

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ЧЕСТНОВА
Анна Юрьевна



**СОДЕРЖАНИЕ И СТРУКТУРА ГЛИКОГЕНА В ГЕПАТОЦИТАХ
НОРМАЛЬНОЙ И ЦИРРОТИЧЕСКОЙ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ И ЧЕЛОВЕКА**

03.03.04 — клеточная биология, цитология, гистология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Безбородкина Наталья Николаевна

Санкт-Петербург

2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
Актуальность исследования.....	7
Цель и задачи исследования.....	9
Основные положения, выносимые на защиту.....	9
Научная новизна полученных результатов.....	10
Теоретическая и практическая значимость работы.....	10
Апробация работы.....	10
Личный вклад автора.....	11
Структура и объем диссертации.....	11
Финансовая поддержка работы.....	11
Список работ, опубликованных по теме диссертации.....	12
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Запасные вещества у животных — жир и гликоген. Различная стратегия использования жиров и углеводов в организме.....	14
1.2. Содержание гликогена в различных тканях, клетках. Динамика в процессе жизнедеятельности. Пищевой цикл. Накопление гликогена в различных тканях перед рождением животного. Значение запасов гликогена для мышечного сокращения.....	15
1.3. Локализация гликогена в гепатоцитах. Первичная структура гликогена, центральная роль печени в его метаболизме. Синтез и деградация гликогена в печени. Ферменты метаболизма гликогена.....	21
1.4. Тканевые и клеточные факторы, влияющие на метаболизм и содержание гликогена.....	34
1.5. Нарушения метаболизма гликогена в печени.....	40
1.6. Структура молекулы гликогена. β и α -частицы гликогена.....	48
1.7. Фракции гликогена, извлекаемые при обработке тканей трихлоруксусной кислотой и КОН. Про- и макрогликоген.....	57
1.8. Основные принципы метода FRET.....	64
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	67
2.1. Объекты исследования.....	67
2.1.1. Экспериментальные животные.....	67
2.1.2. Клинический материал.....	67
2.2. Методы приготовления препаратов.....	68
2.2.1. Приготовление и окрашивание парафиновых срезов.....	68
2.2.2. Приготовление препаратов-мазков изолированных клеток печени.....	68

2.3. Комбинированный цитохимический метод для количественного определения нескольких компонентов в одной и той же клетке	69
2.3.1. Определение сухой массы гепатоцитов	70
2.3.2. Выявление и измерение содержания общего гликогена в изолированных гепатоцитах крысы	71
2.3.3. Определение содержания ДНК в ядрах гепатоцитов крысы и человека.....	72
2.4. Разработка метода для исследования структуры гликогена в отдельных клетках	73
2.4.1. Выбор пары красителей, пригодных для FRET-анализа	73
2.4.2. Определение кинетики окрашивания гликогена в гепатоцитах с помощью реактивов типа Шиффа Au-SO ₂ и EtBr-SO ₂	75
2.4.3. Выявление ЛД- и ТД-фракций гликогена в одной и той же клетке и определение их содержания	76
2.4.4. Анализ стабильности альдегидных групп, образовавшихся в остатках глюкозы гликогена при обработке препаратов йодной кислотой	78
2.4.5. Экстрагирование фракций гликогена из гепатоцитов с помощью трихлоруксусной кислоты и КОН	78
2.5. Оценка степени заполнения внешних ярусов в молекуле гликогена	79
2.6. Выбор оптимальных условий исследования структуры β-частицы гликогена с помощью метода FRET	80
2.6.1. Влияние порядка окрашивания клеток реактивами типа Шиффа на уровень FRET-сигнала	80
2.6.2. Исследование структуры молекул гликогена с помощью конфокальной микроскопии с применением метода FRET (AB).....	80
2.6.3. Определение расстояния между остатками глюкозы в β-частицах гликогена.....	81
2.6.4. Расчет R ₀ для пары Au-EtBr.....	81
2.7. Статистическая обработка полученных данных	82
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	83
3.1. Микроскопическая структура печени крысы и человека в норме и при хроническом гепатите	83
3.1.1. Микроскопическая структура печени крысы в норме и при циррозе, вызванном воздействием CCl ₄	83
3.1.2. Микроскопическая структура печени человека в норме и при циррозе	84
3.2. Полиплоидия и гипертрофия гепатоцитов крысы и человека в норме и при циррозе печени	85
3.3. Общая характеристика гликогенеза в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крысы и человека.....	87

3.3.1. Динамика накопления гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени после введения глюкозы голодным крысам.....	87
3.3.2. Содержание общего гликогена в гепатоцитах человека в норме, при хроническом гепатите и циррозе печени.....	88
3.4. Исследование зависимости содержания общего гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени от степени их плоидности на разных стадиях рефиндинга крыс.....	89
3.5. Изменение сухой массы гепатоцитов различных классов плоидности в нормальной и цирротической печени крысы в ходе гликогенеза.....	93
3.6. Сухая масса гепатоцитов различных классов плоидности у человека в норме, при хроническом гепатите и циррозе печени в постабсорбтивном периоде.....	95
3.7. Зависимость содержания общего гликогена в клетках от их размера в популяциях гепатоцитов различных классов плоидности нормальной и цирротически измененной печени крысы.....	98
3.8. Зависимость содержания общего гликогена в клетках от их массы в различных классах плоидности гепатоцитов человека в норме, при хроническом гепатите и циррозе печени.....	99
3.9. Содержание макрогликогена и прогликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крысы и человека.....	105
3.10. Доля остатков глюкозы на внешних ярусах молекул гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крысы и человека.....	108
3.11. Динамика заполнения внешних ярусов β -частиц гликогена в популяции гепатоцитов нормальной и цирротической печени крысы в ходе гликогенеза.....	110
3.12. Степень заполнения внешних ярусов β -частиц гликогена в популяции гепатоцитов нормальной и патологически измененной печени человека.....	115
3.13. Эффективность FRET в гепатоцитах крысы в ходе гликогенеза.....	116
3.14. Изменение расстояния между цепями глюкозных остатков в β -частицах гликогена в гепатоцитах крысы в ходе гликогенеза.....	120
3.15. Эффективность FRET и ее распределение в цитоплазме гепатоцитов человека в постабсорбтивном периоде.....	124
3.16. Расстояние между цепями глюкозных остатков в β -частицах гликогена в гепатоцитах человека в постабсорбтивном периоде.....	125
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	128
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	147
ВЫВОДЫ.....	148
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	149

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АлАТ — аланинаминотрансфераза

АМФК — аденозинмонофосфат киназа

АсАТ — аспартатаминотрансфераза

ГБ — гликогеновая болезнь

ГС — гликогенсинтаза

ГФ — гликогенфосфорилаза

ГФа — активная форма гликогенфосфорилазы

Г-1-Ф — глюкозо-1-фосфат

Г-6-Ф — глюкозо-6-фосфат

Г-6-Фаза — глюкозо-6-фосфатаза

ДГ — десмогликоген

ДВФ — деветвящий фермент

ЖК — жирные кислоты

ЛГ — лиогликоген

ЛД — ложные дольки печени

ЛД-фракция — легкодоступная фракция гликогена

МГ — макрогликоген

МГ/ПГ — отношение содержания макрогликогена к содержанию прогликогена

Н — норма

ОГ — общий гликоген

ПГ — прогликоген

ПЗ — портальная зона дольки печени

ПЗ/ЦЗ-гликоген — отношение содержания гликогена в гепатоцитах портальной зоны дольки печени к содержанию гликогена в гепатоцитах центральной зоны

СГ — суммарный гликоген (СГ = ОГ)

СД — сахарный диабет

СМГ — сухая масса гепатоцитов

ТД-фракция — труднодоступная фракция гликогена

ТХУ — трихлоруксусная кислота

ХГ — хронический гепатит

ЦЗ — центральная зона дольки печени

ЦОГ — цепи остатков глюкозы

ЦП — цирроз печени

ЭМ — электронная микроскопия

ЯМР — ядерный магнитный резонанс

Ac — акцептор

Au-SO₂ — аурамин-SO₂

Don — донор

E_{FRET} — эффективность FRET (Förster Resonance Energy Transfer), %

EtBr-SO₂ — бромистый этидий-SO₂

PAS — Periodic Acid Schiff-реакция

r — расстояние между донором и акцептором, нм

R₀ — фёрстеровское расстояние между донором и акцептором, на котором эффективность FRET составляет 50 %, нм

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Гликоген — разветвленный полимер глюкозы, содержащийся в качестве запасного вещества практически во всех клетках человека и животных. Он играет важную роль в жизнедеятельности организма, являясь легкодоступным источником энергии для различных метаболических процессов в клетках. В цитоплазме клеток гликоген откладывается в виде особых гранул — β -частиц. В клетках печени, помимо β -частиц, гликоген может находиться также в виде α -частиц (с диаметром ~ 200 нм и более), представляющих ковалентно связанные комплексы из 20–40 β -частиц (Devos et al., 1983; Yang et al., 1990; Rybicka, 1996; Ryu et al., 2009; Sullivan et al., 2010, 2012, 2014). Способность клеток паренхимы печени — гепатоцитов — запасать гликоген, синтезируя его из глюкозы после приема пищи и расщепляя в соответствии с требованиями организма, представляет важный механизм поддержания постоянного уровня глюкозы в крови.

Метаболизм гликогена отличается необычайной сложностью, а его регуляция осуществляется с помощью сложнейших механизмов, включающих различные ферменты, гормоны, ингибиторы и активаторы ферментов, а также ионы металлов (Ferrer et al., 2003; Greenberg et al., 2006; Jurczak et al., 2008). Немаловажную роль в регуляции этих процессов играют также тканевые и клеточные факторы (Jungermann, 1992; Rajvanshi et al., 1998; Teutsch et al., 1999; Kudryavtseva et al., 2001), однако их влияние на содержание гликогена в клетках исследовано недостаточно. В частности, неясно, какое влияние оказывают размеры клеток и их плоидность на течение гликогенеза и содержание в них гликогена.

Со времени открытия гликогена К. Бернаром (1857) прошло почти 160 лет. Однако, несмотря на интенсивные исследования его метаболизма, вылившиеся, в частности, в четыре Нобелевские премии (K. Cori and G. Cori, 1947; L. Leloir, 1970; E. Sutherland, 1971; E. Krebs and E. Fischer, 1992), сведения о пространственной структуре частиц гликогена остаются крайне скудными. Согласно современным представлениям, полностью сформированная молекула гликогена, называемая также β -частицей, имеет диаметр около 42 нм и содержит ~ 55000 остатков глюкозы, соединенных α -(1 \rightarrow 4) и α -(1 \rightarrow 6) гликозидными связями. β -частица, в центре которой находится самогликозилирующийся белок гликогенин, состоит из 12 концентрических ярусов. Четыре внешних яруса частицы включают ~ 95 % всех глюкозных остатков, а восемь внутренних ярусов образуют так называемый скелет, или прогликоген, и содержат около 5 % всех глюкозных остатков молекулы гликогена (Melendez-Hevia et al., 1993; Rybicka, 1996; Melendez et al., 1999; Shearer, Graham, 2002). Полагают, что прогликоген является стабильной промежуточной формой гликогена на пути формирования полной β -частицы (Lomako et al.,

1991; 1993; Alonso et al., 1995). Однако неизвестно существуют ли видовые различия внутренней структуры частиц гликогена или эта структура одинакова у всех видов млекопитающих и неизменна в норме и при патологии.

Общее содержание гликогена в клетках печени, количество его α - и β -частиц колеблется в определенных пределах и зависят от физиологического состояния организма (Devos et al., 1983; Rybicka, 1996; Sullivan et al., 2010). Избыток или, напротив, значительное снижение его содержания в клетках может быть причиной тяжелых заболеваний, среди которых следует отметить сахарный диабет и различные наследственные гликоgenoзы. Для этих болезней характерно не только увеличенное или сниженное по сравнению с нормой содержание гликогена в клетках, но и существенное нарушение его структуры (Розенфельд, Попова, 1989; Ganesh et al., 2001; Tagliabracci et al., 2007; Mayatepek et al., 2010; Tagliabracci et al., 2011).

Хронические гепатиты различной этиологии и их завершающая стадия — цирроз также относятся к тяжелым и часто встречающимся заболеваниям печени у человека. Цирроз печени входит в число основных причин смертности населения многих стран. Установлено, что метаболизм глюкозы и гликогена при циррозе печени нарушен и приобретает ряд черт, свойственных диабету (Owen et al., 1981; Kruszynska, McIntyre, 1991; Kruszynska, 1999; Petersen et al., 1999). Показано также, что это заболевание характеризуется накоплением гликогена в клетках печени и изменением его структуры (Кудрявцева, 1987; Кудрявцева и др., 1992; Kudryavtseva et al., 2001). Однако конкретные механизмы этих структурных изменений остаются неизвестными.

В настоящее время для исследования структуры гликогена используются различные химические и физические методы, но ни один из них не позволяет с достаточной точностью и полнотой описать пространственное строение этой молекулы. Кроме того, почти все эти методы применимы лишь к гликогену, выделенному из ткани, и в этом случае всегда существует опасность возникновения ошибок, связанных с нарушением его исходной структуры. К числу немногочисленных методов, позволяющих проводить исследования структуры гликогена непосредственно в клетках, можно отнести электронную микроскопию, однако этот метод также не дает возможности судить о внутреннем строении его молекул. Поэтому поиск новых подходов, которые позволили бы исследовать структуру молекул гликогена в отдельных клетках, весьма актуален. Такой подход позволил бы соотнести изменения в содержании и структуре гликогена в клетке с ее морфологическими и физиологическими особенностями в норме и при патологии.

Цель и задачи исследования

Цель настоящей работы заключалась в определении содержания гликогена и выяснении его структуры в отдельных гепатоцитах нормальной и цирротической печени крысы и человека. В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

1. В гепатоцитах нормальной и цирротической печени крысы на разных этапах гликогенеза определить содержание гликогена, сухую массу клеток и их плоидность.
2. В нормальной и цирротической печени человека изучить взаимосвязь между содержанием гликогена в гепатоцитах, сухой массой клеток и их плоидностью.
3. Разработать микрофлуориметрический метод определения содержания и структуры гликогена в отдельных гепатоцитах на основе FRET (Förster Resonance Energy Transfer).
4. С помощью разработанного метода исследовать структуру β -частиц гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крысы на разных этапах гликогенеза.
5. Провести анализ структуры β -частиц гликогена в гепатоцитах нормальной и патологически измененной печени человека.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Накопление гликогена в гепатоцитах нормальной печени крысы и человека зависит от размера клеток, а при циррозе печени такая зависимость отсутствует. При этом содержание гликогена в клетках изменяется пропорционально их плоидности.

2. Характер гликогенеза и структура β -частиц гликогена в гепатоцитах цирротической печени у крысы и человека различны:

- в отличие от человека, накопление гликогена в гепатоцитах цирротической печени крысы обусловлено не синтезом новых β -частиц, а заполнением внешних ярусов частиц, уже имеющихся в клетках.

- в гепатоцитах цирротической печени крысы внешние ярусы β -частиц заполнены в большей степени, чем в норме, в то время как при циррозе печени человека, наоборот, внешние ярусы частиц заполнены меньше, чем в норме.

- в гепатоцитах крысы, по мере развития цирроза, расстояние между цепями глюкозных остатков в β -частицах увеличивается, а в гепатоцитах человека — уменьшается.

3. По мере заполнения внешних ярусов β -частиц расстояние между цепями остатков глюкозы уменьшается. Особенно четко эта зависимость выражена в гепатоцитах нормальной печени крысы и человека.

Научная новизна полученных результатов

Ряд результатов, полученных при исследовании структуры гликогена в нормальной и цирротической печени крысы и человека, являются приоритетными. В частности, впервые установлено, что содержание гликогена в гепатоцитах нормальной печени зависит от их размера: чем больше клетка, тем больше в ней гликогена. В цирротической печени подобная зависимость отсутствует.

Впервые показано, что накопление гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крысы связано не с синтезом новых его β -частиц, а с увеличением степени заполнения ярусов в частицах, уже имеющихся в клетках. В отличие от крысы, накопление гликогена в гепатоцитах человека в ходе развития цирроза печени происходит, главным образом, за счет увеличения количества β -частиц.

Впервые установлено, что в процессе гликогенеза сухая масса гепатоцитов и содержание в них гликогена, как в нормальной, так и в цирротической печени крысы изменяются пропорционально дозе генов.

С помощью метода FRET (Förster Resonance Energy Transfer) впервые показано, что по мере заполнения внешних ярусов β -частиц остатками глюкозы расстояние между ярусами уменьшается.

Теоретическая и практическая значимость работы

Работа имеет фундаментальную направленность. Ее результаты важны, прежде всего, для понимания механизмов нарушения метаболизма гликогена и структуры его молекул при хронических поражениях печени. Наличие или отсутствие зависимости между размером гепатоцитов и содержанием в них гликогена, а также соотношение прогликогена и макрогликогена в клетках могут служить показателем степени поражения печени при циррозе и использоваться для прогноза этого заболевания. Полученные в работе данные могут быть использованы в курсах лекций для студентов биологических и медицинских факультетов университетов и медицинских институтов.

Апробация работы

Основные научные результаты диссертации были представлены на 21-й ежегодной конференции немецкого общества цитометрии (DGfZ) (Бонн, Германия, 2011); на II Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2012); на XXVII и XXVIII конгрессе международного общества развития цитометрии (ISAC) (Лейпциг, Германия, 2012; Сан-Диего, Калифорния, США, 2013); на XVI Всероссийской медико-биологической конференции молодых

исследователей (с международным участием) «Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2013); на 23-й конференции азиатско-тихоокеанского общества по изучению печени (APASL) (Сингапур, Сингапур, 2013); на 38-м конгрессе федерации европейских биохимических обществ (FEBS) (Санкт-Петербург, 2013); на III и IV конференции молодых ученых Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2012, 2014); на XVII Всероссийском симпозиуме «Структура и функции клеточного ядра» (Санкт-Петербург, 2014); на VI международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологии и медицины» (Ростов-на-Дону, 2015); на 30-м ежегодном съезде по клинической цитометрии (Денвер, Колорадо, США, 2015); на международном конгрессе по микроскопии (Коттаям, Керала, Индия, 2015); на XX и XXIII международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2013, 2016).

Личный вклад автора

подавляющее большинство экспериментальных процедур, вошедших в работу, и обработка полученных результатов выполнены автором лично. Совместно с соавторами и научным руководителем автор участвовал в обсуждении материалов, вошедших в представленную работу, и в написании публикаций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 176 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения результатов, заключения и списка литературы, включающего 444 источника. Работа иллюстрирована 76 рисунками и 8 таблицами.

Финансовая поддержка работы

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научных проектов № 14-04-32378 – мол_а и 14-04-00730 – а.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК МОН России

1. Безбородкина Н.Н., Штейн Г.И., Сивова Е.В., **Честнова А.Ю.**, Кудрявцев Б.Н. Анализ структуры гликогена в гепатоцитах крыс с использованием цитохимического и FRET методов, Цитология. 2011, 53(7): 555–563.
2. Bezborodkina N.N., Okovity S.V., **Chestnova A.Yu.**, Kudryavtsev B.N. Hepatocytes of cirrhotic rat liver accumulate glycogen more slowly than normal ones. *Hepatol. Int.* 2013, 7: 1084–1090.
3. Bezborodkina N.N., **Chestnova A.Yu.**, Okovity S.V., Kudryavtsev B.N. Activity of glycogen synthase and glycogen phosphorylase in normal and cirrhotic rat liver during glycogen synthesis from glucose or fructose. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2014, 66(2–3): 147–154.
4. **Честнова А.Ю.**, Безбородкина Н.Н., Матюхина Н.М., Кудрявцев Б.Н. Динамика содержания про- и макрогликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крыс на разных этапах гликогенеза. Цитология. 2014, 56(11): 858–864.
5. Bezborodkina N.N., **Chestnova A.Yu.**, Vorobev M.L., Kudryavtsev B.N. Glycogen content in hepatocytes is related with their size in normal rat liver but not in cirrhotic one. *Cytometry Part A.* 2016, 89(4): 357–364.

Публикации в других изданиях

6. **Честнова А.Ю.**, Матюхина Н.М., Безбородкина Н.Н., Кудрявцев Б.Н. Структура гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крыс. Мед. Акад. Журнал. Приложение. 2012, 511–513.
7. Bezborodkina N.N., **Chestnova A.Yu.**, Kudryavtsev B.N. Glycogen metabolism during chronic liver diseases. In Pedro L. Weiss and Brian D. Faulkner (Eds.) *Glycogen Structure, Functions in the body and role in disease.* NOVA Science Publishers. 2013: P.159.

Список тезисов

1. **Chestnova A.Yu.**, Bezborodkina N.N., Stein G.I. Estimate of the mobility of oligosaccharide chains in glycogen molecule/ Abstract book. 2011: 38/ 21st Annual Conference of the DGfZ, Bonn, Germany, October 12–14, 2011.
2. **Chestnova A.Yu.**, Bezborodkina N.N., Stein G.I. Use of the FRET method for the analysis of the glycogen structure in rat hepatocytes/ *Cytometry Part B: Clinical Cytometry.* 2012, 82B(5): 396/ ISAC XXVII International Congress, Leipzig, Germany, June 23–27, 2012.
3. **Честнова А.Ю.**, Безбородкина Н.Н., Штейн Г.И. FRET-анализ структуры гликогена в гепатоцитах крыс/ Цитология. 2012, 54(4): 362/ III Конференция молодых ученых Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, 15–16 мая 2012.
4. **Честнова А.Ю.** Comparative analysis of glycogen accumulation in hepatocytes of normal and cirrhotic rat liver/ Сборник тезисов: «Ломоносов-2013» секция «Клеточная биология и гистология». М.: МАКС Пресс, 2013: 144/ XX международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», Москва, 8–13 апреля 2013.
5. **Честнова А.Ю.** Особенности гликогенеза в нормальной и цирротической печени крыс/ Сборник тезисов: СПб.: Изд-во СПбГУ, 2013: 453–454/ XVI Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей (с международным участием) «Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье», Санкт-Петербург, 20 апреля 2013.
6. Bezborodkina N.N., **Chestnova A.Yu.**, Matyukhina N.M., Kudryavtsev B.N. Morphofunctional condition of hepatocytes of rats with CCl₄ induced liver cirrhosis/ *Hepatol. Int.* 2013, 7 (Suppl. 1): S8–S9/ 23rd Conference of the APASL, Singapore, Singapore, June 6–10, 2013.

7. **Chestnova A.Yu.**, Bezborodkina N.N., Kudryavtsev B.N. Using of combination cytophotometrical method for the determination of dry mass, glycogen and DNA contents of hepatocytes in normal and cirrhotic rat liver/ Abstract book. 2013: 203–204/ ISAC XXVIII International Congress, San Diego, California, USA, May 19–22, 2013.
8. **Chestnova A.Yu.**, Bezborodkina N.N., Matyukhina N.M., Kudryavtsev B.N. Comparative analysis of glycogen molecule structure in hepatocytes of normal and cirrhotic rat liver/ FEBS Journal. 2013, 280 (Suppl. 1): 299/ 38th FEBS Congress «Mechanisms in biology», Saint-Petersburg, Russia, July 6–11, 2013.
9. **Честнова А.Ю.**, Безбородкина Н.Н., Малова А.В., Кудрявцев Б.Н. Динамика накопления про- и макрогликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крыс/ Цитология. 2014, 56(5): 386/ IV Конференция молодых ученых Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, 18–20 марта 2014.
10. **Честнова А.Ю.**, Безбородкина Н.Н., Малова А.В., Кудрявцев Б.Н. Взаимосвязь между плоидностью, размером гепатоцитов и содержанием в них гликогена в нормальной и цирротической печени крыс/ Цитология. 2014, 56(9): 688–689/ XVII Всероссийский симпозиум «Структура и функции клеточного ядра», Санкт-Петербург, 28–30 октября 2014.
11. Лю Л., Байдюк Е.В., Безбородкина Н.Н., **Честнова А.Ю.**, Штейн Г.И., Кудрявцев Б.Н. Корреляция числа гепатоцитов, их сухой массы и плоидности с абсолютной и относительной массой печени у крыс/ Цитология. 2014, 56(9): 671/ XVII Всероссийский симпозиум «Структура и функции клеточного ядра», Санкт-Петербург, 28–30 октября 2014.
12. **Честнова А.Ю.**, Безбородкина Н.Н., Малова А.В., Кудрявцев Б.Н. Оценка подвижности олигосахаридных цепей молекул гликогена в гепатоцитах здоровой и патологически измененной печени человека/ Сборник тезисов. 2015: 292–293/ VI международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологии и медицины», Ростов-на-Дону, 1–3 Октября 2015.
13. **Chestnova A.Yu.**, Malova A.V., Kudryavtsev B.N., Bezborodkina N.N. The dependence of the glycogen content in hepatocytes on size in normal and pathological human liver/Abstract book. 2015/ 30th Annual Clinical Cytometry Meeting and Course, Denver, Colorado, USA, October 9–13, 2015.
14. **Chestnova A.Yu.**, Bezborodkina N.N., Malova A.V., Kudryavtsev B.N. Analysis of the glycogen molecules in healthy and pathologically changed human liver using FRET method/Abstract book. 2015: 55/ World Congress on Microscopy: Instrumentation, Techniques and Applications on Life Sciences and Materials Sciences, Mahatma Gandhi University, Kottayam, Kerala, India, October 9–11, 2015.
15. **Честнова А.Ю.** Структура β -частиц гликогена в гепатоцитах крыс с циррозом печени/ Материалы конференции: «Ломоносов-2016» секция «Фундаментальная медицина»/ XXIII международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», Москва, 11–15 апреля 2016.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Запасные вещества у животных — жир и гликоген. Различная стратегия использования жиров и углеводов в организме

Поддержание жизненных процессов в клетках животных и растений на высоком уровне может быть достигнуто только за счет непрерывного поступления веществ, служащих источником энергии для различных химических реакций. В природе, в условиях постоянного изменения окружающей среды, подобная ситуация возможна лишь в том случае, если в организме присутствует достаточное количество резервных веществ, которые могут быть быстро использованы для поддержания необходимой скорости метаболизма. Основными резервными веществами у животных являются жиры и гликоген, а у растений — крахмал и масла.

Жиры (триацилглицериды) при использовании их в качестве топлива в клетках животных имеют три существенных преимущества перед гликогеном: во-первых, биологическое окисление триацилглицеридов дает значительно больше энергии, чем окисление гликогена. При полном окислении до CO_2 и H_2O 1 моля жирных кислот (ЖК), образующихся из жиров, получается ~ 130 молей АТФ, в то время как при окислении 1 моля глюкозы, образующейся при гидролизе гликогена, только 38 молей АТФ. Не случайно, многие животные накапливают большое количество жира перед тяжелой работой или перед наступлением неблагоприятных условий. Во-вторых, накопление гликогена вместо жира связано со значительным увеличением веса тела не только из-за того, что энергетическая ценность углеводов гораздо ниже, но также потому, что отложение гликогена в клетках сопровождается накоплением значительного количества воды. По приблизительной оценке, отложение гликогена в клетках печени и мышцах сопровождается накоплением около 3 г воды на каждый грамм гликогена. Поэтому, например, если бы птицам для быстрого и длительного полета пришлось запастись гликогеном, то масса этого гликогена и связанной с ним воды была бы в 8 раз больше, чем масса резервного жира, способная дать такое же количество энергии (Хочачка, Сомеро, 1977). В-третьих, при окислении жира, который на единицу веса содержит больше водорода, чем углеводов, образуется вдвое больше воды, чем при окислении углеводов. Это обстоятельство имеет огромное значение для обитателей пустынь и засушливых районов, которым для выживания важнее даже не получение максимума энергии, а образование метаболической воды.

Ввиду этих преимуществ жира, организму обычно выгоднее запастись определенное весовое количество триацилглицеридов, чем равное количество углеводов. Тем не менее, отложение гликогена является важной формой запасаания энергии. Оно дает два очевидных

преимущества перед жиром: во-первых, гликоген очень быстро мобилизуется для метаболических нужд организма и, во-вторых, что еще важнее — из гликогена можно получать энергию в условиях аноксии.

Известно, что жизнь на Земле зародилась в бескислородных условиях. Возможно, отражением этого является то, что основной «скелет» промежуточного обмена у многих современных организмов носит строго анаэробный характер. Метаболические реакции, протекающие при прямом участии кислорода, немногочисленны и к тому же представляют поздние эволюционные надстройки к анаэробному каркасу. К животным, способным жить в условиях аноксии, относятся, например, многие кишечные паразиты, обитатели бескислородного ила на дне озер и прудов, двустворчатые моллюски и ряд других организмов. Кроме того, подобные условия нередко создаются в мышцах при тяжелой физической работе, когда поступление кислорода с кровью не покрывает потребности в нем.

Обычный путь анаэробной выработки энергии — расщепление углеводов до молочной кислоты. 1 моль глюкозы может в анаэробных условиях расщепляться с образованием 2 молей молочной кислоты путем гликолиза. При гликолизе высвобождается лишь около 7 % свободной энергии, которая составляет 50 ккал/моль, от получаемой при полном окислении глюкозы (691 ккал/моль). Таким образом, в полностью анаэробных условиях выработка АТФ за счет энергии гликолиза невелика. Однако те животные, которые лишь временами переходят на гликолиз, могут при поступлении кислорода использовать молочную кислоту как субстрат для окисления в цикле Кребса и, таким образом, в конечном счете, полностью реализуют энергетическую ценность исходного углевода.

1.2. Содержание гликогена в различных тканях, клетках. Динамика в процессе жизнедеятельности. Пищевой цикл. Накопление гликогена в различных тканях перед рождением животного. Значение запасов гликогена для мышечного сокращения

Впервые гликоген или, как его раньше называли, животный крахмал, был получен и описан известным французским физиологом, Клодом Бернаром. 21 марта 1857 года на заседании Биологического Общества в Париже К. Бернар представил доклад о методе изоляции этого вещества из печени, а также представил данные об его физических и химических свойствах. К. Бернар нашел, что при действии этанола и избытка ледяной уксусной кислоты на гомогенат свежей ткани печени гликоген выпадает в виде белого осадка, а полный его гидролиз приводит к образованию глюкозы (Bernard, 1857). Как нередко бывало в истории науки, открытие было сделано К. Бернаром достаточно случайно. Обычно он определял концентрацию сахара в экстракте ткани одновременно в двух параллельных пробах. Но однажды из-за

нехватки времени одну из этих проб он исследовал сразу после смерти собаки, а другую — на следующий день. После анализа на следующий день вторая проба дала гораздо больше сахара, чем проба, взятая сразу после смерти животного. Последующие многочисленные эксперименты, проведенные через разные интервалы времени после смерти животных с использованием перфузии печени водой сразу после ее удаления из брюшной полости, привели К. Бернара к заключению о том, что сахар образуется не из веществ, присутствующих в крови, а из самой ткани печени в результате расщепления гликогена.

В дальнейшем было показано, что гликоген содержится почти во всех тканях, однако в наибольшей концентрации он присутствует в печени (5–7 % от общей массы органа). Общее содержание гликогена в печени составляет примерно 0.4 г у крысы и 70 г у человека. Другой важной тканью, в которой присутствует большое количество гликогена, являются скелетные мышцы. Хотя концентрация гликогена в мышцах гораздо меньше, чем в печени, его общее количество в мышцах выше. Например, у человека содержание гликогена в скелетных мышцах достигает 120 г (Ньюсхолм, Старт, 1977).

Причина, по которой глюкоза хранится в клетках не в виде мономера, а как полимер, связана с различной осмолярностью этих двух форм вещества. Расчеты показали, что запас гликогена в гепатоците примерно соответствует концентрации глюкозы 0.4 М. Однако реальная концентрация нерастворимого гликогена в клетке составляет всего 0.01 мкМ, означая, что его вклад в осмолярность цитозоля невелик. Если бы в цитозоле содержалось 0.4 М глюкозы в мономерной форме, то ее осмолярность могла бы стать очень высокой. Как следствие, это привело бы к проникновению воды в клетку и к ее лизису. Кроме того, при внутриклеточной концентрации глюкозы 0.4 М и концентрации глюкозы 5 мМ в крови млекопитающих, изменение свободной энергии, соответствующее переносу глюкозы внутрь клетки против ~ 80 кратного градиента концентрации, было бы недопустимо велико (Нельсон, Кокс, 2012).

В силу своей высокой лабильности, способности, в отличие от жира, быстро откладываться в клетках и с высокой скоростью расщепляться до глюкозы, гликоген играет чрезвычайно важную роль в жизнедеятельности человека и животных. Это можно проиллюстрировать несколькими примерами.

Во-первых, способность клеток паренхимы печени быстро накапливать гликоген после приема пищи и расщеплять его во время голодания является важным механизмом осуществления глюкостатической функции этим органом. На существенную роль гликогена печени в поддержании постоянного уровня глюкозы в крови впервые обратил внимание К. Бернар. Он показал, что вначале сахар из кишечника попадает через воротную вену в печень, где происходит синтез гликогена и затем уже, по мере надобности, он расщепляется до глюкозы, которая используется клетками для энергетических нужд в различных тканях

организма. Эту функцию печени Бернар назвал гликогенной. Следует, однако, отметить, что К. Бернар сомневался в том, что «большое количество гликогена, образуемого в печени после переваривания углеводов, является результатом прямого превращения сахара в гликоген». Он полагал, что «сахар играет лишь роль мощного стимула, увеличивающего гликогенную функцию в заметной степени». Он допускал, что гликоген образуется из других, более сложных веществ, нежели крахмал, например, фибрина (Bernard, 1877).

В настоящее время установлено, что скорость синтеза гликогена и его количество в клетках во многом определяются составом поступающей пищи и физиологическим состоянием организма перед ее приемом. Показано, что скорость синтеза гликогена из белков и, особенно, из жира, невелика и что именно углеводы являются наилучшими предшественниками гликогена в гепатоцитах (Young, 1957; Peraino, Pitot, 1964). Возможно, из-за этого в подавляющем большинстве работ, посвященных изучению пищевого цикла у животных и человека, в качестве источника пищи использовали различные углеводы.

На долю пищевых углеводов, представленных, главным образом, крахмалом и сахарозой, а также фруктозой и лактозой приходится до 75 % от веществ, поступающих в организм ежедневно. После приема пищи с высоким содержанием углеводов печень, мышцы и жировая ткань утилизируют их путем окисления, либо запасают в форме гликогена или жира. При этом около 55 % глюкозы, образующейся в кишечнике при переваривании углеводов, захватывается печенью (синтез гликогена, синтез триглицеридов, гликолиз) и лишь 15 % поглощается инсулинозависимыми тканями (жировая ткань, скелетные мышцы). Примерно 25 % всосавшейся глюкозы извлекается инсулиннезависимыми тканями (мозг, нервы, форменные элементы крови, мозговой слой почек и зародышевый эпителий семенников). Небольшая ее часть (около 5 %) остается в жидкостях организма (Тепперман, Тепперман, 1989).

Рудерман с соавт. (Ruderman et al., 1976) выделили 5 фаз глюкозного гомеостаза после того, как человек принял в виде пищи 100 г глюкозы и далее в течение 40 сут находился в условиях полного голодания. В фазе I, (фаза абсорбции, 3–4 ч после приема глюкозы), во время которой происходит всасывание глюкозы, концентрация глюкозы и инсулина в крови повышается, а глюкагона — падает. Глюкоза запасается в печени и мышцах в форме гликогена. В фазе II (постабсорбтивная фаза, примерно 12 ч после поступления глюкозы). В течение этой фазы концентрации глюкозы, инсулина и глюкагона возвращаются к исходному уровню. В печени начинается продукция глюкозы за счет расщепления накопленного гликогена (путем гликогенолиза). Главными потребителями глюкозы являются: головной мозг, мозговой слой почек, эритроциты, а также жировая ткань и скелетные мышцы. Типичным постабсорбтивным состоянием у человека является состояние организма после ночного сна. Однако, если пища не поступает в течение суток и более, такое состояние организма определяют, как голодание: фаза

III, фаза раннего голодания, (продолжительность 1 сут), фаза **IV**, голодание до 24 сут, и фаза **V**, голодание более 1 мес. На всех стадиях голодания вследствие истощения запасов гликогена единственным процессом, обеспечивающим глюкозой центральную нервную систему и другие ткани, становится глюконеогенез, протекающий в печени и почках. В постабсорбтивном периоде и при голодании субстраты, служащие источниками для образования АТФ, образуются в ходе катаболизма ранее депонированных энергоносителей — гликогена и жиров (Ercan et al., 1994; Авдеева, Воробьева, 2005).

Во-вторых, установлено, что на поздних этапах эмбриогенеза млекопитающих гликоген в большом количестве накапливается в различных органах плода, особенно в его печени, а затем быстро расходуется в течение первых часов после рождения на энергетические нужды новорожденного.

Известно, что рост и развитие эмбриона целиком зависит от поступления через плаценту глюкозы, липидов и аминокислот. Данные, полученные на человеке и животных, свидетельствуют о том, что глюкоза как источник энергии, имеет первостепенное значение для эмбриона (Kalhan, Parimi, 2000). Метаболизм глюкозы у эмбриона напрямую связан с ее концентрацией в плазме крови, которая поддерживается на постоянном уровне за счет транспорта сахара через плаценту из материнского организма. Показано, что в норме отношение концентрации глюкозы у эмбриона к концентрации глюкозы в крови матери составляет 70–80 % у человека и кролика, 50–60 % — у лошади, 40–50 % — у свиней и 20–30 % — у жвачных животных. Непосредственно перед рождением поступление глюкозы через пупочную вену составляет, например, у жеребенка 5–8 мг/кг/мин (Mota-Rojas et al., 2011).

Рождение и несколько суток после него является критическим этапом в жизни млекопитающих. Переход от зародышевого к послезародышевому периоду развития у плацентарных млекопитающих влечет за собой не только полную потерю контакта плода с плацентой и, следовательно, прекращение питания его за счет организма матери, но представляет собой резкий скачок, как в отношении условий развития плода, так и изменений в нем самом. В течение очень короткого времени организм новорожденного должен осуществить переход от условий внутриматочного развития (высокая температура среды, питание за счет веществ, циркулирующих в крови матери, дыхание за счет кислорода, поступающего через плаценту) к жизни при значительно более низкой, чем раньше, температуре, к питанию через кишечник и дыханию атмосферным воздухом. Быстрый переход к новым условиям существования оказывается, однако, заранее подготовленным благодаря различным анатомо-физиологическим перестройкам в организме плода (Шмидт, 1951) и коренным изменениям метаболизма многих тканей и органов, которые дают возможность новорожденному адаптироваться к новым условиям внешней среды.

Одним из важнейших адаптивных механизмов, позволяющих новорожденному выжить при столь резкой смене среды обитания, является накопление перед рождением большого количества гликогена в печени. Еще раньше, чем в печени, но не в столь большом количестве, гликоген появляется в мышцах, легких, сердце и некоторых других органах, выполняющих, как говорил Клод Бернар, «функцию рассеянного гепатического органа», который заменяет в первой половине утробной жизни недостающую функцию печени (Bernard, 1859). Клод Бернар впервые установил, что гликоген в печени появляется в строго фиксированную для каждого вида животных стадию развития.

Становление гликогенной функции у большинства млекопитающих начинается приблизительно в последней трети эмбриогенеза и последующее ее развитие, в общем, схоже у различных видов (Needham, 1931; Doljanski, 1960). До конца эмбрионального периода увеличение запасов гликогена в печени, сопровождающееся повышением активности ключевого фермента синтеза гликогена — гликогенсинтазы, идет очень высокими темпами (Gruppuso. Brautigam, 1989). Определение содержания гликогена в клетках паренхимы эмбриональной печени крысы с помощью цитофотометрии PAS-реакции показало, что гликоген в очень небольшом количестве появляется во всех гепатоцитах на 15–16-е сут эмбриогенеза (Шалахметова и др., 1981). После этого количество гликогена быстро увеличивается, достигая максимальных значений на 20-е сут эмбрионального развития (Kudryavtseva, 1967). Содержание гликогена в скелетной мускулатуре кроликов с 21-е по 30-е сут антенатального периода увеличивается на 55 %, а в печени — в 10 раз (Аршавский, 1982). Концентрация гликогена в печени крыс непосредственно перед рождением достигает 8–10 %, что почти вдвое выше, чем его обычная концентрация в печени взрослых крыс (Hers, 1981).

Незадолго до рождения уровень гликогена в печени начинает снижаться, и на 1-е сут после рождения его содержание в гепатоцитах оказывается на очень низком уровне, поскольку новорожденный сразу после рождения вынужден использовать свои собственные энергетические резервы, запасенные ранее. Несмотря на то, что концентрация глюкозы в крови новорожденных крысят поддерживается интенсивным гликогенолизом, в течение первых часов после рождения у них развивается глубокая гипогликемия, которая является следствием, с одной стороны, высоких скоростей использования глюкозы различными тканями, а с другой — низкими скоростями ее продукции за счет гликогенолиза и глюконеогенеза (Ferre et al., 1977). Концентрация глюкозы в крови начинает повышаться и приходит в норму лишь через 4–6 ч, после того, как крысенок начинает сосать молоко матери, а глюкоза начинает синтезироваться из лактата, глицерина и аланина путем глюконеогенеза (Mota-Rojas et al., 2011).

В-третьих, гликоген играет важную роль в мышечном сокращении. Мышцы различного функционального назначения составляют до 40–45 % веса тела млекопитающих. Глюкоза в

мышечных тканях, как и в печени, запасается в полимерной форме — гликогене, содержание которого может достигать 0.5–2 % от влажного веса мышцы. Непосредственным источником энергии для мышечного сокращения, как известно, служит АТФ. Однако содержание АТФ в мышцах очень невелико. Источником для пополнения запаса АТФ служит креатинфосфат, содержание которого в мышце во много раз превышает содержание АТФ. В свою очередь, для пополнения запасов креатинфосфата мышца использует окисление глюкозы или жирных кислот. При аэробном окислении глюкозы, содержащейся в мышечном гликогене, можно получить количество энергии, которое примерно на два порядка больше, чем во всем креатинфосфате мышц. Даже при недостатке кислорода из гликогена, который расщепляется до молочной кислоты, можно получить некоторое количество АТФ, но ее выход в этом случае составляет лишь около 7 % от того количества, которое получается при полном окислении полисахарида.

Анаэробный гликолиз является самоподдерживающимся процессом. Энергия, необходимая для сокращения «белых» анаэробных мышц позвоночных (например, мышцы ног кролика или грудная мышца курицы), почти полностью обеспечивается анаэробным гликолизом, в котором в качестве субстрата используется глюкоза, образующаяся из гликогена. Способность к аэробному гликолизу у белых мышц, в отличие от «красных» мышц, очень низка из-за скудного кровоснабжения. Однако и в красных мышцах образование лактата приобретает большое значение в тех случаях, когда энергетические потребности организма оказываются выше, чем их может обеспечить поставляемый с кровью кислород. Подобная ситуация нередко возникает при тяжелой мышечной работе.

Еще Клод Бернар установил, что мышцы непрерывно поглощают глюкозу из крови. В мышцах глюкоза лишь подвергается деградации до молочной кислоты, но никогда в них не образуется (Bernard, 1877). В отличие от печени гликоген в мышцах синтезируется только из глюкозы, поступающей из крови. Лактат, образующийся при интенсивной работе мышц, поступает в кровь, которая переносит его в печень. В печени из лактата образуется пировиноградная кислота, которая затем путем глюконеогенеза превращается в глюкозу. Образовавшаяся в ходе глюконеогенеза глюкоза поступает в кровь, поглощается мышцами и далее вновь используется для мышечного сокращения или запасается в форме гликогена. Этот цикл событий называют циклом Кори. Значение цикла Кори состоит в том, что благодаря этому процессу происходит утилизация молочной кислоты и, тем самым, предотвращается снижение рН крови до опасного уровня.

1.3. Локализация гликогена в гепатоцитах. Первичная структура гликогена, центральная роль печени в его метаболизме. Синтез и деградация гликогена в печени. Ферменты метаболизма гликогена

Хотя в некоторых работах сообщалось о присутствии гликогена в ядрах клеток (Abraham, Furth, 1994; Lavene, Goldin, 2010) подавляющее большинство имеющихся в настоящее время данных свидетельствует о том, что основным местом размещения запасов гликогена в различных типах клеток является их цитоплазма. Показано, что объем гликогена в цитоплазме гепатоцитов, в зависимости от степени сытости организма, может составлять от 0.5 до 19 % от общего ее объема (Rohr et al., 1970; Pfeifer, 1973; Reith et al., 1973). В гепатоцитах гликоген находится в виде двух типов гранул: в виде отдельных частиц (β -частицы) и в виде, так называемых, «розеток», состоящих из нескольких десятков β -частиц (α -частицы) (рис. 1).

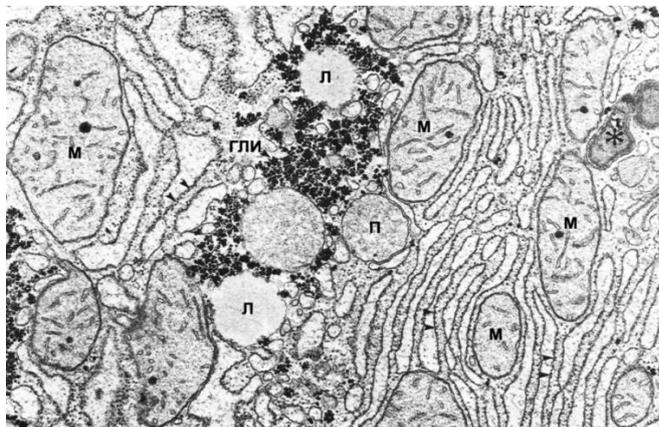


Рис. 1. Электронограмма участка цитоплазмы гепатоцита.

ГЛИ — гранулы гликогена в виде β - и α -частиц;

М — митохондрии;

П — пероксисома;

Л — липидные капли;

* — вторичная лизосома (Phillips et al., 1987).

Частицы гликогена содержат многие ферменты, непосредственно участвующие в его синтезе, деградации или регуляции этих процессов. Показано, например, что в гликогене содержится 50–70 % гликогенфосфорилазы, 70–90 % гликогенсинтазы и 20–50 % киназы фосфорилазы от общего количества этих ферментов в клетке (Розенфельд, Попова, 1989). Это дало повод считать такие гликоген-белковые комплексы особыми клеточными органеллами — «гликогеносомами», функция которых состоит в осуществлении метаболизма гликогена (Rybicka, 1996).

