

- IGFBP2 expression through enhancing autophagy. *Sci. Rep.* 2018;8:3917.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-22257-1>
11. Hur H., Yu E. J., Ham I. H., Jin H. J., Lee D. Preoperative serum levels of insulin-like growth factor-binding protein 2 predict prognosis of gastric cancer patients. *Oncotarget.* 2017;8:10994-11003.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.14202>
12. Cai Q., Dozmorov M., Oh Y. IGFBP-3/IGFBP-3 Receptor System as an Anti-Tumor and Anti-Metastatic Signaling in Cancer. *Cells.* 2020;29(5):1261.
<https://doi.org/10.3390/cells9051261>
13. Xie M., Zhong Y., Xue Q., Wu M., Deng X. [et al.]. Impact of dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation on serum levels of insulin-like growth factor 1 (IGF-1): A dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. *Exp. Gerontol.* 2020;136:110949.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.110949>
14. Kim N. R., Jardí F., Khalil R., Antonio L., Schollaert D. [et al.]. Estrogen receptor alpha signaling in extrahypothalamic neurons during late puberty decreases bone size and strength in female but not in male mice. *FASEB J.* 2020;34(5):7118-7126.
<https://doi.org/10.1096/fj.202000272R>
15. Blyth A. J., Kirk N. S., Forbes B. E. Understanding IGF-II Action through Insights into Receptor Binding and Activation. *Cells.* 2020;9(10):2276.
<https://doi.org/10.3390/cells9102276>
16. Thomas D., Radhakrishnan P. Role of Tumor and Stroma-Derived IGF/IGFBPs in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel).* 2020;12(5):1228.
<https://doi.org/10.3390/cancers12051228>

Поступила 27.04.2021

Сведения об авторах:

Франциянц Елена Михайловна, доктор биологических наук, профессор, заместитель генерального директора по науке; тел.: 89185354388; e-mail: super.gormon@ya.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3618-6890>

Бандовкина Валерия Ахтямовна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей; тел.: 89054257627; e-mail: valerryana@yandex.ru

Каплиева Ирина Викторовна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией; тел.: 89185350516; e-mail: kaplirina@yandex.ru

Сурикова Екатерина Игоревна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник; тел.: 89281377880; e-mail: sunsur2000@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4318-7587>

Нескубина Ирина Валерьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник; тел.: 89281565656; e-mail: neskubina.irina@mail.ru

Трепятаки Лидия Константиновна, младший научный сотрудник; тел.: 89525686817; e-mail: legolab69@yandex.ru

Котиева Инга Мовлиевна, доктор медицинских наук, научный сотрудник; тел.: 89281755846; e-mail: kukulik70@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2796-9466>

Морозова Мария Игоревна, врач-педиатр; тел.: 89185105156; e-mail: maria-morozova94@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616.36-008.5-092.18-073.584

DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2022.17071>

ISSN – 2073-8137

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ГЕПАТОЦИТА ПРИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ БИЛИРУБИНЕМИИ

Ю. С. Винник ¹, Е. Е. Ачкасов ², Л. В. Кочетова ¹, Р. А. Пахомова ³

¹ Красноярский государственный медицинский университет
им. профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого, Российская Федерация

² Первый Московский государственный медицинский университет
им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Российская Федерация

³ Медицинский университет «Реавиз», Санкт-Петербург, Российская Федерация

THE ATOMIC FORCE MICROSCOPY OF THE HEPATOCYTE AT DIFFERENT DEGREE OF THE BILIRUBINEMIYA

Vinnik Yu. S. ¹, Achkasov E. E. ², Kochetova L. V. ¹, Pakhomova R. A. ³

¹ V. F. Voino-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University, Russian Federation

² I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),
Russian Federation

³ University REAVIZ, Saint-Petersburg, Russian Federation

Впервые в зависимости от выраженности билирубинемии методом атомно-силовой микроскопии изучено состояние цитоскелета и мембраны гепатоцита у 38 минипигов. Атомно-силовую микроскопию гепатоцита выполняли на атомно-силовом микроскопе IntegraAura (NT-MTD, Россия). По мере увеличения тяжести механической желтухи

гепатоцит терял четкость визуализации мембраны, клеточное ядро становилось выпуклым, его сегменты сливались. У животных с механической желтухой класса С ядро заполняло практически весь объем клетки, утрачивая четкость границ. Внутриклеточное давление и объем гепатоцита значительно увеличивались у животных с механической желтухой классов В и С. По мере нарастания билирубинемии у животных увеличивались объем и внутриклеточное давление гепатоцита, изменялись структура мембраны и цитоскелет.

