadze I, Kordzaia D. Liver extracellular matrix

peculiarities in mammals and avians. Georgian Medical News. 2021 Jan 1(310):124-33.
9. Azmaiparashvili E, Patarashvili L, Bebiashvili I, Tsomaia K, Gvidiani S, Tananashvili D, Kakabadze M, Gusev S, Kordzaia D. Spatial architecture of biliary tree in mammals: Fractal and Euclidean geometric features. Journal of Anatomy. 2021 Apr 4.

Oral presentations on the topic of thesis

1. Protacryl M–based corrosion casting of liver blood, lymph and biliary pathways; XXIV National Congress of The Bulgarian Anatomical Society, Bulgaria 2019
2. Newel view on liver regeneration after partial hepatectomy; XXIV National Congress of The Bulgarian Anatomical Society Bulgaria, 2019
3. For filling the missing fragments of complex mosaic of liver regeneration; XXVI International Symposium on Morphological Sciences (ISMS), Prague, Czech Republic; 2018

The research was conducted with the support of Shota Rustaveli Georgian National Science Foundation [Grant Number DP2016_22]