Гранулы гликогена распределены по цитоплазме диффузно, но нередко обнаруживается их связь с гладким эндоплазматическим ретикулумом. Многие авторы указывают на тесную связь динамики гранул гликогена с формой митохондрий и их локализацией в гепатоцитах, предполагая, что подобное взаимодействие может быть обусловлено необходимостью мобилизации гликогена для энергетических нужд клеток (Kudryavtseva et al., 1967; Nielsen et al., 2010). Наиболее четко связь динамики гранул гликогена и функционального состояния ткани

продемонстрирована при исследовании цикла сокращения-расслабления скелетных мышц. Электронно-микроскопические исследования показали, что гранулы гликогена размещаются в трех различных районах скелетных мышц: под сарколеммой, между фибриллами (вблизи I-полосы) и внутри мышечного волокна параллельно и перпендикулярно Z-диску, но редко располагаются дальше M-полосы (Meinke, Edstrom, 1991; Marchand et al., 2002). В покоящихся мышцах плотность гранул гликогена в районе сарколеммы превышает таковую в миофибриллярных районах, причем в отношении размера гранул наблюдается обратная картина (Marchand et al., 2002). Установлено, что в течение продолжительной физической нагрузки и последующего отдыха плотность и размер гранул гликогена в этих трех различных районах закономерным образом меняется и сильно зависит от интенсивности физической нагрузки и типа мышечных волокон (Meinke, Edstrom, 1991; Marchand et al., 2007).

Гликоген, также как и амилопектин в крахмале, представляет полимер с сильно разветвленной сетью остатков глюкозы, соединенных как α -1,4-гликозидными связями (93 % от общего числа связей), так и α -1,6-гликозидными связями (7 % от общего числа связей). Однако по сравнению с амилопектином, ветвистость структуры гликогена гораздо сильнее, поскольку ветвления, образованные α -1,6-связями, встречаются через каждые 4–8 остатков глюкозы (рис. 2).

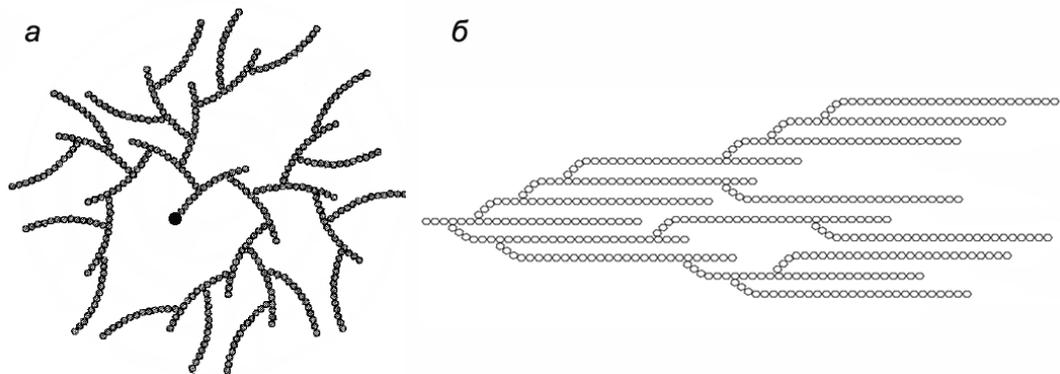


Рис. 2. *а* — структура молекулы гликогена согласно модели Виллана (Gunja-Smith et al., 1970; Goldsmith et al., 1982; Melendez-Nevia et al., 1993); *б* — структура амилопектина (Tagliabracci et al., 2010).

Хотя гликоген преимущественно состоит из остатков глюкозы, он может в очень небольших количествах включать и другие компоненты, например, глюкозамин и фосфат. Частота фосфорилирования остатков глюкозы в C_2 и C_3 -положениях составляет примерно 1 фосфат на 650 остатков глюкозы для гликогена, изолированного из скелетной мышцы кролика, и 1 фосфат на 1500 остатков глюкозы для гликогена, выделенного из скелетных мышц мышей (Tagliabracci et al., 2007, 2008). Показано, что избыточное фосфорилирование глюкозных

остатков в гликогене приводит к одной из форм эпилепсии — болезни Лафора (Delgado-Escueta, 2007; Gentry et al., 2009).

Содержание гликогена в клетках определяется соотношением скоростей его синтеза и распада: если синтез преобладает над деградацией, то гликоген накапливается в клетках, а если деградация гликогена превышает синтез — его содержание уменьшается. Гликоген может синтезироваться из различных источников и разными путями. Он может синтезироваться прямым путем из глюкозы, поступающей в клетки из крови, а также непрямым путем — глюконеогенезом из веществ не углеводной природы — аминокислот (кроме лейцина), молочной кислоты, конечного продукта гликолиза во многих тканях и глицерина, образующегося при распаде жиров. Направления использования гликогена в различных тканях также различны. Путем аэробного или анаэробного гликолиза гликоген может использоваться для нужд самой ткани или для продукции глюкозы, поступающей в кровь, а также участвовать в окислительных реакциях пентозофосфатного пути для генерации НАДФ-Н, необходимого для синтеза жирных кислот, и образования пентозофосфатов, используемых при синтезе РНК и ДНК (рис. 3).



Рис. 3. Схема синтеза и распада гликогена (Ozen, 2007).

В подавляющем большинстве органов и тканей млекопитающих используются лишь отдельные блоки реакций, связанных с метаболизмом гликогена. В скелетных мышцах (Hargreaves, 2004; Ivy, 2004; Przybylskin et al., 2006), сердце (Puthanveetil et al., 2008; Kokubun et

al., 2009; Chandramouli et al., 2015), мозге (Brown, Ronson, 2007; Matsui et al., 2011; Obel et al., 2012; Rojas, Schwartz, 2014) и эритроцитах (Moses et al., 1968, 1972) метаболизм гликогена направлен, в основном, в сторону гликолиза: глюкоза \rightarrow (гликоген) \rightarrow глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф) \rightarrow гликолиз. При этом в сердце и мозге гликоген утилизируется, главным образом, за счет аэробного гликолиза, а в эритроцитах — анаэробным гликолизом. В отличие от вышеперечисленных тканей, в корковом веществе почек (Gerich et al., 2001; Segura, Ruilope, 2013) и тонком кишечнике (Mithieux, Gautier-Stein, 2014) основным направлением метаболизма гликогена является его синтез из глутамината путем глюконеогенеза: глутамин \rightarrow глюконеогенез \rightarrow Г-6-Ф \rightarrow (гликоген) \rightarrow глюкоза.

Единственным органом, который обладает полным набором реакций для метаболизма гликогена, является печень. Клетки паренхимы печени — гепатоциты способны откладывать гликоген в своей цитоплазме как из Г-6-Ф, образующегося из глюкозы крови, так и Г-6-Ф, синтезирующегося в ходе глюконеогенеза. При этом в отличие от многих других органов, печень обычно не использует глюкозу, образующуюся при распаде гликогена, для собственных нужд, а продуцирует ее для потребления другими органами. Как следует из схемы, представленной на **рис. 3**, Г-6-Ф не только занимает центральное место в общем углеводном обмене организма, но является тем метаболитом, с которого синтез гликогена начинается и которым заканчивается его деградация. Основная схема реакций гликогенеза и гликогенолиза подробно описана во многих работах (Алейникова, Воробьева, 2005; Ozen, 2007; Shrayuef, Gerich, 2010; Dashty, 2013) и отличается в различных тканях лишь некоторыми деталями.

Началом метаболических событий, ведущих к синтезу гликогена, является превращение Г-6-Ф в глюкозо-1-фосфат (Г-1-Ф). Эта реакция, катализируемая фосфоглюкомутазой, не требует затрат энергии и, следовательно, легко обратима (**рис. 3**). Далее Г-1-Ф при участии фермента УДФ-глюкопирофосфорилазы соединяется с УТФ. В результате образуется комплекс глюкозы с УДФ и пирофосфат (**рис. 4**). Поскольку пирофосфат очень быстро расщепляется неорганической пирофосфатазой с образованием 2-х молекул фосфата, реакция синтеза УДФ-глюкозы становится необратимой.

Собственно синтез гликогена начинается с переноса остатка глюкозы в УДФ-глюкозе на особый самогликозилирующийся белок-затравку — гликогенин. Гликогенин переносит остатки глюкозы с УДФ-глюкозы сначала на остаток тирозина внутри самого белка, а затем образует α -1,4-гликозидные связи до тех пор, пока олигосахаридная цепь не достигнет длины в 10–20 остатков (Smythe, Cohen, 1991; Alonso et al, 1995; Roach, Skurat, 1997; Lomako et al, 2004). Дальнейшее формирование полной молекулы гликогена происходит с участием гликогенсинтазы (ГС), ветвящего фермента и других ферментов лишь после того, как закончится самогликозилирование гликогенина.

Гликогенин является членом семейства белков, включающего 8 гликозилтрансфераз (Campbell et al, 1997; Henrissat, Davies, 2000). Человек имеет два гена, кодирующие гликогенин. Один из них — GYG1 экспрессируется во всех тканях, в то время как экспрессия GYG2 ограничивается только печенью, сердцем и поджелудочной железой (Mu et al, 1997). В отличие от человека, грызуны обладают лишь одним геном, кодирующим гликогенин.

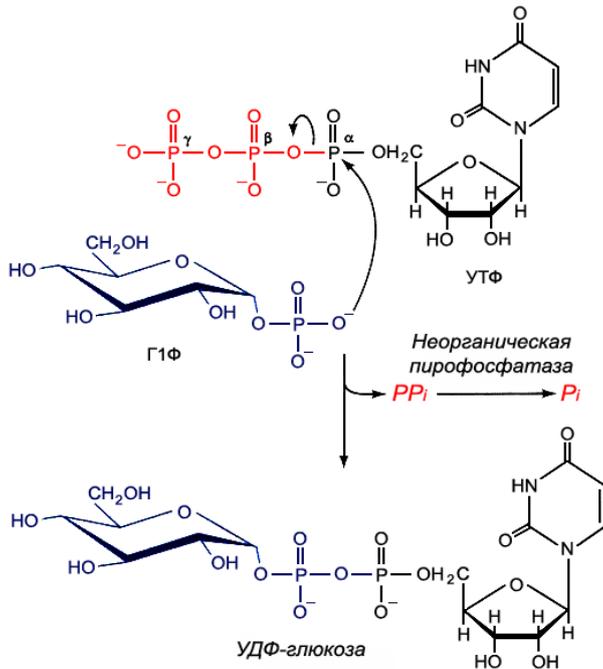


Рис. 4. Образование комплекса УДФ-глюкоза из глюкозо-1-фосфата (Г1Ф) и УДФ (Takusagawa F., 2010).

В структурном отношении, гликогенин представляет семейство гликозилтрансфераз А-типа, характеризующееся одним встроенным доменом Россманна и дополнительной сложной вторичной структурой, которая контролирует как сахаронуклеотидную специфичность донора, так и специфичность акцептора (**рис. 5, а**). УДФ-глюкоза присоединяется к гликогенину с помощью металл-зависимого механизма к С-терминальным концам центральной β -структуры, служащей якорем (**рис. 5, б**). Главная функция иона металла, которым, вероятнее всего, является Mn^{2+} , заключается в стабилизации УДФ при переносе остатка глюкозы. Гликогенин является примером трансферазы, при действии которой α -конфигурация С1-аномерного углерода глюкозы сохраняется и в продукте реакции. Акцептором переносимого остатка глюкозы является сам гликогенин, т.е. либо Tyr195 в начальной фазе реакции, либо терминальный остаток глюкозы в образующейся и растущей после этого олигосахаридной цепи (Cao et al, 1993; Hurley et al, 2005; Hurley et al, 2006).

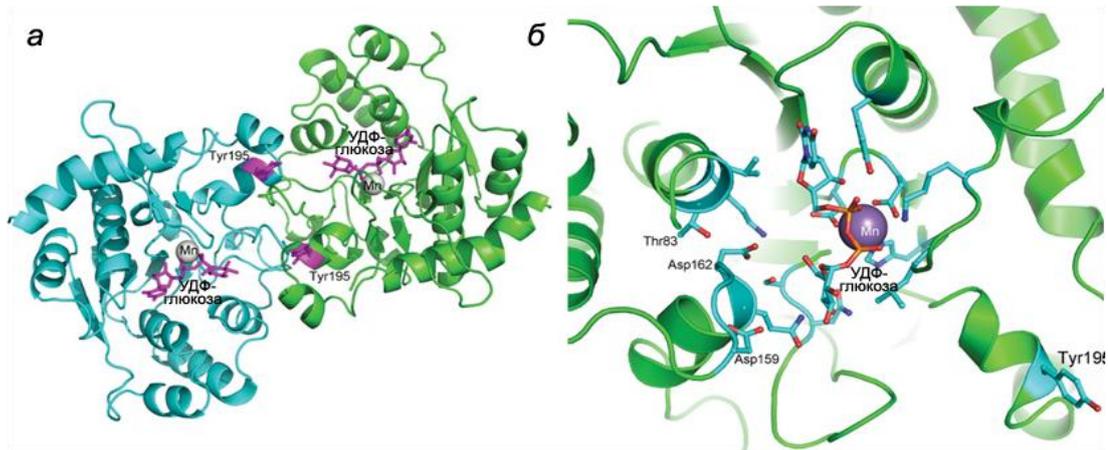


Рис. 5. Структура гликогенина млекопитающих. **а** — димер гликогенина в ленточном представлении. Активный сайт обозначен связанной с субстратом УДФ-глюкозой и окрашен в фиолетовый цвет. Области расположения остатков Tyr195 вблизи поверхности взаимодействия мономеров отмечены фиолетовым цветом; **б** — активный сайт гликогенина (Roach et al., 2012).

Предполагается, что гликоген в клетках до конца никогда не расщепляется. Поэтому его синтез с помощью ГС и других ферментов может начаться сразу с переноса остатков глюкозы с УДФ-глюкозы на предсуществующий гликозилированный гликогенин. Структура «затравки» в этом случае как бы предопределяет тип связи между остатками глюкозы, образующейся в ходе трансгликозилирования. Остатки глюкозы переносятся ГС на нередуцирующий конец олигосахарида, образованного на гликогенине, и соединяются между собой $\alpha 1 \rightarrow 4$ гликозидными связями. В результате, формируется полисахаридная цепь, аналогичная по строению с «затравочной», а гликогенин остается внутри частицы гликогена (**рис. 6**).

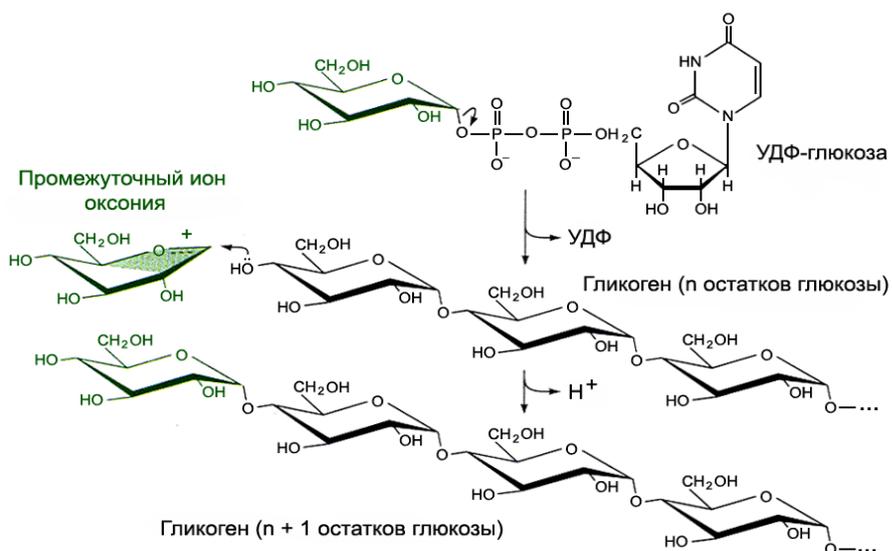


Рис. 6. Реакция присоединения промежуточного иона оксония к молекуле гликогена, катализируемая гликогенсинтазой (Takusagawa F., 2010).

Связь между гликогенином и ГС в ходе катализа опосредуется двумя механизмами: 1) путем ассоциации глюкозил-праймерной цепи с активным сайтом гликогенсинтазы; 2) через консервативную аминокислотную последовательность в С-терминальном домене гликогенина. Однако имеются данные, которые предполагают существование и других сайтов, участвующих в такой ассоциации (Skurat et al, 2006).

Молекулярный вес ГС составляет 95 кДа (Roach, 2002). Млекопитающие обладают двумя генами, кодирующими ГС, — GYS1 и GYS2. GYS1 экспрессируется в скелетных мышцах и большинстве других клеток, способных к синтезу гликогена, а экспрессия GYS2 ограничивается только печенью (Nuttall et al, 1994; Qian et al., 2014).

ГС (рис. 7) у эукариот отвечает за синтез основной массы гликогена путем присоединения остатков глюкозы к невозстанавливающему концу растущей молекулы гликогена, образуя при этом α -1,4-гликозидные связи. УДФ-глюкоза в этом процессе служит донором остатков глюкозы. В отличие от эукариот, синтез гликогена в бактериях и синтез крахмала у растений происходит при участии не уридиндифосфат-глюкозы, а адениндифосфат-глюкозы (Preiss, Walsh, 1981).

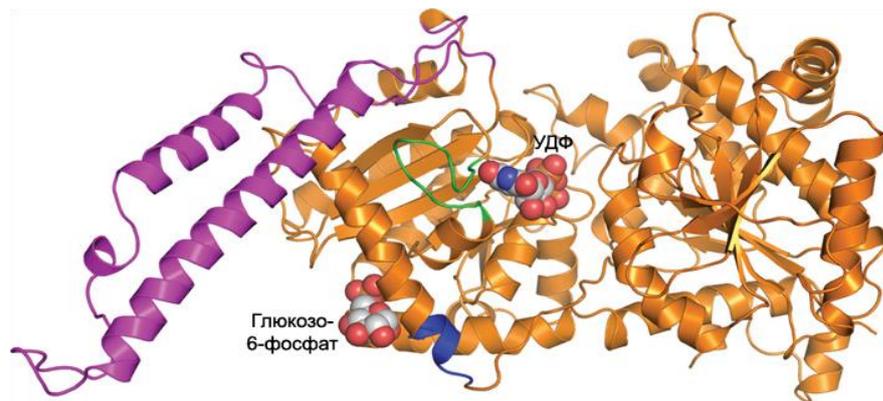


Рис. 7. На диаграмме показаны вставки и пробелы в структуре гликогенсинтазы, которые демонстрируют сайты ее аллостерической регуляции глюкозо-6-фосфатом и присоединения УДФ-глюкозы. Вторичные структурные элементы, демонстрирующие ее тетрамерную структуру, окрашены фиолетовым цветом. Локализация пробела из 10-ти аминокислотных остатков, отличающих его от бактериальных ферментов и участвующих в регуляции глюкозо-6-фосфатом, окрашены в синий цвет. Вставленная петля из аминокислотных остатков демонстрирует сайт связывания УДФ-глюкозы; окрашена в зеленый цвет (Roach et al., 2012).

ГС у эукариот аллостерически активируется Г-6-Ф и ингибируется ковалентным фосфорилированием. Наличие Г-6-Ф способно преодолеть инактивирование фермента, связанное с фосфорилированием, и полностью восстанавливает его активность. Это свойство ГС привело к использованию оценки ее активности в присутствии и отсутствии Г-6-Ф, что дает возможность оценить степень фосфорилирования фермента, даже в том случае, если не все

сайты фосфорилирования оказывают влияние на его активность. Полагают, что дефосфорилирование ГС, которое приводит к ее активации, опосредуется рядом фосфатаз (PP1Gs), содержащих каталитическую субъединицу (PP1c) связанную с соответствующей субъединицей на гликогене (Bollen, 2001; Ceulemans, Bollen, 2004). В настоящее время идентифицировано семь таких связанных с гликогеном субъединиц.

Дополнительным механизмом, регулирующим активность ГС, служит изменение ее внутриклеточной локализации. Показано, что инкубация гепатоцитов, изолированных из печени голодных крыс с глюкозой не только приводит к активации ГС, но и способствует переводу фермента из диффузного его распределения в цитоплазме к периферии клетки (García-Rocha et al., 2001; Ferrer et al., 2003; Jurczak et al., 2008; Rocha et al., 2012). Синтез гликогена преимущественно всегда начинается и активно протекает вблизи клеточной мембраны гепатоцитов. Синтезированный гликоген постепенно перемещается к центру клетки, а его место заполняется новыми молекулами гликогена. По мере накопления гликогена, активность его синтеза перемещается от периферии к внутренним районам клетки (Fernandez-Novell et al., 2002).

Результаты определения скорости синтеза гликогена в гепатоцитах крысы показали, что в начале рефидинга (возобновления кормления животных после голодания) крыс глюкозой, когда синтез гликогена значительно преобладает над его деградацией, минимальная скорость присоединения остатков глюкозы к растущим молекулам гликогена колеблется в пределах $5.43-7.00 \times 10^3 \text{ мин}^{-1}$. В среднем она составляет 6280 остатков глюкозы в минуту. Эта величина означает, что время образования одной гликозидной связи в молекуле гликогена составляет около 10 мс, а одна полная β -частица гликогена, состоящая примерно из 50000 остатков глюкозы, образуется примерно за 8 мин (Безбородкина и др., 2008). Подобная скорость сравнима со скоростью синтеза основных макромолекул в клетках. Показано, например, что скорость синтеза ДНК в репликативной вилке составляет от 600 до 4500 пар нуклеотидов в минуту. Расчеты свидетельствуют также, что РНК синтезируется со скоростью 30 нуклеотидов в секунду, а белок, состоящий из 400 аминокислот, синтезируется за 20 с (Lodish, Verck, 2003). Правда, в другой работе сообщается, что рибосома способна катализировать образование лишь 100 пептидных связей в минуту (Голенченко, Силаева, 2005).

Подобно гликогенину, все эукариотические ГС являются трансферазами, использующими в качестве донора глюкозы УДФ-глюкозу. Однако, в отличие от гликогенина, они не являются металл-зависимыми трансферазами и обладают иной гликозилтрансферазной кóровой структурой (Baskaran et al, 2010; Roach et al., 2012).

Интересным свойством ГС является то, что она остается связанной с гликогеном даже в том случае, когда фермент инактивирован. Таким образом, как дефосфорилированная, так и

фосфорилированная форма ГС могут быть выделены простым осаждением гликогена. Столь тесная связь со своим субстратом предполагает, что этот фермент должен обладать определенным типом связи с углеводом подобным тому, который был найден у гликоген-связывающих субъединиц протеин фосфатазы 1, лафорина и ветвящего фермента (Roach et al., 2012).

ГС способна синтезировать только линейную структуру полисахарида, присоединяя остатки глюкозы из УДФ-глюкозы один за другим к невосстанавливающим концам его растущей молекулы, но не способна формировать разветвления в гликогене. Его разветвленная структура создается при участии фермента ветвления амило-1,4 \rightarrow 1,6-глюкозилтрансферазы. Разветвленная структура гликогена способствует образованию большого числа концевых мономеров. Подобная структура обуславливает компактность гранул гликогена, откладывающихся в цитоплазме клеток, а также дает возможность значительно увеличить скорость синтеза и деградации этого полисахарида.

Амило-1,4 \rightarrow 1,6-глюкозилтрансфераза млекопитающих представляет собой мономер, который состоит из 702 аминокислотных остатков и имеет молекулярный вес 77 кДа (Thon et al., 1992; Roach, 2002). Принцип действия этого фермента состоит в отщеплении примерно семи остатков глюкозы на невосстанавливаемом конце линейного участка одной α -амилоидной цепи и переносе их на С6-углеродный атом остатка глюкозы другой α -амилоидной цепи с образованием α -1,6-гликозидной связи (рис. 8).

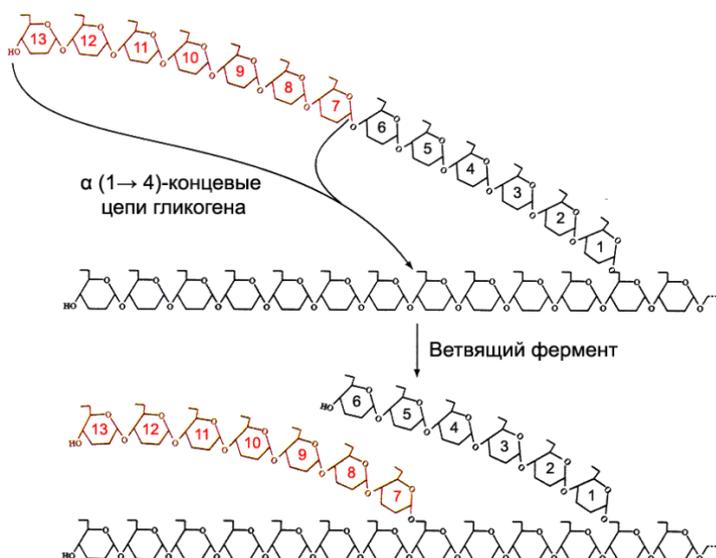


Рис. 8. Механизм ветвления гликогена. Ветви образуются при переносе примерно семи концевых глюкозных остатков с линейного участка α -амилоидной цепи на С6-ОН-группу остатка глюкозы другой α -амилоидной цепи (Takusagawa F., 2010).

Новая точка ветвления может быть образована лишь на расстоянии не менее 4 остатков от любой другой уже существующей точки ветвления. Образование разветвленного полимера приводит к улучшению его растворимости и созданию большого числа невосстанавливающих

концов. В свою очередь это способствует значительному увеличению количества участков, доступных для ГС и гликогенфосфорилазы (ГФ), поскольку оба фермента действуют только на невосстанавливающие концы цепей остатков глюкозы.

Деградация гликогена в клетках происходит в ответ на повышение потребностей организма в глюкозе и может осуществляться как гидролитическим путем, так и с помощью фосфорилаза. Гидролиз гликогена осуществляется различными гликозидазами, которые, в зависимости от механизма действия, свойств и локализации в клетках, подразделяются на эндо- и экзогликозидазы, а также нейтральные и кислые гликозидазы. Наиболее известными среди них является α -амилаза, расщепляющая α -1,4-гликозидные связи в гликогене, нейтральная и кислая гликозидазы, а также амило-1,6-гликозидазы. α -амилаза локализуется в слюне и поджелудочной железе, а остальные ферменты в кишечнике.

Фосфорилиз гликогена, который осуществляется при участии ГФ, приводит к образованию Г-1-Ф: $(\alpha\text{-}1,4 \text{ гликогеновая цепь})_n + \text{P}_i \rightleftharpoons (\alpha\text{-}1,4 \text{ гликогеновая цепь})_{n-1} + \alpha\text{-D-глюкозо-}1\text{-фосфат}$. Мономер ГФ является достаточно большим белком. Он состоит из 842 аминокислот и имеет молекулярную массу 97342 Да. Мономерная и тетрамерная формы этого фермента не активны. Биологической активностью обычно обладает лишь димер, состоящий из двух идентичных субъединиц (рис. 9).

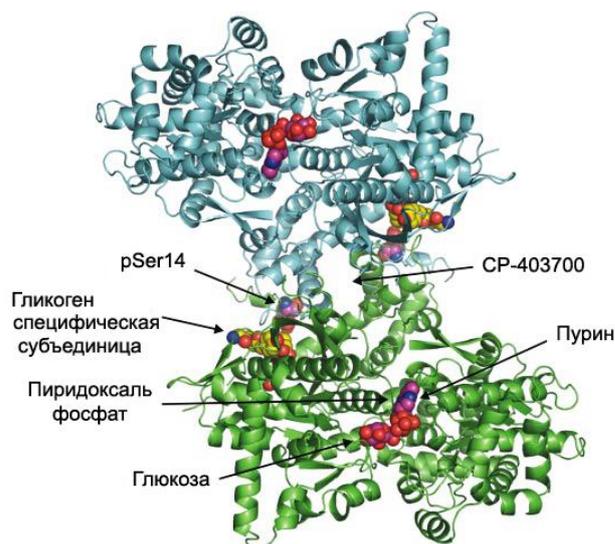


Рис. 9. Схематическое изображение димера гликогенфосфорилазы печени человека. Одна субъединица окрашена в голубой цвет, а другая — в зеленый. Функциональные сайты обозначены шариками разного цвета: каталитический сайт, который включает пиридоксаль фосфат и глюкозу. Ser (P)¹⁴ (pSer14) расположен вблизи аллостерического сайта (Pautsch et al., 2008).

В каждом активном центре ГФ содержится пиридоксаль фосфат (производное витамина В₆). Пиридоксаль фосфат ковалентно связан с некоторыми аминокислотами (в данном случае Lys679), образуя при этом основание Шиффа. Димер ГФ, обладающий высокой каталитической активностью, имеет несколько участков в своей структуре, которые оказывают значительное модулирующее действие на его каталитическую способность. Эти участки включают: каталитический участок, участок связывания с гликогеном, аллостерический участок и участок

с обратимо фосфорилированным серином. При этом участок с обратимо фосфорилированным Ser14, по-видимому, является наиболее важным для каталитической активности ГФ. Присоединение АМФ к молекуле фермента в этом участке способствует переходу из неактивного Т-состояния в активное R-состояние, сопровождаясь изменением его четвертичной структуры.

Реакция отщепления остатка глюкозы от гликогена с образованием Г-1-Ф проходит в три этапа (**рис. 10**).

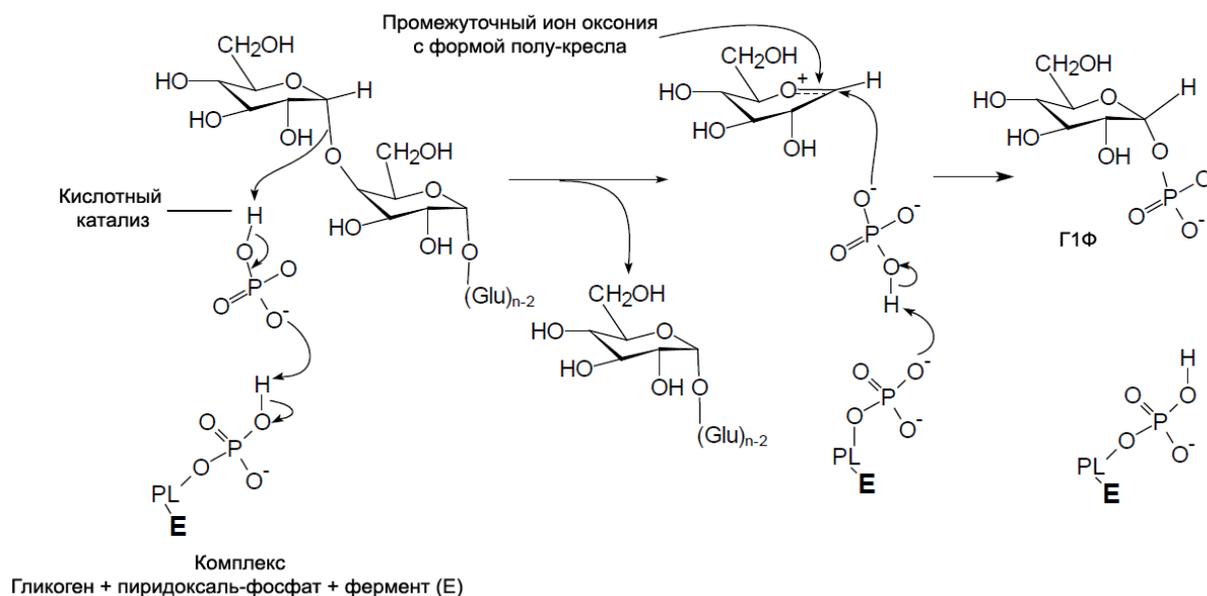


Рис. 10. Схематический механизм реакции отщепления остатка глюкозы от гликогена с образованием глюкозо-1-фосфата (Г1Ф) (Takusagawa F., 2010).

Показано, что аллостерическими активаторами ГФ являются АМФ и ИМФ, а ее ингибиторами — АТФ, АДФ, УДФГ и Г-6-Ф (Biorn, Graves, 2001). ГФ активируется глюкагоном, действие которого опосредовано цАМФ. Повышение концентрации цАМФ активирует цАМФ-зависимую протеинкиназу, которая при участии АТФ фосфорилирует неактивную киназу фосфорилазы и образует активную ее форму. В свою очередь, активная киназа фосфорилазы фосфорилирует фосфорилазу *b*, превращая ее в фосфорилазу *a* (**рис. 11**). Инсулин оказывает действие противоположное глюкагону. Он повышает активность фосфодиэстеразы в печени, способствуя снижению концентрации цАМФ в клетках, и тем самым снижает активность фосфорилазы *a*.

Активирование ГФ, путем превращения ее из формы *b* в форму *a*, рассматривается как механизм, надстроенный в ходе эволюции над основным регуляторным механизмом. Преимущество этого более сложного механизма состоит в том, что он позволяет расщеплять

гликоген при высоких концентрациях АТФ и Г-6-Ф. В физиологическом отношении это оказывается выгодно при возникновении стрессовых ситуаций, когда, например, животному нужно спастись бегством от опасности (Ньюсхолм, Старт, 1977).

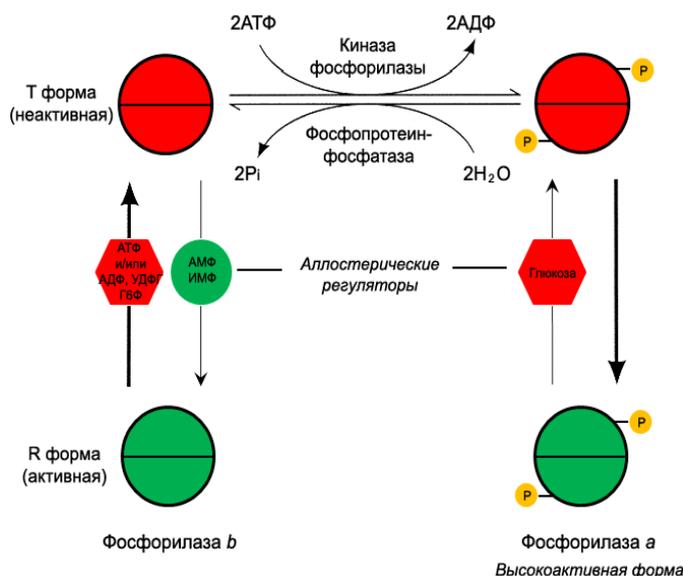


Рис. 11. Аллостерическое регулирование гликогенфосфорилазы (Takusagawa F., 2010).

ГФ может действовать только на линейные цепи (α -1,4-связи) гликогена. Действие этого фермента прекращается, как только останется примерно 4 остатка глюкозы до α -1,6-ветвления (**рис. 12**). В этой ситуации в действие вступает деветвящий фермент (ДВФ) (амило- α -1,6-глюкоздаза, 4- α -глюкотрансфераза), функция которого заключается в выпрямлении цепи глюкозных остатков в этом участке (**рис. 12**).

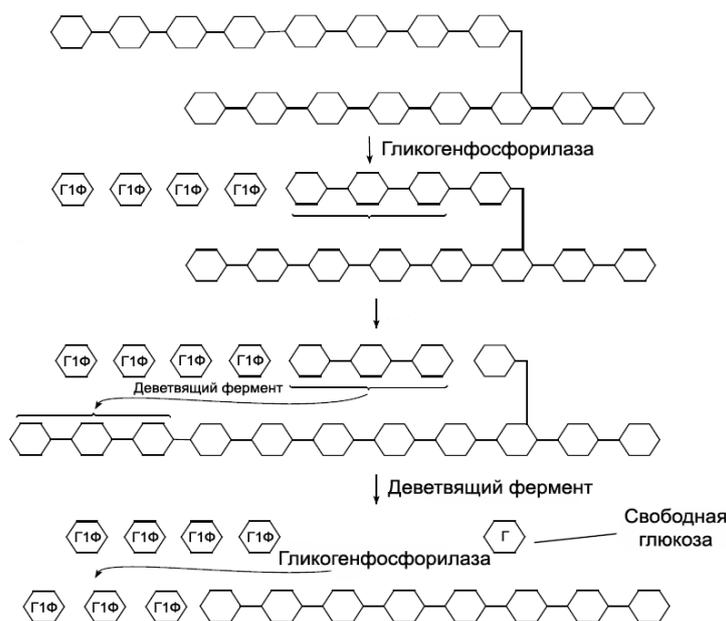


Рис. 12. Механизм действия деветвящего фермента (Takusagawa F., 2010).

Фермент, удаляющий α -1,6-ветвления, обладает двумя типами активности — трансферазной и 1,6-глюкозидазной. ДВФ гликогена у человека представлен мономером с молекулярным весом 175 кДа. Показано, что обе каталитические единицы этого фермента могут действовать независимо одна от другой, предполагая, что в нем присутствует несколько активных центров. Установлено, что у дрожжей С-терминальная часть фермента связана с глюкозидазной активностью, а N-терминальная часть — с глюкозилтрансферазной активностью. Помимо этих активных центров ДВФ, по-видимому, имеет и третий центр, который позволяет ему связываться с гликогеном. Однако полная структура этого фермента еще не определена.

Трансферазная активность фермента позволяет перенести участок цепи гликогена, состоящий из трех остатков глюкозы из боковой цепи на соседний, не восстанавливающий конец, с образованием α -1,4-связи. Оставшийся остаток глюкозы, соединенный α -1,6-связью, отщепляется в виде свободной молекулы глюкозы под действием 1,6-глюкозидазной активности фермента.

В результате такой двойкой активности ДВФ, ГФ способна продолжить расщепление α -1,4-связей гликогена. Конечный продукт реакции деградации гликогена, протекающей при участии ГФ и ДВФ, — Г-1-Ф под действием фосфоглюкомутазы превращается в Г-6-Ф, который далее используется во многих метаболических путях.

Деградация гликогена с участием ГФ и ДВФ является основным механизмом использования этого полисахарида в клеточном метаболизме. Однако гликоген может подвергаться деградации и в лизосомах. На важность этого пути обратили внимание в связи болезнью Помпе (болезни накопления гликогена 2-го типа), при которой происходит нарушение деградации гликогена из-за мутации в гене, кодирующем лизосомальную α -глюкозидазу (Hirschhorn, Reuser, 2000). При болезни Помпе происходит накопление огромного количества гликогена в лизосомах и везикулярных структурах (Fukuda et al., 2006). В наиболее тяжелой форме эта болезнь приводит к смерти человека уже в течение года после рождения.

Показано, что в лизосомах может накапливаться до 10 % от всего гликогена в гепатоцитах (Geddes et al., 1977, 1992). Точный механизм, с помощью которого гликоген поступает в лизосомы, пока неизвестен. Наиболее вероятно, что он переносится в лизосомы с помощью автофагии или автофаго-подобного везикулярного транспорта. Деградация гликогена в лизосомах играет особенно важную роль у новорожденных, в первые часы их жизни, когда глюконеогенез в печени еще не заработал на полную мощность.

1.4. Тканевые и клеточные факторы, влияющие на метаболизм и содержание гликогена

Выполнение гликогенной функции печени связано, прежде всего, с клетками ее паренхимы — гепатоцитами, которые составляют 60–70 % от общего числа клеток и до 90 % ее массы (Bioulac-Sage et al., 1999; Афанасьев и др., 2004). По разным оценкам число гепатоцитов в печени человека составляет $1.0\text{--}2.5 \times 10^{11}$ клеток (Arias et al., 1994; Bircher et al., 1999), а у крысы — $1.96\text{--}2.48 \times 10^8$ в 1 г печени (Iure et al., 1965; Безбородкина, 2006). Полагают, что гепатоциты, как клеточный тип, появляются в раннем эмбриональном периоде — у человека примерно на 18-е сут, а у крыс — на 10–11-е сут пренатального развития (Desmet et al., 1999; Zhao, Duncan, 2005). Эмбриональная печень растет с большой скоростью благодаря высокой пролиферативной активности гепатоцитов (Заварзин, 1967). Однако после рождения митотическая активность клеток паренхимы печени быстро снижается, и у взрослых крыс число гепатоцитов, находящихся в фазе синтеза ДНК, составляет лишь доли процента (Grisham, 1969; Stöcker et al., 1972). На фоне снижения пролиферативной активности гепатоцитов происходит их полиплоидизация. Наиболее интенсивно этот процесс у крыс протекает в течение первых 3–4 нед после рождения, во время перехода крысят от питания молоком матери на самостоятельное питание пищей, богатой углеводами (James et al., 1979; Богданова и др., 1990).

Установлено, что полиплоидизация клеток паренхимы печени осуществляется путем чередования ацитокинетических митозов и бимитозов (Brodsky, Uryvaeva, 1977; Seglen, 1997; Guidotti et al., 2003; Gentric et al., 2012). В результате этого процесса в печени взрослых крыс появляются одноядерные и двуядерные гепатоциты различных классов ploидности — 2с, 2с×2, 4с, 4с×2 и 8с (Бродский, Урываева, 1981; Gentric et al., 2012). Преобладающим классом ploидности гепатоцитов в печени взрослых крыс являются одноядерные тетраплоидные клетки, которые составляют до 80 % и более популяции клеток паренхимы (Богданова и др., 1990; Сакута, Кудрявцев, 1996; 2005). Гепатоциты более высокой ploидности довольно редки и появляются лишь в ходе старения или при заболеваниях печени.

В отличие от крыс, большая часть популяции гепатоцитов нормальной печени человека представлена одноядерными диплоидными клетками, составляющими 80–90 % популяции ее паренхимы. Заметное число полиплоидных гепатоцитов в печени человека появляется лишь после пятидесяти лет в ходе старения (Watanabe et al., 1984; Kudryavtsev et al., 1993).

Показано, что уровень углеводного метаболизма, в частности, метаболизм гликогена в гепатоцитах, и его направление зависит не только от активности ферментов, участвующих в этом процессе, но также от микроскопического строения паренхимы печени (Jungermann, 1987). Микроскопическая структура печени во многом обусловлена особенностями ее

кровообращения, которая уникальна для этого органа. В отличие от других органов, печень одновременно получает артериальную и венозную кровь, поступающую соответственно из печеночной артерии и портальной вены (**рис. 13**).

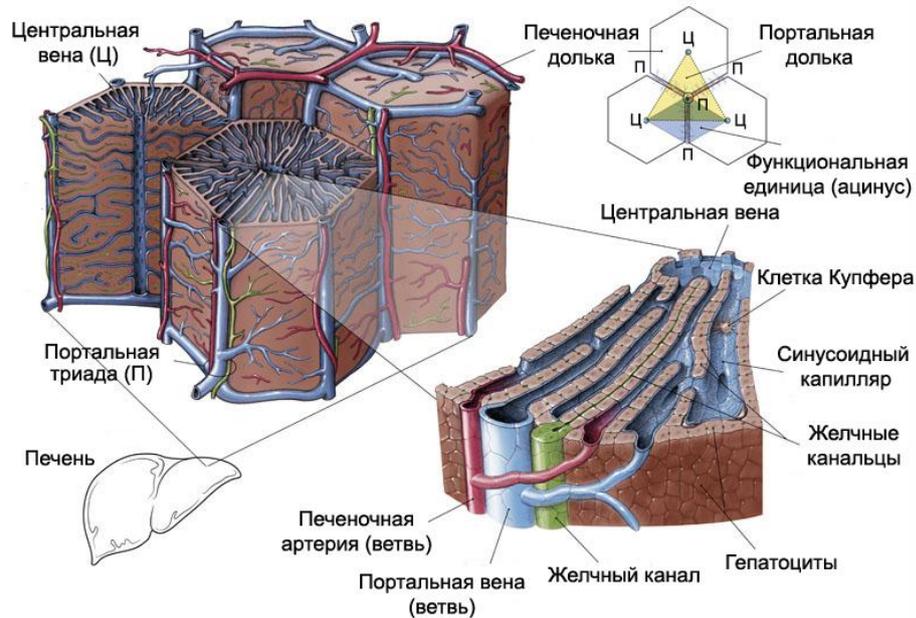


Рис. 13. Микроскопическое строение печени (схема).

Основной морфофункциональной единицей печени считают печеночную дольку, о строении которой существует несколько представлений, которые, однако, не исключают друг друга, а лишь отражают различные стороны структуры и функции печени (Rappaport et al., 1954; Sasse et al., 1992; Romert et al., 1993; Teutsch, 2005). Согласно классическому представлению, дольки имеют форму шестигранных призм с плоским основанием, по углам которого располагаются портальные тракты, включающие ветви воротной вены, печеночной артерии, желчные протоки, лимфатические сосуды, а также афферентные и эфферентные нервные волокна, и слегка выпуклой вершиной, на которой находится центральная вена (**рис. 13**). Поскольку портальные тракты расположены по углам шестигранника, они не относятся к какой-то одной конкретной дольке, а принадлежат трем долькам, между которыми каждый из них проходит. В центре дольки располагается центральная вена, по которой кровь оттекает в несущие кровь нижнюю полую вену и далее в правый желудочек сердца.

Паренхима печени представляет собой расположенные вокруг центральной вены печеночные балки (трабекулы), состоящие примерно из 20 гепатоцитов (**рис. 13**). Поскольку трабекулы часто анастомозируют между собой, у многих видов животных их радиальное направление в дольках не всегда четко прослеживается.

При описании микроскопического строения печени часто пользуются также такими понятиями как «портальная долька» и «ацинус». На схеме (**рис. 13**) портальная печеночная долька включает сегменты трех соседних классических долек, окружающих порталный тракт. Поэтому она имеет форму треугольника, в центре которого лежит триада, а на периферии (по углам) — центральные вены. В портальной дольке, в отличие от классической, кровотоков по капиллярам направлен от центра к периферии.

Печеночный ацинус представляет собой участок паренхимы, образованный сегментами двух рядом расположенных классических долек (**рис. 13**) (Rappaport, 1981). На срезах печени он нередко описывается фигурой, близкой к ромбу, у острых углов которого расположены центральные вены, а у тупого угла — триада с ее ветвями, отходящими вовнутрь ацинуса. В ацинусах, как и в портальной дольке, кровоснабжение осуществляется от его центральных участков к периферическим. Кровь из концевых веточек воротной вены и печеночной артерии порталного тракта попадает в сеть синусоидов, образованную трабекулами гепатоцитов, и продвигается по направлению к центральным венам.

В печеночном ацинусах выделяют три зоны: перипортальную (зона 1), расположенную вокруг оси ацинуса, клетки которой снабжаются кровью с наиболее высоким содержанием кислорода, промежуточную (зона 2) и перивенозную (зона 3). Перивенозную зону образуют клетки, прилежащие к центральной вене и получающие кровь с наиболее низкой концентрацией кислорода, обогащенную конечными продуктами клеточного метаболизма.

Зонам 1, 2 и 3 печеночного ацинуса в классической дольке соответствуют порталная зона, промежуточная и центральная зоны. В порталной зоне дольки клетки снабжаются кровью с наибольшим содержанием кислорода, в то время как в центральной зоне клетки получают кровь наиболее бедную кислородом. Давление кислорода, измеренное различными методами, в перипортальной зоне превышает таковое в центральной зоне дольки в 3.1–3.5 раза (Ji et al., 1982). Перипортальные гепатоциты, как более «аэробные» клетки, обладают большим митохондриальным объемом (20 % v/v) и площадью крист на клетку (33000 мкм²) по сравнению с гепатоцитами, расположенными в периферической зоне, митохондриальный объем у которых составляет (12 % v/v), а общая площадь крист — 23000 мкм² (Arias et al., 1994). Как следствие, перипортальные клетки обладают более высокой скоростью дыхания и окислительного фосфорилирования, более высокой активностью ключевых окислительных ферментов (Jungermann, Katz, 1989; Lamers et al., 1989; Racine-Samson et al., 1996; Ikesawa et al., 1998; Sell, 2001).