Ключевые слова: цитоскелет гепатоцита, механическая желтуха, атомно-силовая микроскопия, билирубинемия

For the first time, depending on the severity of bilirubinemia, the state of the cytoskeleton and the hepatocyte membrane was studied by atomic force microscopy. To study the hepatocyte cytoskeleton, an experiment was performed on 38 minipigs. Atomic force microscopy of hepatocyte was performed on an atomic force microscope IntegraAura (NT-MTD, Russia). As the severity of mechanical jaundice increased, hepatocyte lost the clarity of membrane imaging, the cell nucleus became convex, its segments merged, in animals with the severity of class C mechanical jaundice, the nucleus filled almost the entire cell volume, losing the clarity of the boundaries. Intracellular pressure and hepatocyte volume increased significantly in animals with class B and C mechanical jaundice severity. According to the experimental study, with bilirubinemia increased in animals, the volume of the hepatocyte and its intracellular pressure also increased, the structure of the membrane and the cytoskeleton of the hepatocyte changed.

Keywords: hepatocyte cytoskeleton, mechanical jaundice, atomic force microscopy, bilirubinemia

Для цитирования: Винник Ю. С., Ачкасов Е. Е., Кочетова Л. В., Пахомова Р. А. АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ГЕПАТОЦИТА ПРИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ БИЛИРУБИНЕМИИ. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2022;17(3):291-294. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2022.17071>

For citation: Vinnik Yu. S., Achkasov E. E., Kochetova L. V., Pakhomova R. A. THE ATOMIC FORCE MICROSCOPY OF THE HEPATOCYTE AT DIFFERENT DEGREE OF THE BILIRUBINEMIA. *Medical News of North Caucasus*. 2022;17(3):291-294. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2022.17071> (In Russ.)

АСМ – атомно-силовая микроскопия
МЖ – механическая желтуха

ОПН – острая печеночная недостаточность

При оценке частоты заболеваемости органов брюшной полости выявлено, что заболевания, сопровождающиеся механической желтухой, следуют после острого аппендицита и кишечной непроходимости. Их количество ежегодно увеличивается, а процент летальных исходов, несмотря на внедрение малоинвазивных технологий, растет и достигает 19 %. Состояние больных с механической желтухой зачастую зависит от степени тяжести печеночной недостаточности (ОПН), которая в 15–30 % случаев осложняет течение послеоперационного периода у больных с механической желтухой [1–3].

Механизмы развития ОПН зависят как от концентрации желчных кислот и содержания билирубина в крови, так и от возраста больного, наличия у него сопутствующих заболеваний.

По мнению большинства хирургов главным патогенетическим звеном развития ОПН у больных механической желтухой является нарушение выделения через желчные протоки связанного билирубина, что ведет к патоморфологическим изменениям. Гистологически в печени появляются признаки некробиоза гепатоцитов, развивается их выраженная дистрофия, нарастает отек пространства Диссе, появляются локальные очаги некроза. При развитии тяжелой степени ОПН функционирующая часть паренхимы печени уменьшается до критической массы [4–7].

При поражении печени токсической этиологии морфофункциональные изменения клеток наступают из-за нарушения цитоскелета и патологии мембраны. Мембрана гепатоцита высокоактивна, поскольку именно через неё происходит обмен веществ между гепатоцитом и кровью. При этом в цитоплазме наблюдается ферментативный дисбаланс, меняется внутриклеточный ионный гомеостаз, нарушаются перекисные процессы. Макрофаги, лимфоциты, Kupfer-клетки и другие клетки иммунной системы принимают активное участие в этих процессах.