Градиент концентраций кислорода, субстратов и гормонов, существующий между различными зонами дольки печени, естественно, отражается на обмене глюкозы и гликогена в гепатоцитах, расположенных в этих зонах. Перипортальные клетки, получающие больше

кислорода, обладают более высокой способностью путем глюконеогенеза к синтезу глюкозы из аминокислот, лактата и глицерина. Соответственно, эти клетки обладают более высокой активностью глюкозо-6-фосфатазы (Г-6-Фазы) (Sokal et al., 1989; Teutsch et al., 1999) и фруктозо-1,6-дифосфатазы (Katz et al., 1977; Schmidt et al., 1978), а также имеют более высокую активность и молярное содержание фосфоенолпируваткарбоксикиназы (Wimmer et al., 1990). Показано также, что лактатдегидрогеназа и аланинаминотрансфераза, обеспечивающие глюконеогенез C_3 -субстратами, проявляют более высокую активность в перипортальной зоне дольки печени (Wimmer, Pette, 1979).

В отличие от перипортальных гепатоцитов, перивенозные клетки обладают более высокой способностью к гликолизу. Высокая гликолитическая способность этих клеток проявляется, в частности, в более высокой активности и содержании глюкокиназы (Kirchner et al., 1993; Toyoda et al., 1995) и пируваткиназы (Miethke et al., 1985).

Согласно модели «метаболической зонации», предложенной Юнгерманном (Jungermann, 1987), в печени одновременно активно протекают процессы гликолиза и глюконеогенеза (Jungermann, Sasse, 1978).

Преобладание глюконеогенеза и окислительного энергетического метаболизма в более «аэробной» перипортальной зоне, а гликолиза и липогенеза в менее «аэробной» перивенозной зоне дольки печени хорошо соответствует термодинамическим представлениям (Jungermann, Sasse, 1978). Глюконеогенез является эндотермическим процессом, требующим 47.2 ккал/моль глюкозы (Decker et al., 1970; Thauer et al., 1977), поэтому он должен быть сопряжен с окислительно-энергетическим метаболизмом. Поскольку гликолиз и липогенез являются экзотермическими процессами (-71.1 ккал/моль глюкозы), синтез жирных кислот из глюкозы, в принципе, может протекать независимо от окислительного энергетического метаболизма.

Полагают, что перипортальный гликоген синтезируется преимущественно «непрямым путем» из глюконеогенных предшественников, а перивенозный гликоген образуется непосредственно из глюкозы (Gebhard, 1992; Jungermann, Kietzmann, 1997; Kruszynska, 1999). Подобный вывод соответствует данным о зональном распределении глюкокиназы и Г-6-Фазы (Jungermann, Katz, 1989). Показано, что отношение активностей глюкокиназы к Г-6-Фазе в перивенозных гепатоцитах в 6 раз выше, чем в перипортальных гепатоцитах. Поэтому в тех случаях, когда глюкоза является единственным субстратом, синтез гликогена происходит преимущественно в перивенозных зонах долек печени.

Несмотря на все эти соображения, вопрос о том, в какой зоне дольки начинается синтез гликогена после приема пищи, и с какой скоростью он протекает в разных зонах, не однозначен. Во-первых, нужно заметить, что на активность глюкокиназы, которая гораздо выше в гепатоцитах перивенозной зоны, сильное влияние оказывает продолжительность

голодания. Показано, что после продолжительного голодания активность этого фермента значительно снижается и восстанавливается после приема пищи не сразу (Ньюсхолм, Старт, 1977; Walker, 1977; Bois-Joyeux et al., 1990). Во-вторых, показано, что синтез гликогена, через глюконеогенез, вносит заметно больший вклад в его накопление после приема пищи, чем прямой путь. При этом вклад непрямого пути в образование гликогена лишь возрастает по мере увеличения времени между приемами пищи (Newgard et al., 1983; Kuwajima et al., 1986; Kruszynska, 1999).

Определение содержания гликогена в гепатоцитах перипортальной и периферической зон дольки печени через различные интервалы времени кормления голодных крыс смесью глюкозы и фруктозы показало, что скорость накопления гликогена в перипортальных клетках выше, чем в периферических (Кудрявцева и др., 1990; Kudryavtseva et al., 1992). Отношение содержания гликогена в гепатоцитах портальной зоны к содержанию гликогена в гепатоцитах центральной зоны (ПЗ/ЦЗ-гликоген) на всех этапах рефининга крыс превышает 1.0 (Кудрявцева и др., 1990). В постабсорбтивном периоде величина ПЗ/ЦЗ-гликоген в нормальной печени крыс и человека также превышает 1.0, а индивидуальные колебания составляют 1.05–1.30 (Kudryavtseva et al., 1996; Мамырбаева и др., 1998; Кудрявцева и др., 2000; Кудрявцева и др., 2001).

Анализ гистограмм распределения гепатоцитов по содержанию гликогена, полученных через различные интервалы времени после начала кормления голодных крыс, позволил заключить, что все гепатоциты в разных зонах дольки печени способны синтезировать гликоген, но скорость его накопления в индивидуальных клетках сильно различается. Различная концентрация ферментов метаболизма гликогена и разная их активность в индивидуальных клетках играют, по-видимому, наиболее значительную роль в дисперсии клеток по содержанию гликогена. Однако гетерогенность гепатоцитов по уровню плоидности, размеру и пролиферативной активности также вносит существенный вклад в различия клеток по этому признаку и оказывает ощутимое влияние на их функциональную активность.

Исследование *in situ* содержания гликогена в гепатоцитах крысят на 7, 14, 21 и 30-е сут после рождения показало, что во время синтеза ДНК уровень гликогена в клетках разной плоидности падает примерно на одну и ту же величину (около 26 %), относительно клеток, находящихся в G_{0+1} -фазе клеточного цикла. При этом содержание гликогена в гепатоцитах по мере прохождения ими S-фазы клеточного цикла постепенно уменьшается. Показано также, что хотя гепатоциты, находящиеся в G_2 -фазе, обладают удвоенным числом генов, содержание гликогена в них остается на уровне соответствующем G_{0+1} -фазе (Шалахметова и др., 1981). Включение «в работу» реплицированных генов, которое приводит к удвоению содержания гликогена в клетках, происходит, по-видимому, в ходе митоза или сразу после его завершения.

Схожие данные были получены и при исследовании содержания гликогена в синтезирующих и не синтезирующих ДНК гепатоцитах регенерирующей печени крыс (Майтесян, 1983).

Во многих работах показано, что в расчете на один геном различные функциональные показатели полиплоидных клеток не отличаются от соответствующих показателей диплоидных клеток (Brodsky, Uryvaeva, 1977). Анализ содержания гликогена в одноядерных и двуядерных гепатоцитах различной ploидности в ходе постнатального онтогенеза крыс (Кудрявцева и др., 1979; Шалахметова и др., 1981) в регенерирующей печени (Майтесян, 1983) показал, что, несмотря на значительные различия содержания гликогена в индивидуальных клетках, его среднее содержание в гепатоцитах строго соответствует степени ploидности клеток. Полученные данные свидетельствуют о том, что метаболизм гликогена в гепатоцитах различных классов ploидности следует одинаковым закономерностям. Вместе с тем, можно отметить, что зависимость содержания гликогена в гепатоцитах от уровня их ploидности исследована лишь для одного вида млекопитающих — крыс. Подобные данные для других видов, в частности, человека, отсутствуют. Кроме того, неясно, сохраняется ли соответствие содержания гликогена уровню ploидности гепатоцитов в ходе рефиндинга.

В отличие от ploидности гепатоцитов и их пролиферативной активности, ситуация с влиянием размера гепатоцитов на их функциональную активность гораздо менее ясна. Размер клеток, который является фундаментальным параметром, оказывает существенное влияние на общий план строения клеток и их функцию (Jorgensen, Tyers, 2004). Подавляющее большинство работ, посвященных исследованию взаимосвязи размера клеток с их функцией, связано с изучением ионозависимых изменений клеток на различные показатели их метаболизма. Быстрые изменения объема клеток, обусловленные их гидратацией или обезвоживанием, оказывают сильное влияние на многочисленные метаболические пути в печени, включая синтез и распад белков, липогенез, гликолиз и синтез мочевины (Waldegger, Lang, 1998). Показано, что набухание и обезвоживание гепатоцитов вызывают заметные изменения в потреблении кислорода, продукции глюкозы, скорости глюконеогенеза и гликолиза, а также активности ключевых ферментов углеводного обмена в этих клетках (Hallgren et al., 2003; Krumschnabel et al., 2003). В целом, гидратация клеток стимулирует в них анаболические процессы и пролиферацию, в то время как обезвоживание клеток ведет к усилению катаболизма и повышает их чувствительность к апоптозу (Schliess, Häussinger, 2003).

Быстрые изменения размера гепатоцитов, вызванные их набуханием или дегидратацией, невелики по своей амплитуде (около 35 %, Espelt et al., 2008) и не сопровождаются изменениями в них количества органоидов и различных структур. В отличие от изменений объема клеток, вызванных гипер- или гипоосмотическими условиями, интервал колебаний размера гепатоцитов в печени млекопитающих гораздо масштабнее. Показано, например, что

размер гепатоцитов и содержание в них белка могут различаться в несколько раз даже у клеток одной и той же ploидности (Майтесян, 1983; Завадская и др., 1989; Богданова и др., 1990). Некоторые авторы считают, что количество гликогена, которое может накапливаться в гепатоцитах, сильно зависит от их размера. Полагают, что чем больше клетка, тем большее количество гликогена она может откладывать в своей цитоплазме (Ньюсхолм, Старт, 1977). Однако данные, подтверждающие или опровергающие это предположение, до нашей работы отсутствовали.

1.5. Нарушения метаболизма гликогена в печени

Ключевая роль печени в углеводном метаболизме млекопитающих, важным звеном которого является метаболизм гликогена, предполагает, что болезни этого органа, связанные с нарушением обмена гликогена, могут привести к серьезным последствиям для всего организма. Известно большое количество болезней печени у человека и животных, связанных с дефектами метаболизма этого полисахарида. Условно их можно разделить на врожденные болезни обмена гликогена и не наследственные заболевания печени, приобретенные в течение жизни, сопровождающиеся тяжелыми нарушениями метаболизма гликогена.

Гликогеновые болезни (Розенфельд, Попова, 1979) или гликогенозы представляют группу генетически обусловленных заболеваний, которые характеризуются дефицитом одного из ферментов, связанных с синтезом или деградацией гликогена (**Таблица 1**). Первые данные о наследственных нарушениях обмена гликогена появились еще в 20-е годы прошлого века, но о том, что избыточное накопление гликогена в печени связано с дефицитом одного из ферментов его метаболизма стало известно гораздо позже. В 1952 году Герти и Карл Кори сообщили, что у некоторых пациентов с избыточным накоплением гликогена в печени отсутствует Г-6-Фаза. Несколько позже эти же авторы обнаружили другой тип гликогеновой болезни, связанный с дефицитом амило-1,6-глюкозидазы — ветвящего фермента. В настоящее время известно о двенадцати различных гликогеновых болезнях, которые в основном проявляются в эпизодах гипогликемии и гепатомегалии, но вариабельность характерных черт этих болезней очень велика.

Гликогеновые болезни (ГБ) классифицируют на основе дефицита какого-либо фермента, участвующего в метаболизме гликогена, и по типу ткани (обычно это паренхима печени или мышечная ткань), в которой отсутствует фермент. Около 80 % всех ГБ печени составляют ее типы I, m, K и n (Ozen, 2007).

Гликогеновая болезнь типа I (болезнь Гирке, гепаторенальный гликогеноз), пожалуй, наиболее известная из ГБ. Она обусловлена дефицитом Г-6-Фазы. Г-6-Фаза связана с

эндоплазматическим ретикулумом и функционирует как многокомпонентная система. Известно 4 подтипа этой болезни. Каталитическая субъединица этого фермента локализована внутри эндоплазматического ретикулума и ее дефицит вызывает **Ia** тип болезни. Кроме того, существуют транспортеры, которые переносят в эндоплазматический ретикулум субстрат для фермента — Г-6-Ф и его продукты — фосфат и глюкозу. Дефицит транспортера Г-6-Ф приводит к гликогеновой болезни типа **Ib**, а дефицит транспортеров фосфата и глюкозы — болезням типа **Ic** и **Id** соответственно. При гистопатологическом исследовании печени больных ГБ I типа обнаруживаются набухшие гепатоциты с цитоплазмой, слабо окрашивающейся на гликоген, но с ядрами, содержащими большое его количество (**рис. 14, а**).

Гликогеновая болезнь типа m (болезнь Кори, болезнь Форбеса, дефицит амило-1,6-гликозидазы) приводит к потере активности фермента разветвляющего гликоген, который обладает двумя независимыми каталитическими функциями: олиго-1,4-трансферазной и амило-1,6-гликозидазной. Обе каталитические единицы фермента необходимы для его нормальной активности. Дефицит амило-1,6-гликозидазы приводит к избыточному накоплению гликогена с неправильной структурой, которая отрицательно сказывается на функции гепатоцитов.

ГБ m-типа составляет около 24 % от всех случаев гликогеновых болезней и сопровождается гепатомегалией, гипогликемией и дислипидемией, а в некоторых случаях — задержкой умственного развития (Ozen, 2007). Наиболее высокая частота встречаемости ГБ m-типа зарегистрирована у населения Фарерских островов, где она составляет 1:3600 вследствие близкородственных связей (Santer et al, 2001).

Таблица 1. Классификация гликогенозов (Chandramouli et al., 2015).

Тип гликогеноза	Название	Подтипы	Фермент с нарушенной активностью	Основные органы, ткани и клетки, в которых на сегодняшний день выявлен дефект фермента	Ссылки на источники литературы
0	Агликогеноз	–	Гликогенсинтаза	Печень	136, 211
I	Болезнь Гирке, печеночно-почечный гликогеноз	Ia Ib Ic Id	Глюкозо-6-фосфатаза	Печень, почки, слизистая оболочка тонкого кишечника	136, 211, 310, 325
II	Болезнь Помпе	II IIb	Кислая α -1,4-глюкозидаза	Сердце, скелетные мышцы, печень	118, 162, 271, 324, 352, 439
III	Болезнь Кори, ограниченный декстриноз	IIIa IIIb IIIc IIId	Амило-1,6-глюкозидаза (деветвящий фермент (ДФ)) глюкозидазная активность ДФ трансферазная активность ДФ	Сердце, скелетные мышцы, печень	211, 435
IV	Амилопектиноз, Болезнь Андерсена	–	Амило-1,4 \rightarrow 1,6-трансглюкозидаза (ветвящий фермент)	Сердце, печень, селезенка	136
V	Болезнь Мак-Ардля	–	Мышечная гликогенфосфорилаза (миофосфорилаза)	Скелетные мышцы	136
VI	Болезнь Херса	–	Гликогенфосфорилаза печени	Печень	435
VII	Болезнь Таруи	–	Фосфофруктокиназа	Скелетные мышцы, эритроциты	136
VIII	Болезнь Томсона	–	Гликогенфосфорилаза печени	Печень	136
IX	Болезнь Хага	IXa IXb IXc	α -субъединица киназы фосфорилазы β -субъединица киназы фосфорилазы γ -субъединица киназы фосфорилазы	Печень, эритроциты, лейкоциты, скелетные мышцы	435
X	–	–	цАМФ-зависимая киназа фосфорилазы	Печень, мышцы	136
XI	Болезнь Фанкони-Бикеля	–	Транспортер глюкозы (ГЛЮТ2)	Печень, почки	136, 211
Не классиф.	Прогрессивная миоклоническая эпилепсия Лафора	–	Тирозин-фосфатаза/убиквитин-лигаза	Сердце, скелетные мышцы, печень, мозг, почки	137, 182, 273, 436

Гликогеновая болезнь типа IV (болезнь Андерсена, дефицит ветвящего фермента, амилопектиноз) впервые была описана в 1956 году как семейный цирроз печени с отложением в гепатоцитах атипичного гликогена. При отсутствии фермента амило-1,4→1,6-трансглюкозидазы гликоген не может ветвиться. В результате, в различных клетках, включая гепатоциты и миоциты, накапливается атипичный гликоген со структурой подобной амилопектину (**рис. 14, б**). Частота встречаемости ГБ IV типа составляет примерно 0.3 % от всех ГБ.

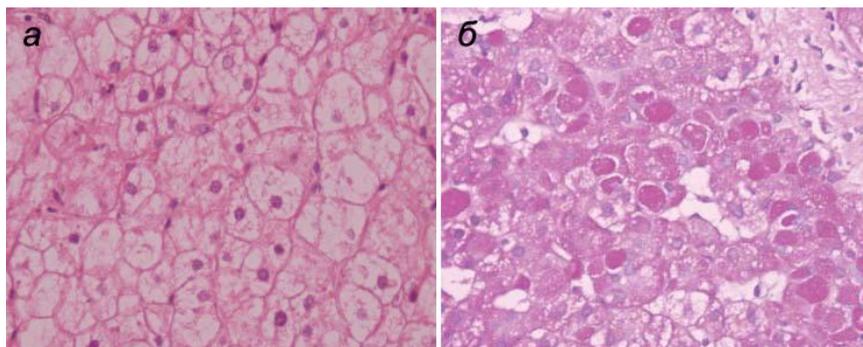


Рис. 14. *а* — гликогеновая болезнь I типа. Показано мозаичное накопление гликогена в гепатоцитах, с большим количеством его в ядрах. Клеточные мембраны ярко выраженные.

б — гликогеновая болезнь IV типа. Диффузное отложение PAS-положительного амилопектина в гепатоцитах (Ozen, 2007).

В отличие от редкой формы **гликогеновой болезни VI типа** (болезнь Херса), обусловленной дефицитом ключевого фермента метаболизма гликогена — ГФ, гликогеновые болезни, связанные с дефектами системы активации ГФ, встречаются гораздо чаще. Известны различные варианты ГБ, которые связаны с многочисленными дефектами системы киназы фосфоорилазы-Via, K, X и W.

Типы ГБ, обусловленные дефектом системы активации ГФ и затрагивающие печень, можно классифицировать на две главные формы: форму, связанную с X-хромосомой, которая имеет два субтипа — XLG-1 и XLG-n, а также аутосомную рецессивную форму. Обычными симптомами и исходами ГБ, связанных с системой регуляции активности ГФ являются гепатомегалия, замедление роста и двигательной активности, гипотония, повышение в крови концентрации индикаторных ферментов цитолиза гепатоцитов аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспаратаминотрансферазы (АсАТ), холестерина и триглицеридов, а также гипогликемия (Willems et al, 1990; Burwinkel et al, 1998; Schippers et al, 2003).

Гликогеновая болезнь n-типа (дефицит кислой мальтазы, болезнь Помпе, дефицит альфа-глюкозидазы) представляет лизосомальную болезнь. Клинические проявления этого заболевания очень разнообразны, что связано с вариабельностью остаточной активности альфа-1,4-глюкозидазы в тканях из-за различных мутаций в гене, расположенном на 17-й хромосоме

(Haines et al, 1990). Характерной особенностью болезни Помпе является накопление значительного количества гликогена в лизосомах.

Существует 4 типа ГБ n-типа. Общая частота младенческой и взрослой форм ГБ этого типа достигает примерно 1 на 40000 человек. Главными чертами классической болезни Помпе для младенческого возраста являются кардиомиопатия и мышечная гипотония, а у подростков и взрослых главной мишенью этой болезни являются скелетные мышцы (Veratis et al, 1978; Slonim et al, 2000).

В отличие от наследственных нарушений метаболизма гликогена в печени, частота встречаемости которых для новорожденных составляет 0.002–0.005 %, частота заболеваний печени не наследственной природы, но связанных с серьезными отклонениями в обмене гликогена, несравнимо выше. Наиболее тяжелыми и опасными для жизни человека болезнями печени являются хронические гепатиты различной этиологии и диабет.

Хронические гепатиты (ХГ) различной этиологии, завершающей и наиболее опасной для жизни стадией которых является цирроз печени (ЦП), — широко распространенные заболевания человека и животных. Основными причинами ХГ являются неумеренное употребление алкоголя и лекарственных препаратов, а также заражение через кровь различными гепаднавирусами (В, С, D, Е и др.). Одних только носителей этих вирусов, которые с высокой вероятностью приводят к развитию ХГ, в мире насчитывается около миллиарда человек (Mauss et al., 2015). Считается, что алкогольный и «лекарственный» гепатиты являются причиной ЦП у более половины больных ХГ, а вирусный гепатит, как этиологический фактор, ответственен за 10–24 % случаев развития ЦП у больных ХГ. В качестве других причин ЦП указывают также аутоиммунные гепатиты и гепатиты неизвестного происхождения, так называемые криптогенные гепатиты (10–35 %) (Gressner, Schuppan, 1999; Шерлок, Дули, 2002).

ЦП представляет тяжелое необратимое заболевание, как правило, заканчивающееся летальным исходом. Характерными чертами ЦП являются диффузная гибель гепатоцитов, узелковая трансформация паренхимы и образование фиброзных септ, соединяющих систему портальных сосудов с системой печеночных вен. Главными диагностическими признаками ЦП считают фиброз большей части паренхимы, выраженную регенерацию печеночной ткани, необычно мелкие портальные тракты и избыточное количество центральных вен в дольках (Anthony et al., 1978; Верин, 2001; Афанасьев и др., 2004). Все эти факторы приводят к значительной перестройке дольковой структуры органа.

Разрастание фиброзной ткани изменяет соотношение между паренхимными и непаренхимными элементами в пользу последних, оказывая тем самым неблагоприятное воздействие на жизнедеятельность основного клеточного типа в печени — гепатоцитов. Значительные изменения при ЦП происходят и в системе микроциркуляции органа.

Соединительнотканые септы при ЦП расчленяют единую для всего органа сеть синусоидов на множество изолированных фрагментов. В результате происходит редукция терминальных ветвей воротной вены, затрудняющая ток крови по синусоидам. Важной особенностью кровообращения при ЦП является развитие коллатерального кровообращения, которое способствует развитию портальной гипертензии. Значительная часть крови при ЦП обходит печень, минуя ее паренхиму. Перестройка сосудистого русла паренхимы печени, достигающая своего апогея на конечной стадии ХГ и ЦП, приводит к резкому снижению снабжения гепатоцитов кислородом и необходимыми для их жизнедеятельности веществами, вызывая гипоксию и голодание клеток (Шерлок, Дули, 2002). Естественно предположить, что столь серьезные нарушения структуры печени при ЦП, неизбежно отразятся на выполнении ее многочисленных тканеспецифических функций, в том числе гликогенной. Действительно, имеющиеся в настоящее время немногочисленные данные позволяют заключить, что перестройка архитектоники печени, наблюдающаяся в ходе развития ХГ, приводит к значительным изменениям активности ферментов метаболизма гликогена, содержания гликогена в клетках, а также скорости его синтеза и расщепления.

Данные о содержании гликогена в печени больных ХГ достаточно противоречивы (Блюгер, 1978; Owen et al., 1981; Krähenbühl et al., 1991). Однако большинство имеющихся данных свидетельствует о том, что концентрация гликогена в цирротической печени находится в пределах нормы или даже заметно превышает ее. Цитофотометрия содержания гликогена в гепатоцитах, изолированных из биопсий печени больных ХГ и ЦП различной этиологии, показала, что уровень гликогена в клетках печени больных после ночного голодания в несколько раз превышает норму. При этом содержание гликогена в гепатоцитах увеличивается по мере усиления тяжести поражения печени (Кудрявцева, 1987; Кудрявцева и др., 1982, 1989; Безбородкина и др., 2008).

Определение скорости накопления гликогена в гепатоцитах нормальной печени крыс и гепатоцитах цирротической печени после per os введения голодным крысам глюкозы или фруктозы позволило установить, что при ЦП она ниже, чем в норме (Безбородкина и др., 2008). Кроме того, показано, что, как в нормальной печени, так и в цирротической печени, содержание гликогена в гепатоцитах портальной зоны (ПЗ) долики печени на всех этапах рефиндинга крыс глюкозой или фруктозой выше, чем в клетках центральной зоны (ЦЗ) долики печени (Безбородкина и др., 2008). Как следствие, величина ПЗ/ЦЗ-гликогена долики в нормальной печени заметно выше, чем при ЦП (Безбородкина и др., 2008). Схожие данные были получены при исследовании содержания гликогена в различных зонах долики нормальной и цирротической печени человека (Безбородкина и др., 2008). Основными причинами столь значительных различий между гепатоцитами нормальной и цирротической печени по

содержанию гликогена и динамике его накопления в ходе рефиндинга, по-видимому, являются структурная перестройка паренхимы, о которой говорилось выше, а также нарушение гормонального статуса организма (Rosetti et al., 1987; Kruszynska, McIntyre, 1991; Kruszynska, 1999).

Содержание гликогена в печени определяется соотношением скоростей его синтеза и деградации. Поэтому снижение скорости накопления гликогена в гепатоцитах цирротической печени после получения голодными крысами пищи и более высокие, чем в норме, уровни гликогена в клетках при циррозе могут быть связаны с изменением активности ключевых ферментов гликогенеза и гликогенолиза — ГС и ГФ. Данные об активности ГС и ГФ при ЦП, имеющиеся в литературе, немногочисленны и достаточно противоречивы, поскольку они получены на материале печени при различном пищевом статусе организма. Хотя в некоторых работах было обнаружено снижение активности ГС в печени при экспериментальном ЦП (Giardina et al., 1994; Krähenbühl et al., 1996), большинство имеющихся в настоящее время данных, полученных на крысах и человеке, свидетельствуют о том, что в постабсорбтивном периоде активность ГС в цирротической печени не отличается от значений нормы или лишь слегка ниже ее (Krähenbühl et al., 1991; Кудрявцева и др., 1994, 1996, 1998; 1999; Kudryavtseva et al., 2001; Krähenbühl et al., 2003; Безбородкина и др., 2008).

Данные о скорости деградации гликогена в цирротической печени также немногочисленны и противоречивы. С одной стороны, при ЦП наблюдалась более быстрая, чем в норме, деградация гликогена (Krähenbühl et al., 1991), а с другой — обнаружено, что скорость гликогенолиза в печени пациентов с ЦП гораздо ниже, чем в нормальной печени (Petersen et al., 1999). Главным фактором, контролирующим метаболизм гликогена в печени, как известно, является ГФ, активность которой в десятки раз выше активности ГС даже в том случае, если последняя выражается в тех же единицах, что и ГФ (Ercan et al., 1994). Подавляющее большинство имеющихся в настоящее время данных свидетельствует о том, что активность ГФ при экспериментальном ЦП у крыс и при ЦП различной этиологии у человека заметно ниже, чем в норме (Кудрявцева и др., 1994, 1996, 1998, 1999, 2002; Krähenbühl et al., 1996). Кроме того, показано, что активность ГФ при усилении тяжести поражения печени человека снижается: на стадии ХГ до ЦП активность ГФ составляла 49 % от уровня нормы, а на стадии ЦП — лишь 33 % (Безбородкина и др., 2008).

Морфо-функциональная перестройка печени, усиливающаяся по мере развития ХГ и перехода его в завершающую стадию — ЦП, приводит к существенным изменениям не только метаболизма гликогена в этом органе, но и углеводного метаболизма в целом. Целый ряд черт углеводного обмена при ЦП, а именно, интолерантность тканей к глюкозе (Schmueli et al., 1993; Petrides et al., 1994; Mion et al., 1996), сниженная активность глюкокиназы в печени (Caro et al.,

1995; Aiston et al., 2001; Wu et al., 2002, 2005), резистентность клеток к инсулину (Cavallo-Perin et al., 1985; Müller et al., 1992; Allison et al., 1994; Petrides et al., 1994; Del Olmo et al., 1996; Holstein et al., 2002; Bernsmeyer, Heim, 2009; Garcia-Compean et al., 2009) сближают ЦП с другим опасным и широко распространенным заболеванием — сахарным диабетом (СД).

СД — огромная медицинская, экономическая и социальная проблема во многих странах. В 2014 году уровень заболеваемости СД по данным ВОЗ составил более 347 млн человек (около 9 % взрослого населения планеты) (ВОЗ. Информационная бюллетень № 312, 2015). По данным на январь 2011 году в России этим заболеванием страдает более 3.3 млн человек (примерно 0.3 млн — СД 1-го типа и около 3 млн — СД 2-го типа). Исследования, однако, показывают, что реальная цифра распространенности СД гораздо выше и приближается к 9 млн человек (~ 5 % от всего населения России). По прогнозам Международной Федерации диабета число больных СД к 2030 году может составить около 8.4 млрд человек (Международная Федерация диабета. Диабетический атлас, 2009). В настоящее время СД занимает 4-е место среди болезней, которые становятся причиной летального исхода.

Гипергликемия и нарушение гормонального статуса, характерные для больных СД, сопровождаются заметными изменениями метаболизма гликогена в печени, хотя имеющиеся данные по этому вопросу немногочисленны и противоречивы. В ряде работ было показано, что при экспериментальном СД у крыс синтез гликогена, который определяли по включению ^{14}C -меченых предшественников, ухудшен (Friedmann et al., 1970; Whitton, Hems, 1975). При этом установлено, что в печени крыс с СД вклад непрямого пути синтеза гликогена (C_3 -предшественники \rightarrow Г-6-Ф \rightarrow гликоген) увеличен по сравнению с прямым путем его образования (глюкоза \rightarrow Г-6-Ф \rightarrow гликоген) (Giaccari, Rosetti, 1992). Вместе с тем, в других работах на животных (мышь с наследственным и стрептозотоциновым диабетом) каких-либо отличий уровней гликогена в «диабетической» печени по сравнению с контролем не было найдено (Stearns, Benzo, 1977; Roesler et al., 1990).

Определение концентрации гликогена и скорости его синтеза в печени больных СД 2-го типа показало (Krssak et al., 2004), что перед приемом пищи уровень гликогена у пациентов с СД был ниже, чем в контроле (227 ± 6 и 275 ± 10 ммоль/л печени соответственно, $p < 0.001$). Общая скорость синтеза гликогена после приема пищи также была более низкой, чем в контроле. При диабете она составила 0.76 ± 0.16 , а в контроле — 1.36 ± 0.15 мг/кг/мин ($p < 0.02$). Схожие данные были получены Магнуссоном с соавт. (Magnusson et al., 1992), которые нашли, что через 4 ч после приема пищи концентрация гликогена в печени пациентов с СД составила 131 ± 20 ммоль/л печени, в то время как в контроле — 282 ± 60 ммоль/л печени ($p < 0.05$).

Данные об активности ключевых ферментов гликогенеза и гликогенолиза ГС и ГФ при СД также очень противоречивы. С одной стороны, было найдено, что активность ГС при СД возрастает (Bahnak, Gold, 1982; Akatsuka et al., 1983; Niewoehner, Nuttall, 1986), а активность ГФ снижается (Gannon, Nuttall, 1990). Более низкая активность ГФ при СД подтверждается также исследованиями с использованием явления ядерного магнитного резонанса (ЯМР), которые свидетельствуют о более низкой скорости деградации гликогена при СД (Magnusson et al., 1992; Hundal et al., 2000). С другой стороны, было показано, что в печени db/db мышей с наследственным СД уровни ГС не отличаются от нормы, а общая активность ГФ и ее активной формы ГФа у db/db мышей повышены. При этом авторы обнаружили, что кинетические свойства этих ферментов у мышей с СД иные, чем в нормальной печени. Изменения кинетических параметров ферментов проявлялись, в основном, в форме снижения V_{\max} и в чувствительности их к АТФ (Roesler et al., 1990). Помимо данных, приведенных выше, Голден с соавт. (Golden et al., 1979) сообщили о более низкой активности ГС в печени голодных крыс с СД по сравнению с контрольными крысами.

Таким образом, содержание гликогена, т.е. количество его молекул в клетках, подвержено быстрым и масштабным изменениям в ответ на требования со стороны организма. Однако лабильность числа молекул гликогена (β -частиц) в клетках, скорость их образования и деградации связаны не только с ключевыми ферментами метаболизма гликогена и многочисленными факторами, регулирующими активность ферментов, но также с внутренней структурой этих частиц. Показано, что структура молекул гликогена в клетках нормальных и патологически измененных органов и тканей подвержена значительным изменениям (Кудрявцева и др., 1974, 1988, 1992; Кудрявцева, 1987; Shearer et al., 2005; Безбородкина и др., 2008; Wilson, 2010; Roach et al., 2012; Gilbert, Sullivan, 2014). Однако механизмы формирования и деградации β -частиц гликогена, динамики их состава в норме и при патологии, роль структурных изменений частиц в регуляции гликогенеза и гликогенолиза во многом еще остаются неизвестными.

1.6. Структура молекулы гликогена. β и α -частицы гликогена

Структура молекулы гликогена (β -частицы) теоретически описана достаточно хорошо (Melendez-Nevia et al. 1993, Melendez et al. 1997, 1999). Для характеристики ее особенностей (**рис. 15**) используются всего четыре переменные, а именно: число внешних цепей (C_A), общее число остатков глюкозы, содержащихся в молекуле (GT), число остатков, непосредственно доступных действию фосфоорилазы (GP_T), и объем молекулы (V_S). Эти переменные, в свою очередь, зависят от трех параметров: степени ветвления (r), числа ярусов (t) и числа остатков

глюкозы в каждой цепи (g_c). Показано, что значения этих параметров при расчете структуры гликогена составляют: $r = 2$ (Melendez et al., 1997), $t_{max} = 12$ (Melendez et al., 1998) и $g_c = 13$ (Melendez-Hevia et al., 1993). Гликоген, изолированный из различных тканей млекопитающих или организмов, находящихся на разных уровнях эволюционного развития (от бактерий до человека), имеет очень близкие значения этих параметров (Melendez-Hevia et al., 1995; Melendez et al., 1997). Подобный факт свидетельствует, с одной стороны, о древности структуры гликогена, оптимальность которой эволюция шлифовала на протяжении многих десятков и даже сотен миллионов лет, а с другой — о высокой надежности теоретических представлений о структуре гликогена, полученных на основании расчетов с использованием названных параметров.

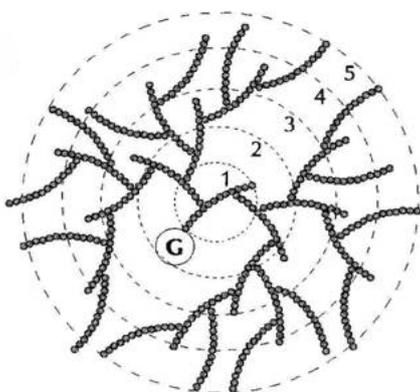


Рис. 15. Структура гликогена согласно модели Вилана. Полная молекула гликогена (β -частица) имеет сферическую форму с 12 концентрическими ярусами глюкозных остатков (на схеме представлены только 5 ярусов). В центре частицы находится самогликозилирующийся белок гликогенин (**G**) (Melendez et al., 1999).

Расчеты показали, что если бы молекула гликогена содержала не 12, а 13 ярусов, то объем последнего составил бы 10000 нм^3 , а количество остатков глюкозы в нем — ~ 55000 (т.е. то количество, которое содержится в полной 12-ярусной частице). Полагая, что объем молекулы глюкозы равен примерно 0.113 нм^3 , это означает, что остатки глюкозы на 13-ом ярусе заняли бы 62 % его поверхности (для сравнения: в 12-ярусной частице эта величина составляет около 26 %). Такая плотность расположения глюкозных остатков на поверхности молекулы ограничила бы действие ГС и ГФ (Goldsmith et al., 1982; Melendez-Hevia et al., 1993). Ранее Мадсен и Кори (Madsen, Cori, 1958) показали, что по мере роста частицы гликогена остатки глюкозы на ее поверхности становятся всё более и более тесно прижатыми друг к другу, создавая тем самым стерическое препятствие для работы ферментов метаболизма гликогена. Авторы пришли к выводу о том, что размер молекулы гликогена регулируется особенностями ее собственной структуры. Согласно электронно-микроскопическим данным, предельный диаметр молекулы гликогена составляет 40–44 нм (Roach et al., 2012). Таким образом, 12-ярусная структура β -частицы оказывается оптимальной по следующим причинам: во-первых, в этом случае максимальное количество глюкозы запасается в наименее возможном объеме; во-вторых, большое число нередуцирующих концов на внешнем ярусе позволяет ГФ с высокой

скоростью расщеплять гликоген даже без участия разветвляющего энзима и тем самым максимально быстро обеспечивать клетки необходимым топливом.

Повторяемость структуры гликогена, ее самоконтроль и самоподобие на каждом уровне формирования β -частицы дает основание считать ее фракталом (Melendez et al., 1999). Самоподобие β -частицы проявляется, в частности, в том, что количество глюкозных остатков в неразветвленных А-цепях на самом внешнем ярусе, независимо от размера молекулы гликогена, составляет примерно равную относительную величину (Shearer, Graham, 2004; Roach et al., 2012). Преимущества фрактальной структуры гликогена состоят в том, что, во-первых, она позволяет быстро создавать молекулу и быстро ее расщеплять. Столь простой и прямой путь образования и деградации молекулы гликогена обеспечивает высокую скорость метаболизма (Melendez-Nevia et al., 1994). Во-вторых, такая структура обеспечивает простой механизм регуляции метаболических потоков (Melendez-Nevia, Isidore, 1985; Melendez-Nevia, Torres, 1988; Melendez-Nevia et al., 1994). Наконец, важным следствием фрактальной структуры гликогена является стабильность его молекулы. Сферическая форма молекулы гликогена способствует, с одной стороны, максимуму потенциальной энергии на ее поверхности в виде глюкозных остатков, а с другой — максимально увеличивает число водородных связей на ее поверхности и, тем самым, повышает стабильность молекулы, несмотря на присутствие в ней высокого уровня потенциальной энергии (Melendez et al., 1999).

Как уже говорилось, помимо полисахаридной части β -частица (гранула гликогена) содержит белки, участвующие в ее метаболизме. Вследствие того, что каждая гранула гликогена имеет свой собственный метаболический механизм, позволяющий увеличивать в ней число остатков глюкозы или уменьшать их количество, гранулы гликогена нередко называют гликогеносомами. В нормальных условиях отдельная гранула включает полный набор ферментов метаболизма гликогена. В то же время следует отметить, что взаимодействие ферментов с полисахаридной частью гранулы гликогена очень динамичное, поскольку некоторые белки, в зависимости от условий, складывающихся в клетке, могут связываться с гранулой или отдаляться от нее. Помимо ранее упоминавшихся белков-ферментов — ГС, ГФ, киназ, фосфатаз, гликогенина, ДВФ, частицы гликогена содержат актин, АМФ-киназу (АМФК), активация которой приводит к увеличению поглощения глюкозы, а также небольшие по молекулярному весу белки, взаимодействующие с гликогенином. Полагают, что эти белки принимают участие в инициации гликозилирования гликогенина (Roach, 2002; Shearer, Graham, 2004; Roach et al., 2012). Кроме уже известных белков, в частицах гликогена были обнаружены также лафорин (Minassian et al., 1998; Ganesh et al., 1999) и Stbd1 (крахмал-связывающий домен белка 1)/генетонин 1 (Jiang et al., 2010) (**рис. 16**).

Протеомный анализ мягко очищенного гликогена из печени мышей и крыс (Stapleton et al., 2010) подтвердил присутствие в β -частицах большинства вышеназванных белков, за исключением киназы фосфорилазы и АМФК. Некоторое удивление вызвало обнаружение в частицах гликогена легких и тяжелых цепей ферритина, а также отсутствие ветвящего фермента. Полагают, что ветвящий фермент, хотя и взаимодействует с гликогеном, но не образует с ним прочной связи и поэтому легко диссоциирует из молекулы (Caudwell, Cohen, 1980).

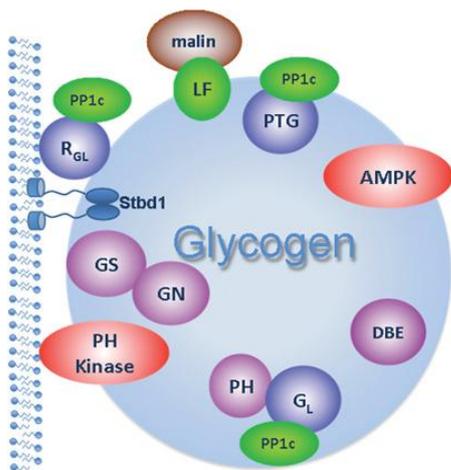


Рис. 16. Частица гликогена.

На рисунке представлен комплекс гликогена с белками: ферменты обмена гликогена (розово-лиловый цвет) — гликогенин (GN), гликогенсинтаза (GS), гликогенфосфорилаза (GH) и девятый фермент (DBE); протеинкиназы (красный цвет) — киназа фосфорилазы (PH киназа) и АМФ-активируемая протеинкиназа (АМПК); фосфатазы (зеленый цвет) — каталитическая субъединица 1 типа (PP1c) и лафорин (LF); PP1-гликоген ассоциированные субъединицы (голубой цвет) — R_{GL} , G_L и PTG ; и $Stbd1$ белок, связанный с мембраной клетки. Предполагают, что малин связан с гликогеном через взаимодействие с лафорином. Киназа фосфорилазы, $Stbd1$ и R_{GL} связаны с мембраной (Roach et al., 2012).

В нормальных условиях каждая гранула гликогена содержит ферменты его метаболизма и белки, выполняющие каркасную функцию, которые вместе составляют до 80 % от общего веса гранулы (Shearer, Graham, 2004). Поэтому исследование роли белков, входящих в состав β -частицы, и особенностей их взаимодействия чрезвычайно важно для понимания механизмов ее роста и деградации. Отдельные белки могут присоединяться к грануле гликогена, диссоциировать от нее или перемещаться в другие компартменты клетки в зависимости от условий метаболизма. Полагают, что динамика этих процессов играет ключевую роль в обеспечении различных метаболических процессов в клетке необходимым топливом.

Регуляция формирования частиц гликогена и их деградации в зависимости от энергетических потребностей клеток исследована пока еще недостаточно. Поскольку гликогенин является основой частицы гликогена, на которой строится вся последующая полисахаридная конструкция с участием ГС и ветвящего энзима, можно предположить, что содержание этого белка будет определять количество частиц гликогена и динамику его общего содержания в клетках. Однако данные, касающиеся изменения содержания гликогенина в ходе синтеза и деградации гликогена, противоречивы. В ряде работ было показано, что гликогениновая мРНК увеличивается в 2–3 раза после продолжительной мышечной нагрузки (Shearer et al. 2005) и в первые часы периода восстановления (Kraniou et al. 2000; Shearer et al.

2005). Кроме того, было найдено, что количество белка-гликогена возрастает на 70 % в течение пяти часового восстановления мышцы по сравнению с его количеством при полной мышечной усталости (Arkinstall et al. 2004; Shearer et al. 2005). Эти данные предполагают, что гликогенин деградирует в ходе физической нагрузки по мере того, как гранулы катаболизируются, но затем его уровень восстанавливается во время отдыха за счет синтеза, приводя к увеличению числа гранул. Однако в других работах не было обнаружено изменений в содержании гликогена как в ходе продолжительной физической нагрузки, так и при последующем восстановлении мышцы (Marchand et al., 2007).

К сожалению, столь же мало, как о синтезе гликогена, мы знаем о деградации этого белка при различных физиологических условиях. Неизвестно, что происходит с гликогенином, когда гранулы распадаются — он деградирует, инактивируется или остается в активной форме? Результаты некоторых работ, проведенных на мышцах человека при физической нагрузке и во время восстановления после нее, предполагают, что если запасы гликогена сильно истощаются, гликогенин не исчезает, а консервируется в небольших гранулах (Wilson et al. 2007). Подобный механизм дает возможность ГС быстро восстановить запасы гликогена в мышце во время отдыха. Подобно тому, как мы не знаем, может ли гранула гликогена двигаться, мы не знаем, может ли перемещаться и гликогенин. Между тем, информация об этом позволила бы узнать, где и как происходит синтез новых гранул гликогена. В этой связи интересно отметить, что гликогенин и GNIP — белок, взаимодействующий с гликогенином и стимулирующий его самогликозилирование, связаны в скелетных мышцах с актином и десмином цитоскелета соответственно (Vaque et al. 1997, Skurat et al. 2002). Возможно, такая связь позволяет направлять гликогенин и GNIP в определенные области мышцы для осуществления синтеза гликогена (Graham et al. 2010). Предполагается, что в гепатоцитах транслокация гранул также связана с цитоскелетом (Garcia-Rocha et al., 2001).

Хотя понимание организации гранул гликогена и регуляции их образования еще далеко от идеала, уже сейчас ясно, что состав белков, связанных с гранулой, и белок-белковые взаимодействия на разных этапах ее формирования очень важны для оценки скорости накопления гликогена и его использования клетками. В ряде случаев концентрация гликогена в клетках, как регулятор поглощения и утилизации глюкозы, может быть даже более значимым фактором, чем инсулин (Richter et al. 2001; Pilegaard et al. 2002; Nielsen, Richter 2003; Hargreaves, 2004). Особенности структуры молекулы гликогена позволяют запасать максимально большое количество глюкозы в минимально возможном объеме. Это предполагает, что на молекулярном уровне полимерная структура гликогена должна налагать ряд пространственных ограничений на ферменты, вовлекаемые в процесс присоединения и отщепления остатков глюкозы. Моделирование формирования молекулы гликогена показало,

что ее высокая структурная однородность может сохраняться при следующих главных условиях: 1) ГС должна работать преимущественно на внутренних цепях остатков глюкозы, а ГФ — на внешних и 2) перемещение ГС из одного локуса гликогена к другому должно быть гораздо более быстрым, чем перемещение ГФ (DiNuzzo, 2013). Единственным допущением, с помощью которого можно объяснить однородность структуры гликогена, является сродство ГС к внутренним цепям остатков глюкозы (**рис. 17**).

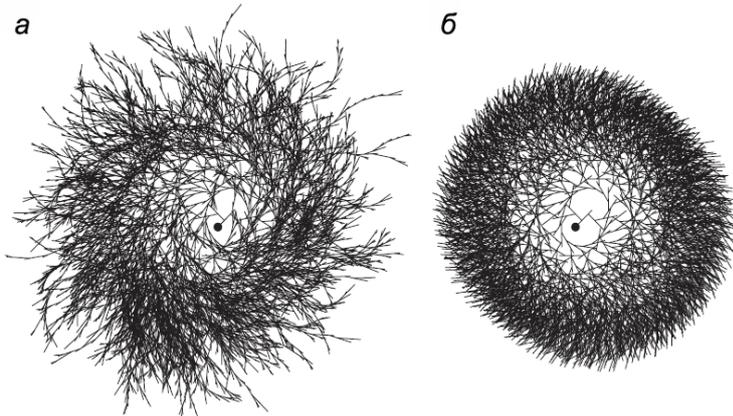


Рис. 17. Влияние сродства гликогенсинтазы к внутренним цепям на гомогенность молекулы гликогена. (*a*) В отсутствии стерических ограничений на работу фермента, молекула гликогена в итоге получается очень негомогенной. В частности, наблюдаются два типа неправильной структуры молекулы. Для первого типа характерно избыточное ветвление, которое может продолжаться до ≈ 30 -го яруса.