К непаренхиматозным клеткам относятся синусоидальные эндотелиальные клетки и клетки билиарной системы, однако две трети общей клеточной популяции печени составляют гепатоциты [7–10].

Публикации, посвященные изучению роли клеток иммунной системы в развитии печеночного фиброза при механической желтухе, единичны, при этом работы по оценке влияния МЖ на цитоскелет гепатоцита практически отсутствуют. В этом аспекте изучение мембраны и структуры гепатоцита при различной степени билирубинемии вызывает большой научный и практический интерес.

Цель исследования: при помощи атомно-силовой микроскопии исследовать строение мембраны и цитоскелета гепатоцита в зависимости от степени билирубинемии.

Материал и методы. Эксперимент проведен на 38 минипигах весом $7,05 \pm 0,5$ кг. Все исследования выполняли с 9:00 до 12:00 с соблюдением принципов, изложенных в законодательных документах по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных целей. Методика моделирования механической желтухи и условия эксперимента подробно изложены в предыдущих работах [11].

По соотношению уровня трансаминаз и билирубина сыворотки в норме оценивали степень тяжести МЖ [11]. У всех экспериментальных животных выполнена лапаротомия. Перевязку общего желчного протока проводили животным 2–4 групп. По мере нарастания МЖ выделили четыре группы животных. Животные без моделирования МЖ составили первую группу. Мини-пиги с перевязкой желчных протоков и легкой степенью тяжести механической желтухи, что по классификации Э. И. Гальперина соответствовало классу А, были отнесены ко 2-й группе. В 3-ю группу вошли животные с МЖ, соответствующей классу В, или со средней степенью тяжести механической желтухи. В 4-ю группу – животные с механической желтухой, соответствующей классу С [12].

Всем животным выполняли биохимический анализ крови, проводили гистохимическое исследование ткани печени и микроскопию гепатоцита (с использованием атомно-силового микроскопа IntegraAura). Сканирование мембраны гепатоцита выполняли в полуконтактном режиме. Силы адгезии измеряли в контактном режиме. Использовали кремниевые зонды серии NSG01 (NT-MDT, Россия) жесткостью 7,2 нН/нм с резонансной частотой 190 кГц, при этом длина кантилевера составляла 125 мкм, ширина – 20 мкм, толщина – 3 мкм. Применяли программное обеспечение ACM NOVA для получения изображений и программу Image Analysis для анализа изображений.

Анализ сканов проводили на отмытых гепатоцитах. Сканировали 20–25 гепатоцитов в каждом образце. Первоначально исследовали гепатоцит в целом, затем сканировали его мембрану.

Результаты и обсуждение.

У здоровых животных гепатоциты имели полигональную форму, мембрана была четко контурирована, имелось округлое ядро (рис. 1).

По результатам АСМ гепатоцитов животных второй группы строение ядра, его контуры не отличались от гепатоцита здорового животного, но была отмечена недостаточная четкость мембраны клетки. У животных с МЖ средней степени тяжести мембрана клетки плохо визуализировалась, ядро клетки было увеличено в размерах, занимало центральную часть гепатоцита, было «разбухшим» (рис. 2). У животных 4-й группы (с тяжелой механической желтухой) визуализировать мембрану полностью практически не представлялось возможным, ядро клетки было выпуклым, заполняло объем клетки практически полностью (рис. 3).

По мере нарастания у животных бициркуляции наблюдали изменение микроворонки базальной поверхности гепатоцита, которые приобретали вид шиповидных выростов. При оценке размеров гепатоцита статистически значимых изменений его площади не выявлено, она оставалась в пределах $161,50 \pm 2,0$ – $158,40 \pm 1,80$ мкм², но при этом увеличивался объем эритроцита. Статистически достоверно возрастал объем гепатоцита у животных со средней и тяжелой МЖ. На фоне этого исчезала четкость мембраны гепатоцита и увеличивалось давление внутри клетки. Внутриклеточное давление практически в четыре раза увеличивалось у животных с тяжелой МЖ: с 0,34 кПа во 2-й группе до 1,3 кПа в 4-й группе. Статистически значимо у животных с МЖ IV степени был больше объем гепатоцита.