Как следствие этого, в молекуле образуется много незавершенных цепей глюкозы. Во втором типе неправильной структуры молекулы наблюдается несимметричное ветвление из-за того, что левая ветвь создается быстрее правой ветви (на пятом и десятом остатке соответственно). (*б*) Если гликогенсинтаза работает преимущественно на внутренних цепях, молекула гликогена оказывается полностью структурно гомогенной. Сродство гликогенсинтазы к внутренним цепям представляет минимальное допущение, с помощью которого достигается почти полная гомогенность структуры молекулы. В отличие от гликогенсинтазы гликогенфосфорилаза работает без предпочтения к внутренним или внешним цепям. Однако теоретически гомогенность гликогена слегка увеличивается, если допустить, что фосфорилаза предпочитает для работы наружные цепи. Следует отметить, что на схемах, как негомогенная (*a*), так и гомогенная (*б*) структурные формы молекулы гликогена содержат одинаковое число глюкозных остатков и что время синтеза гликогена в ходе роста двух молекул также одинаково (DiNuzzo, 2013).

Пространственный порядок взаимодействия ферментов синтеза и деградации гликогена, при котором ГФ в β -частице располагается над ГС, позволяет избежать избыточного роста внешних цепей и дает возможность корректировать случайные ошибки ГС в процессе присоединения глюкозных остатков. Различная доступность ферментов синтеза и деградации гликогена к остаткам глюкозы приводит в результате к различной скорости оборота молекулы, когда ее внешние области подвергаются более быстрому обороту, чем внутренние. Считается, что пространственные ограничения, налагаемые на активность ГС и ГФ, оптимально способствуют выполнению важнейшей метаболической функции гликогена, которая заключается в образовании большого количества глюкозы в течение короткого времени и быстром пополнении его запасов. При этом, как показано с помощью изотопного мечения,

процессы присоединения и отщепления глюкозных остатков в молекуле гликогена следуют принципу: последний остаток присоединяется — первый отсоединяется (Stetten, Stetten, 1954; Devos, Hers, 1979; Elsner et al., 2002).

Гликоген в виде отдельных, свободно лежащих в цитоплазме β -частиц присутствует в скелетных мышцах и некоторых других тканях. В печени β -частицы гликогена нередко собраны в агломераты, состоящие из 20–40 частиц (Devos et al., 1983), так называемые α -частицы. Диаметр α -частиц может достигать 200–300 нм (Rybicka, 1996; Sullivan et al., 2010) и на электронограммах они выглядят как «розетки» различного размера (рис. 18). Недавно α -частицы гликогена были обнаружены в сердце мышей (Besford et al., 2012), где они состоят из 4–20 β -частиц. Средний диаметр α -частиц в сердце составляет 133 ± 60 нм, однако, у отдельных частиц диаметр может достигать 200 нм.

Наличие или отсутствие α -частиц в ткани может определять порядок деградации гликогена. Показано, что деградация молекул гликогена в печени, в которой присутствует много α -частиц, происходит упорядоченно, тогда как в жировой ткани, где гликоген содержится преимущественно в виде β -частиц, этот процесс идет случайным образом (Devos, Hers, 1979; 1980). Авторы полагают, что α -частицы в печени соединены между собой связью, которая определяет каким путем будет происходить синтез и деградация гликогена. Предполагается также, что популяцию частиц гликогена в гепатоцитах составляют две группы частиц. Одна группа представлена преимущественно растущими частицами, которые еще связаны с ГС. Эти частицы присутствуют при низких концентрациях гликогена и их количество ограничено. Вторую группу составляют частицы, которые достигают своих максимальных размеров и, в принципе, их число не лимитировано (Devos et al., 1983).

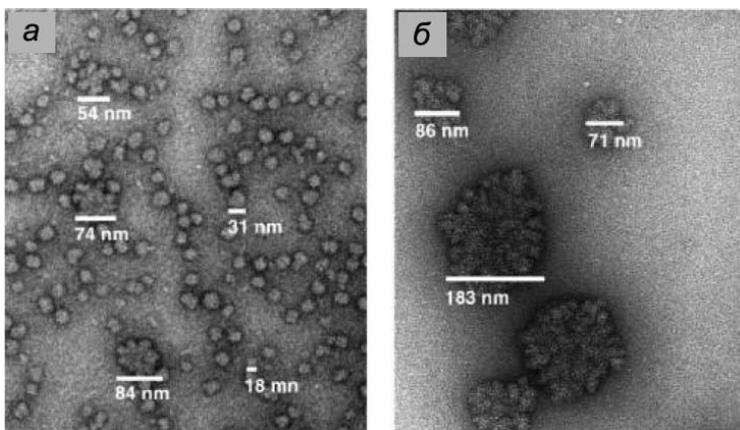


Рис. 18. Электронограммы частиц гликогена, изолированного из морского брюхоногого моллюска *Crepidula fornicata* (а) и печени крысы (б). Гликоген моллюска преимущественно состоит из β -частиц, средний диаметр которых составляет ~ 20 нм, а гликоген печени крысы — из α -частиц (средний диаметр ~ 100 нм) (Sullivan et al., 2010).

Природа связей, удерживающих β -частицы друг с другом при образовании α -частиц, не совсем ясна. Ранее было показано, что эти связи не являются водородными или ионными (Orrell, Bueding, 1964). Накамура (Nakamura, 1977) предположил, что β -частицы соединяются

между собой α -1,4-гликановыми цепями. После обработки гликогена 2-меркаптоэтанолом, который, как известно, разрушает дисульфидные связи, размер и форма частиц гликогена изменяются незначительно. Обработка частиц гликогена протеазой также не изменяет их форму и профиль распределения при гель-фильтрации. Эти результаты свидетельствуют о том, что большие частицы гликогена не разрушаются при обработке протеолитическим ферментом и, следовательно, белки, по-видимому, также не принимают участие в связях β -частиц друг с другом при формировании α -частиц (Nata et al., 1984). Исследование зависимости среднего размера молекул гликогена, растворенных в диметилсульфоксиде, от концентрации LiBr показало, что объединение β -частиц при формировании α -частиц происходит без участия водородных связей или белок-белковых взаимодействий. Предполагается, что α -частицы формируются с помощью ковалентных связей (Sullivan et al., 2010).

Данные о распределении частиц гликогена в печени мышей по размеру во время его синтеза и деградации, а также в период голодания, полученные с помощью эксклюзионной хроматографии, позволили сформулировать «рециклирующую» модель метаболизма гликогена, представленную на **рис. 19** (Sullivan et al., 2014).

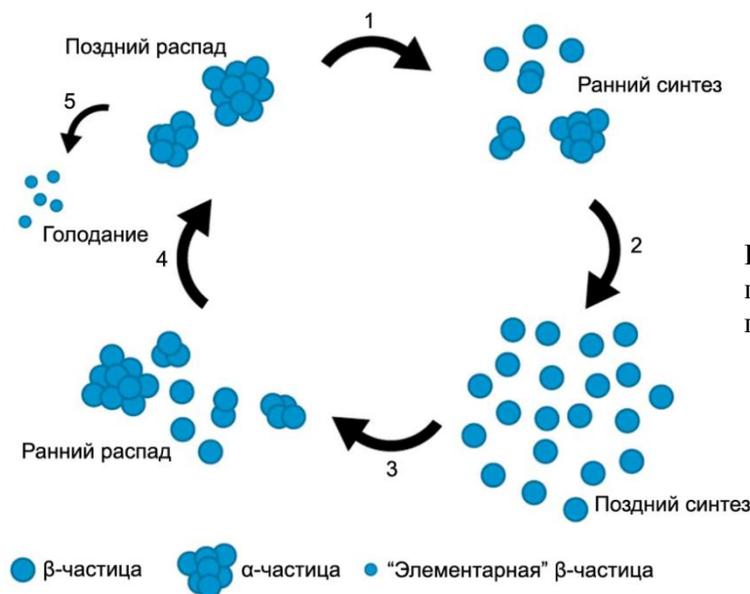


Рис. 19. Изменения структуры гликогена в печени мышей в течение суток и при голодании (Sullivan et al., 2014).

На стадии «позднего синтеза», после приема пищи, когда концентрация глюкозы в крови повышается, возникает необходимость синтезировать большие количества гликогена. По мнению авторов, формирование в это время небольших (по сравнению с α -частицами) β -частиц гликогена позволяет увеличить отношение площади поверхности к объему и тем самым повысить сродство активной формы ГФа к гликогену, а также облегчить включение глюкозы в гликоген. α -частицы, оставшиеся от предыдущего суточного цикла, распадаются в ходе синтеза

гликогена на отдельные β -частицы (стрелки 1 и 2 на **рис. 19**). Если бы этого не происходило, то α -частицы гликогена, которые не деградировали в течение одного суточного цикла, продолжали бы расти в ходе следующей фазы синтеза, приводя в результате к появлению α -частиц более крупных, чем в предыдущем цикле. В результате этого средний размер частиц гликогена с каждым днем становился бы все больше и больше.

В постпрандиальном (послеобеденном) периоде, после завершения синтеза гликогена, должен происходить более медленный и более контролируемый процесс реализации глюкозы в кровь, что достигается путем трансформации многих β -частиц в более крупные α -частицы (стрелка 3 на **рис. 19**). Последующий процесс деградации гликогена затрагивает в первую очередь относительно более мелкие β -частицы и в меньшей степени крупные α -частицы (стрелка 4 на **рис. 19**). Подобный вывод подтверждается тем, что ГФ проявляет большую активность в гликогене с меньшим молекулярным весом (Stetten, Stetten, 1958). Данные по включению меченой глюкозы в гликоген также указывают на то, что скорость метаболизма его более крупных молекул ниже, чем у мелких (Geddes et al., 1977). Полученные результаты позволили сделать вывод о том, что площадь поверхности молекул гликогена может играть важную роль в контроле его деградации.

Интересной особенностью частиц гликогена во время голодания является их небольшая величина и низкий уровень дисперсии по размеру (стрелка 5 на **рис. 19**). Полагают, что это обстоятельство играет важную энергосберегающую роль, поскольку *de novo* синтез молекул гликогена после поступления пищи требовал бы гораздо больших затрат энергии и больше времени, нежели сохранение в клетках небольших «элементарных» молекул гликогена, к которым может быстро присоединяться большое количество новых остатков глюкозы (Sullivan et al., 2014).

Математическое описание молекулы гликогена и ее моделирование, установление приблизительных размеров молекулы, выявление белков, входящих в ее состав, установление порядка присоединения и отсоединения остатков глюкозы в β -частице позволило создать общее представление об ее структуре. Однако в настоящее время почти ничего неизвестно о пространственной структуре молекул гликогена. Неизвестно, является ли структура молекулы однородно повторяющейся по всему ее объему или гетерогенной в различных ее частях. Неизвестно, в каком количественном соотношении находятся белки, входящие в состав β -частицы, и как они взаимодействуют между собой в ходе формирования и деградации гранулы? Неизвестно, может ли происходить отсоединение остатков глюкозы на любом этапе формирования β -частицы, или только после того как она полностью сформирована. Неизвестна динамика присоединения остатков глюкозы к молекулам во время его синтеза, и что происходит со структурой молекул гликогена при нарушениях его метаболизма.

1.7. Фракции гликогена, извлекаемые при обработке тканей трихлоруксусной кислотой и КОН. Про- и макрогликоген

Установление того факта, что молекула гликогена, помимо полисахаридной части, содержит белки, участвующие в синтезе и деградации гликогена, играющие роль каркаса и выполняющие другие функции, привело к важному событию в изучении внутренней структуры гликогена — обнаружению двух его форм — прогликогена (ПГ) и макрогликогена (МГ). Идея существования двух форм гликогена не нова. Сообщения о них относятся еще к началу XX века (Arnold, 1908). Вильштеттер и Родевальд в 1934 году сообщили о присутствии в печени гусей двух форм гликогена, которые различались по растворимости в трихлоруксусной кислоте (ТХУ). Лиогликоген (ЛГ), который в ряде работ называют МГ, хорошо растворяется в ТХУ, в то время как десмогликоген (ДГ) или «остаточный гликоген» не растворяется в ТХУ и экстрагируется лишь при обработке ткани крепкой щелочью (Willstätter, Rohdewald, 1934). Предполагалось, что ДГ, позже названный ПГ, в отличие от ЛГ, находится в связи с белками (Prins, Jeanlos, 1948). Однако затем было найдено, что связанная с белками фракция гликогена — ПГ, является следствием механического осаждения ее вместе с белками и поэтому представляет собой артефакт (Kits Van Heijningen, Kemp, 1955). К схожему заключению пришла Е.Л. Розенфельд, которая показала, что при многократных повторных экстракциях гликогена с помощью ТХУ его можно было выделить из печени практически полностью, не прибегая к использованию щелочи. В этом случае можно было говорить лишь о «легко» и «трудно» экстрагируемом гликогене, поскольку его количество при первой, второй и последующих экстракциях действительно менялось в различных условиях опыта (Розенфельд, Попова, 1979). Оставалось, однако, неясным выявляется ли «легко» и «трудно» экстрагируемый гликоген лишь при использовании методов, неизбежно связанных с разрушением тканей, или эти фракции присутствуют также и в реальных, неразрушенных клетках и тканях.

Первые попытки сопоставить данные биохимического анализа с гисто- и цитохимическими были предприняты Куглером и Вилкинсоном (Kugler, Wilkinson, 1959, 1960, 1961). Параллельное использование биохимического и гистохимического методов при обработке тканей горячей щелочью (КОН) и холодной ТХУ позволило авторам заключить, что PAS (Periodic Acid-Schiff)-реакция выявляет только фракцию гликогена, растворимую в ТХУ, т.е. ЛГ. Следует, однако, отметить, что при PAS-окрашивании тканей Куглер и Вилкинсон использовали очень короткое время окисления препаратов в йодной кислоте — около 5 мин, при котором выявляется лишь часть ЛГ. Позже было установлено, что для выявления всего гликогена в клетках и тканях требуется гораздо более продолжительная обработка препаратов в йодной кислоте (Gahrton, 1964; Vdolach et al., 1969; Кудрявцева и др., 1972).

Исследование зависимости интенсивности PAS-реакции в гепатоцитах крысы от продолжительности окрашивания препаратов в реактиве Шиффа показало, что эта зависимость имеет двухступенчатый характер (рис. 20).

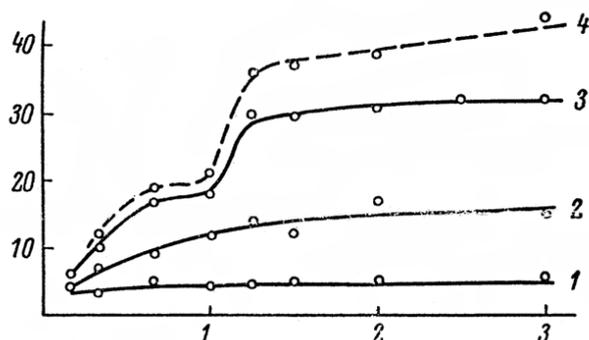


Рис. 20. Зависимость интенсивности флуоресценции клеток печени от времени окрашивания в реактиве типа Шиффа Au-SO₂ (флуоресцентная реакция).

По оси абсцисс — время (в мин); по оси ординат — интенсивность флуоресценции клеток (в отн. ед.).

1, 2, 3 — окисление в периодате соответственно 10, 20 и 90 мин;

4 — то же, что и 3, но учтен эффект внутреннего фильтра (Кудрявцева и др., 1974).

Экстракция гликогена из гепатоцитов, помещенных на предметные стекла, с помощью ТХУ и КОН согласно общепринятым методикам позволила сделать вывод о том, что в гепатоцитах *in situ* также присутствуют две фракции гликогена. Фракция, которая извлекается с помощью ТХУ и относительно быстро (в течение 40 мин) окрашивается реактивом Шиффа, представляет «легкодоступную» фракцию (ЛД-фракция) гликогена. Фракция, для экстракции которой требуется обработка препаратов горячей КОН, а для выявления — окрашивание реактивом Шиффа в течение 90 мин, представляет «труднодоступную» фракцию (ТД-фракция) гликогена (Кудрявцева и др., 1974). Общее содержание гликогена в клетках (суммарный гликоген, СГ) в этом случае представляет сумму обеих его фракций (СГ = ЛД-фракция + ТД-фракция).

Важной вехой в развитии представлений о ПГ и МГ стало обнаружение двух форм гликогена, различающихся не по присутствию или отсутствию в своем составе белка, а по его пропорции относительно полисахарида. Одна из этих форм представляла классический макромолекулярный гликоген, содержащий 0.35 % белка (гликогенина). Другая форма (p400) представляла гликоген, в котором содержание белка (гликогенина) достигало 10 % и, как следствие этого, она осаждалась с помощью ТХУ (Lomako et al., 1991). Поскольку p400 *in vitro* превращалась в макромолекулярный гликоген, ее обозначили, как ПГ. ПГ имеет низкую молекулярную массу ($\sim 4 \times 10^5$ Да) и служит стабильной промежуточной формой гликогена при образовании МГ, масса которого составляет $\sim 10^7$ Да (Lomako et al., 1991). Столь сильная разница молекулярных масс МГ и ПГ позволила предположить, что в метаболизме гликогена участвуют только четыре внешних яруса (9–12-й) его молекулы, представляющих МГ, в то время как восемь внутренних ярусов (1–8-й) ПГ не принимают участия в этом процессе (Melendez et al., 1997). Такое различие в метаболизме внешних и внутренних ярусов молекулы гликогена представляется разумным механизмом, поскольку запас «топлива» в восьми

внутренних ярусах составляет лишь около 6 % от количества глюкозных остатков в полной молекуле гликогена.

Пропорция ПГ к МГ варьирует в зависимости от типа ткани. В скелетных мышцах и сердце она очень высока (Lomako et al., 1993). Сильное превышение ПГ над МГ в мышцах и сердце означает, что если бы ПГ в этих тканях полностью превращался в МГ, то они могли бы запасать гораздо больше гликогена, чем печень. На самом деле этого не наблюдается.

Некоторые авторы предполагали, что синтез ПГ на гликогене осуществляется с помощью особой прогликогенсинтазы, свойства которой отличаются от традиционной ГС (Lomako et al. 1991, 1993; Alonso et al. 1995). Позже было показано, что для объяснения присутствия ПГ в клетках нет необходимости в существовании особой ГС, поскольку при изменении степени фосфорилирования традиционной ГС изменяется степень зависимости фермента от Г-6-Ф и сродство его к УДФ-глюкозе или гликогенину. Таким образом, в настоящее время существование у млекопитающих особой, прогликогениновой формы ГС считается маловероятным, поскольку не найдено генных продуктов, соответствующих различным ГС. Однако у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и круглого червя *Ascaris suum* найдены две изоформы ГС, которые кодируются различными генами (Ghosh et al., 1989; Farkas et al., 1991).

В исследованиях, проведенных на скелетных мышцах и печени, значительное внимание уделялось функциональной роли ПГ и МГ. Теоретически, можно допустить два способа пополнения запасов гликогена в ходе его ресинтеза в клетках: 1) путем увеличения размера уже имеющихся гранул гликогена; 2) путем образования новых гранул гликогена. Первый способ предполагает, что число гранул гликогена в ткани остается постоянным, поскольку происходит лишь рост предсуществующих гранул до более крупных размеров. В этом случае для увеличения содержания гликогена в клетках синтез новых молекул гликогена не требуется. Подобный процесс, в конце концов, должен привести к снижению доли ПГ и увеличению доли МГ. Второй способ увеличения содержания гликогена в ткани связан с формированием новых гранул гликогена. Этот процесс должен сопровождаться увеличением содержания ПГ и медленным увеличением или отсутствием изменений в содержании МГ. Очевидно также, что такой способ увеличения запасов гликогена требует дополнительного синтеза гликогена.

В работах, проведенных на скелетных мышцах человека и крысы, показано, что на ранних стадиях (0–30 мин) фазы восстановления мышечных волокон после физической нагрузки синтез гликогена осуществляется в основном за счет ПГ. Лишь гораздо позднее, спустя несколько часов, когда концентрация гликогена достигнет определенной значительной величины, начинается синтез МГ (Adamo, Graham, 1998; Battram et al., 2004; Wilson, 2009; Granlund et al., 2011). Как и в случае синтеза, скорость деградации гликогена оказалась наиболее высокой в ПГ. Катаболизм

МГ начинал преобладать лишь тогда, когда скорость гликогенолиза снижалась (Graham et al., 2001). Данные, имеющиеся в настоящее время, свидетельствуют о том, что на ранней стадии восстановления мышц после физической нагрузки запасы гликогена увеличиваются путем формирования новых гранул ПГ. Вероятно, этот процесс инициируется уже в ходе нагрузки, чему способствует усиление синтеза гликогениновой мРНК и белка-гликогенина. Лишь когда число гранул гликогена достигнет критического порога, они начинают увеличиваться в размере, и вклад МГ в пополнение запасов гликогена становится заметным. Показано, что при изменении физиологического состояния организма содержание ПГ и МГ в мышечной ткани изменяется различным образом, как по времени, так и по амплитуде. Обе формы гликогена проявляют высокую чувствительность к содержанию углеводов в пище, однако, ПГ и в этом случае оказался гораздо более динамичной фракцией, чем МГ. Мобилизация МГ наблюдалась лишь во время интенсивной физической нагрузки. Однако катаболизм МГ быстро прекращался, если нагрузка возрастала или повторялась (Graham et al., 2001; Shearer, Graham, 2004; Shearer et al., 2005).

В отличие от вышеназванных авторов, Джеймс с соавторами пришли к противоположному выводу. Исследуя динамику ТХУ-растворимого и ТХУ-нерастворимого гликогена в скелетных мышцах крыс при голодании животных и на различных этапах после получения ими пищи, авторы пришли к заключению, что наибольший вклад в изменение содержания общего гликогена вносит его ТХУ-растворимая фракция, т.е. МГ. Содержание ТХУ-нерастворимого гликогена (ПГ) оставалось в этих условиях стабильным или увеличивалось незначительно (James et al. 2008).

В печени доля ТХУ-растворимого гликогена значительно превышает долю ТХУ-нерастворимого гликогена (Lomako et al., 1993). Эксперименты на изолированных гепатоцитах показали, что в печени взрослых крыс и человека фракция ТХУ-растворимого (ЛД-фракция) гликогена составляет 80–95 %, а ТХУ-нерастворимого (ТД-фракция) гликогена — 5–20 % (Кудрявцева, Шалахметова, 1976; Кудрявцева, 1987; Кудрявцева и др., 1988, 1992, 1994, 2000, 2001, 2002; Kudryavtseva et al., 2003). Однако в гепатоцитах новорожденных крысят обе фракции гликогена представлены примерно поровну (Кудрявцева, Шалахметова, 1979). Показано, что в процессе голодания и во время синтеза гликогена, после получения крысами пищи, богатой углеводами, наиболее лабильной фракцией является ЛД-фракция гликогена (Кудрявцева, Шалахметова, 1976; Кудрявцева и др., 1982, 1990). Содержание ТД-фракции изменяется сильнее, чем ЛД-фракции, лишь у новорожденных крысят (Кудрявцева, Шалахметова, 1976) и у голодных взрослых крыс в начальном периоде после получения пищи. Показано, что синтез гликогена в клетках ПЗ и ЦЗ дольки печени в начальном периоде после получения крысами фруктозо-глюкозной смеси происходит исключительно за счет ТД-фракции. Однако в ходе дальнейшего рефиндинга содержание ТД-фракции в гепатоцитах

увеличивается незначительно, и накопление гликогена происходит, главным образом, путем синтеза ЛД-фракции гликогена (Кудрявцева и др., 1982, 1990).

Цитохимический анализ фракционного состава гликогена в гепатоцитах при различных формах повреждения печени у человека и животных показал, что доля ЛД-фракции заметно снижается по мере усиления тяжести заболевания и степени структурных перестроек в ткани; соответственно возрастает доля ТД-фракции гликогена. Показано, что, если в клетках нормальной печени крысы доля ЛД-фракции составляла 81–87 %, то при ЦП, вызванном воздействием CCl_4 , она снижалась до 51–65 %. При этом содержание СГ в гепатоцитах увеличивалось в 2–3 раза, а доля ТД-фракции — до 40 % (Кудрявцева и др., 1994, 1996, 1998; Kudryavtseva et al., 2003). Схожие данные были получены при исследовании СГ и его фракций в печени человека. Определение содержания СГ в гепатоцитах, изолированных из биопсий нормальной печени человека и печени пациентов с различными хроническими заболеваниями этого органа, показало, что уровень СГ в клетках у больных с тяжелыми поражениями печени увеличивался в 3–4 раза по сравнению с нормой (Кудрявцева и др., 1980; 1986). При исследовании фракционного состава гликогена в гепатоцитах больных хроническим вирусным и алкогольным гепатитами различной тяжести было установлено, что доля ЛД-фракции, составлявшая в нормальной печени 84–93 %, снижается при ЦП, в среднем, до 67 %, а у некоторых больных — до 48–50 % (Кудрявцева, 1987; Кудрявцева и др., 1988, 1989, 1992, 2000, 2002). Анализ серийных биопсий печени, полученных у пациентов с травматической болезнью, показал, что доля ЛД-фракции, составлявшая в норме 80–95 % (в среднем, 86.8 ± 3.4 %), снижалась до 66.3 ± 6.4 %. В некоторых случаях, особенно при развитии эндотоксикоза, доля ЛД-фракции в гепатоцитах уменьшалась до 58 % и даже 44 % (Кудрявцева и др., 1988a). Соответственно увеличивалась доля ТД-фракции гликогена.

Несмотря на различную динамику ПГ и МГ в норме и при патологии, структурные взаимоотношения этих фракций гликогена и даже само присутствие их в тканях, как отдельных сущностей, вызывает много споров. В некоторых работах, выполненных с помощью электронной микроскопии, в мышечных волокнах человека были обнаружены крупные и мелкие гранулы гликогена в соотношении $\sim 1:4$ (Sjostrom et al., 1982), что свидетельствовало в пользу существования ПГ и МГ. Однако позже, на гораздо более обширном биопсийном материале, полученном из скелетных мышц человека, было показано, что распределение частиц гликогена по диаметру представляет непрерывный ряд и частота распределения частиц подчиняется нормальному закону Гаусса (Marchand et al., 2002, **рис. 21**). Полученные результаты позволили авторам сделать вывод о том, что ПГ, как стабильная промежуточная форма гликогена на пути к МГ, не существует.

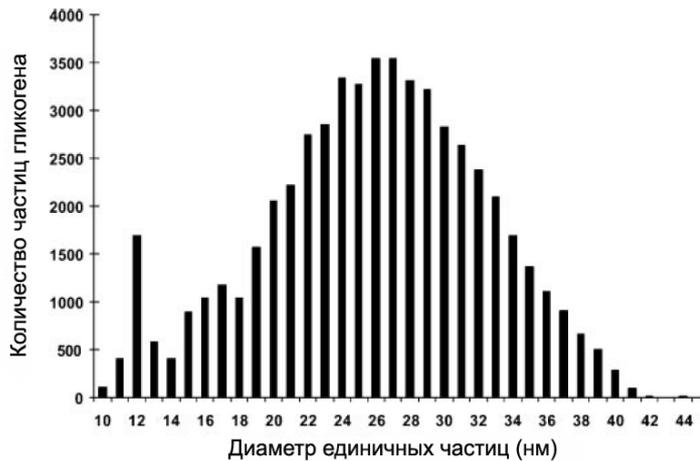


Рис. 21. Гистограмма распределения единичных частиц гликогена по диаметру (нм) в скелетных мышцах человека (Marchand et al., 2002).

Хотя этот вывод кажется достаточно убедительным, он, тем не менее, вызывает возражения. Во-первых, если полагать, что обычный метаболизм гликогена неизбежно связан с взаимопревращением ПГ ↔ МГ (Alonso et al., 1995), а восемь ярусов ПГ служат лишь в качестве платформы, на которой формируются внешние (9–12-й) ярусы МГ (Elsner et al., 2002), то, наоборот, было бы странным ожидать иного распределения, чем непрерывный ряд размеров частиц. Во-вторых, хотя максимальный диаметр частиц соответствует теоретически ожидаемому (42–44 нм), толщина электронно-микроскопического среза (~ 70 нм), лишь не намного превышающая диаметр частиц, за счет срезания более крупных β-частиц могла исказить форму распределения. В-третьих, судя по указанной авторами величине ошибки среднего диаметра частиц 25.2 ± 2.8 нм ($n = 55000$), точность определения размера частиц гликогена с помощью используемого авторами метода была невелика.

Другим знаковым событием в изучении проблемы взаимоотношения ПГ и МГ стала работа Джеймса с соавторами, в которой исследовали молекулярный вес гликогена, экстрагируемого из скелетных мышц с помощью ТХУ или КОН. Авторы показали, что предварительная гомогенизация ткани значительно повышает экстракцию гликогена с помощью ТХУ (с ~ 16 % до 52–64 %), а КОН-гликоген (ПГ) и ТХУ-гликоген (МГ) имеют примерно равный и высокий молекулярный вес. Результаты этой работы позволили заключить, что поскольку многие авторы не применяли в своих работах гомогенизацию тканей перед экстракцией гликогена, это приводило к значительной недооценке его количества и соответственно неверной интерпретации полученных данных. Кроме того, полученные результаты позволили выразить сомнение относительно существования 400 кДа прогликогена, как отдельной фракции, не растворимой в ТХУ (James et al., 2008). К сожалению, авторы не привели никаких доказательств относительно величин молекулярного веса гликогена после его экстракции из ткани с помощью ТХУ или КОН, отметив лишь, что он одинаково высокий. Поскольку для полной экстракции ТХУ-гликогена в работе использовали неоднократную

обработку тканей с помощью 10 %-й ТХУ, общая продолжительность которой составила около 30 мин, нельзя исключить, что подобная процедура могла привести к гидролизу части гликогена (Van der Kleij, 1951; Powell et al., 2015) и занижению величины молекулярного веса гликогена. Поэтому, несмотря на всю важность полученных результатов, отсутствие данных о действительной величине молекулярного веса ТХУ- и КОН-гликогена не позволяет пока сделать окончательный вывод об отсутствии ПГ и МГ, как самостоятельных форм гликогена.

Анализируя литературу о ТХУ-растворимом и ТХУ-нерастворимом гликогене нельзя не отметить, что целый ряд авторов считает, что различная интерпретация данных, касающихся «свободного» и «связанного» гликогена, обусловлена исключительно различиями методик, применяемых для экстракции гликогена из тканей. Использование адекватной методики позволяет практически полностью извлечь гликоген из тканей с помощью холодного раствора ТХУ. Предполагается, что так называемый «связанный» гликоген удерживается в тканях при ТХУ-экстракции не с помощью химических связей с белками, а скорее путем его физического захвата различными структурами и, таким образом, проблемы ТХУ-растворимого и ТХУ-нерастворимого гликогена не существует (Roe et al., 1961; Розенфельд, Попова, 1979). Следует, однако, отметить, что, во-первых, часть гликогена действительно взаимодействует с различными белками-ферментами его метаболизма (ГС, ГФ, ветвящим ферментом и др.), образуя при этом химические связи. Например, константа Михаэлиса (K_m) при взаимодействии ГФ с гликогеном была определена еще в середине прошлого века (Cori et al., 1943; Stetten, Stetten, 1958). Во-вторых, данные о легко извлекаемом и трудно извлекаемом гликогене получены исключительно с помощью грубых биохимических методик, основанных на разрушении тканей, цель применения которых заключалась в получении максимально большого выхода гликогена. Использование, например, гомогенизаторов повышало экстракцию гликогена с помощью растворов ТХУ в несколько раз (Roe et al., 1961; James et al., 2008). Задача выявления фракций гликогена, различающихся по степени устойчивости к действию ТХУ или степени «связанности» с белками, в этих исследованиях не стояла. В-третьих, использование цитохимического метода для выявления гликогена в неразрушенных клетках в сочетании с методами экстракции гликогена с помощью ТХУ и КОН показало, что фракции ТХУ-растворимого и ТХУ-нерастворимого гликогена действительно существуют (Кудрявцева и др., 1974).

Таким образом, данные о пространственной структуре молекул гликогена, имеющиеся в настоящее время, скудны и противоречивы. Подавляющее большинство из них основано либо на теоретических представлениях и математических расчетах, либо на результатах определения размеров α - и β -частиц гликогена, полученных с помощью электронной микроскопии или эксклюзионной хроматографии. Модель структуры молекулы гликогена, основанная на

существовании в тканях двух форм гликогена — прогликогена и макрогликогена, хотя и вызывает много справедливой критики, тем не менее, дает возможность находить более-менее разумное объяснение получаемым данным. Именно поэтому в нашей работе для интерпретации результатов экспериментов мы использовали модель структуры гликогена, предложенную W.J. Whelan и его сотрудниками (Lomako et al., 1991, 1993, 1995; Alonso et al., 1995), в основу которой положена гипотеза о про- и макрогликогене.

Отсутствие или противоречивость экспериментальных данных о пространственной структуре частиц гликогена, в первую очередь, связано с отсутствием надежных и адекватных методов, позволяющих получать такие данные. Одним из кандидатов на роль методов, дающих возможность исследовать пространственную структуру макромолекул, в том числе гликогена, непосредственно в клетках является FRET (Förster Resonance Energy Transfer) метод.

1.8. Основные принципы метода FRET

Фёрстеровский резонансный перенос энергии представляет собой безызлучательный процесс, при котором энергия молекулы донора (Don), находящейся в возбужденном состоянии, переносится на основное состояние молекулы акцептора (Ac) путем диполь-дипольного взаимодействия (**рис. 22**). Ac должен абсорбировать энергию Don в области длин волн флуоресценции последнего. Перенос энергии Don → Ac очень сильно зависит от многих факторов, таких, например, как степень перекрытия спектров испускания и возбуждения молекул Don и Ac и, что особенно важно, от расстояния между ними. FRET обычно происходит на расстояниях, сравнимых с размерами большинства биологических макромолекул, а именно, в пределах от 10 Å до 100 Å (1–10 нм). Вероятность передачи энергии между парой Don/Ac зависит от расстояния между Don и Ac и может быть выражена через фёрстеровское расстояние R_0 .

Теория FRET постулирует, что эффективность этого процесса (E_{FRET}) изменяется в шестой степени расстояния (r) между двумя макромолекулами:

$$E_{\text{FRET}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6}$$

где, R_0 — расстояние, на котором E_{FRET} составляет 50 % (нм). R_0 для любой пары флуоресцирующих молекул может быть рассчитано, исходя из спектральных свойств Don и Ac:

$$R_0 = 9.78 \times 10^3 \times \left(k^2 \times n^{-4} \times Q_D \times J(\lambda)\right)^{\frac{1}{6}}$$

Коэффициент k описывает ориентацию диполей во время Don/Ac-перехода; его величина может изменяться от 0 (при перпендикулярной ориентации) до 4 (при коллинеарной/параллельной ориентации). В настоящее время принято считать, что для большинства биологических моделей k составляет величину $2/3$. Показатель преломления среды (n) для биологических макромолекул в водных растворах составляет 1.4. Q_D — квантовый выход Don в отсутствие Ac, а $J(\lambda)$ — интеграл перекрывания, который представляет степень перекрытия спектра эмиссии Don и спектра абсорбции Ac. Значения $J(\lambda)$ и R_0 увеличиваются при возрастании коэффициента экстинкции Ac и степени перекрывания между спектром эмиссии Don и спектром абсорбции Ac.

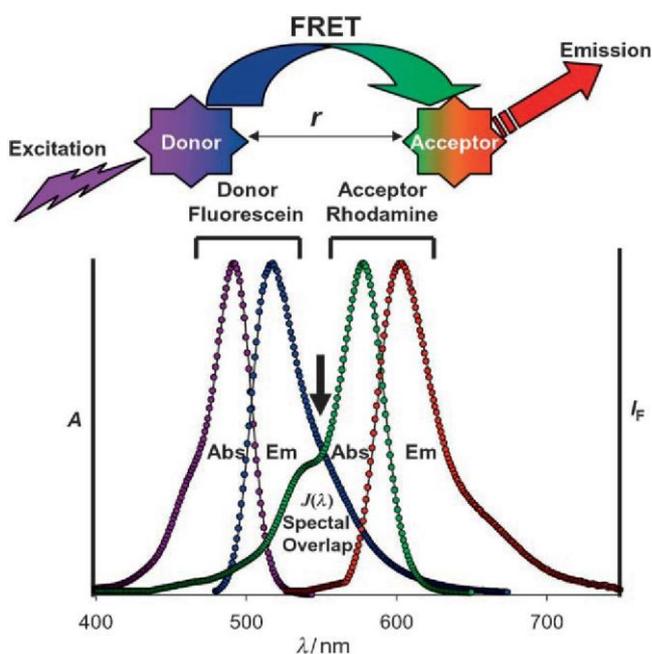


Рис. 22. Схема FRET-процесса. Молекула донора, находящаяся в возбужденном состоянии, передает энергию безызлучательным путем на соседнюю молекулу акцептора, расположенную на расстоянии r от донора. Акцептор реализует эту энергию через флуоресценцию или безызлучательным путем. Показаны спектры абсорбции (Abs) и эмиссии (Em) одной из наиболее часто используемой для FRET пары красителей: флуоресцеина, как донора, и родамина, как акцептора. Флуоресцеин эффективно возбуждается длиной волны 480 нм и флуоресцирует в районе 520 нм.

Перекрывание спектров флуоресценции флуоресцеина и абсорбции родамина, обозначенное как $J(\lambda)$, наблюдается в области 500–600 нм. Ферстеровское расстояние R_0 для этой пары красителей составляет 55 \AA (5.5 нм). Таким образом, при оптимальной конфигурации взаимодействующих молекул ($r < 55 \text{ \AA}$), возбуждение флуоресцеина длиной волны 500 нм может привести к значительной FRET-флуоресценции родамина в области свыше 600 нм. A — нормализованные спектры абсорбции, I_F — нормализованные спектры флуоресценции (Sapsford et al., 2006).

Графически E_{FRET} представлена на **рис. 23**. Поскольку зависимость между E_{FRET} и r выражена, как $(1/r)^6$, кривая резко падает. Для расстояний между флуорофорами, значительно меньших R_0 , E_{FRET} близка к максимальной, в то время как на расстояниях, значительно больших, чем R_0 , величина E_{FRET} близка к нулю.

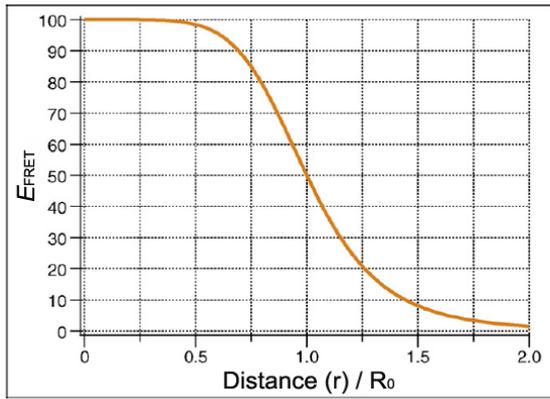


Рис. 23. Зависимость эффективности FRET (E_{FRET}) от расстояния. E_{FRET} изменяется обратно шестой степени расстояния между донором и акцептором. В результате, происходит резкое падение E_{FRET} . Вследствие того, что FRET сильно зависит от расстояния, процесс передачи энергии выявляется только в том случае, когда два флуорофора находятся на расстоянии ближе, чем $1.5 R_0$ (Piston and Kremers, 2007).

FRET очень привлекательный вид анализа взаимодействий между биологическими макромолекулами вследствие его высокой чувствительности к очень небольшим изменениям расстояния между Don и Ac, пропорциональных r^6 . При расстояниях близких к R_0 FRET может применяться в качестве молекулярной линейки для измерения расстояния между макромолекулами и, таким образом, использоваться для целей структурной биологии (Jares-Erijman, Jovin, 2003; Sapsford et al., 2006; Piston, Kremers, 2007). В настоящее время методы, использующие явление FRET, достаточно широко применяются для изучения белок-белковых взаимодействий в живых клетках или растворах, для изучения внутримолекулярных и межмолекулярных конформационных изменений белков, обусловленных изменением расстояния или ориентации между флуорофорами донора и акцептора (Fessenden, 2009; Grecco, Verveer, 2011; Miyawaki, 2011). В качестве донора и акцептора в этом случае используются генетически закодированные белки, способные флуоресцировать в различных областях видимого спектра (от синей до ближней инфракрасной области), или белки, меченные красителями разного цвета. Известны также работы, в которых FRET использовали для изучения структуры ДНК (Stuhmeier et al., 2000; Didenko, 2001). Однако нам не удалось найти работ, в которых FRET использовали бы для исследования структуры полисахаридов.

Таким образом, цель настоящей работы заключалась в определении содержания гликогена и выяснении его структуры в отдельных гепатоцитах нормальной и цирротической печени крысы и человека.

Метод FRET использовали в качестве основного при изучении структуры гликогена.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

2.1.1. Экспериментальные животные

Исследования проведены на 36 белых беспородных крысах-самцах. Крыс содержали на стандартном пищевом рационе. Вес животных в начале эксперимента составлял 130–140 г, а в его конце (через 6 мес) — 250–300 г. В начале эксперимента животные были разделены на две группы — опытную (с циррозом печени, ЦП) и контрольную, в каждой по 18 крыс. Животных опытной группы подвергали ингаляционному воздействию паров четыреххлористого углерода (CCl₄) (7 мл на 100 л объема) в герметичной камере по 20 мин 3 раза в неделю в течение 6 мес для получения экспериментального цирроза печени. Животные контрольной группы не подвергались воздействию CCl₄. Их печень считали нормальной.

Для исследования динамики накопления гликогена в печени животных из опытной группы (через 1 нед после прекращения отравления) и контрольной группы предварительно подвергали голоданию в течение 48 ч (вода *ad libitum*), после чего им перорально вводили 30 % -ный раствор глюкозы из расчета 4 г/кг веса тела. Сразу после прекращения голодания (0-я мин) и затем через 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90 и 120 мин после введения глюкозы животных выводили из эксперимента путем декапитации. Печень извлекали и разрезали на кусочки, которые использовали для проведения гистологических и цитофотометрических исследований.

2.1.2. Клинический материал

Исследования на гепатоцитах человека проведены на материале прижизненных пункционных биопсий печени, которые получали в клинике внутренних болезней № 2 Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. Материал печени забран у 5 пациентов с хроническим гепатитом (ХГ) (двое мужчин и три женщины), средний возраст которых составлял 40.7 ± 6.0 лет, и 7 пациентов с циррозом печени (ЦП) различной этиологии (шесть мужчин и одна женщина), средний возраст которых составлял 44.3 ± 8.3 года. В качестве контроля использован материал пациентов, в составе 7 человек (трое мужчин и четыре женщины), средний возраст которых составлял 44.0 ± 3.6 года. Морфологические и клинические признаки поражения печени у пациентов контрольной группы отсутствовали. Их печень считали нормальной. Биопсии получали натощак в одно и то же время (11–12 ч).

2.2. Методы приготовления препаратов

2.2.1. Приготовление и окрашивание парафиновых срезов

Кусочки печени человека, контрольных и опытных крыс фиксировали в 10 %-ном нейтральном формалине и заливали в парафиновые блоки по стандартной методике (Роскин, 1957), из которых затем с помощью микротомы приготавливали срезы, толщиной 5–7 мкм.

Срезы печени крысы окрашивали гематоксилин-эозином по Майеру, а срезы печени человека — гематоксилин-пикрофуксином по Ван-Гизону (Пирс, 1962). Для выявления соединительной ткани препараты окрашивали пикросириусом (0.01 %-ный раствор сириуса красного F3BA в насыщенном водном растворе пикриновой кислоты) в течение 1 ч. После окраски препараты споласкивали в 30 %-ной уксусной кислоте (2 мин), обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заключали в канадский бальзам. При этой методике коллагеновые волокна окрашиваются в красный цвет, а остальные структуры — в желтый (Juncueira et al., 1979).

Изображения срезов, окрашенных гематоксилин-эозином, гематоксилин-пикрофуксином и пикросириусом получали с помощью микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия) (объективы 10×/0.30, 20×/0.50), оборудованного цифровой камерой Leica DFC420C (Leica Microsystems Inc, Германия).

2.2.2. Приготовление препаратов-мазков изолированных клеток печени

Препараты для цитофотометрии приготавливали на стандартных предметных стеклах в виде мазков изолированных гепатоцитов, которые получали двумя способами:

1) Для приготовления препаратов-мазков из материала пункционных биопсий печени человека биоптаты сначала помещали на 15 мин в смесь, состоящую из 0.067 М К, Na-фосфатного буфера (pH 8.0) и 5 %-ной сахарозы (1:1 v/v). Затем их переносили на 8 мин в 0.067 М К, Na-фосфатный буфер, pH 7.4 (Кудрявцева и др., 1983). По истечении указанного срока из биоптатов приготавливали мазки изолированных гепатоцитов путем осторожного потряхивания кусочков в капле буфера с помощью пинцета. Полученную взвесь клеток разносили по поверхности предметного стекла с помощью кварцевого стекла со шлифованным краем.

2) Для получения препаратов-мазков изолированных гепатоцитов крыс проводили перфузию печени 0.067 М К, Na-фосфат-сахарозным буфером с pH 7.8 в течение 10 мин. Далее вырезали наиболее отмытый от крови (наиболее светлый) участок печени и тонким пинцетом

помещали его на 20 мин в емкость с другой сменой этого же буфера. Затем, кусочки печени размером около 3 мм³ переносили на 5 мин в 0.067 М фосфатный буфер с рН 7.2. После этого приготавливали мазки на предметных стеклах указанным выше способом. Для исследования кинетики окрашивания гепатоцитов реактивами типа Шиффа препараты клеток печени накормленных крыс контрольной группы приготавливали на покровных стеклах по методике, описанной выше. Препараты фиксировали метанолом, высушивали на воздухе и хранили в темном месте.

2.3. Комбинированный цитохимический метод для количественного определения нескольких компонентов в одной и той же клетке

В соответствии с задачами данной работы было необходимо получить количественные данные для одной и той же клетки по нескольким параметрам: сухой массе, содержанию общего гликогена (ОГ), и степени ploидности. Для этой цели использовали комбинированный цитохимический метод, позволяющий для одной и той же клетки количественно определять эти показатели (Кудрявцев и др., 1979). При использовании этого метода сначала выявляют и измеряют один компонент, затем следующий при использовании процедуры, которая не затрагивает еще неизмеренные компоненты клетки, но может влиять на уже измеренные и т.д. Подобный подход позволяет оценить содержание каждого компонента в клетке практически с той же точностью, какая существует при раздельном их определении.

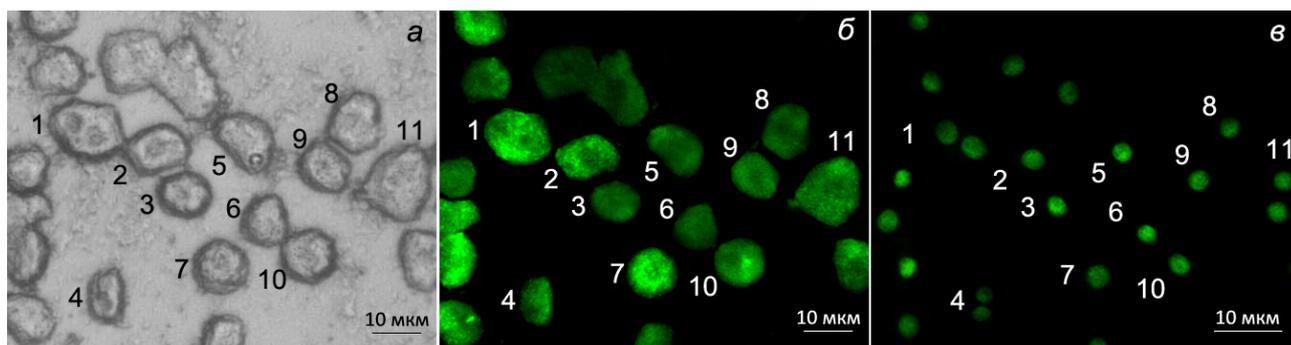


Рис. 24. *а* — изолированные гепатоциты с присвоенными им номерами, фазовый контраст, *б* — те же гепатоциты, окрашенные с помощью флуоресцентной PAS-реакции на гликоген, *в* — те же гепатоциты, ядра которых окрашены с помощью флуоресцентной реакции Фельгена на ДНК. Микроскоп Axioskop (Carl Zeiss, Германия), цифровая камера DFC360FX (Leica Microsystems Inc, Германия). Объектив Plan-NEOFLUAR 20×/0.50.

Применение комбинированного цитохимического метода сопряжено с необходимостью использования нескольких измерительных приборов. Для того, чтобы несколько раз находить местоположение каждой клетки на предметных стеклах, на них с помощью алмазного стеклореза наносили координатную сетку с размером квадратов около 1 мм². Для получения

изображений выбранных участков препарата (около 100) использовали микроскоп Axioskop (Carl Zeiss, Германия) (объектив Plan-NEOFLUAR 20×/0.50), оборудованный цифровой камерой DFC360FX (Leica Microsystems Inc, Германия). На изображениях выбирали целые, отдельно расположенные гепатоциты, каждому из которых, в соответствии с его местоположением на предметном стекле, присваивали определенный номер, как показано на **рис. 24, а**. На каждом препарате, в зависимости от задачи исследования, отмечали от 100 до 500 клеток.

2.3.1. Определение сухой массы гепатоцитов

Сухую массу гепатоцитов (СМГ) крысы и человека измеряли на неокрашенных фиксированных метанолом препаратах-мазках, заключенных в глицерин, по методике, описанной ранее (Бродский, 1966; Бенеке, 1969). Измерения производили с помощью интерференционного микроскопа МБИН-4 (ЛОМО, Ленинград) в монохроматическом свете, используя интерференционный светофильтр $\lambda_{\max} = 550$ нм и объектив 40×/0.65.

СМГ рассчитывали по формуле (Бродский, 1966; Бенеке, 1969):

$$M = \frac{\delta \times S}{100 \times \alpha} \quad (1)$$

где: **M** — сухая масса клетки, пг; **δ** — разность хода лучей, см; **S** — площадь клетки, см², **α** — удельное приращение показателя преломления, см³/г, значение которого для белков в глицерине составляет 0.00095 см³/г (Pellegrino et al., 1963).

При измерении СМГ вначале определяли оптическую разность хода лучей для клетки и среды (**рис. 25**).

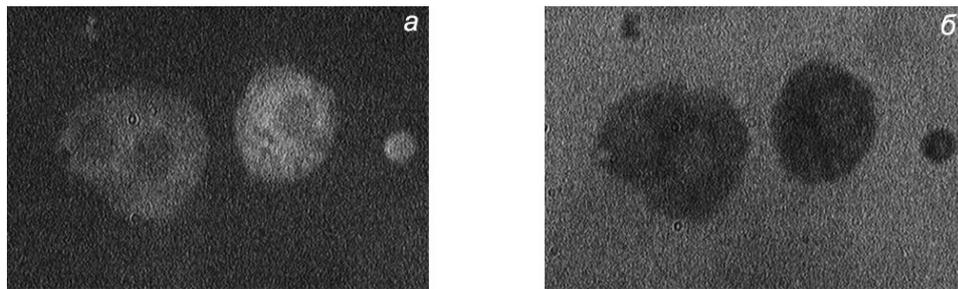


Рис. 25. Гепатоциты. Интерференционный микроскоп: **а** — установка на темное поле; **б** — установка на темный объект. Окраски нет, объектив 40×/0.65.

Оптическую разность хода определяли по формуле:

$$\delta = \frac{\varphi_1 - \varphi_2}{K} \times \lambda \quad (2)$$

где: **δ** — разность хода лучей, см; **φ₁**, **φ₂** — отсчеты по шкале компенсатора Сенармона, градусы; **λ** — длина волны света, 550 нм; **K** = 180°.

Затем с помощью программы ImageJ (НИН, США) измеряли площадь клетки (в $\mu\text{м}^2$). На каждом препарате, в зависимости от задачи, измеряли 100–450 клеток.

После измерений СМГ покровное стекло снимали и удаляли глицерин путем последовательного проведения препарата через спирты возрастающей концентрации.

2.3.2. Выявление и измерение содержания общего гликогена в изолированных гепатоцитах крысы

Содержание гликогена измеряли в тех же клетках, для которых ранее была определена сухая масса. Для определения содержания общего гликогена (ОГ) в гепатоцитах использовали флуоресцентный вариант PAS-реакции (Кудрявцева и др., 1970). Картированные препараты-мазки изолированных гепатоцитов вначале помещали на 1.5 ч в 0.8 %-ный раствор KIO_4 , приготовленный на 0.23 %-ной HNO_3 . В результате окисления из 1,2-гликолиевых групп в остатках глюкозы гликогена образуются альдегидные группы (McManus, 1946). Далее окисленные препараты промывали в проточной воде в течение 15 мин и затем в одной смене дистиллированной воды. Для выявления гликогена в гепатоцитах окрашивание препаратов проводили при комнатной температуре в течение 90 мин в реактиве типа Шиффа аураине- SO_2 (Au-SO_2) (0.3 %-ный раствор аурамина OO (Reanal, Венгрия), 0.2 мл хлористого тионила ($\text{SOCl}_2/100$ мл)). После окрашивания Au-SO_2 препараты проводили через три смены дистиллированной воды и три смены сернистых вод (5 г $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 950 мл воды, 50 мл 1 N HCl) по 3 мин в каждой, для того, чтобы удалить неспецифично связавшийся краситель. Затем препараты в течение 20 мин промывали в проточной воде, споласкивали дистиллированной водой и обезвоживали в спиртах (по две смены 70° , 96° и 100° этанола). После спиртов препараты высушивали на воздухе и хранили в темноте. Перед измерениями препараты заключали в нефлуоресцирующее вазелиновое масло.

Изображения клеток, окрашенных Au-SO_2 (**рис. 24, б**), получали с помощью флуоресцентного микроскопа Axioskop (Carl Zeiss, Германия), снабженного цифровой камерой DFC360FX (Leica Microsystems Inc, Германия). Для возбуждения флуоресценции препаратов, окрашенных Au-SO_2 , и регистрации их флуоресценции использовали набор фильтров Filter Set 10 (Carl Zeiss, Германия). При измерениях применяли объектив Plan-NEOFLUAR $20\times/0.50$. Интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных Au-SO_2 , измеряли с помощью программы ImageJ (НИН, США).

2.3.3. Определение содержания ДНК в ядрах гепатоцитов крысы и человека

После измерения содержания гликогена в клетках покровное стекло снимали и удаляли вазелиновое масло с предметного стекла с помощью ксилола и этанола возрастающей концентрации. Затем окраску клеток на гликоген удаляли путем обработки препаратов в течение 15 мин 0.05 %-ным борогидридом натрия (NaBH_4) *ex tempore*. В результате такой обработки альдегидные группы, образовавшиеся при окислении остатков глюкозы в гликогене с помощью KIO_4 , превращаются в первичные спиртовые и теряют способность окрашиваться Au-SO_2 .

ДНК в ядрах гепатоцитов выявляли на препаратах-мазках с помощью флуоресцентной реакции Фельгена, в которой использовали реактив типа Шиффа — Au-SO_2 (Кудрявцев, Розанов, 1974). Гидролиз препаратов проводили в 6 N HCl при комнатной температуре в течение 8 мин. После гидролиза препараты споласкивали в трех сменах дистиллированной воды и окрашивали в течение 1.5 ч в темноте при температуре 4 °C 0.3 %-ным раствором Au-SO_2 , содержащем 0.2 мл $\text{SOCl}_2/100$ мл. Затем препараты споласкивали в 3 сменах дистиллированной воды, охлажденной до 4 °C, проводили через охлажденные до 4 °C сернистые воды (3 смены по 3 мин в каждой), промывали в проточной воде 20 мин, ополаскивали дистиллированной водой и обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации (70°, 96°, 100°) (по 2 смены этанола каждой концентрации, по 5 мин). После этого препараты высушивали на воздухе и хранили в темноте. Непосредственно перед измерением содержания ДНК в клетках препараты заключали в нефлуоресцирующее вазелиновое масло.

Изображения ядер гепатоцитов, окрашенных Au-SO_2 (рис. 24, в) получали с помощью микроскопа Axioskop (Carl Zeiss, Германия) (объектив Plan-NEOFLUAR 40×/0.75), оборудованного цифровой камерой DFC360FX (Leica Microsystems Inc, Германия). Для возбуждения флуоресценции Au-SO_2 и ее регистрации использовали набор фильтров Filter Set 10 (Carl Zeiss, Германия). Интенсивность флуоресценции ядер гепатоцитов, окрашенных Au-SO_2 , измеряли с помощью программы ImageJ (НИН, США).

Диплоидным (2c) стандартом при определении плоидности гепатоцитов служили лимфоциты периферической крови крысы, окрашенные Au-SO_2 по Фельгену.

Среднюю плоидность гепатоцитов $N(c)$ рассчитывали по формуле (Делоне и др., 1987):

$$N(c) = \sum n_i \times 2^i \quad (3)$$

где: n_i — относительное число гепатоцитов i -того класса плоидности ($i = 1$ — диплоидный класс, $i = 2$ — тетраплоидный и т.д.).

2.4. Разработка метода для исследования структуры гликогена в отдельных клетках

В настоящее время для выявления гликогена в клетках широко используется PAS (Periodic Acid-Schiff)-реакция или, как ее еще называют ШИК (Шифф-йодная кислота)-реакция. С помощью PAS-реакции можно не только специфично выявлять гликоген в различных типах клеток, но и определять его содержание. Реакция включает два основных этапа: окисление препаратов в растворе йодной кислоты и последующее их окрашивание в реактиве Шиффа. Механизм этой реакции заключается в том, что при окислении йодной кислотой или ее солями из 1,2-гликолиевых групп гликогена образуются альдегидные группы. Альдегидные группы затем выявляются с помощью реактива Шиффа, который в своем классическом варианте представляет раствор основного фуксина в сернистой кислоте (Пирс, 1962). Позже вместо основного фуксина в реактиве стали использовать другие красители, которые было предложено называть реактивами типа Шиффа (Kasten, 1959, 1960). При разработке метода исследования структуры гликогена в гепатоцитах в качестве основы мы также использовали PAS-реакцию.

Разработка метода для исследования структуры гликогена в гепатоцитах включала несколько этапов: 1) испытание флуоресцентных красителей, различающихся по химической структуре, на предмет использования их в качестве заменителей основного фуксина в реактиве Шиффа при проведении PAS-реакции; 2) выбор пары красителей, способных не только специфично выявлять гликоген при использовании их в PAS-реакции, но и обладающих соответствующими спектральными характеристиками для применения их в качестве донора (Don) и акцептора (Ac) при проведении FRET анализа гликогена в клетках; 3) исследование зависимости интенсивности окрашивания гликогена в гепатоцитах с помощью выбранных реактивов типа Шиффа разного цвета от времени окрашивания в реактиве и определение оптимальных условий окрашивания препаратов для выявления ПГ и МГ; 4) вычисление фёрстеровского расстояния, R_0 , для пары красителей, которые предполагалось использовать в качестве Don и Ac при проведении исследований внутренней структуры β -частиц гликогена в клетках с помощью метода FRET.

2.4.1. Выбор пары красителей, пригодных для FRET-анализа

Для приготовления реактивов типа Шиффа были использованы следующие флуоресцентные красители: аурамин ОО (Reanal, Венгрия), акрифлавин (Merck, Германия), риванол (ХФК “Акрихин”, Россия), 2,5-бис-[4-аминофенил-(1')]-1,3,4-оксадиазол, ВАО (CIBA, Швейцария), бромистый этидий (Sigma-Aldrich, США), йодистый пропиций (Fluka, Германия) и парарозанилин (Sigma-Aldrich, США) (**Таблица 2**). Использование этих красителей в качестве

реактивов типа Шиффа показало, что все они позволяют специфично выявлять гликоген в гепатоцитах. PAS-реакция со всеми красителями была отрицательной, как после предварительной обработки препаратов α -амилазой, так и в том случае, если препараты перед окрашиванием не подвергались окислению в йодной кислоте.

Таблица 2. Концентрации красителей, линии спектра излучения ртутной лампы HBO-100, использованные для возбуждения флуоресценции красителей, и длина волны в максимуме их флуоресценции.

Краситель	Сокращенное название	Концентрация, %	$\lambda_{\text{возбуждения}}$, нм	$\lambda_{\text{макс. флуоресценции}}$, нм
Аурамин ОО	Au	0.3	405, 436	526
Акрифлавин	Afl	0.01	546	605
2, 5-бис-[4-аминофенил-(1')]-1, 3, 4-оксидазол	BAO	0.01	365	440–450
Бромистый этидий	EtBr	0.0004	546	595–610
Йодистый пропидий	PrJ	0.0003	546	615–625
Риванол	Riv	0.001	405, 436	520
Парарозанилин	pRA	0.01	546	590

При выборе пары красителей для использования в качестве Don и Ac в исследованиях с помощью FRET учитывали не только специфичность связывания красителей с альдегидными группами гликогена, но также и другие их характеристики. Оказалось, что акридиновые красители риванол, и особенно акрифлавин, обладают выраженной метакромазией, т.е. изменяют цвет флуоресценции при изменении концентрации гликогена в клетках. Йодистый пропидий при использовании его в качестве реактива типа Шиффа образует осадок на предметных стеклах в ходе окрашивания, делая необходимым принимать дополнительные меры для удаления неспецифично связавшегося красителя. Использование парарозанилина, из-за значительного поглощения им света возбуждения флуоресценции, связано с появлением так называемого «эффекта внутреннего фильтра», что приводит к необходимости вносить поправки при измерениях интенсивности флуоресценции клеток. Применение BAO ограничено, главным образом, из-за проблем технического плана, которые обусловлены тем, что спектральная область возбуждения этого красителя (365 нм), как правило, недоступна в обычных

люминесцентных микроскопах. Исходя из вышесказанного, в дальнейшей работе мы использовали только два красителя — аурамин ОО и бромистый этидий.

2.4.2. Определение кинетики окрашивания гликогена в гепатоцитах с помощью реактивов типа Шиффа Au-SO₂ и EtBr-SO₂

Одним из подходов для изучения структуры и конформационных изменений молекул гликогена в клетках может быть исследование кинетики его окрашивания с помощью различных цитохимических реакций, специфично выявляющих гликоген. С этой целью препараты, приготовленные на покровных стеклах, после окисления их в 0.8 %-ном растворе КЮ₄ окрашивали различное время либо в реактиве типа Шиффа Au-SO₂ (0.3 %-ный Au-SO₂, 0.2 мл SOCl₂/100 мл), либо в EtBr-SO₂ (0.0004 %-ный раствор EtBr-SO₂, 0.2 мл SOCl₂/100 мл). Окрашивание проводили при комнатной температуре. На каждую временную точку использовали по 2 препарата. После завершения окрашивания, все препараты одновременно вынимали из красителей и обрабатывали по методике, описанной выше (см. раздел 2.3.2).

Изображения клеток, окрашенных Au-SO₂ или EtBr-SO₂, получали с помощью микроскопа Ахиоскоп (Carl Zeiss, Германия), снабженного цифровой камерой DFC360FX (объектив Plan-NEOFLUAR 20×/0.50). Для возбуждения и регистрации флуоресценции Au-SO₂ использовали набор фильтров Filter Set 10 (Carl Zeiss, Германия), а для возбуждения и регистрации флуоресценции EtBr-SO₂ — набор фильтров Filter Set 15 (Carl Zeiss, Германия). При измерениях интенсивности флуоресценции клеток использовали программу ImageJ (НИН, США).

Результаты, представленные на **рис. 26**, свидетельствуют о том, что зависимость интенсивности флуоресценции гепатоцитов от времени их окрашивания при использовании обоих реактивов имеет схожий двухступенчатый характер. В интервале 0–40 мин происходит быстрое связывание как Au-SO₂, так и EtBr-SO₂, а в интервале 40–70 мин связывание обоих красителей резко замедляется (или прекращается). Однако затем наблюдается новая волна интенсивного связывания красителей. После 90 мин кривая зависимости интенсивности флуоресценции клеток от времени окрашивания фактически выходит на плато, свидетельствуя о максимальном связывании красителей с альдегидными группами гликогена в ходе PAS-реакции. Полученные нами данные подтверждают ранее сделанный вывод о том, что в гепатоцитах гликоген состоит из двух фракций: легкодоступной для связывания с красителем (ЛД) и труднодоступной (ТД) (Кудрявцева и др. 1974). ЛД-фракция гликогена полностью выявляется после окрашивания препаратов Au-SO₂ или EtBr-SO₂ в течение 40 мин, в то время как ТД-фракция начинает выявляться после 75 мин, уже после того, как окрасилась ЛД-фракция.

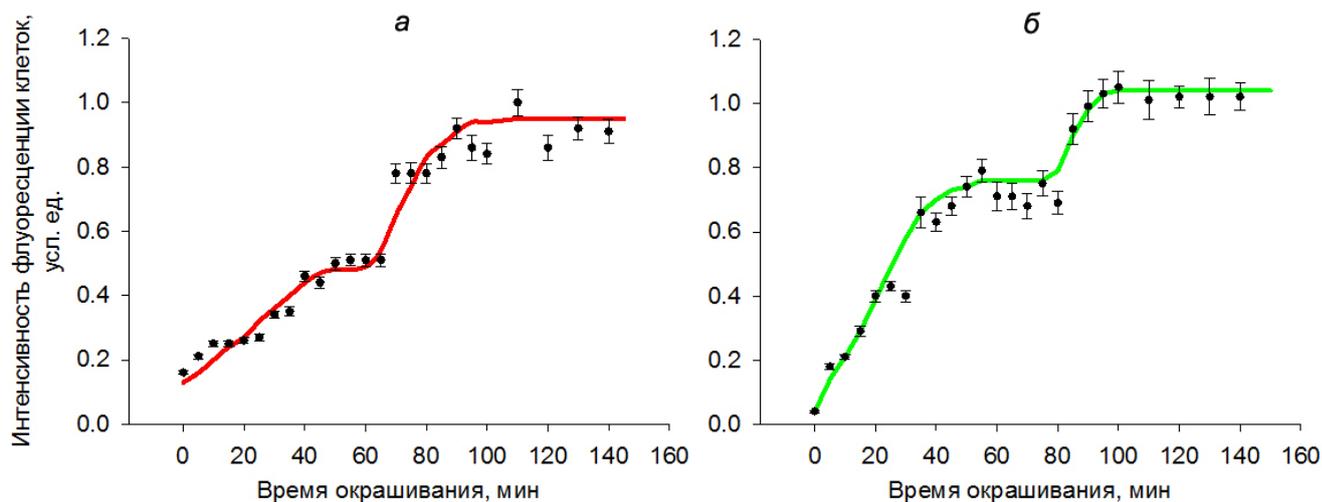


Рис. 26. Зависимость интенсивности флуоресценции гепатоцитов от времени окрашивания их EtBr-SO₂ (а) и Au-SO₂ (б).

Примечание: при исследовании зависимостей, представленных на рис. а и б, использовались клетки, полученные от разных крыс.

2.4.3. Выявление ЛД- и ТД-фракций гликогена в одной и той же клетке и определение их содержания

Как говорилось выше (раздел 2.4.2), окрашивание препаратов в течение 40 мин позволяет выявить ЛД-фракцию гликогена, в то время как для выявления ТД-фракции требуется более длительное окрашивание препаратов в реактиве типа Шиффа. ТД-фракция гликогена начинает окрашиваться лишь после 70 мин обработки препаратов Au-SO₂ или EtBr-SO₂. Выявление ТД-фракции заканчивается примерно к 90–100-й минуте.

Таким образом, окрашивание препаратов Au-SO₂ или EtBr-SO₂ в течение 90 мин позволяет выявить содержание ОГ в клетках, которое представляет сумму содержания ЛД-фракции (40 мин окрашивания) и содержания ТД-фракции (окрашивание в течение ~ 40–90 мин.).

Для того, чтобы выявить обе фракции гликогена (ЛД и ТД) в одной и той же клетке, препараты после окисления в КЮ₄ сначала окрашивали в течение 40 мин в реактиве типа Шиффа EtBr-SO₂ (0.00004 %-ный раствор EtBr, 0.2 мл SOCl₂/100 мл) и затем, после споласкивания в одной смене дистиллированной воды и промывки в сернистых водах (см. раздел 2.3.2.), в течение следующих 50 мин окрашивали в Au-SO₂ (0.3 %-ный раствор Au, 0.2 мл SOCl₂/100 мл). Окрашивание препаратов EtBr-SO₂ в течение 40 мин позволяло выявить ЛД-фракцию гликогена («красная» флуоресценция, рис. 27, а), а последующее окрашивание препаратов Au-SO₂ в течение 40–90 мин выявляло ТД-фракцию гликогена («зеленая» флуоресценция, рис. 27, б).

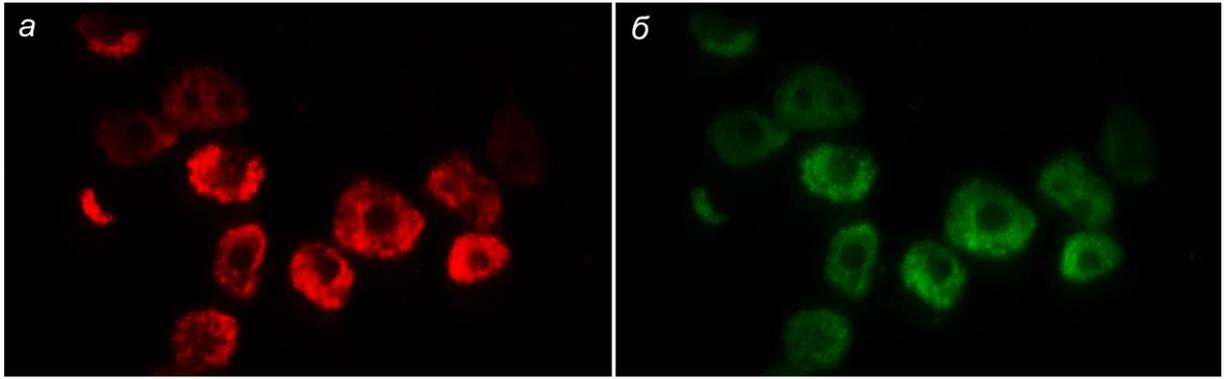


Рис. 27. Гепатоциты, окрашенные EtBr-SO₂ — макрогликоген (*а*) и Au-SO₂ — прогликоген (*б*). Микроскоп Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия), цифровая камера DFC420C (Leica Microsystems Inc, Германия). Объектив Plan-NEOFLUAR 20×/0.50.

Ранее (Кудрявцева и др., 1974) содержание фракций гликогена в гепатоцитах выявляли с помощью только одного реактива типа Шиффа (Au-SO₂). В этом случае содержание ЛД- и ТД-фракции определяли на разных препаратах: на одних препаратах измеряли содержание ЛД-фракции (окрашивание в течение 40 мин), а на других — содержание ОГ гликогена (окрашивание в течение 90 мин). Содержание ТД-фракции получали путем вычитания содержания ЛД-фракции из содержания ОГ (ТД = ОГ – ЛД). Чтобы показать надежность предлагаемого нами метода определения содержания фракций гликогена в одной и той же клетке, в котором используются реактивы типа Шиффа разного цвета (**рис. 28 — 1, 3, 5**), с методом определения фракций на разных препаратах (**рис. 28 — 2, 4, 6**), мы сравнили результаты обоих методов. Оказалось, что полученные результаты хорошо совпадают. При использовании нашего метода доля ЛД- и ТД-фракций составила 91.7 % и 8.3 %, а при использовании метода определения фракций на разных препаратах — 93.0 % и 7.0 %.

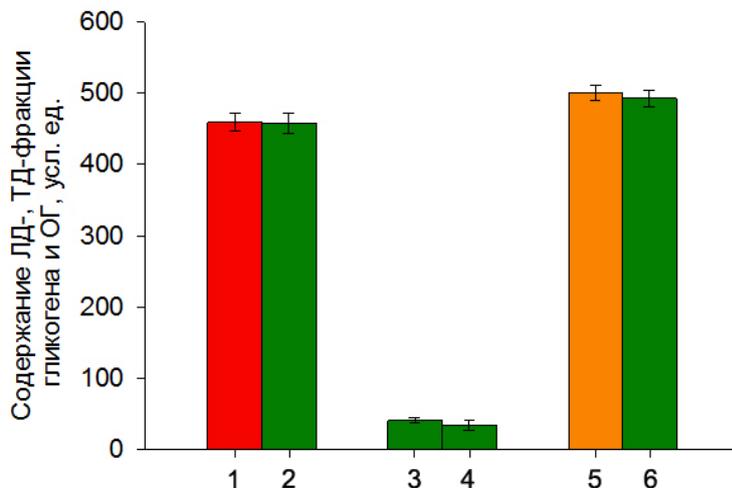


Рис. 28. Содержание легкодоступной (ЛД), труднодоступной (ТД) фракций гликогена и общего гликогена (ОГ) в гепатоцитах при использовании разных методов.

1 — содержание ЛД-фракции (40 мин EtBr);

3 — содержание ТД-фракции (50 мин Au);

5 — содержание ОГ (ЛД + ТД).

2 — содержание ЛД-фракции (40 мин Au);

4 — содержание ТД-фракции (ОГ – ЛД);

6 — содержание ОГ (90 мин Au).

2.4.4. Анализ стабильности альдегидных групп, образовавшихся в остатках глюкозы гликогена при обработке препаратов йодной кислотой

Препараты после окрашивания ЛД-фракции гликогена EtBr-SO_2 , перед помещением в Au-SO_2 для последующего выявления ТД-фракции, отмывали в дистиллированной воде, сернистых водах и проточной воде для того, чтобы удалить несвязавшийся краситель. Общая продолжительность этих обработок составляла не менее 30 мин и могла повлиять на реакционную способность оставшихся альдегидных групп ТД-фракции, которые должны быть окрашены Au-SO_2 . Для оценки насколько долго альдегидные группы сохраняют свою реакционную способность после воздействия на них сернистыми водами, препараты после окисления KIO_4 в течение от 0 до 180 мин выдерживали при комнатной температуре в сернистой воде. После этого препараты одновременно помещали в реактив типа Шиффа Au-SO_2 , окрашивали при комнатной температуре в течение 90 мин и далее обрабатывали способом, описанным в разделе 2.3.2.

Результаты этого опыта, представленные на **рис. 29**, свидетельствуют о том, что, по крайней мере, в течение 3 ч нахождения препаратов в водном растворе SO_2 потери альдегидных групп не происходило (**рис. 29**).

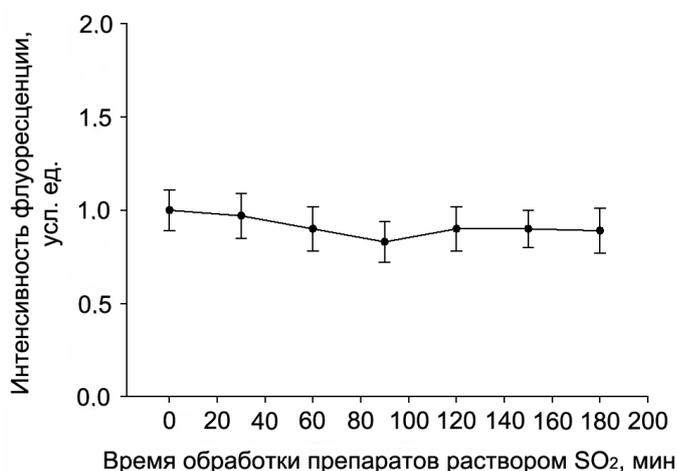


Рис. 29. Влияние различного времени выдерживания препаратов в растворе SO_2 на стабильность альдегидных групп гликогена в гепатоцитах. Вертикальные отрезки означают ошибку среднего.

2.4.5. Экстрагирование фракций гликогена из гепатоцитов с помощью трихлоруксусной кислоты и КОН

Экстракция гликогена с помощью ТХУ и КОН показала, что фракция гликогена, быстро окрашивающаяся в течение 40 мин EtBr-SO_2 или Au-SO_2 , извлекается при обработке клеток холодной трихлоруксусной кислотой (ТХУ) (**рис. 30 — 3**), в то время, как для экстракции

медленно окрашивающейся в течение ~ 40–90 мин фракции Au-SO₂, требуется применение горячей КОН (рис. 30 — 6).

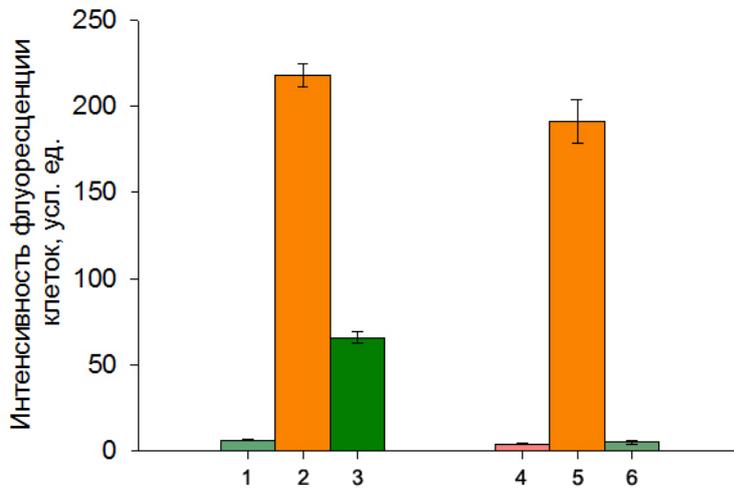


Рис. 30. Влияние экстракций гликогена в КОН и ТХУ на интенсивность флуоресценции клеток.

1 — собственная флуоресценция клеток (зеленая, $\lambda_{\text{max}} = 526$ нм);

2 — интенсивность флуоресценции клеток при 90-минутном окислении КЮ₄ и окрашивании (40 мин EtBr-SO₂ + 50 мин Au-SO₂);

3 — предварительная обработка ТХУ + окрашивание;

4 — собственная флуоресценция клеток (красная, $\lambda_{\text{max}} = 620$ нм);

5 = 2;

6 — предварительная экстракция КОН + окрашивание.

Если принять распространенную в настоящее время гипотезу о структуре молекулы гликогена (Lomako et al., 1991, 1993; Alonso et al., 1995; Melendez et al., 1997), которая заключается в том, что ее внутренние ярусы (1–8-й) представляют ПГ, который можно извлечь из клеток только с помощью горячей щелочи, а внешние ярусы (9–12-й) представляют МГ, экстрагирующийся с помощью ТХУ, то, используя наш метод в каждой клетке можно рассчитать степень заполнения внешних ярусов молекул гликогена.

2.5. Оценка степени заполнения внешних ярусов в молекуле гликогена

Степень заполнения внешних ярусов молекулы гликогена остатками глюкозы рассчитывали по формуле:

$$\mathbf{F} = \mathbf{1} \times \mathbf{t}_9 + \mathbf{2} \times \mathbf{t}_{10} + \mathbf{4} \times \mathbf{t}_{11} + \mathbf{8} \times \mathbf{t}_{12} \quad (4)$$

где: \mathbf{F} — степень заполнения ярусов, %. \mathbf{t}_9 , \mathbf{t}_{10} , \mathbf{t}_{11} и \mathbf{t}_{12} — 9, 10, 11 и 12-й ярусы молекулы гликогена; $\mathbf{1t}_9$ — при величине отношения МГ/ПГ ≤ 1 ; $\mathbf{2t}_{10}$ — при величине отношения МГ/ПГ ≤ 2 ; $\mathbf{4t}_{11}$ — при величине отношения МГ/ПГ ≤ 4 ; $\mathbf{8t}_{12}$ — при величине отношения МГ/ПГ ≤ 8 . Если степень заполнения ярусов неполная, то она превращается по мере заполнения ярусов в $\mathbf{F} = \mathbf{1t}_9$, $\mathbf{F} = \mathbf{1t}_9 + \mathbf{2t}_{10}$ и т. д.

2.6. Выбор оптимальных условий исследования структуры β -частицы гликогена с помощью метода FRET

2.6.1. Влияние порядка окрашивания клеток реактивами типа Шиффа на уровень FRET-сигнала

Для выявления оптимальных условий получения FRET-сигнала использовали два варианта окрашивания препаратов реактивами типа Шиффа:

I вариант: препараты сначала в течение 40 мин окрашивали Au-SO₂, а затем в течение 50 мин EtBr-SO₂;

II вариант: препараты сначала в течение 40 мин окрашивали EtBr-SO₂, а затем в течение 50 мин Au-SO₂.

Эффективность FRET (E_{FRET}) при использовании 1-го варианта окрашивания Au-SO₂ → EtBr-SO₂ составила $2.5 \pm 0.5 \%$, а при использовании обратного окрашивания EtBr-SO₂ → Au-SO₂ — $12.9 \pm 1.1 \%$ ($p < 0.001$). В результате был выбран 2-й вариант окрашивания препаратов.

2.6.2. Исследование структуры молекул гликогена с помощью конфокальной микроскопии с применением метода FRET (AB)

Регистрацию E_{FRET} в нескольких участках гепатоцита (обычно 3–4 участка) (**рис. 31**) производили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems Inc, Германия), используя программу FRET AB (фотообесцвечивание акцептора) (Zal, Gascoigne, 2004; Piston, Kremers, 2007). В качестве донора (Don) использовали Au, а акцептора (Ac) — EtBr. В процессе фотообесцвечивания интенсивность люминесценции Ac снижалась ~ на 50 %.

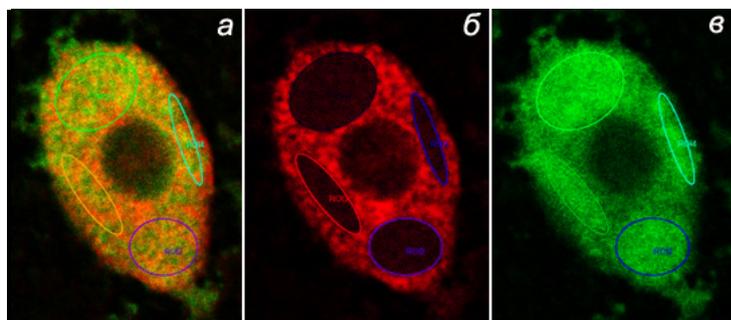


Рис. 31. *а* — гепатоцит с отмеченными областями; *б* — гепатоцит после фотообесцвечивания акцептора в выделенных областях; *в* — повышение флуоресценции донора (Don) после выжигания акцептора (Ac). Лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Leica TCS SP5 (Leica Microsystems Inc, Германия). Объектив HCX PL APO 40×/1.25 Oil.

При определении E_{FRET} использовали два лазера — 405 нм (возбуждение Don) и 514 нм (фотообесцвечивание Ac). Мощность лазера 514 нм составляла 30 % от максимальной. При

измерениях применяли объектив HCX PL APO 40×/1.25 Oil. В качестве иммерсии использовали Immersol 518F, в качестве среды заключения — нефлуоресцирующее вазелиновое масло. Измерения E_{FRET} проводили в тех же гепатоцитах, в которых было измерено содержание МГ и ПГ. На каждом препарате измеряли не менее 25 клеток.

2.6.3. Определение расстояния между остатками глюкозы в β -частицах гликогена

Расстояние между Don (Au) и Ac (EtBr) в молекулах гликогена рассчитывали по формуле:

$$r = R_0 \times \sqrt[6]{\frac{1-E_{\text{FRET}}}{E_{\text{FRET}}}} \quad (5)$$

где: E_{FRET} — значение эффективности FRET; R_0 — критическое расстояние, на котором $E_{\text{FRET}} = 0.5$.

2.6.4. Расчет R_0 для пары Au-EtBr

E_{FRET} , как известно, зависит от физических свойств Don и Ac, а именно, степени перекрытия их спектров возбуждения и флуоресценции, их поляризации, квантового выхода донора и т. д., а главное — расстояния между ними (Piston, Kremers, 2007; Fessenden, 2009):

$$E_{\text{FRET}} = \frac{1}{\left(1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6\right)}$$

где: E_{FRET} — эффективность FRET; r — расстояние между Don и Ac; R_0 — критическое расстояние, на котором $E_{\text{FRET}} = 0.5$.

На **рис. 32** приведены спектры поглощения и испускания клеток, окрашенных EtBr-SO₂ или Au-SO₂ в ходе PAS-реакции. Спектры испускания были получены с помощью микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems Inc, Германия). Спектры поглощения Au и EtBr приведены по литературным данным (Gadella, 1999). Важно отметить, что спектр испускания гепатоцитов, окрашенных Au-SO₂ ($\lambda_{\text{max}} \approx 526$ нм) и спектр поглощения гепатоцитов, окрашенных EtBr-SO₂ ($\lambda_{\text{max}} \approx 540$ нм), перекрываются между собой.

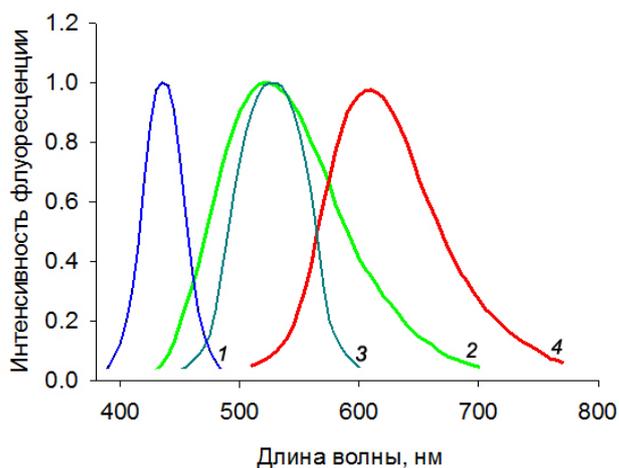


Рис. 32. Спектры поглощения Au (1), EtBr (3) и спектры испускания Au (2), EtBr (4)

Наши расчеты с использованием программы PhotochemCAD (www.photochemcad.com) показали, что для пары Au–EtBr, используемой в данной работе, значение R_0 составляет 3.2 нм. В расчетах использовали значения квантового выхода Au 0.3 (Viera Ferreira et al., 2004) и коэффициента экстинкции EtBr $5680 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Lee et al, 2001). Поскольку радиус 12-ярусной β -частицы гликогена составляет около 21 нм (Rybicka, 1996; Melendez et al., 1999), можно предположить, что в фёрстеровском взаимодействии принимают участие молекулы Don (Au), связанные с остатками глюкозы 7-го и 8-го внутренних ярусов β -частицы, и молекулы Ac (EtBr), находящиеся на 9-м и 10-м внешних ярусах молекулы гликогена (**рис. 33**).

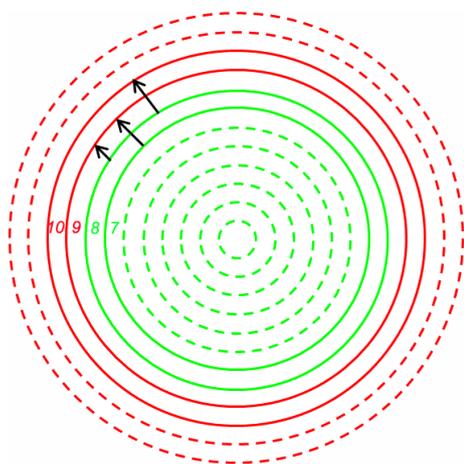


Рис. 33. Схематическое изображение молекулы гликогена. Цифрами отмечены ярусы, между которыми возможен перенос энергии. Расстояние между каждым из ярусов в β -частице гликогена с диаметром ~ 42 нм составляет ~ 1.9 нм (Goldsmith et al., 1982; DiNuzzo, 2013).

2.7. Статистическая обработка полученных данных

Статистическую обработку полученных результатов проводили на персональном компьютере, используя пакет программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США) и SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc, США). Данные на диаграммах и графиках представляли в виде средней величины и ее ошибки ($X \pm Sx$). Достоверность различий между величинами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Для оценки зависимости между параметрами проводили корреляционный анализ с определением коэффициентов корреляции (r). Для оценки достоверности результатов использовали таблицу критических значений корреляции Пирсона.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Предваряя изложение экспериментального материала, представленного в этой главе, нужно отметить, что полученные результаты разделены на две части. В первой части (разделы с 3.1 по 3.8) дана характеристика структуры ткани печени в норме и при патологии, на фоне которой разворачиваются процессы метаболизма гликогена и изменения структуры его молекул, дана общая характеристика гликогенеза в нормальной и цирротической печени, а также приведены данные о роли клеточных факторов в регуляции этого процесса. Во второй части (разделы с 3.9 по 3.16) представлены данные о динамике структуры гликогена в ходе гликогенеза гепатоцитов нормальной и патологически измененной печени.

3.1. Микроскопическая структура печени крысы и человека в норме и при хроническом гепатите

3.1.1. Микроскопическая структура печени крысы в норме и при циррозе, вызванном воздействием CCl_4 (Bezborodkina, Chestnova et al., 2013; Bezborodkina, Okovity, Chestnova et al., 2013)

Хронический гепатит на стадии цирроза, как известно, характеризуется значительной перестройкой структуры печени. Развитие цирроза печени (ЦП) ведет к потере дольковой организации органа, изменению сосудистого русла и увеличению отношения непаренхимных клеток к паренхимным вследствие усиленной пролиферации первых и гибели последних.

Гистологический анализ срезов печени крыс показал, что у контрольных животных структура паренхимы типична для нормального органа. Она характеризуется радиально расположенными трабекулами гепатоцитов вокруг центральных сосудов, небольшим количеством соединительной ткани и четко выраженными границами портальных сосудов и желчных протоков (**рис. 34, а, б**).

На срезах печени крыс, подвергавшихся в течение 6 мес отравлению CCl_4 , выявлены диффузные лейкоцитарные инфильтраты, свидетельствующие об активизации воспалительных процессов (**рис. 34, в**). Кроме воспалительных процессов в ткани печени крыс опытной группы, наблюдаются признаки фибротизации органа. Паренхима органа прорастает соединительнотканью, нарушающими дольковую структуру органа. При окраске пикросирусом выявлены соединительнотканевые волокна по ходу синусоидов (**рис. 34, г**).

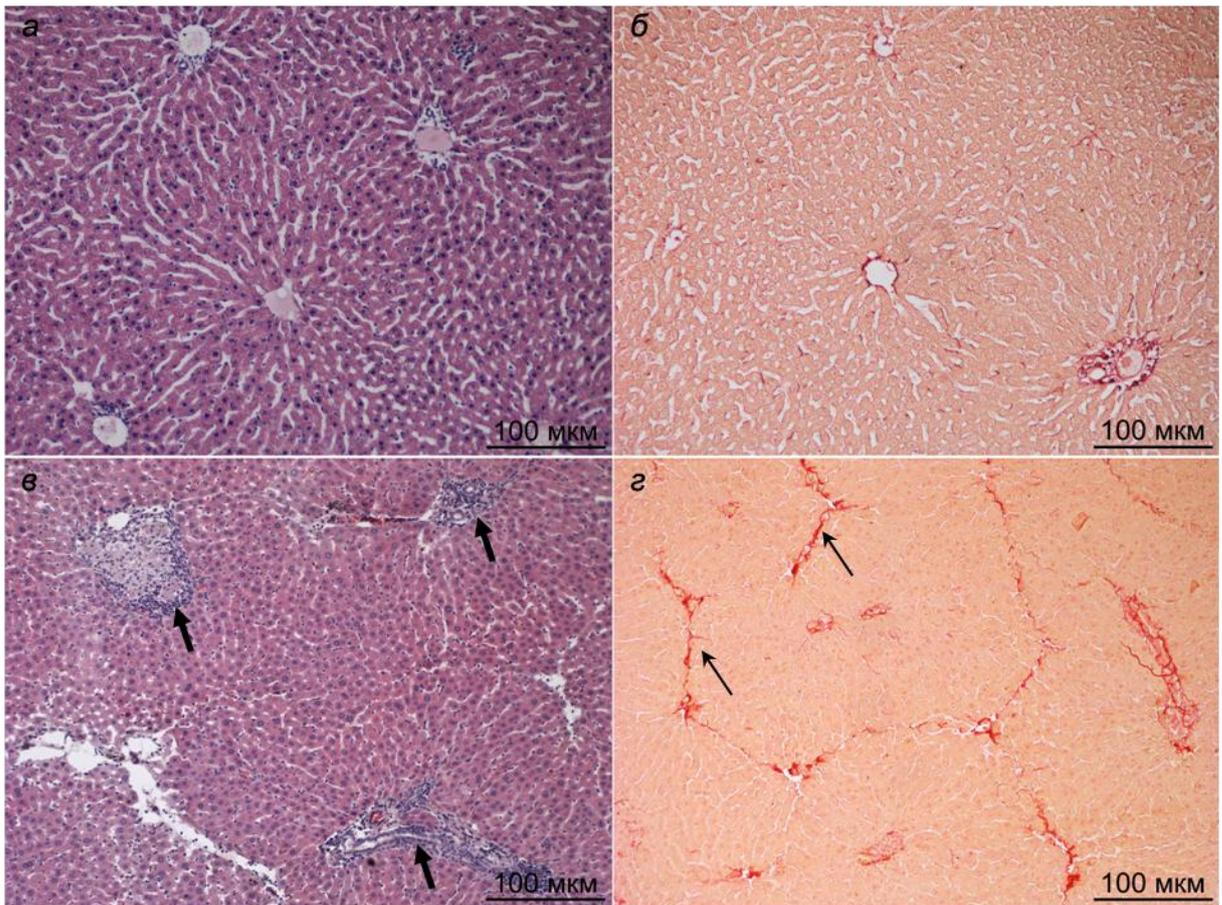


Рис. 34. Срезы печени крыс: *а, б* — норма; *в, з* — цирроз. *а, в* — окраска гематоксилин-эозином; *б, з* — пикосириусом. Микроскоп Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия), цифровая камера Leica DFC420C (Leica Microsystems Inc, Германия). Объектив Plan-NEOFLUAR 20×/0.50.

Примечание: жирными стрелками отмечены очаги воспаления (*в*), тонкими — соединительно-тканые тяжи по ходу синусоидов (*з*).