Структурно-морфологические характеристики отдельных клеток рассматриваются как информативный критерий, дающий возможность оценить функциональное состояние органа. Механическая

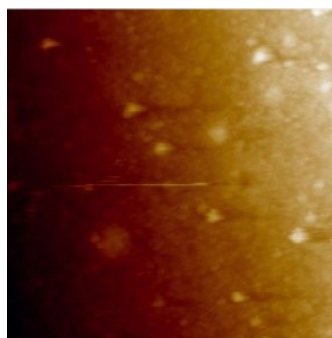


Рис. 1. 2D- и 3D-изображение гепатоцитов интактного животного

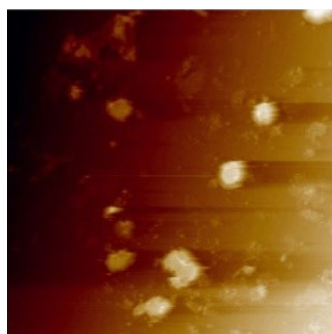
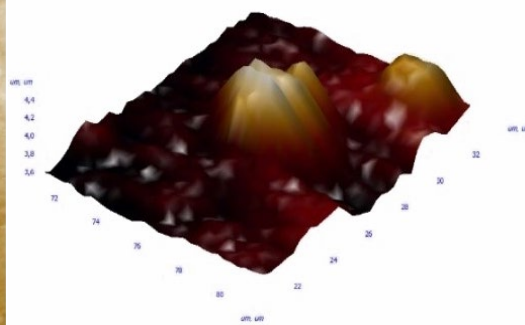


Рис. 2. 2D- и 3D-изображение гепатоцитов экспериментального животного 3-й группы

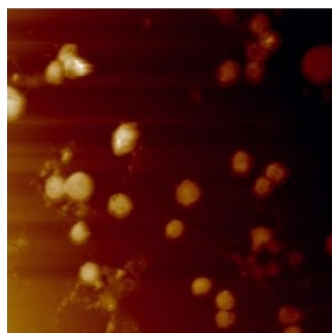
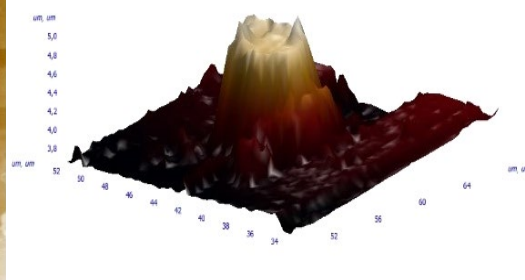
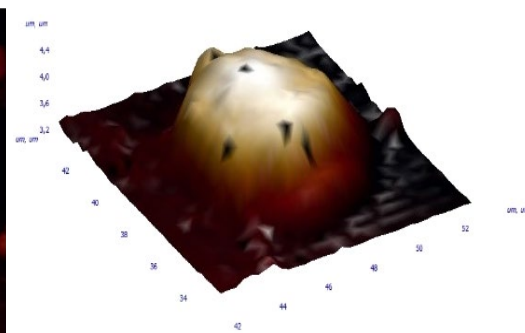


Рис. 3. 2D- и 3D-изображение гепатоцитов экспериментального животного 4-й группы



желтуха любой этиологии, вызывающая гипертензию внутрипеченочных желчных протоков, сопровождается апоптозом с последующим цитолизом и некрозом гепатоцитов. Атомно-силовое микроскопия позволяет визуализировать цитоскелет и изучать нано-механические свойства клеточной мембраны, которые определяют течение как физиологических, так и патологических процессов. Сохранение объема и формы клетки имеет важное значение в гомеостазе и функциональном состоянии не только самой клетки, но и ткани и органа в целом [13, 14].