3.1.2. Микроскопическая структура печени человека в норме и при циррозе

Исследования срезов печени человека в норме и при ЦП показало, что в норме структура паренхимы печени человека, как и у крысы, характеризуется радикально расположенными трабекулами гепатоцитов вокруг центральных вен и четко выраженными портальными сосудами и желчными протоками (**рис. 35, а**). При развитии ЦП наблюдается значительное нарушение дольковой структуры органа (**рис. 35, б**), в паренхиме печени появляются очаги некроза, происходит массовая гибель гепатоцитов и замещение паренхимы печени соединительной тканью, которое приводит в результате к образованию ложных долек (ЛД) (**рис. 35, в**).

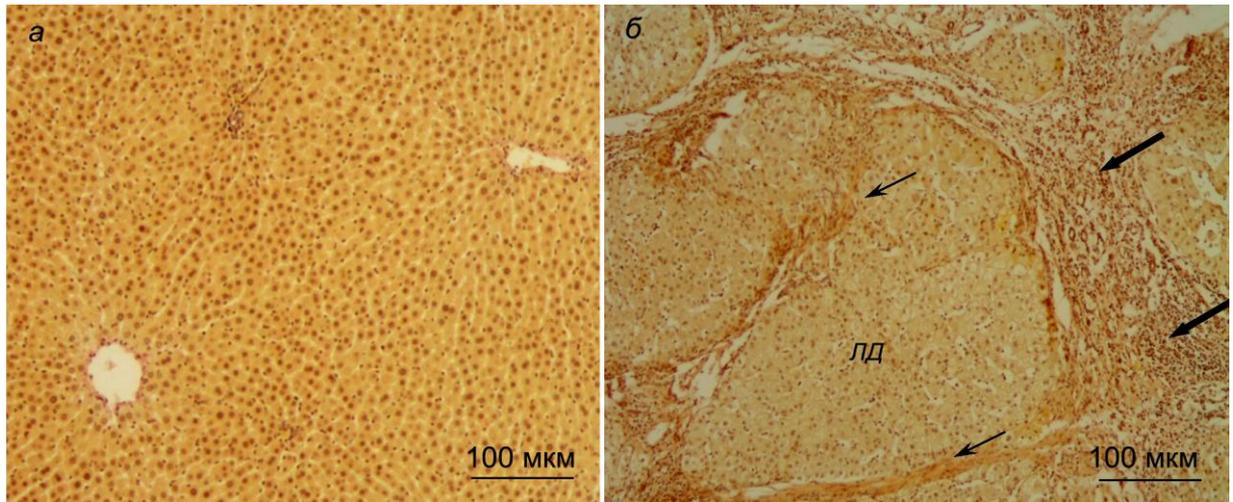


Рис. 35. Срезы печени человека: *а* — норма, *б* — цирроз печени. Окраска гематоксилин-пикрофуксином. Микроскоп Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия), цифровая камера Leica DFC420C (Leica Microsystems Inc, Германия). Объектив Plan-NEOFLUAR 20×/0.50.

Примечания: 1) *лД* — ложная долька печени; 2) жирными стрелками отмечены очаги некроза, тонкими — прослойки соединительной ткани (*б*).

3.2. Полиплоидия и гипертрофия гепатоцитов крысы и человека в норме и при циррозе печени (Bezborodkina, Chestnova et al., 2016)

Гепатоцеллюлярная недостаточность стимулирует регенерацию патологически измененного органа, важную роль в которой, помимо пролиферации гепатоцитов, играет их полиплоидизация и гипертрофия. ДНК-синтетическая активность гепатоцитов в определенной мере компенсирует их потерю в результате гибели, но также приводит к повышению ploидности клеток. Исследование распределения гепатоцитов по классам ploидности в нормальной и цирротически измененной печени крысы показало, что состав клеточной популяции паренхимы при ЦП подвергается значительному изменению.

Таблица 3. Распределение популяции гепатоцитов нормальной и цирротически измененной печени крысы по классам ploидности, $X \pm Sx$.

Доля гепатоцитов крыс разных классов ploидности, %						Средняя ploидность гепатоцитов
2c	2c×2	4c	4c×2	8c	8c×2	
Нормальная печень						
0.86 ± 0.26	4.62 ± 0.72	75.61 ± 3.14	14.38 ± 2.9	4.53 ± 0.79	—	4.75 ± 0.18
Цирротически измененная печень						
2.32 ± 1.01	3.53 ± 1.45	68.51 ± 3.95	14.22 ± 2.94	10.37 ± 2.82	1.05 ± 0.62	5.06 ± 0.10

Данные, представленные в **таблице 3**, свидетельствуют о том, что средняя ploидность гепатоцитов, которую рассчитали по формуле (3) (см. раздел 2.3.3 в главе «Материалы и методы исследования»), при ЦП составила $5.06c$ — на 6.1 % больше, чем в нормальной печени ($p < 0.05$). Важно отметить, что в клеточной популяции цирротически измененной печени крысы происходит не только увеличение в 2.2 раза ($p < 0.05$) доли высокоploидных $8c$ -клеток, но и снижение числа $2c \times 2$ -гепатоцитов. Кроме этого, в клеточной популяции паренхимы печени с циррозом появляются двуядерные гепатоциты с ploидностью ядер $8c$, которые отсутствовали в нормальной печени (**Таблица 3**). Ploидность отдельных одноядерных гепатоцитов достигала уровня $16c$ (не показано). При этом, несмотря на значительные изменения клеточного состава паренхимы цирротически измененной печени, преобладающим классом ploидности гепатоцитов в ней, как и в нормальной печени, были одноядерные тетраploидные ($4c$) гепатоциты (**Таблица 3**).

В отличие от крысы, модальный класс клеток в печени человека представлен одноядерными диплоидными ($2c$) гепатоцитами. Средняя ploидность гепатоцитов нормальной печени человека составляла $2.56 \pm 0.17c$, у больных хроническим гепатитом (ХГ) на стадии до ЦП — $2.50 \pm 0.11c$, а на стадии ЦП — $2.21 \pm 0.05c$. В патологически измененной печени, как и в нормальной, преобладали $2c$ -клетки, причем при ЦП доля этих клеток увеличилась (**Таблица 4**).

Таблица 4. Распределение гепатоцитов человека по классам ploидности в нормальной печени, при хроническом гепатите (ХГ) и циррозе печени (ЦП), $X \pm Sx$.

	Доля гепатоцитов человека разных классов ploидности, %					Средняя ploидность клеток, c
	$2c$	$2c \times 2$	$4c$	$4c \times 2$	$8c$	
Норма (n=7)	75.19 ± 7.23	16.22 ± 5.81	7.07 ± 1.89	1.07 ± 0.58	0.45 ± 0.17	2.56 ± 0.17
ХГ (n=5)	76.90 ± 4.83	15.46 ± 2.96	6.82 ± 1.65	—	0.82 ± 0.36	2.50 ± 0.11
ЦП (n=7)	89.57 ± 2.28	4.70 ± 1.47	5.73 ± 1.38	—	—	2.21 ± 0.05

Уровень гипертрофии клеток обычно оценивают по их линейным размерам, площади или объему. В представленной работе размер гепатоцитов определяли по их сухой массе (в пг), которую рассчитывали по формулам (1) и (2) (см. раздел 2.3.1 в главе «Материалы и методы исследования»), поскольку на этот параметр практически не влияют различные факторы, использующиеся в процессе приготовления препаратов (состав буферных смесей, тип фиксатора и т.д.).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что сухая масса гепатоцита (СМГ) в нормальной печени крысы составляет, в среднем, 685 ± 2 пг, но при ЦП она увеличивается на 39.9 % и достигает 958 ± 5 пг ($p < 0.001$). Результаты определения СМГ показали, что в нормальной печени человека она составила 585 ± 8 пг, при ХГ СМГ снижалась до 532 ± 6 пг ($p < 0.001$), а при ЦП СМГ увеличивалась на 6.3 % по сравнению с нормой ($p < 0.05$) и составила 624.5 ± 10.0 пг.

3.3. Общая характеристика гликогенеза в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крысы и человека

3.3.1. Динамика накопления гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени после введения глюкозы голодным крысам (Bezborodkina, Okovity, Chestnova et al., 2013)

Голодание даже в течение нескольких суток приводит к заметному уменьшению массы печени животных. Данные, представленные в **таблице 5**, свидетельствуют о том, что вес печени при голодании быстро снижается. 48-часовое голодание приводит к уменьшению веса печени примерно на четверть, а после голодания в течение 96 ч вес печени, по нашим данным, составлял лишь 2/3 от исходного веса этого органа.

Таблица 5. Изменение веса тела, веса печени и относительного веса печени крыс в течение голодания, $X \pm Sx$.

Время голодания, ч	Вес тела, г	Вес печени, г	Относительный вес печени, %
0	375 ± 9	10.64 ± 0.16	2.84 ± 0.08
24	328 ± 6^b	8.74 ± 0.13^b	2.67 ± 0.06
48	297 ± 4^{bd}	7.69 ± 0.12^{bd}	2.59 ± 0.05^a
72	287 ± 6^b	7.19 ± 0.14^{bc}	2.51 ± 0.07^a
96	282 ± 7^b	7.00 ± 0.18^b	2.49 ± 0.09^a

Примечания: 1) отличия от значения до начала голодания (0 ч) при уровне значимости: а — $p < 0.01$; b — $p < 0.001$; 2) отличия от предыдущего значения при уровне значимости: с — $p < 0.01$; d — $p < 0.001$.

Исследование содержания общего гликогена (ОГ) в клетках печени через различные интервалы времени после введения голодным крысам глюкозы показало, что в нормальной печени поступление глюкозы в клетки стимулирует быстрое накопление в них ОГ. Содержание

ОГ в гепатоцитах уже через 10 мин после введения глюкозы увеличивалось на 34 % ($p < 0.01$) по сравнению с его содержанием в клетках голодных крыс (рис. 36). На последующих, более поздних этапах, содержание ОГ в печени контрольных крыс продолжало нарастать. При этом периоды быстрого накопления содержания ОГ чередовались с периодами замедления этого процесса (рис. 36). В конце эксперимента (120-я мин) содержание ОГ в гепатоцитах превысило его исходный уровень в 1.9 раза.

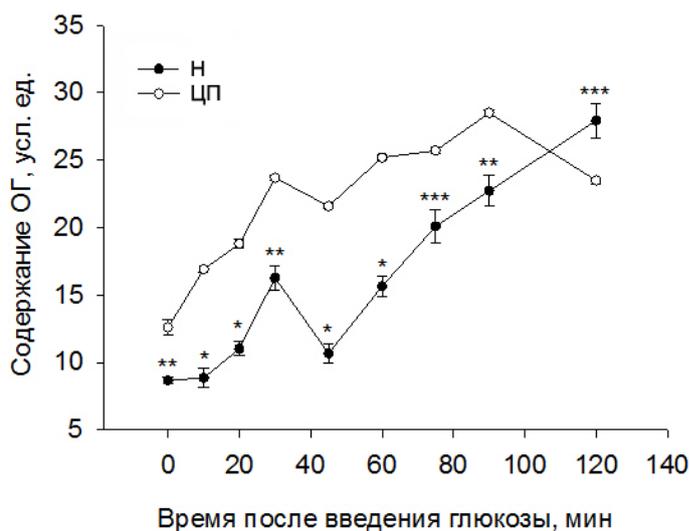


Рис. 36. Изменение содержания общего гликогена (ОГ) в гепатоцитах нормальной (Н) и цирротической печени (ЦП) крысы через разные интервалы времени после введения глюкозы голодным животным.

Примечания: 1) вертикальные отрезки — ошибка среднего; 2) средние значения при ЦП отличаются от значений нормы при уровне значимости * — $p < 0.001$; ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.05$.

В отличие от нормальной печени, при ЦП после введения глюкозы животным, голодавшим в течение 48 ч, гликоген вначале очень медленно накапливался в клетках. Однако, начиная с 45-й мин, содержание ОГ в гепатоцитах непрерывно увеличивалось и к концу эксперимента превысило его исходный уровень в 3.2 раза ($p < 0.001$) (рис. 36).

Важно отметить, что на всех сроках после введения глюкозы голодным животным, за исключением 120-й мин, содержание ОГ в гепатоцитах контрольных крыс заметно превышало такое в гепатоцитах крыс с ЦП (в среднем в 1.6 раза).

3.3.2. Содержание общего гликогена в гепатоцитах человека в норме, при хроническом гепатите и циррозе печени (Chestnova et al., 2015a)

Исследование содержания ОГ в гепатоцитах печени человека после ночного голодания показало, что при ХГ оно было выше, чем в норме, на 20 % ($p < 0.001$) и, в среднем, составляло 11.41 ± 0.16 усл. ед. При ЦП содержание ОГ увеличивалось на 130 % ($p < 0.001$) по сравнению с нормой и составило 21.99 ± 0.56 усл. ед. (рис. 37). По мере усиления тяжести ХГ и перехода заболевания на стадию ЦП возрастало не только содержание ОГ в гепатоцитах, но значительно увеличивалась и его концентрация. Концентрация ОГ в гепатоцитах составила (усл. ед.): в

норме 0.0172 ± 0.0002 , при ХГ 0.0217 ± 0.0003 , при ЦП 0.0375 ± 0.0012 . Уровень достоверности различий между ХГ–Норма, ЦП–Норма и ЦП–ХГ составил $p < 0.001$.

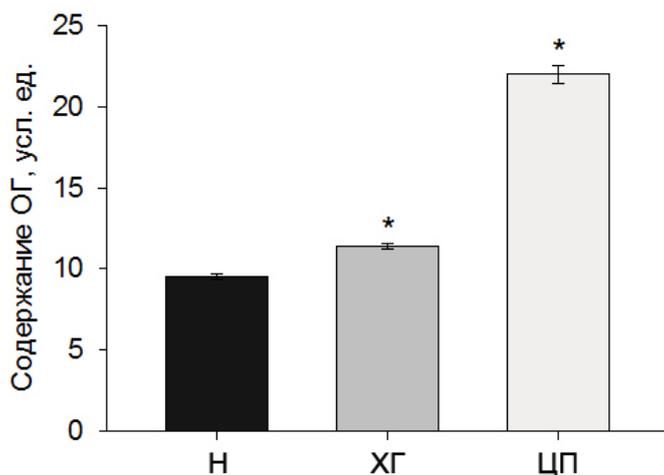


Рис. 37. Содержание общего гликогена (ОГ) в гепатоцитах человека в норме (Н), при хроническом гепатите (ХГ) и циррозе печени (ЦП).

Примечания: 1) вертикальные отрезки — ошибка среднего; 2) средние значения при ХГ и ЦП отличаются от значения нормы при уровне значимости * — $p < 0.001$.

3.4. Исследование зависимости содержания общего гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени от степени их ploидности на разных стадиях рефиндинга крыс (Bezborodkina, Chestnova et al., 2016)

Как уже говорилось, цирроз в ходе своего развития сопровождается значительной потерей клеток паренхимы печени. Уменьшение числа клеток и нарушение условий микроокружения, в которых гепатоциты вынуждены выполнять свои многочисленные специализированные функции, могут приводить к снижению уровня этих функций. Одной из них является участие в поддержании постоянного уровня глюкозы в крови. В этой связи принципиальным является ответ на вопрос: соответствует ли содержание гликогена в гепатоцитах цирротической печени уровню ploидности клеток? В **таблице 6** представлены данные о содержании ОГ в гепатоцитах различных классов ploидности на разных сроках после введения глюкозы голодным крысам в контрольной и опытной группах.

Полученные данные свидетельствуют, во-первых, о том, что содержание гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени быстро увеличивается после введения глюкозы голодным крысам. Во-вторых, из представленных данных следует, что содержание гликогена в клетках при голодании и на разных этапах рефиндинга, как в нормальной печени, пропорционально степени их ploидности (**рис. 38**).

Кроме того, из полученных результатов следует, что гепатоциты каждого класса ploидности, как в нормальной, так и в цирротической печени накапливают гликоген в равной пропорции (**рис. 39**). В этом отношении одноядерные гепатоциты, если они имели ploидность равную с двуядерными гепатоцитами, не отличались от последних по содержанию ОГ (**рис. 39**).

Таблица 6. Содержание общего гликогена (усл. ед.) в одноядерных и двухядерных гепатоцитах различных классов плоидности в нормальной и цирротически измененной печени крысы при голодании (0-я мин), а также через 10 и 60 мин после введения глюкозы голодным животным, $X \pm Sx$.

Время, мин	Классы плоидности, с					
	2с	2с×2	4с	4с×2	8с	8с×2
Нормальная печень						
0 (n=3)	4.7 ± 0.3 (10)	9.9 ± 0.2 (46)	9.6 ± 0.1 (637)	19.3 ± 0.3 (116)	18.2 ± 0.4 (44)	—
10 (n=3)	8.8 ± 0.5* (12)	16.3 ± 0.6* (54)	17.2 ± 0.1* (740)	32.9 ± 0.8* (168)	34.3 ± 0.9* (64)	—
60 (n=3)	17.3 ± 1.8* (6)	33.2 ± 0.8* (50)	33.5 ± 0.2* (1078)	65.9 ± 0.8* (183)	63.8 ± 1.7* (39)	—
Цирротически измененная печень						
0 (n=3)	3.7 ± 0.8 (16)	7.2 ± 0.8 (27)	7.6 ± 0.2 (903)	14.9 ± 0.6 (185)	14.4 ± 0.6 (138)	27.1 ± 10.8 (8)
10 (n=3)	6.8 ± 2.2 (12)	13.4 ± 3.9 (34)	13.2 ± 0.7* (599)	27.1 ± 3.2* (183)	26.4 ± 3.1* (86)	54.9 ± 6.1# (14)
60 (n=3)	10.4 ± 1.0* (43)	21.0 ± 2.0* (47)	22.3 ± 0.8* (593)	44.1 ± 4.7* (67)	41.5 ± 3.1* (93)	76.2 ± 9.1& (10)

Примечания: 1) результаты для каждой временной точки представляют собой взвешенное среднее из данных, полученных для 3 крыс; 2) в скобках — число измеренных клеток; 3) содержание гликогена в гепатоцитах отличается от соответствующего значения у голодных животных при уровне значимости * — $p < 0.001$; & — $p < 0.01$; # — $p < 0.05$.

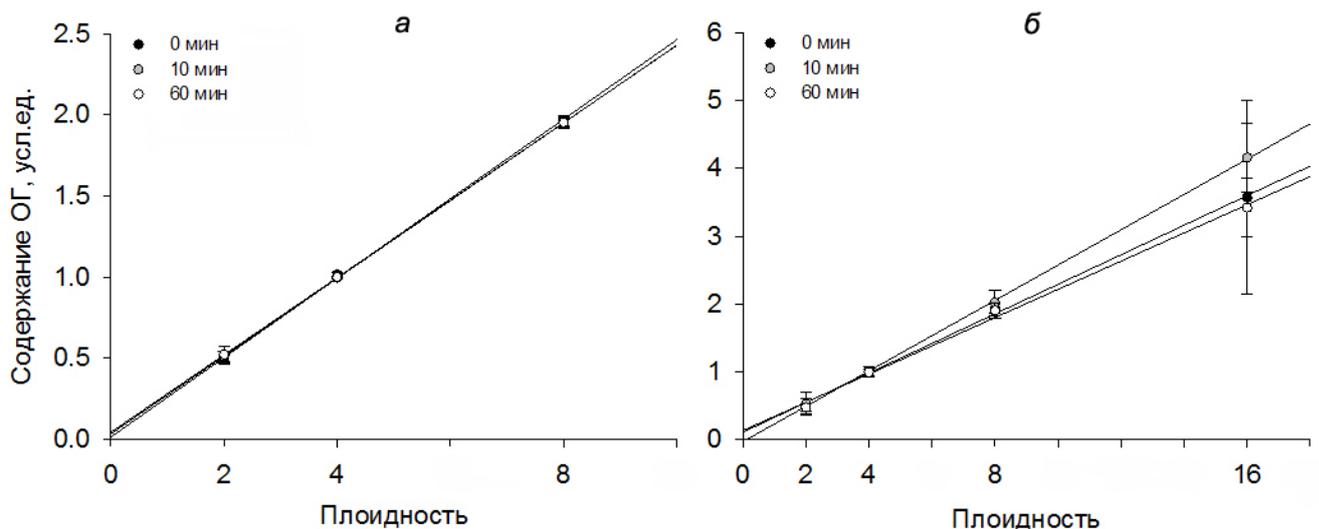


Рис. 38. Зависимость содержания общего гликогена (ОГ) в гепатоцитах нормальной (а) и цирротической (б) печени крысы от плоидности клеток при голодании (0-я мин), а также через 10 и 60 мин после введения глюкозы голодным животным.

Примечание: вертикальные отрезки — ошибка среднего.

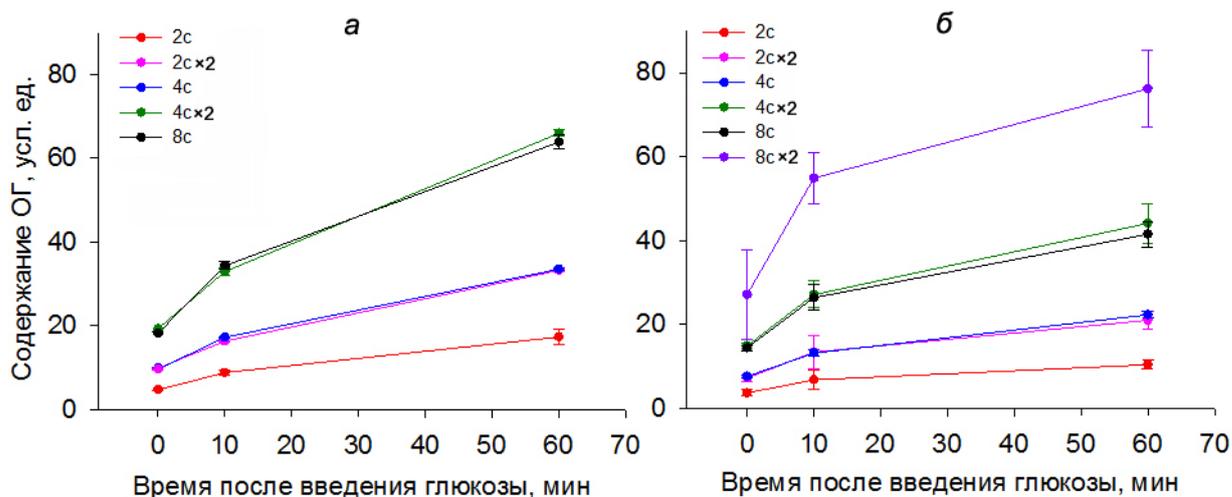


Рис. 39. Динамика содержания общего гликогена (ОГ) в гепатоцитах различных классов плоидности в нормальной (*а*) и цирротической печени (*б*) в ходе рефидинга крыс глюкозой.

Примечание: вертикальные отрезки — ошибка среднего.

Из данных, представленных на **рис. 40** следует, что при ЦП заметно увеличивается вариабельность гепатоцитов крысы по содержанию ОГ. Если в нормальной печени коэффициент вариации (*v*) по содержанию ОГ в 4с-гепатоцитах составлял 21.1–30.8 %, то в цирротически измененной печени он достигал величины 40.5–54.4 % ($p < 0.001$) (**рис. 40**).

Результаты, представленные на **рис. 41** свидетельствуют о том, что в печени человека с ЦП, как и у крысы, увеличивается вариабельность гепатоцитов по содержанию ОГ. Если в норме и при ХГ коэффициент вариации по содержанию ОГ в 2с-гепатоцитах составлял 53.5 и 48.4 % соответственно, то при ЦП он достигал величины 71.7 % ($p < 0.001$) (**рис. 41**).

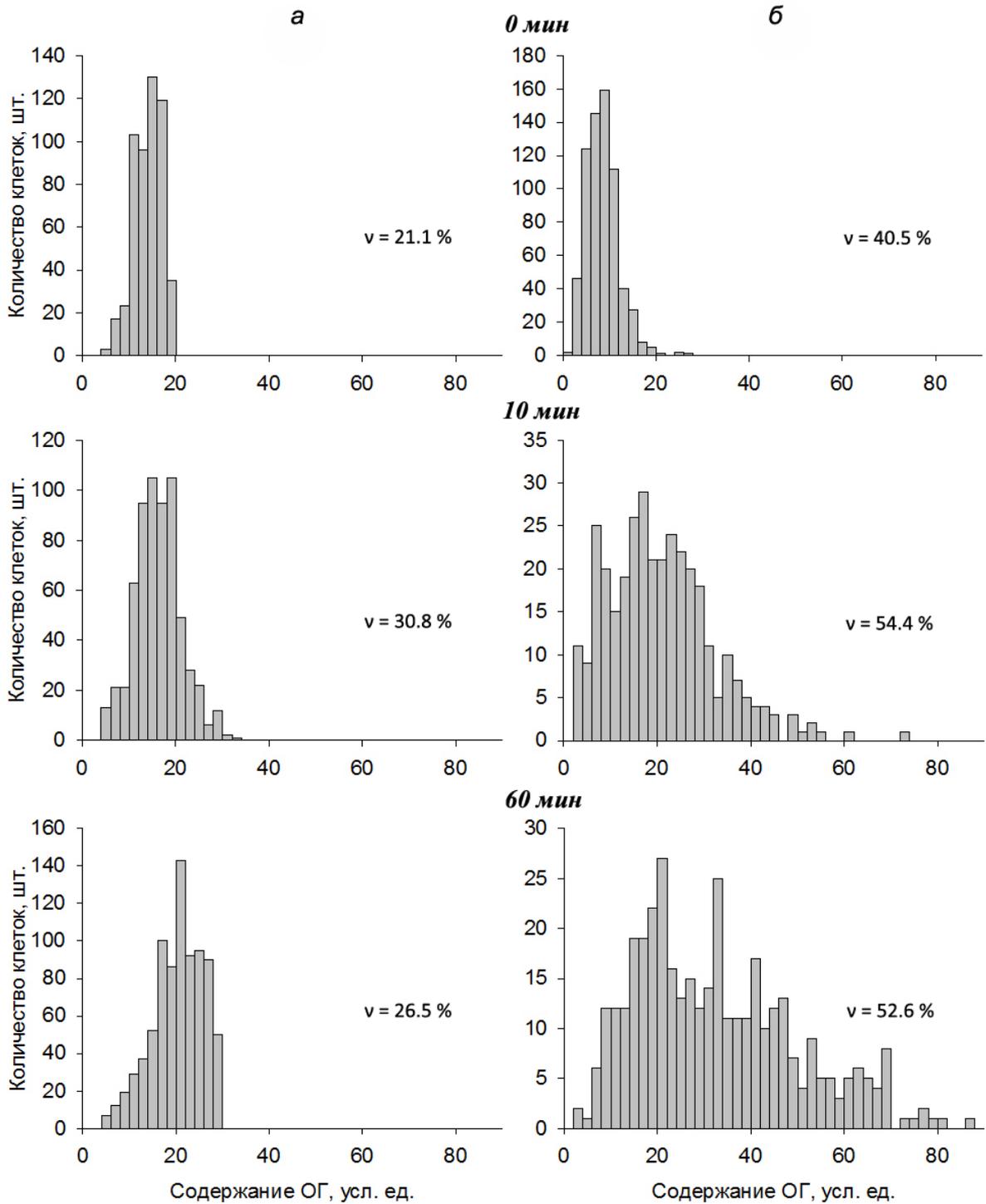


Рис. 40. Гистограммы распределения содержания общего гликогена (ОГ) в гепатоцитах в классе одноядерных 4с-клеток нормальной (а) и цирротической (б) печени крысы при голодании (0-я мин), а также через 10 и 60 мин после введения глюкозы голодным животным.

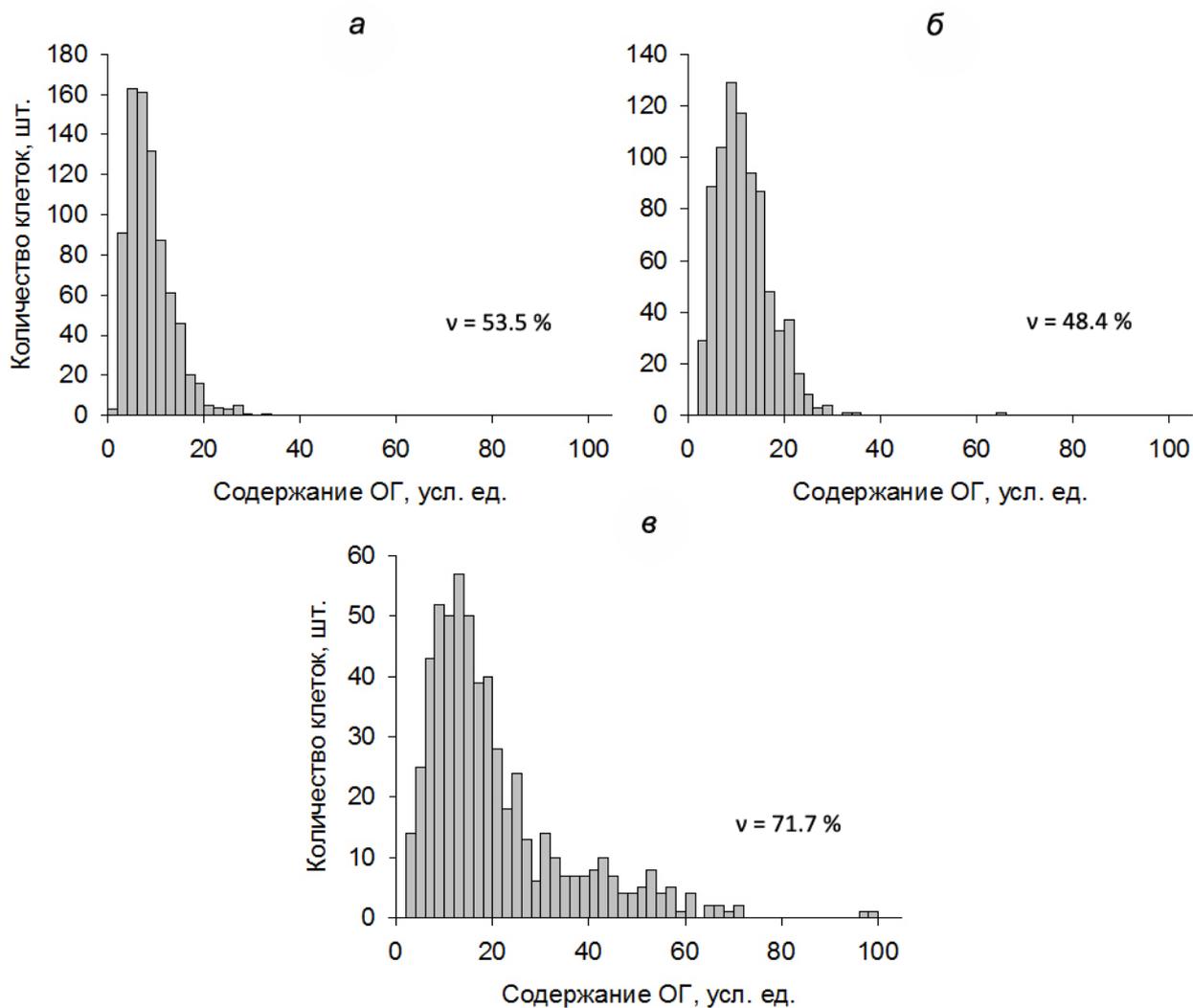


Рис. 41. Гистограммы распределения гепатоцитов человека по содержанию общего гликогена (ОГ) в классе одноядерных 2с-клеток в норме (**а**), при хроническом гепатите (**б**) и циррозе печени (**в**).

3.5. Изменение сухой массы гепатоцитов различных классов плоидности в нормальной и цирротической печени крысы в ходе гликогенеза (Bezborodkina, Chestnova et al., 2016)

Результаты, представленные в **таблице 7**, свидетельствуют о том, что введение глюкозы голодным крысам уже через 10 мин приводит не только к увеличению содержания ОГ в гепатоцитах, но и к увеличению СМГ в каждом классе плоидности клеток нормальной и цирротической печени. Например, в нормальной печени сухая масса одноядерных тетраплоидных клеток (4с-гепатоциты) через 10 мин после введения глюкозы возрастала, в среднем, на 11.6 % ($p < 0.001$) по сравнению с голодными крысами, а в цирротической печени — на 7.0 % ($p < 0.01$) (**рис. 42**). Через 60 мин СМГ этих клеток увеличивалась на 29.8 % ($p < 0.001$) и 17.0 % ($p < 0.01$) соответственно (**рис. 42**).

Таблица 7. Сухая масса (пг) гепатоцитов различных классов плоидности в нормальной и цирротически измененной печени крысы при голодании (0-я мин), а также через 10 и 60 мин после введения глюкозы голодным животным, $X \pm Sx$.

Время, мин	Классы плоидности, с					
	2с	2с×2	4с	4с×2	8с	8с×2
Нормальная печень						
0 (n=3)	216.5 ± 6.6 (10)	521.1 ± 9.3 (46)	519.4 ± 2.2 (637)	1015.7 ± 11.7 (116)	1111.6 ± 11.5 (44)	—
10 (n=3)	267.3 ± 5.8* (12)	578.2 ± 8.6* (54)	579.8 ± 2.9* (740)	1037.8 ± 6.9 (168)	1146.0 ± 27.0 (64)	—
60 (n=3)	365.7 ± 17.5* (6)	666.6 ± 8.4* (50)	674.4 ± 3.1* (1078)	1096.9 ± 10.7* (183)	1251.7 ± 34.1* (39)	—
Цирротически измененная печень						
0 (n=3)	327.0 ± 15.7 (16)	679.1 ± 31.5 (27)	695.2 ± 5.1 (903)	1270.4 ± 20.7 (185)	1270.8 ± 24.6 (138)	2024.3 ± 167.5 (8)
10 (n=3)	378.8 ± 19.7# (12)	826.7 ± 45.4# (34)	744.1 ± 7.9* (599)	1393.6 ± 22.1* (183)	1423.8 ± 38.7* (86)	2356.1 ± 119.1 (14)
60 (n=3)	369.1 ± 13.7# (43)	722.2 ± 35.2# (47)	813.4 ± 10.0* (593)	1464.1 ± 38.3* (67)	1488.0 ± 47.8* (93)	2507.9 ± 211.8 (10)

Примечания: 1) результаты для каждой временной точки представляют собой взвешенное среднее из данных, полученных для 3 крыс; 2) в скобках — число измеренных клеток; 3) сухая масса гепатоцитов отличается от соответствующего значения у голодных животных при * — $p < 0.001$, # — $p < 0.05$.

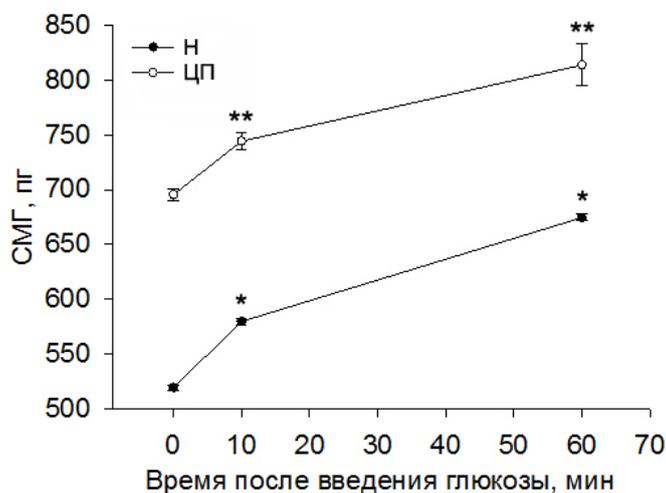


Рис. 42. Зависимость сухой массы 4с-гепатоцитов (СМГ) от времени после введения глюкозы (мин) в нормальной (Н) и цирротической печени (ЦП) крысы. **Примечания:** 1) вертикальные отрезки — ошибка среднего; 2) средние значения СМГ на 10-й и 60-й мин отличаются от значений СМГ у голодных животных (0-я мин) при уровне значимости * — $p < 0.001$; ** — $p < 0.01$.

Результаты, представленные в **таблице 7**, свидетельствуют о том, что в ходе рефиндинга СМГ в цирротической печени крыс заметно превышает СМГ соответствующей плоидности в нормальной печени.

Гипертрофия гепатоцитов в ходе развития патологического процесса может быть связана как с увеличением плоидности клеток, так и с увеличением размера их цитоплазмы. Результаты, представленные на **рис. 43**, свидетельствуют о том, что средние значения СМГ в

нормальной и цирротически измененной печени увеличиваются пропорционально степени ploидности клеток.

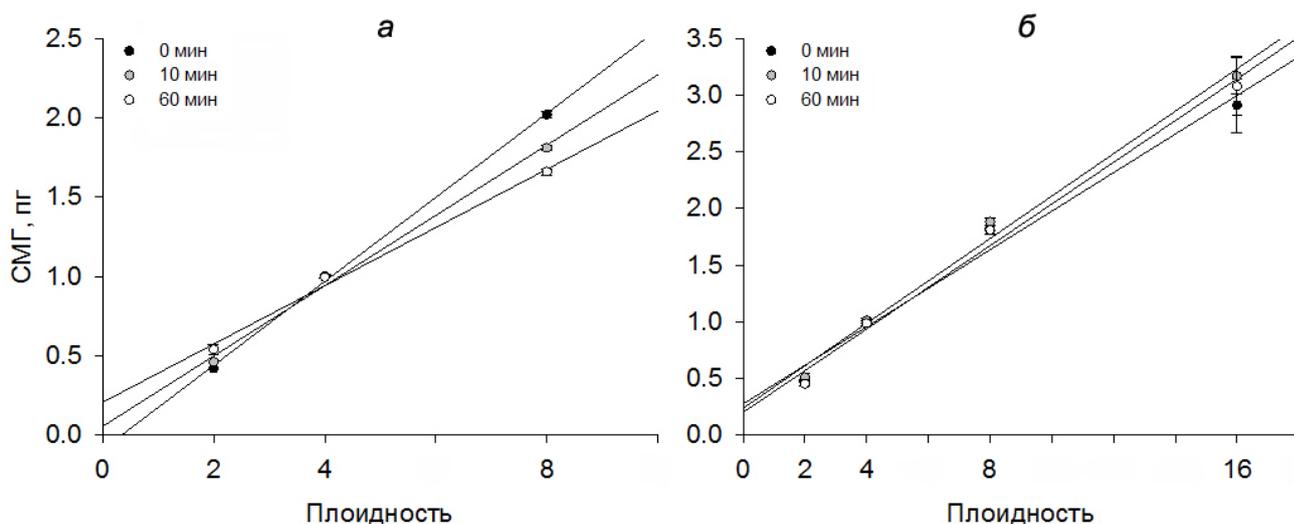


Рис. 43. Зависимость сухой массы гепатоцитов (СМГ) нормальной (а) и цирротической (б) печени крысы от степени ploидности клеток при голодании (0-я мин), а также через 10 и 60 мин после введения глюкозы голодным животным.

Примечание: вертикальные отрезки — ошибка среднего.

Определение СМГ нормальной и цирротической печени показало, что этот показатель у голодных крыс и на разных этапах рефиндинга сильно варьирует. Колебания СМГ у голодных крыс достигают 9.2 раза. Во многом вариабельность СМГ обусловлена различиями в степени их ploидности (Таблица 7). Однако даже в пределах одного класса ploидности СМГ также достаточно сильно различается ($v = 15.2\text{--}20.7\%$). На рис. 44 представлены данные по распределению сухой массы в классе одноядерных 4с-клеток у голодных крыс (0-я мин), а также через 10 и 60 мин после введения им глюкозы. Полученные данные свидетельствуют о том, что сухая масса отдельных клеток, например, в классе одноядерных 4с-гепатоцитов у голодных крыс в норме и при ЦП изменяется от 400 до 798 пг.

3.6. Сухая масса гепатоцитов различных классов ploидности у человека в норме, при хроническом гепатите и циррозе печени в постабсорбтивном периоде (Chestnova et al., 2015a)

Результаты, представленные в таблице 8, свидетельствуют, во-первых, о том, что СМГ, как в нормальной, так и в патологически измененной печени человека сильно варьирует в каждом классе ploидности клеток. Коэффициенты вариации (v) для сухой массы в классе одноядерных диплоидных гепатоцитов человека составили: в норме — 34.5% , при ХГ —

30.3 %, а при ЦП — 39.3 % (рис. 45). Во-вторых, из представленных данных можно заключить, что СМГ изменяется пропорционально ploидности клеток, как в норме, так и при патологии (рис. 46).

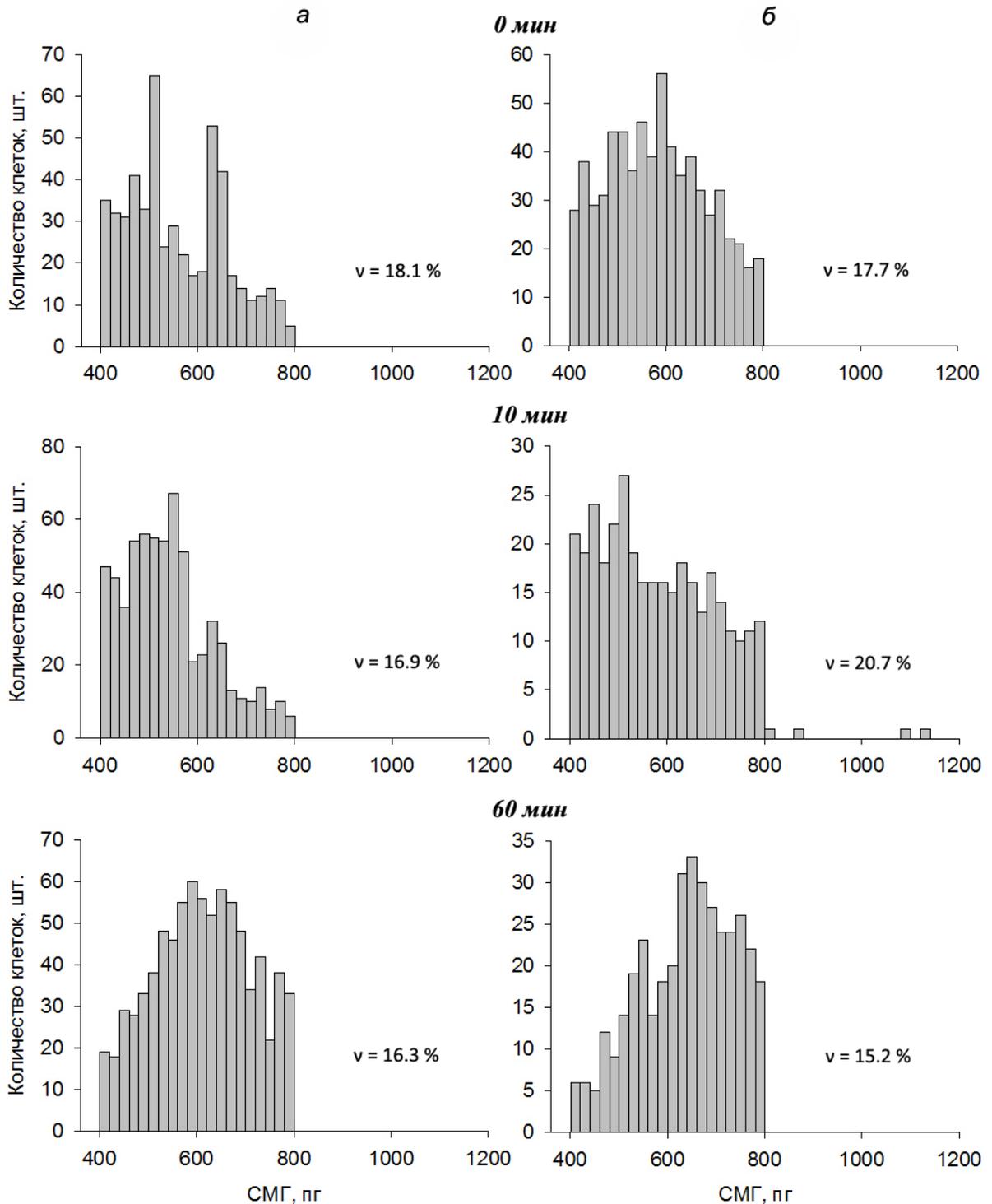


Рис. 44. Гистограммы распределения сухой массы гепатоцитов (СМГ) в классе одноядерных 4с-клеток нормальной (а) и цирротической (б) печени крысы при голодании (0-я мин), а также через 10 и 60 мин после введения глюкозы голодным животным.

Таблица 8. Сухая масса (пг) гепатоцитов разных классов плоидности у человека в норме, при хроническом гепатите (ХГ) и циррозе печени (ЦП), $X \pm Sx$

	Классы плоидности, c				
	$2c$	$2c \times 2$	$4c$	$4c \times 2$	$8c$
Норма (n=7)	476.90 ± 36.00 (799)	915.76 ± 76.83 (170)	805.55 ± 61.14 (72)	1515.80 ± 152.90 (10)	2084.09 ± 320.01 (4)
ХГ (n=5)	437.96 ± 29.30 (801)	732.84 ± 67.01 (136)	762.30 ± 65.60 (58)	—	1937.58 ± 269.50 (9)
ЦП (n=7)	594.78 ± 59.28 (573)	982.66 ± 79.96 (26)	865.32 ± 95.64 (37)	—	—

Примечание: в скобках — число измеренных клеток.