При изучении цитоскелета и билипидной мембраны гепатоцита методом АСМ показано, что параллельно с нарастанием тяжести МЖ на мембране появляются шиповидные выросты, ядро становится нечетким с размытыми контурами, при этом объем гепатоцита и внутриклеточное давление увеличиваются. Подобные изменения выявлены в эритроцитах и нейтрофилах периферической крови больных с разной тяжестью МЖ доброкачественной этиологии [11, 15–17]. Полученные данные позволяют предположить, что рост внутриклеточного давления гепатоцита обусловлен постепенным

разрушением мембраны и билипидного слоя мембраны ядра. Изменение цитоскелета, объема и внутриклеточного давления гепатоцита является одним из цитологических признаков перехода апоптоза в некроз. Эндотоксическая интоксикация, обусловленная МЖ, нарушает не только биохимические процессы, но и структуру клетки. Однонаправленность изменений клеток печени и клеток периферической крови экспериментальных животных подтверждает роль билирубинемии в патогенезе ОПН у больных механической желтухой.

Литература/References

1. Федоров В. Э., Харитонов Б. С., Масляков В. В., Логвина О. Е., Нарыжная М. А. Особенности течения механической желтухи, обусловленной осложнением желчнокаменной болезни. *Вестник хирургии им. И. И. Грекова*. 2020;179(3):48-57. [Fedorov V. Je., Haritonov B. S., Masljakov V. V., Logvina O. E., Naryzhnaja M. A. Features of the course of mechanical jaundice due to complications of bile stone disease. *Vestnik hirurgii im. I. I. Grekov*. 2020;179(3):48-57. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.24884/0042-4628-2020-179-3-48-57>
2. Papakostas C., Bezirizoglou E., Pitiakoudis M. [et al.]. Endotoxemia in the portal and the systemic circulation in obstructive jaundice. *Clin. Exp. Med.* 2003;3:124-128. <https://doi.org/10.1007/s10238-003-0015-y>
3. Тарасенко С. В., Натальский А. А., Луньков И. А., Зайцев О. В., Песков О. Д. Печеночная недостаточность при механической желтухе. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2013;10:54. [Tarasenko S. V., Natal'skij A. A., Lun'kov I. A., Zajcev O. V., Peskov O. D. A liver failure eat mechanical jaundice. *Experimentsnaya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2013;10:54. (In Russ.)].
4. Jeremy I., Don C. Rokey. Diagnosis and evaluation of hyperbilirubinemia. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2017;33(3):164-170. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000354>
5. Kleiner D. E., Chalasani N. P., Lee W. M., Fontana R. J., Bonkovsky H. L. Hepatic histological findings in suspected drug-induced liver injury: systematic evaluation and clinical associations. *Hepatology*. 2014;59(2):661-670. <https://doi.org/10.1002/hep.26709>
6. Беляев А. Н., Козлов С. А., Беляев С. А., Костин С. В., Дербеденева О. А. Функциональные и морфологические нарушения печени при остром обтурационном холестазе и их коррекция (экспериментальное исследование). *Анналы хирургической гепатологии*. 2014;19(4):64-70. [Belyaev A. N., Kozlov S. A., Belyaev S. A., Kostin S. V., Derbedeneva O. A. Functional and morphological liver disorders in acute obturation cholestasis and their correction (experimental study). *Annaly khirurgicheskoy gepatologii*. 2014;19(4):64-70. (In Russ.)].
7. Raffeto J. D. Changes in cellular motility and cytoskeletal actin in fibroblasts from patients with chronic venous insufficiency and in neonatal fibroblasts in the presence of chronic wound fluid. *J. Vasc. Surg.* 2001;33(6):1233-1241. <https://doi.org/10.1067/mva.2001.113297>
8. Мостюк Е. М. Морфофункциональные нарушения в печени как критерии прогноза развития печеночной недостаточности при механической желтухе. *Харьковская хирургическая школа*. 2013;3:160-164. [Mostjuk E. M. Morfofunktsionalnye's Moscow bale of violation in a liver as criteria of the forecast of development of a liver failure at mechanical jaundice. *Kharkovskaya khirurgicheskaya shkola*. 2013;3:160-164. (In Russ.)].