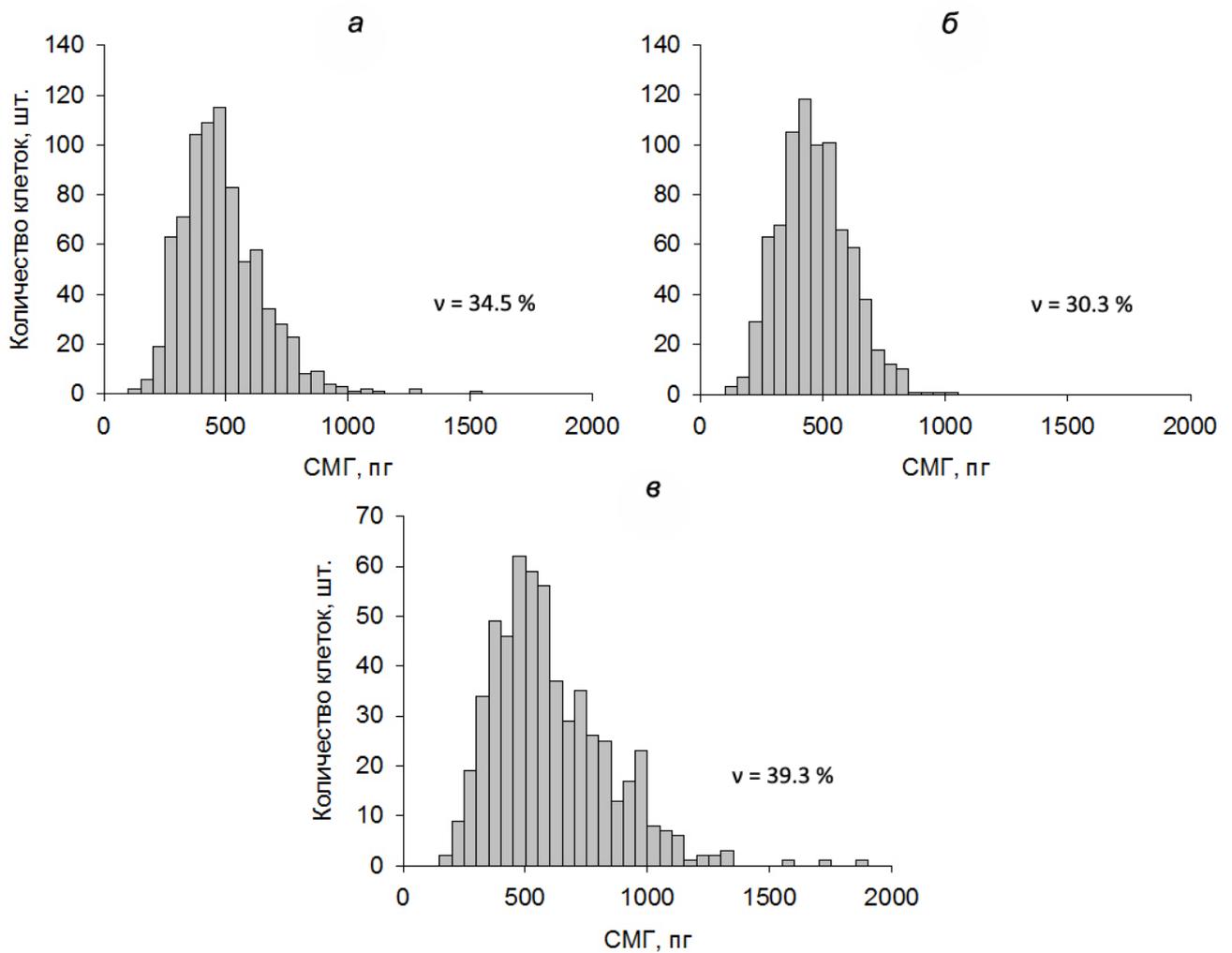


Рис. 45. Гистограммы распределения сухой массы гепатоцитов (СМГ) в классе одноядерных $2c$ -клеток у человека в норме (а), при хроническом гепатите (б) и циррозе печени (в).

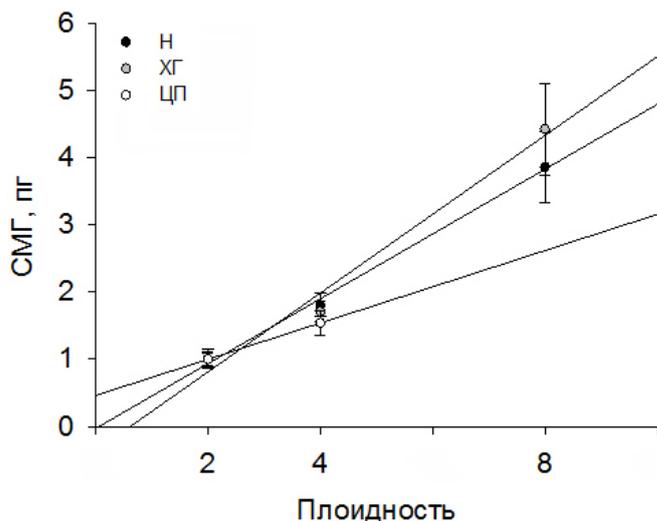


Рис. 46. Зависимость сухой массы гепатоцитов (СМГ) от их плоидности у человека в норме (Н), при хроническом гепатите (ХГ) и циррозе печени (ЦП).

Примечание: вертикальные отрезки — ошибка среднего.

3.7. Зависимость содержания общего гликогена в клетках от их размера в популяциях гепатоцитов различных классов плоидности нормальной и цирротически измененной печени крысы (Bezborodkina, Chestnova et al., 2016)

Некоторые авторы полагают, что содержание гликогена в гепатоцитах тесно связано с их массой. Считается, что чем больше масса клетки, тем большее количество гликогена она может запастись в своей цитоплазме (Ньюсхолм, Старт, 1977). Для того чтобы проверить это предположение, была исследована взаимосвязь между содержанием ОГ в гепатоцитах и их массой в нормальной и цирротически измененной печени крыс, находящихся в разном пищевом статусе. Кроме того, чтобы исключить влияние плоидности клеток на полученные результаты, эту зависимость исследовали для каждого класса плоидности в отдельности.

Результаты, представленные на **рис. 47, а; 48, а и 49, а**, свидетельствуют о том, что в нормальной печени существует высокая степень корреляции между массой гепатоцитов и содержанием в них ОГ, т.е. чем больше масса гепатоцита, тем больше содержится в нем гликогена. Подобная зависимость наблюдается в каждом классе плоидности клеток, как при голодании, так и в ходе рефиндинга крыс глюкозой, во время интенсивного синтеза гликогена в печени. В цирротически измененной печени зависимость между массой клеток и содержанием в них ОГ отсутствует в каждом классе плоидности клеток (**рис. 47, б; 48, б; 49, б**).

В тетраплоидном классе гепатоцитов нормальной печени зависимость между массой клеток и содержанием в них ОГ проявляется особенно четко. На графиках (**рис. 50, а**), представляющих этот класс плоидности гепатоцитов, выявляются три субпопуляции клеток, для которых коэффициент корреляции составляет 0.948–0.994 ($p < 0.001$).

3.8. Зависимость содержания общего гликогена в клетках от их массы в различных классах ploидности гепатоцитов человека в норме, при хроническом гепатите и циррозе печени (Chestnova et al., 2015a)

Результаты, представленные на **рис. 51, а**, свидетельствуют о том, что в нормальной печени человека, как и у крысы, существует четкая корреляция между СМГ и содержанием в них ОГ. Подобная зависимость наблюдается в каждом классе ploидности клеток. При ХГ зависимость между СМГ и содержанием в них ОГ также присутствует, как и в норме (**рис. 51, б**). Однако у пациентов с ЦП подобная зависимость не наблюдается (**рис. 51, в**).

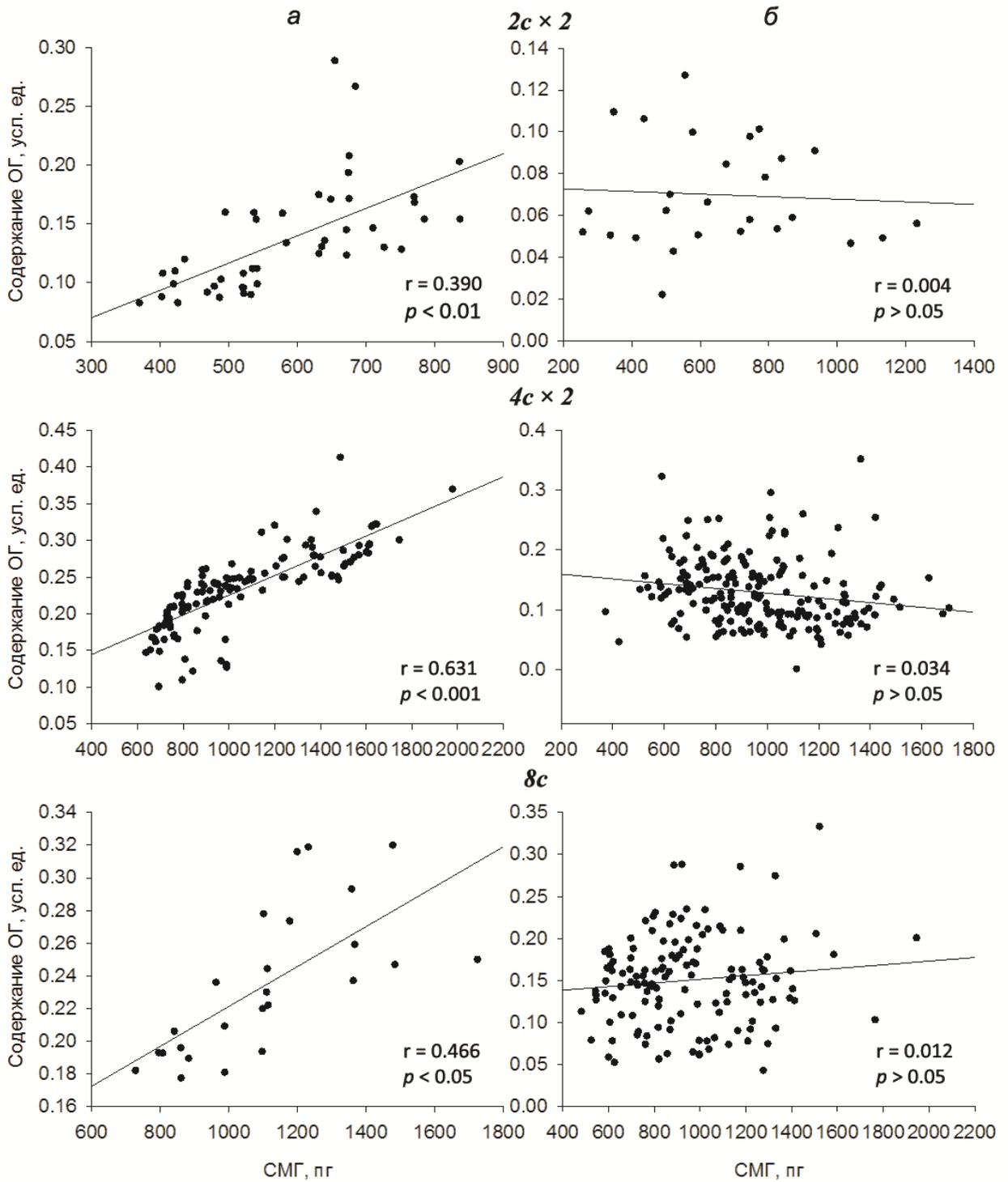


Рис. 47. Зависимость содержания общего гликогена (ОГ) от сухой массы гепатоцитов (СМГ) различных классов плоидности нормальной (а) и цирротической (б) печени у голодных крыс (0-я мин).

Примечание: каждая точка на графике соответствует одной клетке.

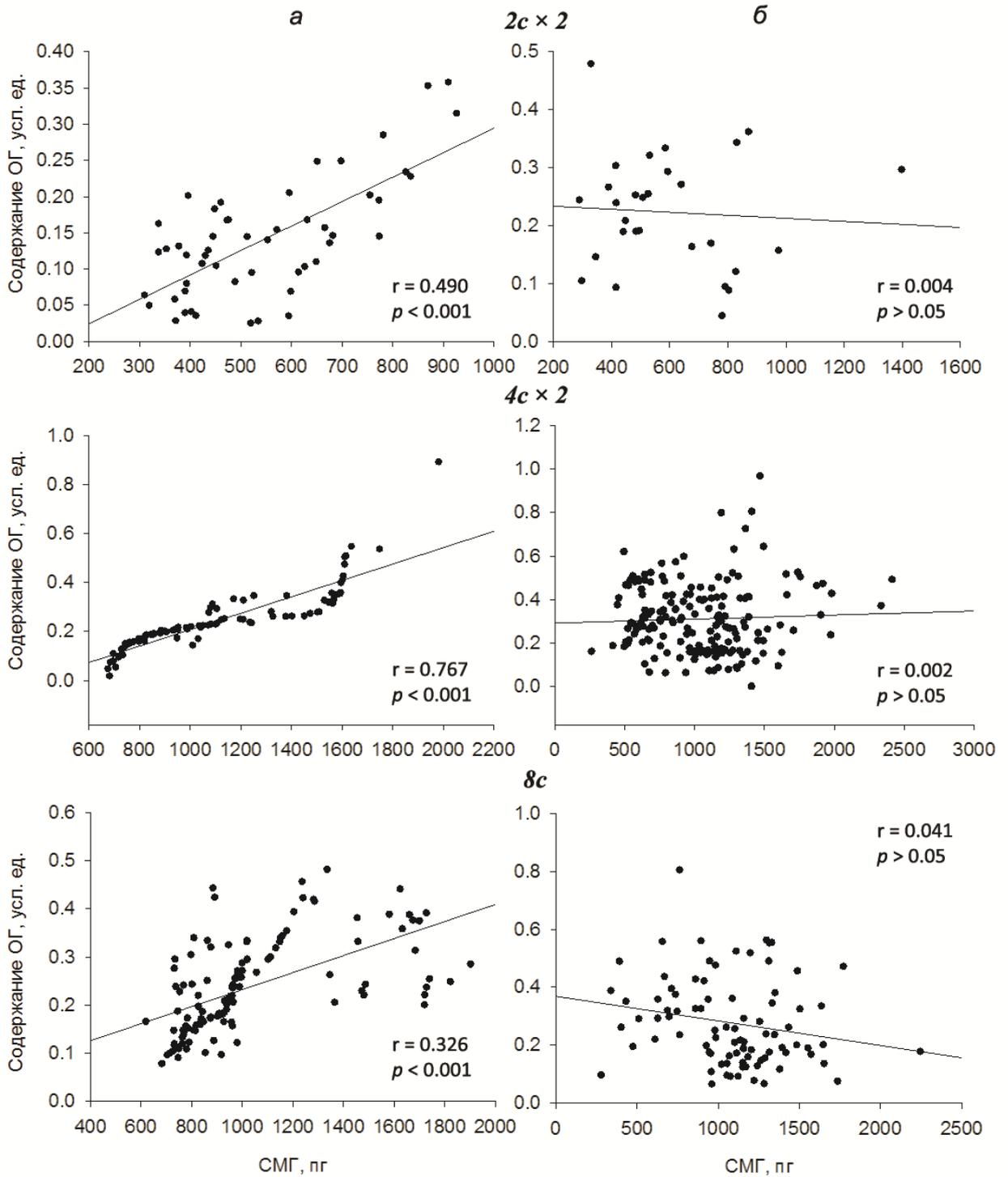


Рис. 48. Зависимость содержания общего гликогена (ОГ) от сухой массы гепатоцитов (СМГ) различных классов плоидности нормальной (*a*) и цирротической (*б*) печени через 10 мин после введения глюкозы голодным крысам.

Примечание: каждая точка на графике соответствует одной клетке.

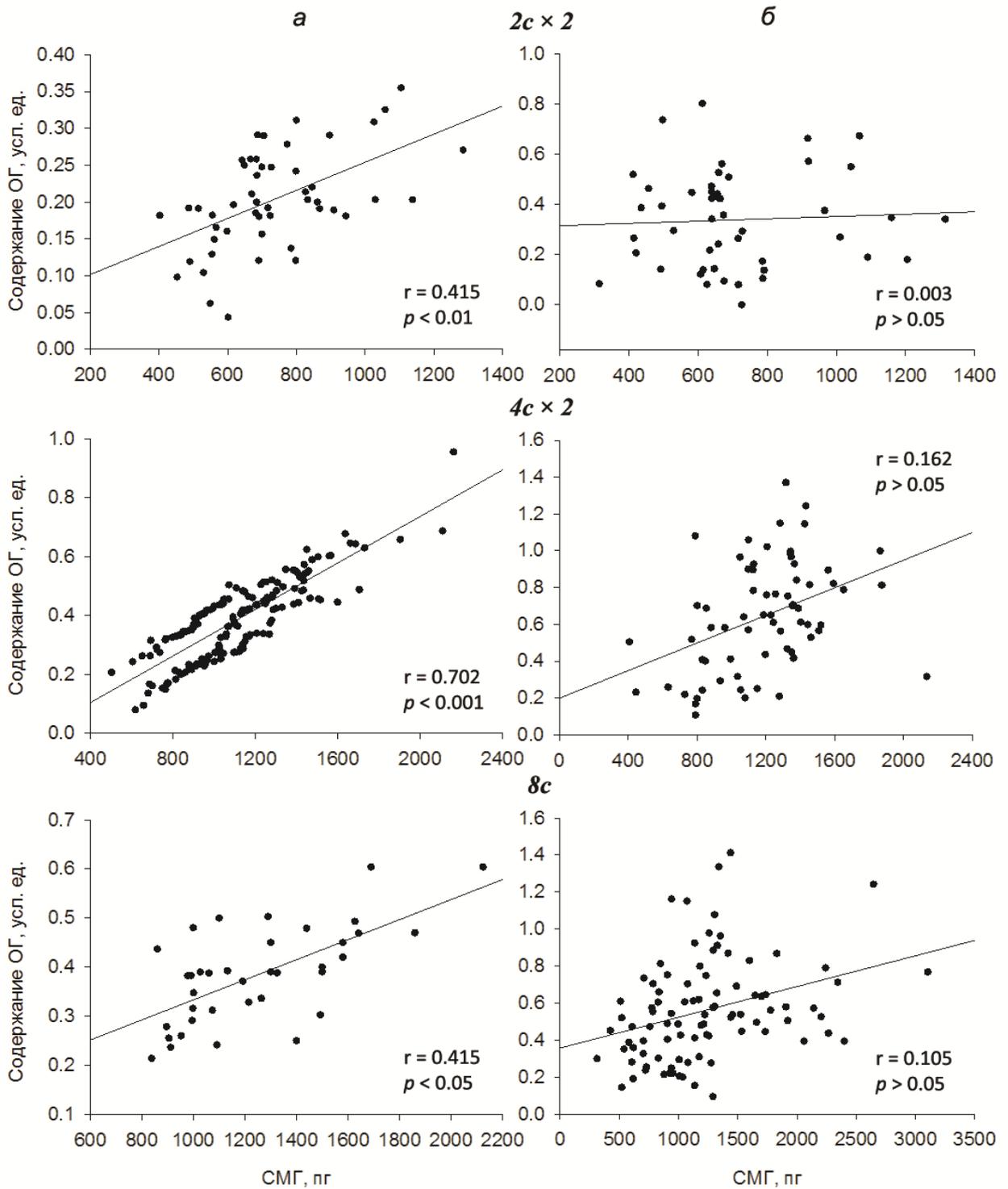


Рис. 49. Зависимость содержания общего гликогена (ОГ) от сухой массы гепатоцитов (СМГ) различных классов плоидности нормальной (а) и цирротической (б) печени через 60 мин после введения глюкозы голодным крысам.

Примечание: каждая точка на графике соответствует одной клетке.

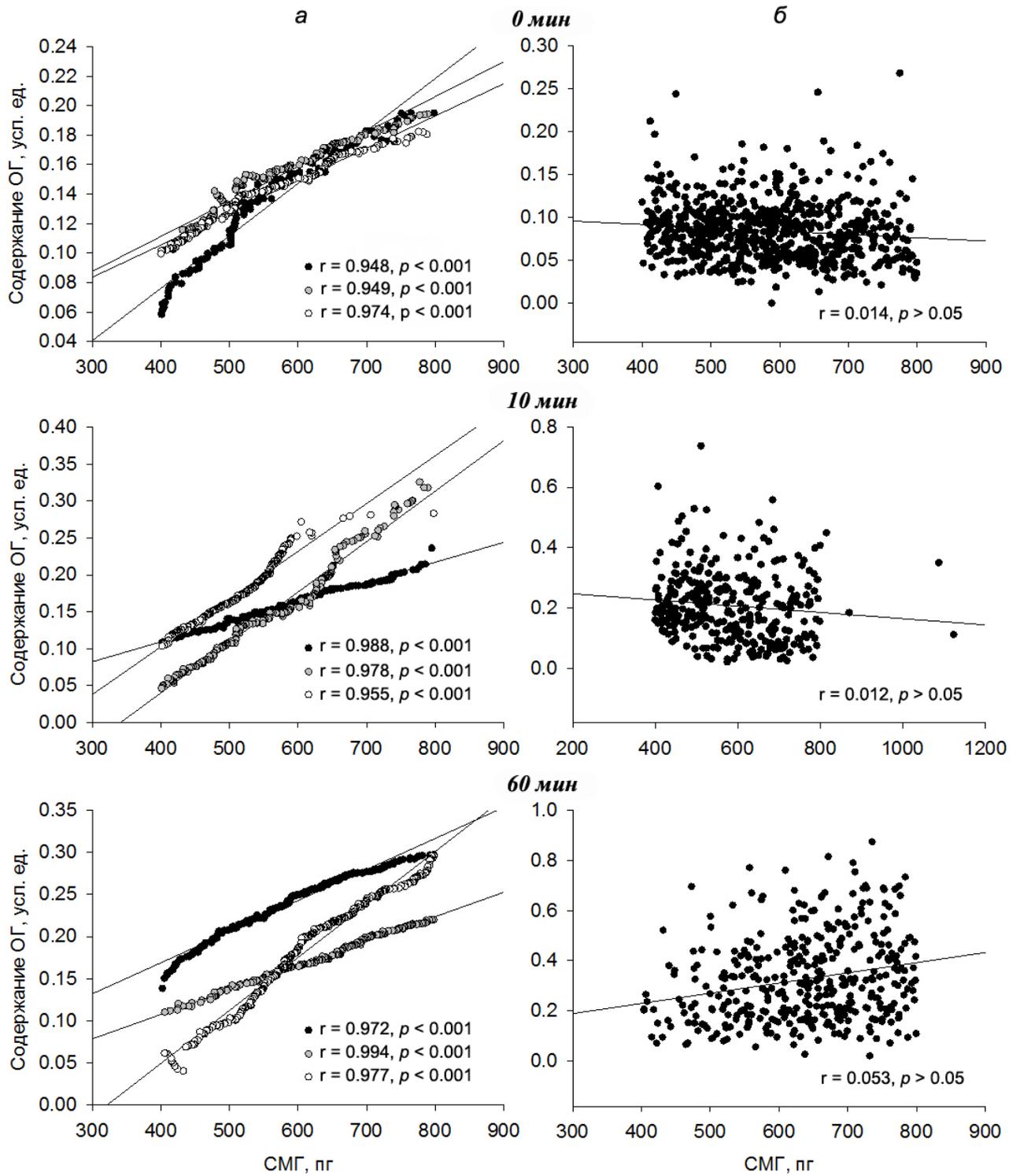


Рис. 50. Тетраплоидные гепатоциты нормальной (а) и цирротической (б) печени крысы на разных этапах рефиндинга. Взаимосвязь между содержанием общего гликогена (ОГ) и их сухой массой (СМГ).

Примечания: 1) каждая точка на графике соответствует одной клетке; 2) черным, красным и зеленым цветом обозначены три субпопуляции клеток в нормальной печени крысы.

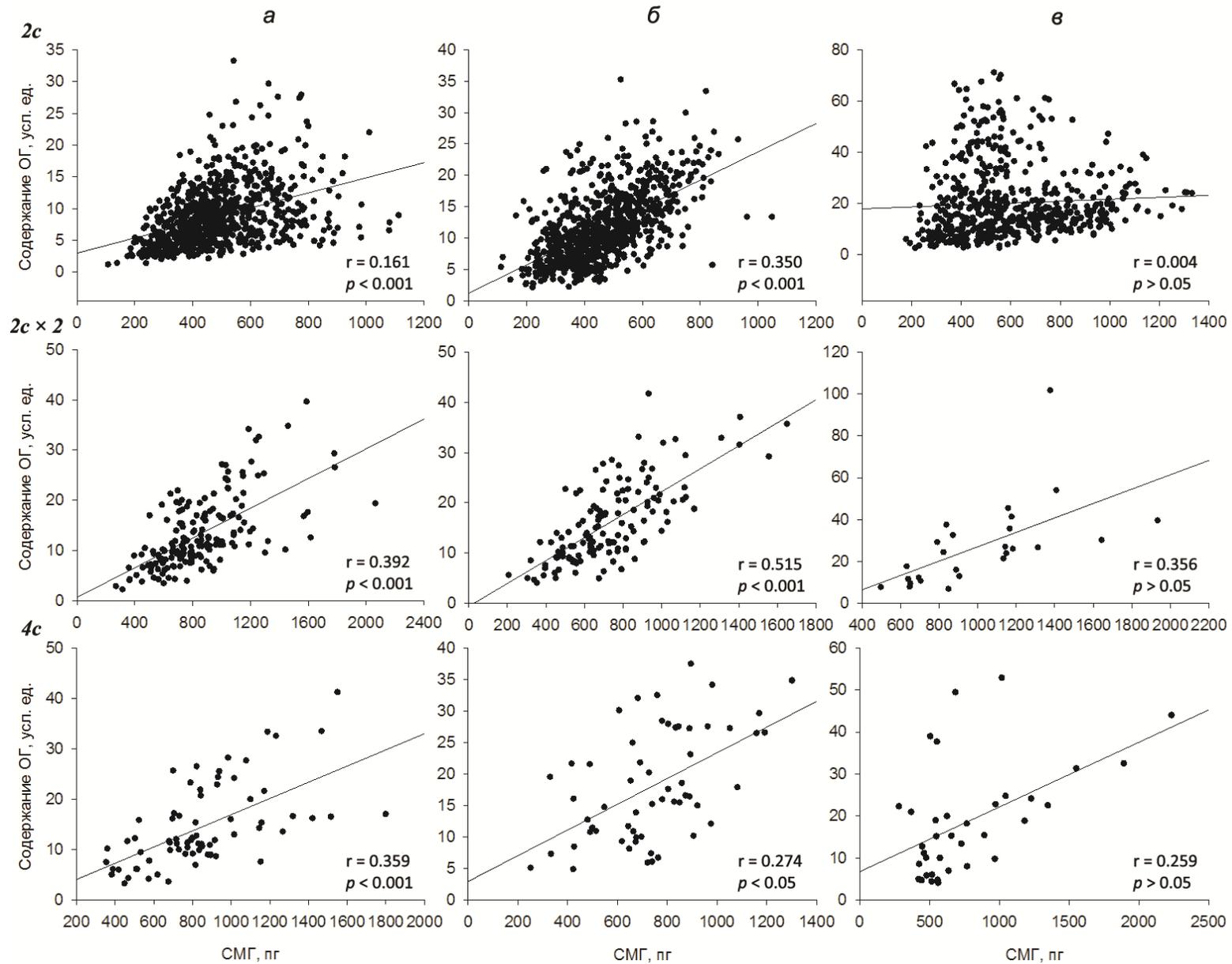


Рис. 51. Зависимость содержания общего гликогена (ОГ) от сухой массы гепатоцитов различных классов плоидности человека в норме (*a*), при хроническом гепатите (*б*) и циррозе печени (*в*). **Примечание:** каждая точка на графике соответствует одной клетке.

3.9. Содержание макрогликогена и прогликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крысы и человека (Честнова и др., 2014; Честнова, 2016)

Возможность выявить две фракции гликогена в одной и той же клетке с помощью красителей с разными спектральными характеристиками позволила исследовать изменения содержания МГ и ПГ в гепатоцитах крысы в течение гликогенеза. Результаты, представленные на **рис. 52, а**, свидетельствуют о том, что после введения глюкозы голодным животным содержание МГ в гепатоцитах нормальной и цирротической печени уже через 10 мин увеличивалось на 67 % и 21 % соответственно ($p < 0.01$) (**рис. 52, а**). При этом содержание МГ в клетках контрольных крыс на всех сроках рефидинга (кроме 120-й мин) превышало содержание МГ в клетках крыс с ЦП. Следует также отметить, что на разных стадиях рефидинга доля МГ в отдельных гепатоцитах как у контрольных крыс, так и крыс с ЦП могла достигать 90 %, однако доля таких клеток была невелика.

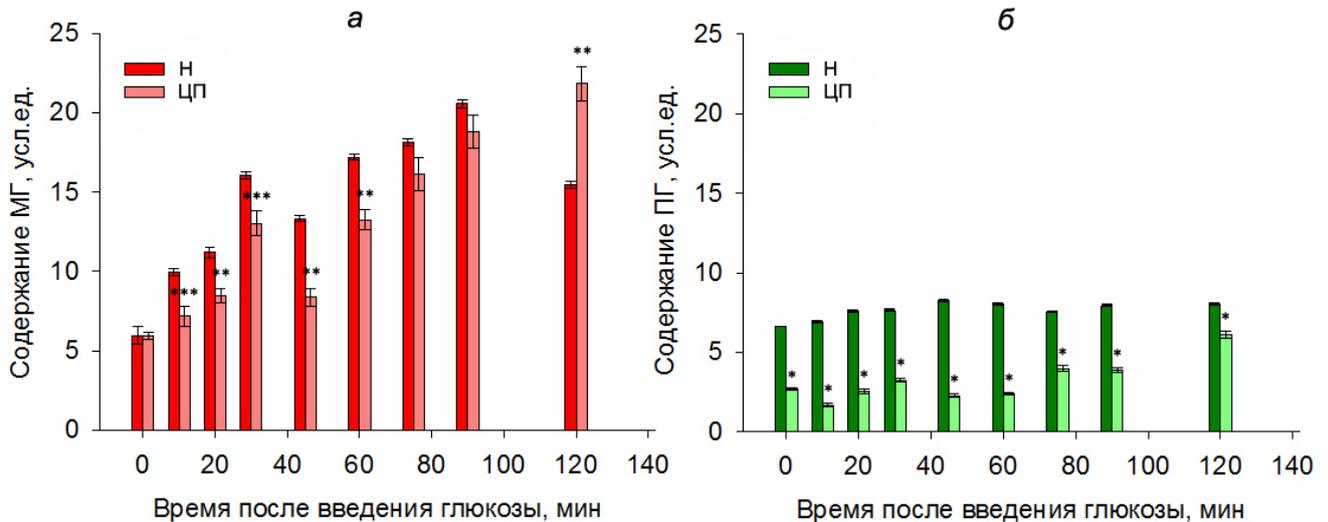


Рис. 52. а — содержание макрогликогена (МГ); **б** — содержание прогликогена (ПГ) в гепатоцитах нормальной (Н) и цирротической (ЦП) печени крысы через разные интервалы времени после введения глюкозы голодным животным.

Примечания: 1) вертикальные отрезки — ошибка среднего; 2) средние значения при ЦП отличаются от значений нормы при уровне значимости * — $p < 0.001$; ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.05$.

Содержание ПГ в гепатоцитах крыс контрольной группы возрастало на 12.7 % ($p < 0.01$) в течение 20 мин после введения глюкозы голодным животным, а затем оно не изменялось. В отличие от контроля, содержание ПГ при ЦП слабо изменялось в первые 60 мин гликогенеза, но затем увеличивалось и в конце эксперимента превысило исходный уровень в 2.3 раза ($p < 0.001$) (**рис. 52, б**).

Полученные данные свидетельствуют о том, что после 48-часового голодания, относительное содержание ПГ в гепатоцитах контрольных крыс в 1.7 раза превышает таковое в гепатоцитах при ЦП. В целом, на протяжении всего время гликогенеза доля ПГ в гепатоцитах

нормальной печени была выше, чем в гепатоцитах крыс с ЦП. Доля ПГ в гепатоцитах нормальной и цирротической печени несколько снижалась в течение гликогенолиза, в то время как относительное содержание МГ возрастало (рис. 53, а, б).

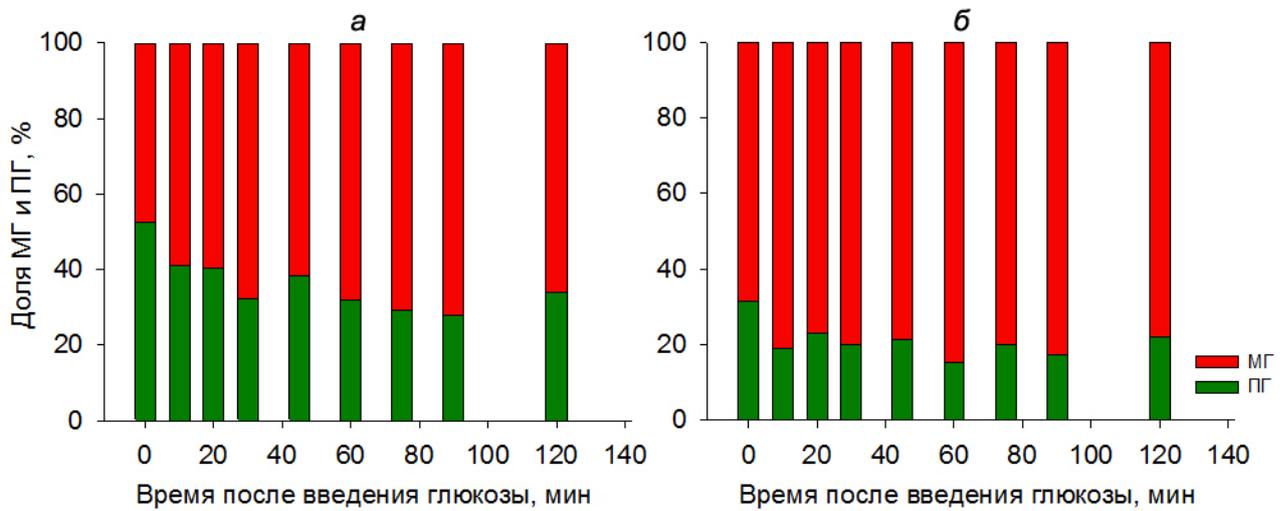


Рис. 53. Доля (%) макрогликогена (МГ) и прогликогена (ПГ) в гепатоцитах нормальной (а) и цирротической (б) печени крысы через разные интервалы времени после введения глюкозы голодным животным.

Относительное содержание МГ в гепатоцитах нормальной печени человека составляло 88 %, а ПГ — 12 %. По мере развития патологического процесса в печени доля МГ несколько снижалась, составив у пациентов с ХГ и ЦП около 80 % ($p < 0.01$; $p < 0.01$). Соответственно увеличивалась доля ПГ (рис. 54).

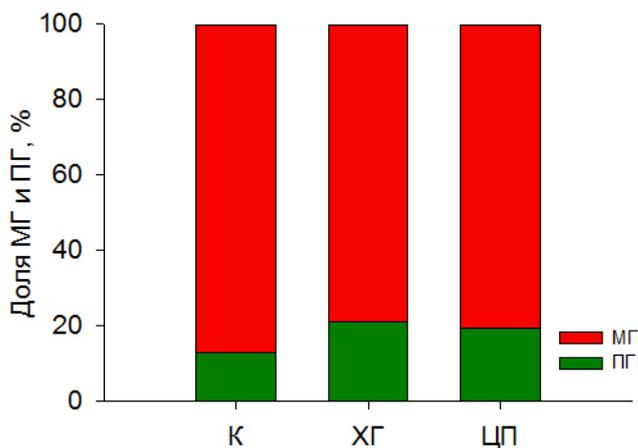


Рис. 54. Доля макрогликогена (МГ) и прогликогена (ПГ) в гепатоцитах человека в норме (Н), при хроническом гепатите (ХГ) и циррозе печени (ЦП).

Анализ зависимости содержания ОГ от содержания МГ в гепатоцитах показал, что накопление гликогена в печени и колебания его уровня в клетках контрольных и опытных крыс на разных этапах гликогенолиза связаны, главным образом, с изменениями уровня МГ. Коэффициент корреляции (r) для этой зависимости составил 0.923–0.953 в контрольной и 0.992–0.994 в опытной группах крыс (рис. 55).

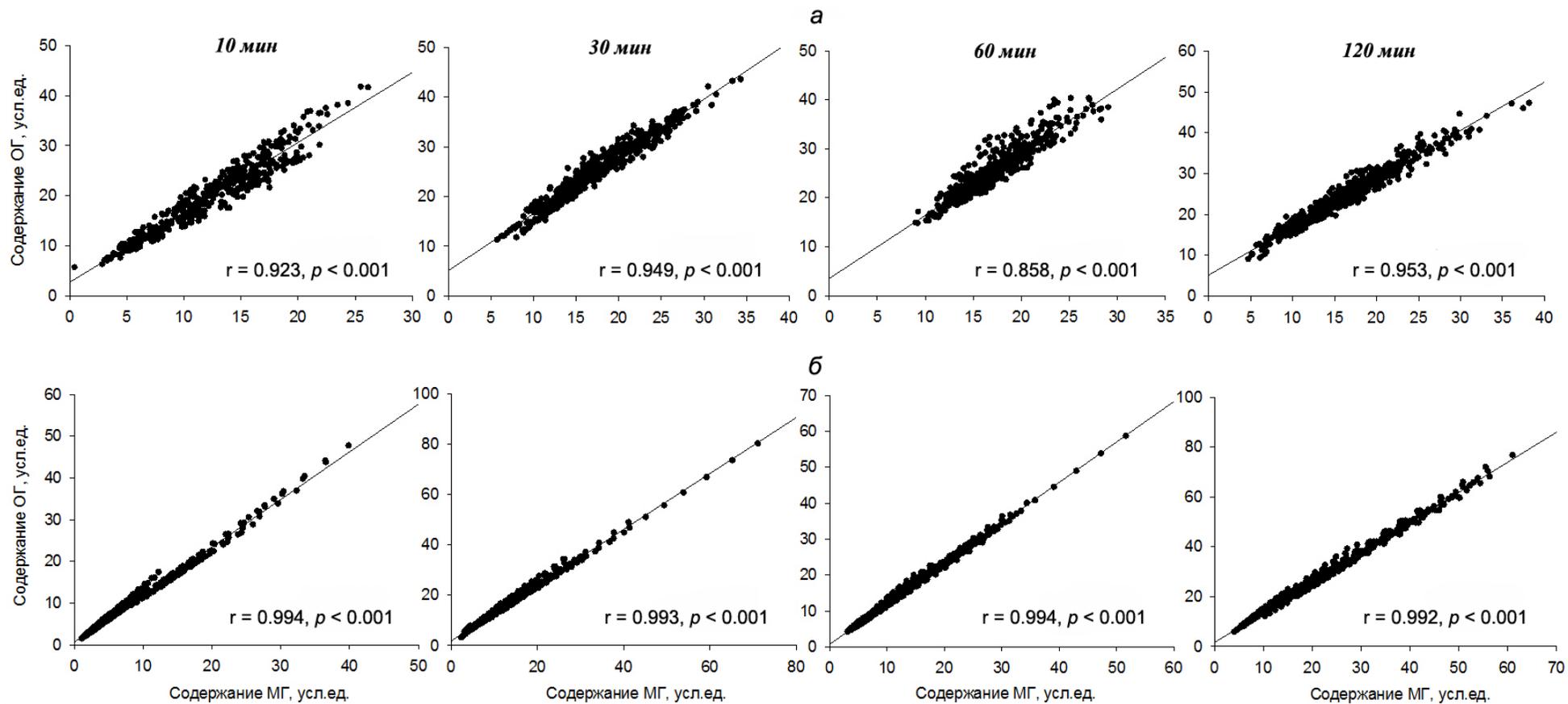


Рис. 55. Зависимость содержания общего гликогена (ОГ) от содержания макрогликогена (МГ) в гепатоцитах нормальной (а) и цирротической (б) печени крысы на разных этапах гликогенеза (10, 30, 60 и 120-я мин).

Примечание: каждая точка на графиках соответствует одной клетке.

3.10. Доля остатков глюкозы на внешних ярусах молекул гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крысы и человека (Честнова и др., 2015; Честнова, 2016)

Величина отношения содержания макрогликогена к содержанию прогликогена (МГ/ПГ), в принципе, позволяет рассчитать относительное число остатков глюкозы, находящихся на внешних ярусах β -частиц в гепатоцитах нормальной и цирротической печени в течение гликогенеза. Однако из-за слишком малого размера частиц гликогена и огромного их количества в клетке невозможно подсчитать степень заполнения какого-либо яруса для каждой β -частицы или получить данные о дисперсии частиц гликогена в одной клетке по этому параметру. Тем не менее, с помощью нашего метода можно получить сведения не только о степени заполнения ярусов остатками глюкозы, используя формулу (4) (см. раздел 2.5 в главе «Материалы и методы исследования»), для «средней» β -частицы гликогена в данной конкретной клетке, но и распределении клеток в популяции гепатоцитов по этому показателю.

Полученные данные (рис. 56, а) свидетельствуют о том, что при голодании гликоген гепатоцитов нормальной печени крысы состоит из β -частиц, у которых на 90 % заполнен 9-й ярус. Введение глюкозы голодным крысам стимулирует синтез гликогена в печени, приводя к его накоплению в гепатоцитах. В ходе гликогенеза к 90-й мин в молекулах гликогена полностью заполняется не только 9-й ярус, но примерно на 80 % заполняется и 10-й ярус (рис. 56, а).

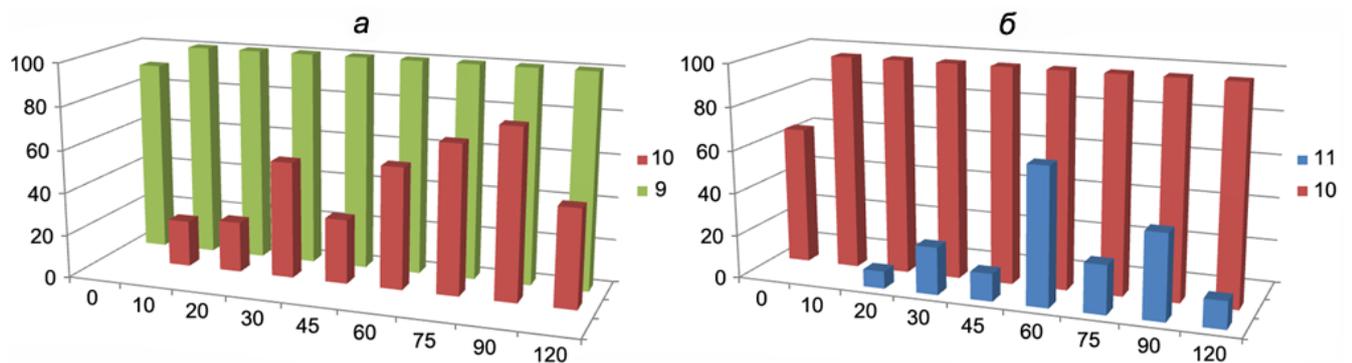


Рис. 56. Доля глюкозных остатков на внешних ярусах молекулы гликогена в нормальной (а) и цирротической (б) печени крысы, %.

В отличие от нормальной печени, у голодных крыс с ЦП в β -частицах заполнен не только 9-й ярус, но частично (на 64.0 %) и 10-й ярус. В ходе рефиндинга у крыс с ЦП уже через 10 мин после введения глюкозы полностью заполняется 10-й ярус молекул гликогена (рис. 56, б). В дальнейшем, все изменения в содержании МГ происходят только в пределах 11-го яруса. Степень заполнения 11-го яруса в β -частицах при ЦП варьировала в пределах 0–64 %.

Полностью сформированные молекулы гликогена, состоящие из 12 ярусов, в гепатоцитах крыс обеих групп отсутствовали даже спустя 120 мин после введения глюкозы голодным животным.

Из графика, представленного на **рис. 57**, следует, что на всех сроках после введения глюкозы голодным животным количество остатков глюкозы на внешних ярусах молекул гликогена в гепатоцитах крыс с ЦП превышало таковое в гепатоцитах нормальной печени (**рис. 57**).

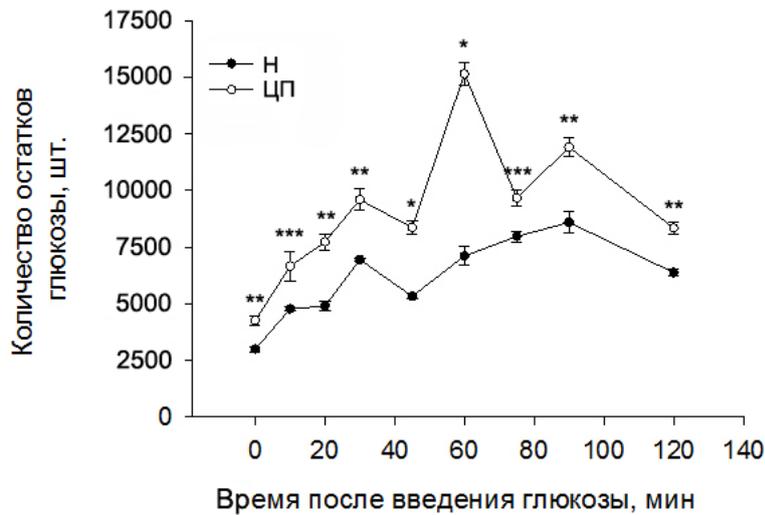


Рис. 57. Изменение числа остатков глюкозы на внешних ярусах молекул гликогена в гепатоцитах нормальной (Н) и цирротической печени (ЦП) крысы.

Примечания: 1) вертикальные отрезки — ошибка среднего; 2) средние значения при ЦП отличаются от значений нормы при уровне значимости * — $p < 0.001$; ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.05$.

В отличие от крысы, у человека степень заполнения внешних ярусов молекул гликогена в гепатоцитах нормальной печени заметно выше. Гепатоциты человека в постабсорбтивном периоде, в среднем, содержат β -частицы с полностью заполненным 11-м ярусом и заполненным на 20.2 % 12-м ярусом. По сравнению с нормальной печенью при ХГ и ЦП степень заполнения внешних ярусов молекул гликогена ниже. В печени пациентов с ХГ и ЦП в гепатоцитах присутствуют частицы гликогена с полностью заполненным 10-м и 11-м ярусами, которые заполнены на 31.7 % и 50.0 % соответственно (**рис. 58**).

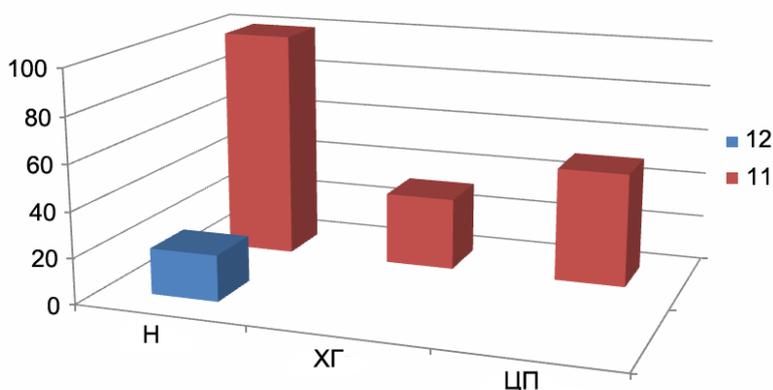


Рис. 58. Доля глюкозных остатков на внешних ярусах молекулы гликогена в гепатоцитах нормальной (Н) печени человека, при хроническом гепатите (ХГ) и циррозе печени (ЦП).

3.11. Динамика заполнения внешних ярусов β -частиц гликогена в популяции гепатоцитов нормальной и цирротической печени крысы в ходе гликогенеза (Честнова, 2016)

Возможность определения величины МГ/ПГ в каждой клетке позволяет не только оценить степень заполнения внешних ярусов молекул гликогена в популяции гепатоцитов нормальной и цирротической печени, но также исследовать ее динамику в ходе гликогенеза и на каждой его стадии.

Как уже говорилось, содержание МГ в гепатоцитах всегда значительно выше, чем ПГ. Теоретически, содержание МГ в этих клетках может составлять 94–97 %, а содержание ПГ — 3–6 % от ОГ. Следовательно, содержание МГ в клетках может превышать содержание ПГ примерно в 20 раз, а количество цепей остатков глюкозы (ЦОГ) в этой фракции гликогена составит 3840. Данные, представленные на **рис. 59**, свидетельствуют о том, что число ЦОГ на внешних ярусах β -частиц в нормальной и цирротической печени не достигает теоретической величины даже через 2 ч после начала рефидинга. В нормальной печени среднее количество ЦОГ в большинстве случаев колеблется в пределах от 500 до 1500 и лишь на одном сроке (90 мин после введения глюкозы) она приближается к 2500. На ранних этапах гликогенеза гепатоциты в популяции довольно синхронно накапливают гликоген, о чем свидетельствует небольшой коэффициент вариации (v) значений ЦОГ ($< 20\%$), но на более поздних этапах гликогенеза значения v заметно увеличиваются ($> 20\%$). При циррозе максимальная величина ЦОГ не превышает значений этого показателя в норме, но варьирует в больших пределах. Кроме того, в отличие от нормы, коэффициент вариации значений ЦОГ в гепатоцитах цирротической печени крысы сохранялся высоким на протяжении всего гликогенеза (23.9–48.9 %), свидетельствуя о значительной асинхронности этого процесса в популяции (**рис. 60**).