9. Ali Kemal Onalan, Salih Tuncal, Sibel Kilicoglu, Salih Celepli, Zahide Esra Durak. Effect of silymarin on oxidative stress and liver histopathology in experimental obstructive jaundice model. *Acta cirurgica brasileira*. 2016;31(12):801-806. <https://doi.org/10.1590/s0102-865020160120000004>
10. Xu R., Huang H., Zhang Z., Wang F. S. The role of neutrophils in the development of liver diseases. *Cell. Mol. Immunol.* 2014;11(3):224-231. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.2>
11. Пахомова Р. А., Винник Ю. С., Кочетова Л. В., Воронова Е. А., Нагорнов Ю. С. Атомно-силовая микроскопия эритроцита при разной степени тяжести механической желтухи (экспериментальное исследование). *Анналы хирургической гепатологии*. 2017;1(22):1:82-87. [Pakhomova R. A., Vinnik Yu. S., Kochetova L. V., Voronova E. A., Nagornov Yu. S. Atomic and power microscopy of an erythrocyte at various degrees of severity of mechanical jaundice (pilot study). *Annaly khirurgicheskoy gepatologii*. 2017;1(22):82-87. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.18484/2305-0047.2019.6.650>
12. Гальперин Э. И., Момунова О. Н. Классификация тяжести механической желтухи. *Анналы хирургической гепатологии*. 2012;2:5-9. [Galperin E. I., Momunova O. N. Classification of weight of mechanical jaundice. *Annaly khirurgicheskoy gepatologii*. 2012;2:5-9. (In Russ.)].
13. Takeyasu K. (Ed.). Atomic force microscopy in nanobiology. CRC Press; 2014:1-437. <https://doi.org/10.1201/b15671>
14. Moroz V. V., Chernysh A. M., Kozlova E. K., Borshegovskaya P. Y., Bliznjuk U. A. [et al.]. Comparison of red blood cell membrane microstructure after different physicochemical influences: atomic force microscope research. *J. Crit. Care*. 2010;25(3):539-el. <https://doi.org/10.1016/j.jcrr.2010.02.007>
15. Tian Y., Gawlak G., Shah A. S., Higginbotham K., Tian X. [et al.]. Hepatocyte growth factor-induced Asef-IQGAPI complex controls cytoskeletal remodeling and endothelial barrier. *J. Biol. Chem.* 2015;290(7):4097-4109. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.620377>
16. Пахомова Р. А., Винник Ю. С., Кочетова Л. В. Морфофункциональное состояние эритроцитов при доброкачественной механической желтухе. *Вестник хирургии им. И. И. Грекова*. 2017;4:22-26. [Pakhomova R. A., Vinnik Yu. S., Kochetova L. V. Morfofunktsional condition of erythrocytes at benign mechanical jaundice. *Vestnik hirurgii im. I. I. Grekov*. 2017;4:22-26. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.24884/0042-4625-2017-176-4-22-26>
17. Li Mi, Liu Lian Qing, Xi Ning, Wang Yue Chao, Dong Za Li, Xiao Xiu Bin. Atomic force microscopy imaging and mechanical properties measurement of red blood cells and aggressive cancer cells. *Sci. China Life Sci.* 2012;55(11):968-973. <https://doi.org/10.1007/s11427-012-4399-3>

Поступила 15.04.2021

Сведения об авторах:

Винник Юрий Семёнович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей хирургии им. профессора М. И. Гильмана; тел.: 89131917762; e-mail: yuvinnik@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8135-0445>

Ачкасов Евгений Евгеньевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой спортивной медицины и медицинской реабилитации; тел.: 84992482430; e-mail: 2215.g23@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9964-5199>

Кочетова Людмила Викторовна, кандидат медицинских наук, доцент, профессор кафедры общей хирургии им. профессора М. И. Гильмана; тел.: 89620677313; e-mail: DissovetKrasGMU@bk.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5784-7067>

Пахомова Регина Александровна, доктор медицинских наук, доцент кафедры хирургических болезней; тел.: 89029423912; e-mail: PRA5555@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3681-4685>