На ранних этапах гликогенеза (0–30-я мин), спустя 75 мин после введения глюкозы голодным животным и на 120-й мин эксперимента величина МГ/ПГ не изменялась по мере увеличения содержания ОГ в гепатоцитах нормальной печени крысы (**рис. 61**). На 45, 60 и 90-й мин гликогенеза изменения данного показателя достигали $\Delta(\text{МГ/ПГ}) = 1.36, 6.61$ и 3.34 усл. ед. (**рис. 61**). В гепатоцитах цирротической печени крысы величина МГ/ПГ не изменялась по мере увеличения содержания ОГ в клетках лишь в состоянии голода животных (0-я мин). После введения глюкозы голодным крысам, в среднем, на различных этапах гликогенеза изменения этого показателя достигали $\Delta(\text{МГ/ПГ}) = 3.18$ усл. ед. (**рис. 62**).

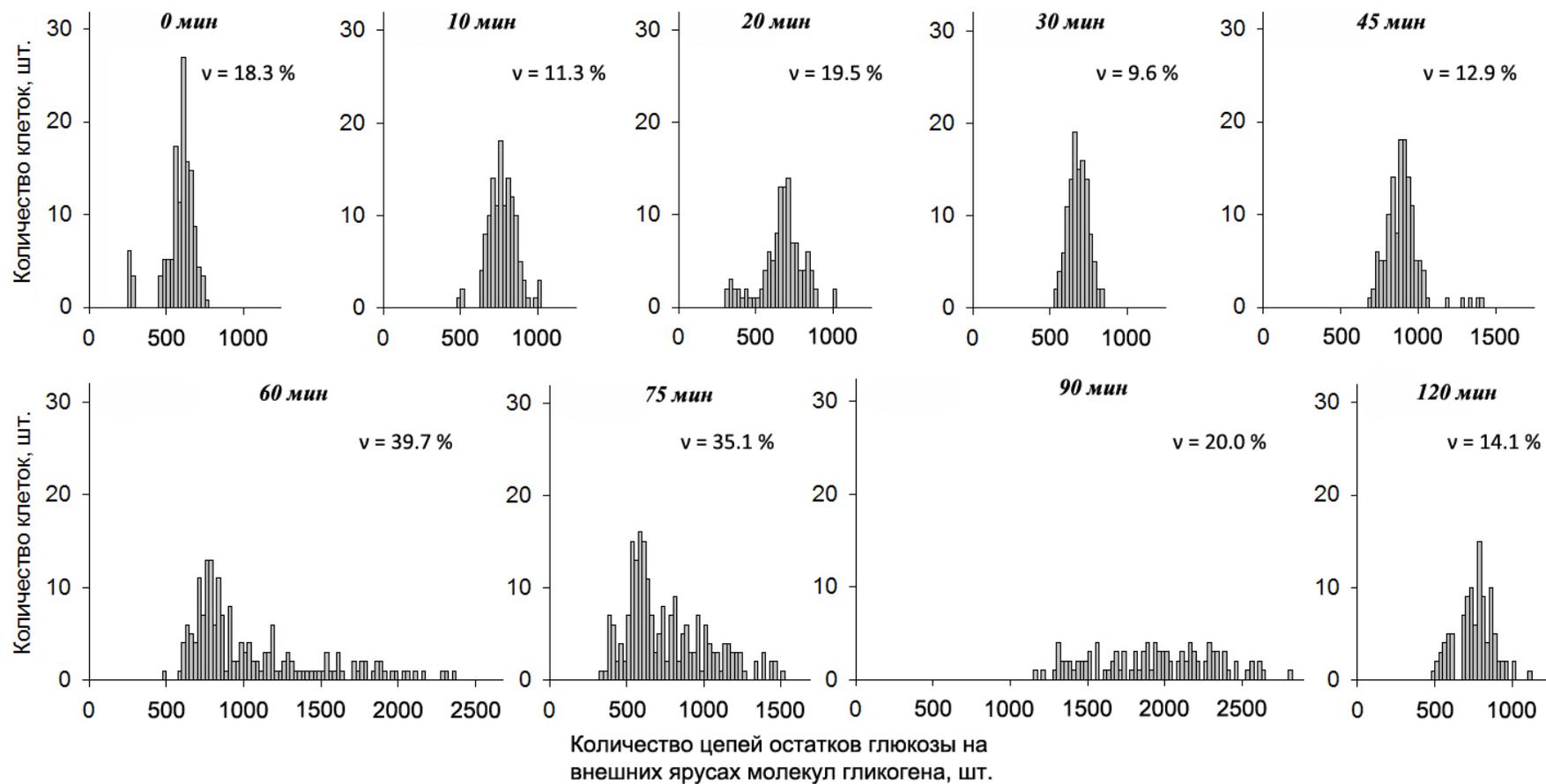


Рис. 59. Гистограммы распределения клеток в популяции гепатоцитов нормальной печени крысы по количеству цепей остатков глюкозы на внешних ярусах молекулы гликогена на разных этапах гликогенеза.

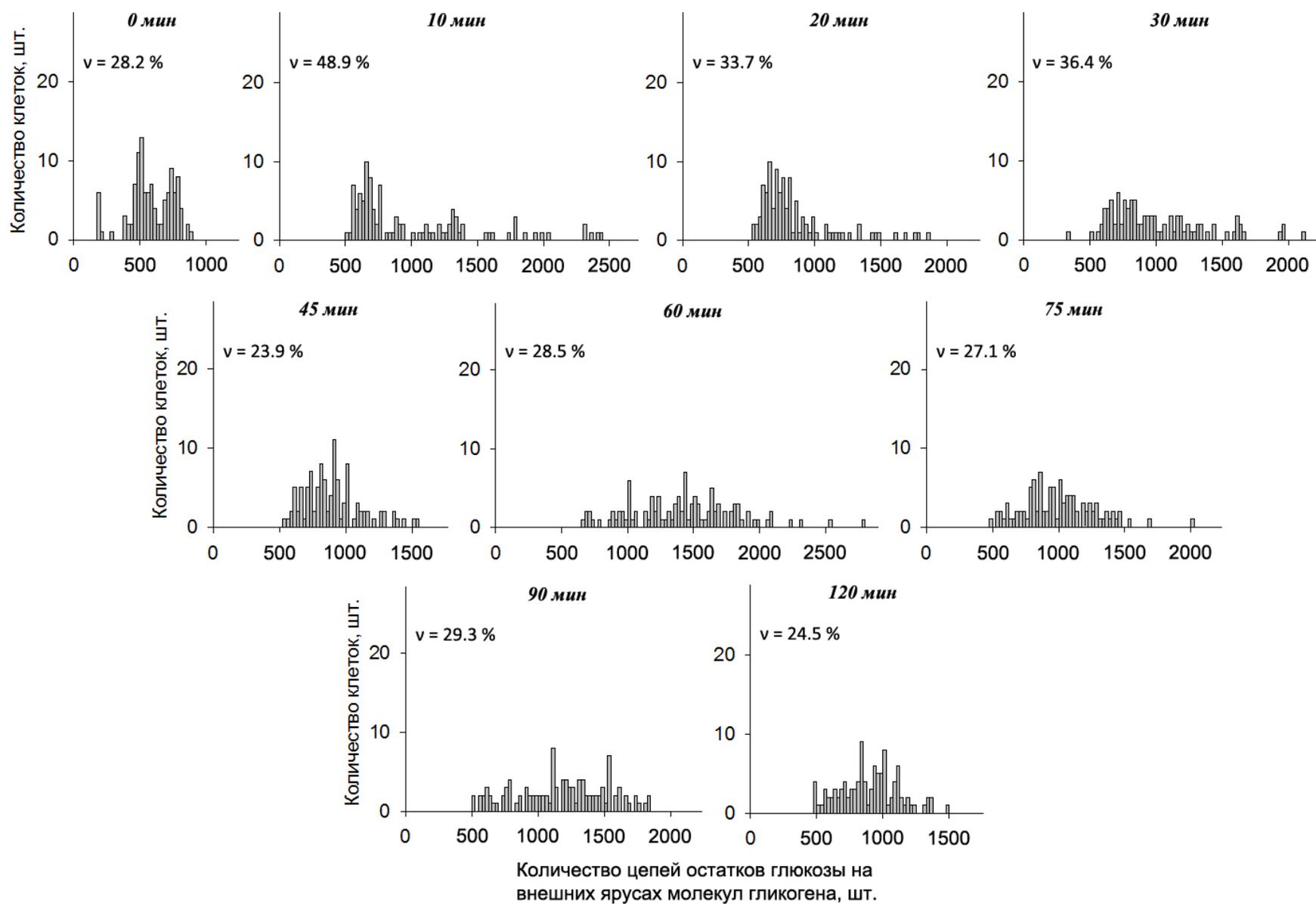


Рис. 60. Гистограммы распределения клеток в популяции гепатоцитов цирротической печени крысы по количеству цепей остатков глюкозы на внешних ярусах молекулы гликогена на разных этапах гликогенеза.

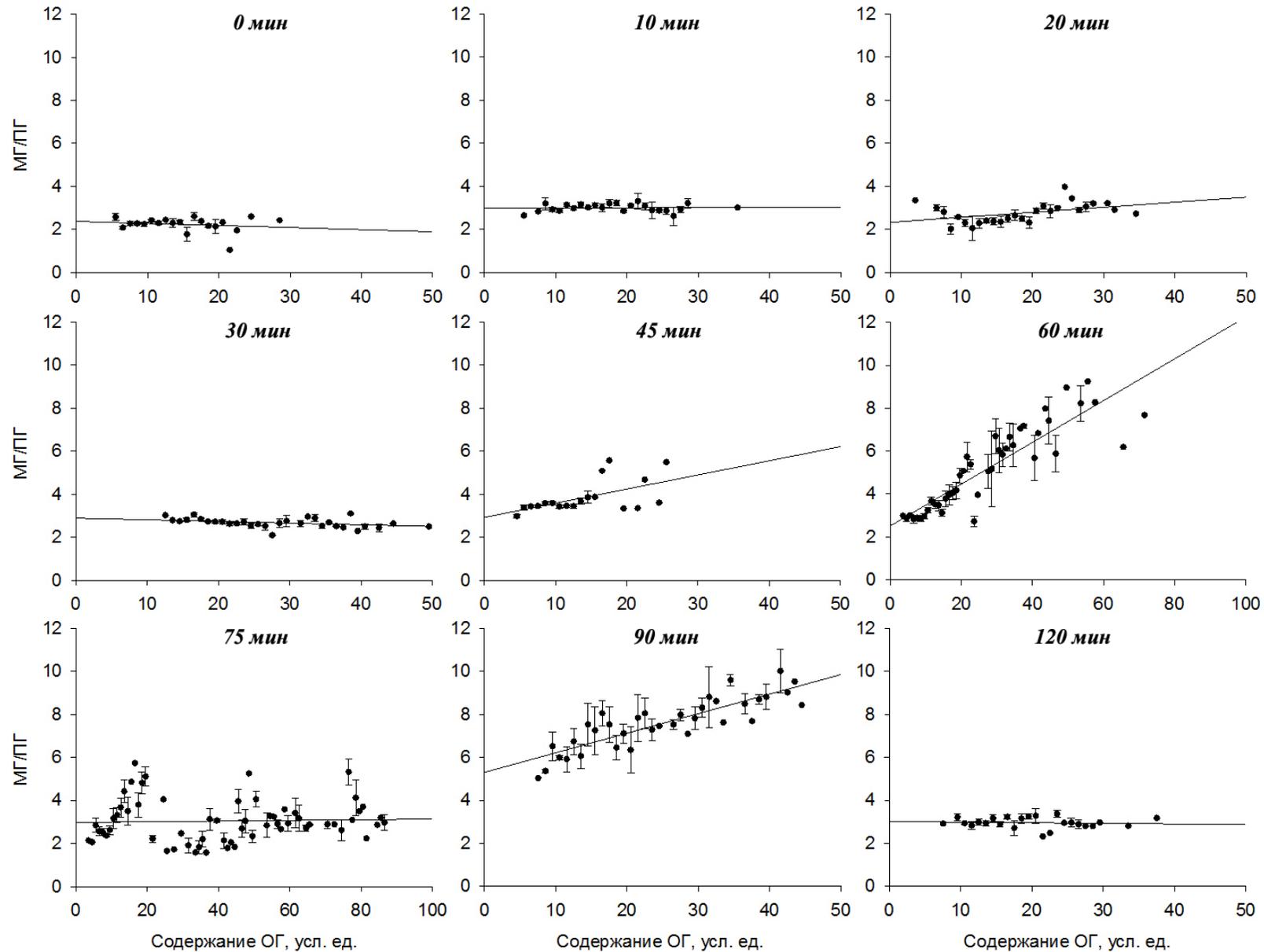


Рис. 61. Зависимость содержания общего гликогена (ОГ) от степени заполнения (усл. ед.) внешних ярусов молекул гликогена (МГ/ПГ) в гепатоцитах нормальной печени крысы на разных этапах гликогенеза. **Примечание:** вертикальные отрезки — ошибка среднего.

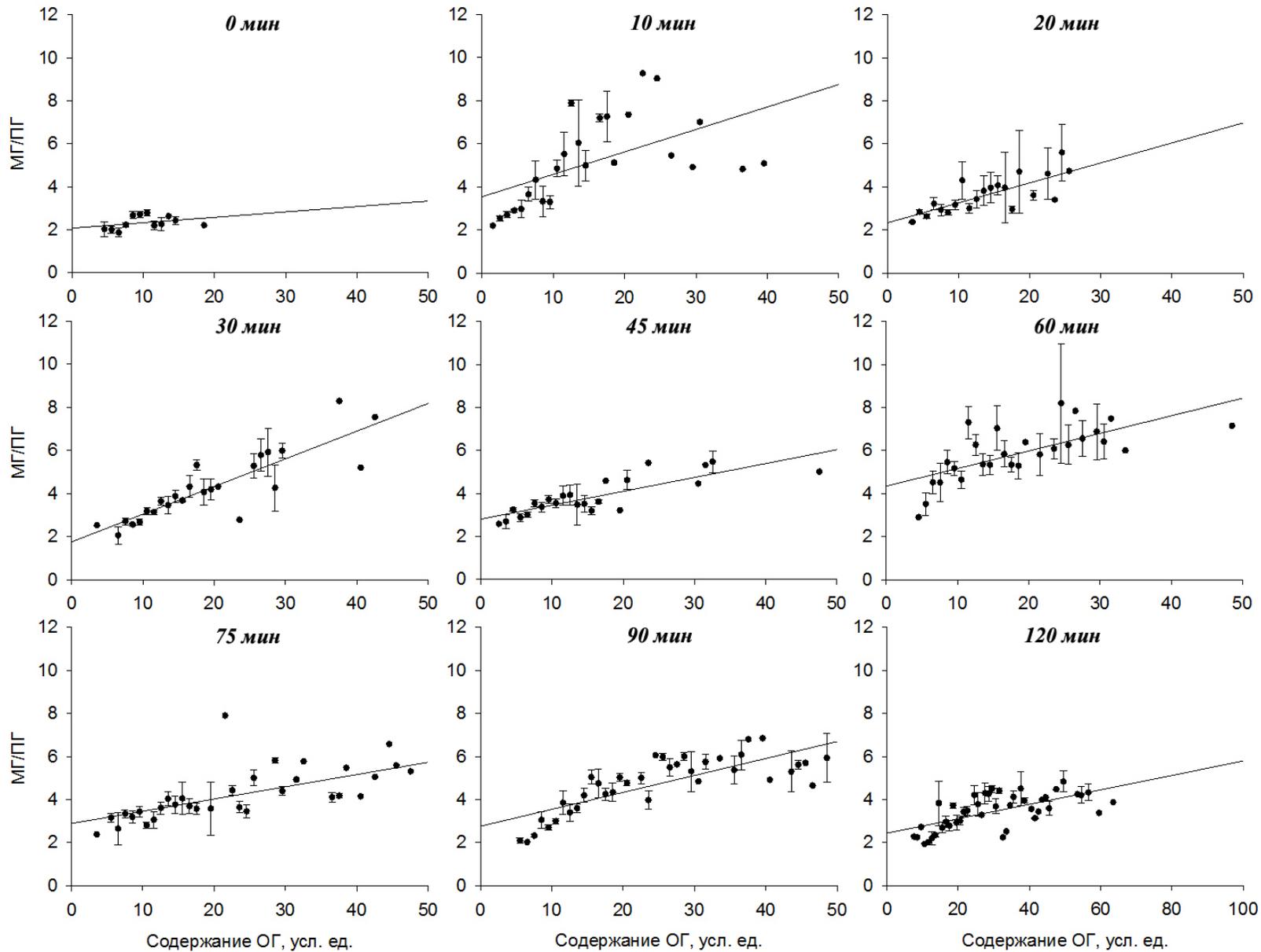


Рис. 62. Зависимость содержания общего гликогена (ОГ) от степени заполнения (усл. ед.) внешних ярусов молекул гликогена (МГ/ПГ) в гепатоцитах цирротической печени крысы на разных этапах гликогенеза. **Примечание:** вертикальные отрезки — ошибка среднего.

3.12. Степень заполнения внешних ярусов β -частиц гликогена в популяции гепатоцитов нормальной и патологически измененной печени человека (Честнова и др., 2015)

В отличие от крысы, для человека отсутствует возможность исследования динамики заполнения внешних ярусов β -частиц гликогена в популяции гепатоцитов в ходе гликогенеза. Биопсийный материал печени человека позволяет получить информацию о степени заполнения внешних ярусов β -частиц гликогена в популяции гепатоцитов нормальной и патологически измененной печени человека лишь для какой-то одной временной точки, характеризующей пищевой статус организма, в данном случае, для постабсорбтивного периода.

Результаты, представленные на **рис. 63**, свидетельствуют о том, что в неповрежденной печени человека распределение ЦОГ очень близко к нормальному с максимумом около 2000 и $v = 40.5 \%$, демонстрируя, что в популяции, по-видимому, встречаются единичные клетки с полностью заполненными ярусами β -частиц (вплоть до 12-го). Однако в большинстве клеток нормальной печени гликоген, в среднем, состоит из β -частиц с полностью заполненными внешними ярусами, вплоть до 11-го. При развитии патологического процесса в гепатоцитах внешние ярусы молекул гликогена становятся менее заполненными. При ХГ и ЦП в гликогене большинства клеток полностью заполненными оказываются лишь 9-й и 10-й ярусы β -частиц.

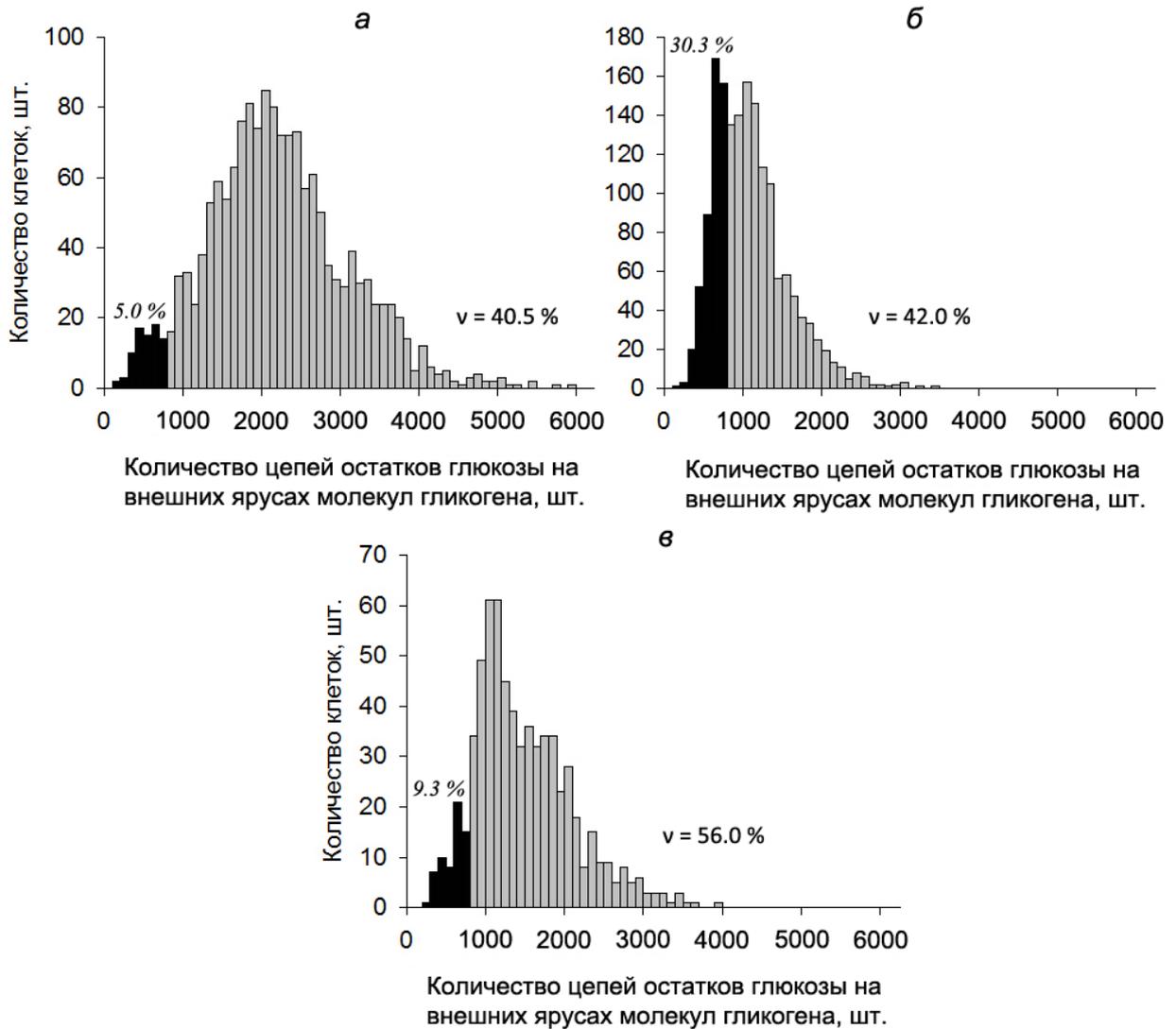


Рис. 63. Гистограммы распределения клеток в популяции гепатоцитов человека по количеству цепей остатков глюкозы на внешних ярусах молекул гликогена в норме (*а*), при хроническом гепатите (*б*) и циррозе печени (*в*).

Примечание: красным цветом обозначена доля клеток с частицами гликогена, в которых глюкозные остатки заполняют 9-й и 10-й ярусы.

3.13. Эффективность FRET в гепатоцитах крысы в ходе гликогенеза (Честнова, 2016)

Определение эффективности FRET (E_{FRET}) в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крысы на разных этапах после введения голодным животным глюкозы показало, что величина этого параметра при патологии значительно отличалась от нормы, а также изменялась в ходе гликогенеза. E_{FRET} в клетках нормальной печени возрастала вдвое уже через 10 мин после начала рефидинга, но далее изменялась незначительно. В клетках цирротической печени E_{FRET} оставалась на уровне близком к таковому у голодных крыс, а затем снижалась примерно в 2 раза. В среднем, E_{FRET} в нормальной печени составила 11.6 %, а в цирротической — 3.5 % (рис. 64).

Следует отметить, что E_{FRET} в клетках измеряется как сигнал от большого количества молекул гликогена с различной степенью заполнения их внешних ярусов. Поскольку R_0 для пары красителей аурамин-бромистый этидий составляет 3.2 нм, а расстояние между соседними ярусами принимается равным ~ 1.9 нм, предполагается, что в фёрстеровском взаимодействии принимают участие молекулы Don (Au), связанные с остатками глюкозы 7–8-го внутренних ярусов β -частицы и молекулы Ac (EtBr), находящиеся на 9–10-м внешних ярусах молекулы гликогена (см. раздел 2.6.4 в главе «Материалы и методы исследования», **рис. 33**). Можно ожидать, что преобладание числа частиц без внешних ярусов (8-ярусных молекул гликогена) приведет к снижению E_{FRET} (поскольку передачи энергии от Don к Ac не произойдет). С другой стороны, внешние 11-й и 12-й ярусы, содержащие наибольшее число остатков глюкозы, не принимают участие в получении энергии от Don, поскольку находятся на расстоянии, превышающем R_0 для используемой в нашей работе пары красителей. Поэтому на уровень E_{FRET} в ходе гликогенеза может влиять степень заполнения 9-го и 10-го внешних ярусов, относительное количество ПГ (8-ярусных частиц) в клетке, а также расстояние между олигосахаридными цепями в молекулах гликогена. Данные, представленные на **рис. 65**, свидетельствуют о том, что в клетках нормальной печени корреляция между E_{FRET} и степенью заполнения внешних ярусов (9–12-го) молекул гликогена наблюдается почти на всех сроках рефиндинга и в некоторых случаях коэффициент корреляции (r) достигает значения 0.74. В отличие от нормы, при ЦП корреляция между E_{FRET} и степенью заполнения внешних ярусов молекул гликогена в подавляющем большинстве случаев отсутствует и достигает достаточно высокого значения (0.55) лишь на одном сроке, 90 мин после начала рефиндинга крыс глюкозой (**рис. 66**). Данные, представленные на **рис. 65** и **рис. 66**, свидетельствуют о том, что E_{FRET} при одной и той же степени заполнения внешних ярусов β -частиц может изменяться в несколько раз, указывая, по-видимому, на подвижность цепей остатков глюкозы на всех стадиях рефиндинга.

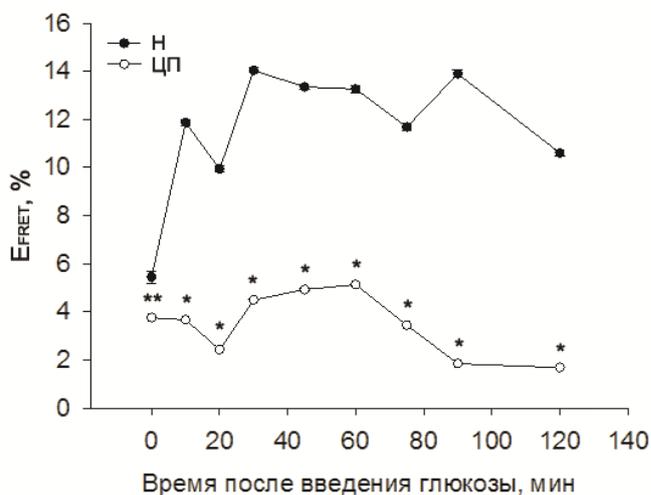


Рис. 64. Эффективность FRET (E_{FRET}) в гепатоцитах нормальной (Н) и цирротической печени (ЦП) крысы на разных этапах гликогенеза.

Примечания: 1) вертикальные отрезки — ошибка среднего; 2) средние значения при ЦП отличаются от значений нормы при уровне значимости * — $p < 0.001$; ** — $p < 0.01$.

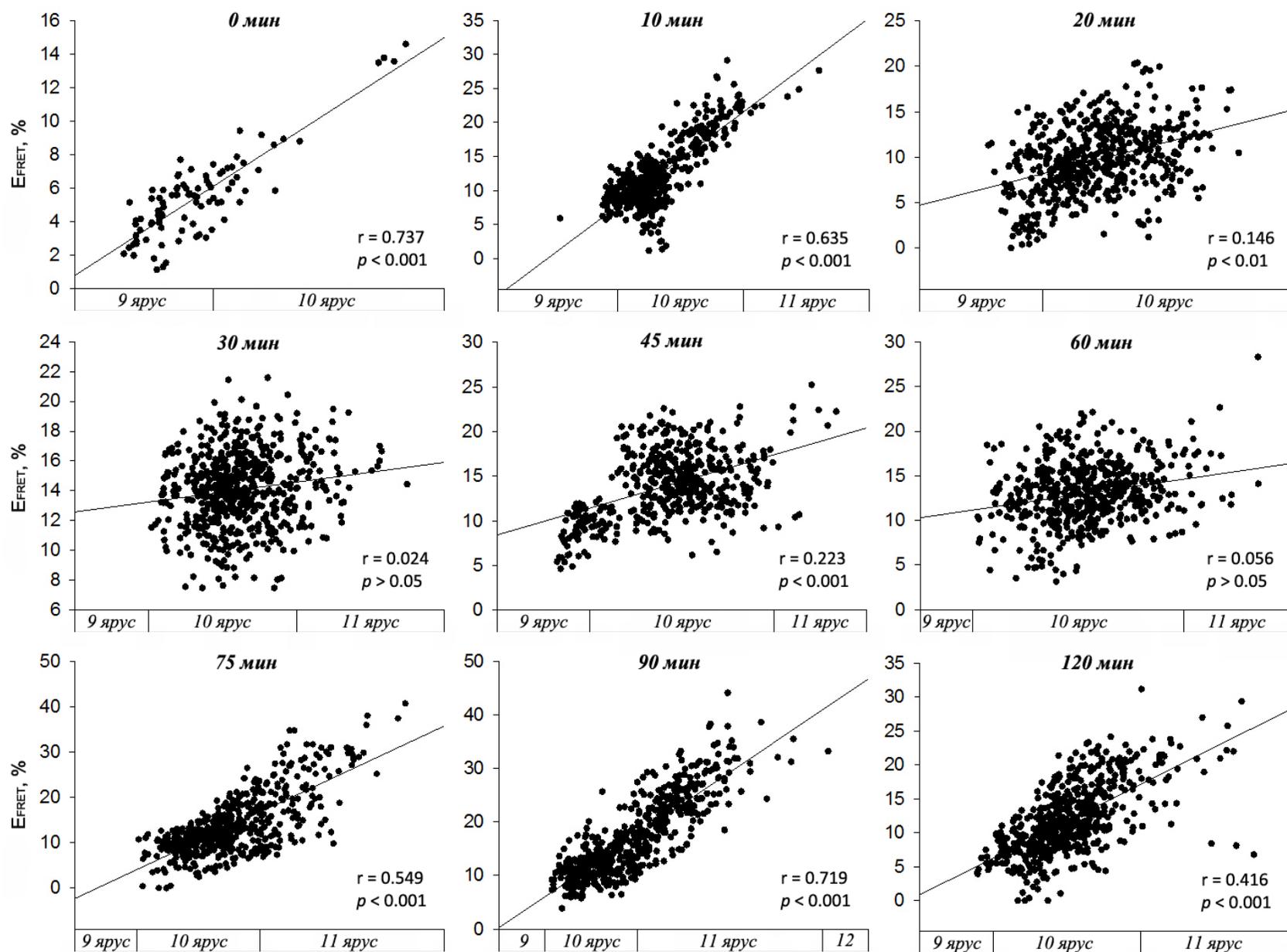


Рис. 65. Зависимость эффективности FRET (E_{FRET}) от степени заполнения внешних ярусов (9–12-го) молекул гликогена в гепатоцитах нормальной печени крысы на разных этапах гликогенеза. **Примечание:** каждая точка на графиках соответствует одной клетке.

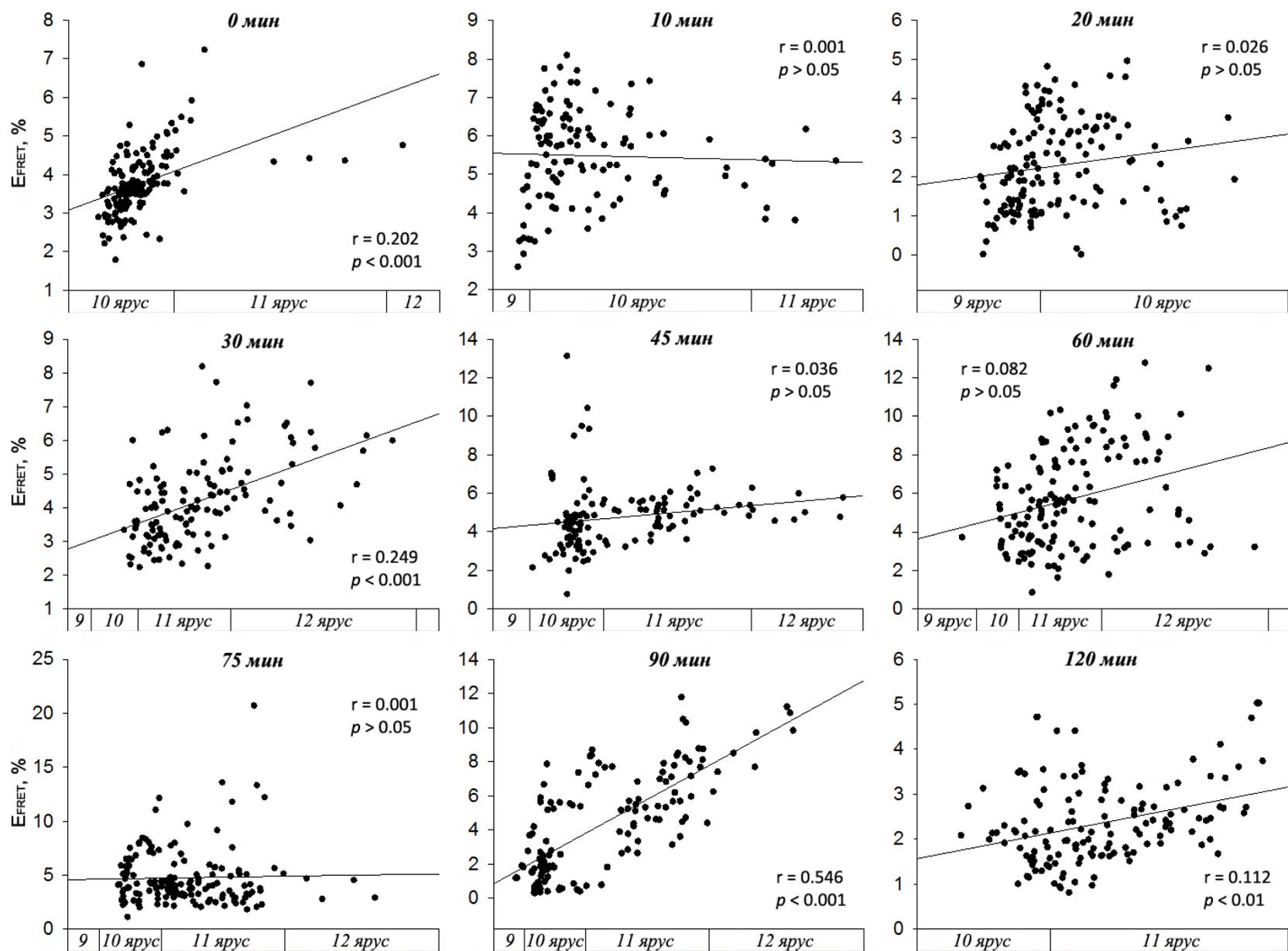


Рис. 66. Зависимость эффективности FRET (E_{FRET}) от степени заполнения внешних ярусов (9–12-го) молекул гликогена в гепатоцитах цирротической печени крысы на разных этапах гликогенеза. **Примечание:** каждая точка на графиках соответствует одной клетке.

3.14. Изменение расстояния между цепями глюкозных остатков в β -частицах гликогена в гепатоцитах крысы в ходе гликогенеза (Честнова, 2016)

Расчеты по формуле (5) (см. раздел 2.6.3 в главе «Материалы и методы исследования») показали, что в нормальной печени крысы расстояние между Don и Ac (r) в частицах гликогена уже через 30 мин после введения глюкозы уменьшается примерно на 17 % ($p < 0.001$) и далее остается на одном уровне (рис. 67). Динамика изменения r в частицах гликогена цирротической печени на первых этапах гликогенеза схожа с нормальной печенью, но после 60 мин рефиндинга r увеличивается и к 120-й мин превышает расстояние у голодных крыс на 11 % ($p < 0.001$) (рис. 67). В среднем, r в частицах гликогена в нормальной печени меньше, чем в β -частицах цирротической печени, составляя 4.401 ± 0.004 нм и 5.447 ± 0.009 нм соответственно ($p < 0.001$).

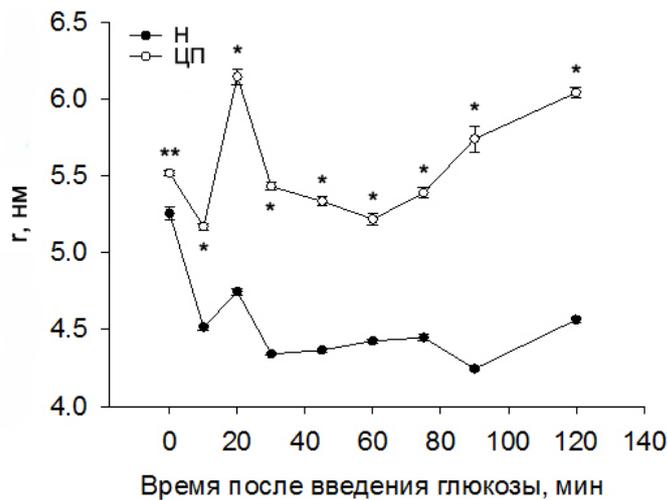


Рис. 67. Расстояние между Don и Ac (r) в молекулах гликогена в гепатоцитах нормальной (Н) и цирротической печени (ЦП) крысы на разных этапах гликогенеза.

Примечания: 1) вертикальные отрезки — ошибка среднего; 2) средние значения при ЦП отличаются от значений нормы при уровне значимости * — $p < 0.001$; ** — $p < 0.01$.

Возможность определить уровень E_{FRET} в каждой отдельно выбранной клетке на предметном стекле позволило рассчитать расстояние между Don и Ac (r) в молекулах гликогена в среднем на клетку. Из представленных графиков (рис. 68 и рис. 69) видно, что по мере заполнения внешних ярусов гликогена остатками глюкозы, r уменьшается. В среднем, за весь период гликогенеза в гепатоцитах нормальной печени r уменьшается на 1.08 ± 0.18 нм, а в гепатоцитах крыс с ЦП — на 0.64 ± 0.21 нм ($p < 0.05$). Наиболее резкое уменьшение r в норме обнаружено на 0, 75, 90 и 120-й мин после введения глюкозы голодным животным ($\Delta r = 1.48$; 1.4; 1.7 и 1.59 нм соответственно) (рис. 68), при ЦП — лишь на одном сроке (90-я мин), где r составила 2.23 нм (рис. 69).

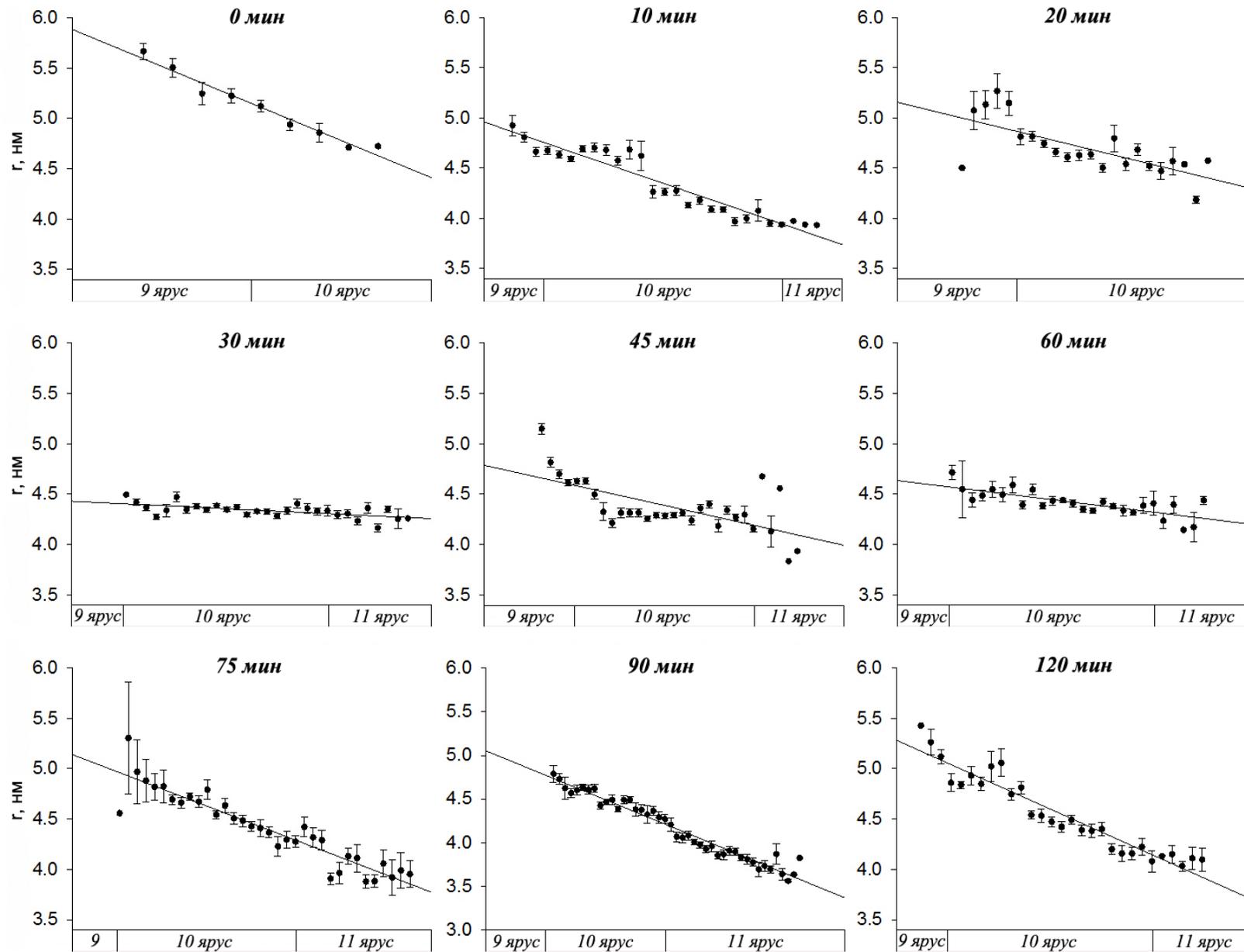


Рис. 68. Зависимость расстояния между Dpn и As (r) от степени заполнения внешних ярусов (9–11-го) молекул гликогена в гепатоцитах нормальной печени крысы на разных этапах гликогенеза. **Примечание:** вертикальные отрезки — ошибка среднего.

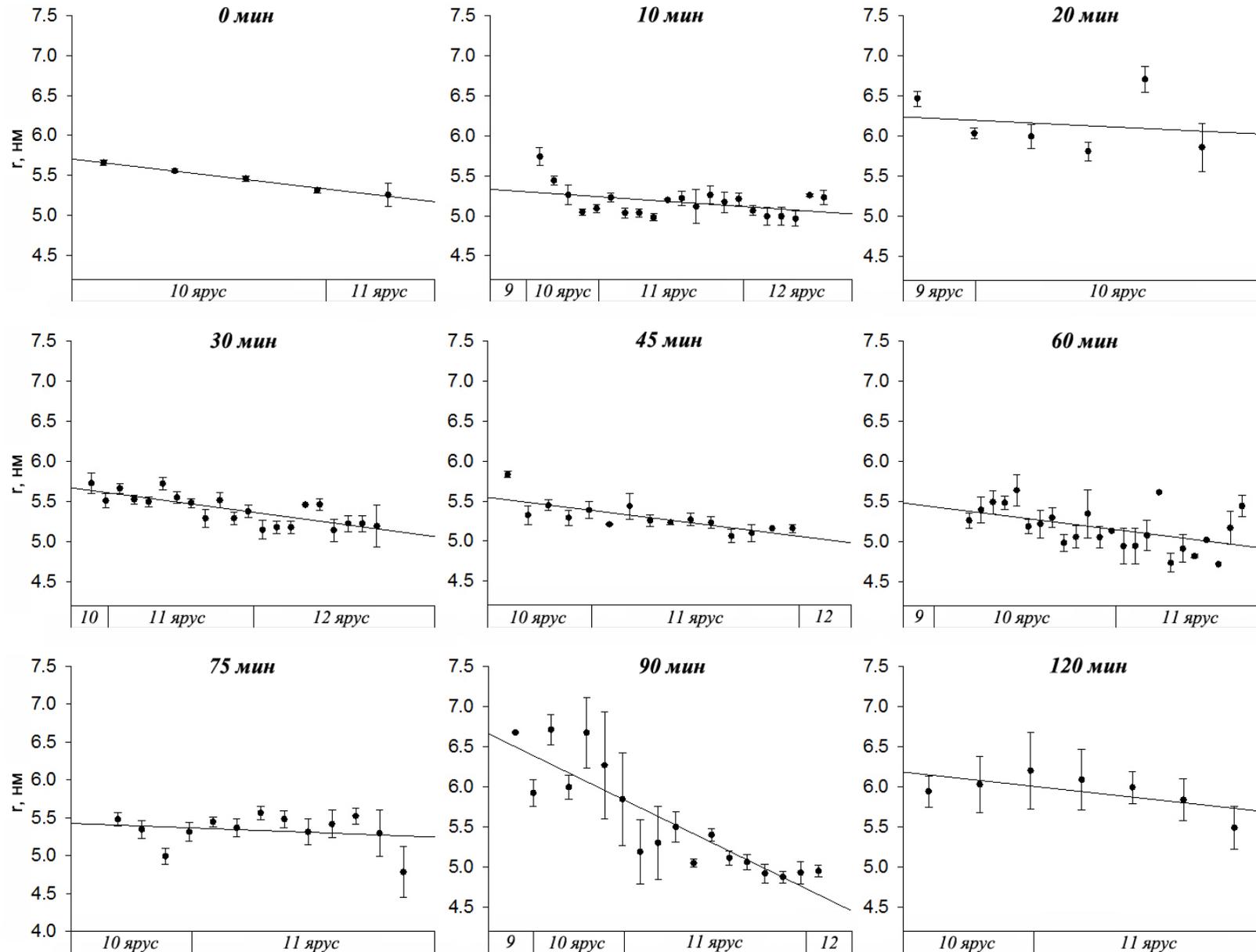


Рис. 69. Зависимость расстояния между Dnp и Ac (r) от степени заполнения внешних ярусов (9–12-го) молекул гликогена в гепатоцитах цирротической печени крысы на разных этапах гликогенеза. **Примечание:** вертикальные отрезки — ошибка среднего.

Используя процедуру АВ (Acceptor Bleaching) можно получить сведения не только о структуре частиц гликогена, но и морфологически выразить передачу энергии от донора к акцептору в виде изображений областей клеток, на которых представлено распределение эффективности сигнала FRET в цитоплазме гепатоцитов. На серии изображений гепатоцитов (**рис. 70**) можно видеть, что уровень E_{FRET} , отмеченный по мере усиления сигнала разным цветом, достаточно четко отражает локализацию частиц гликогена с различной степенью заполнения внешних ярусов.

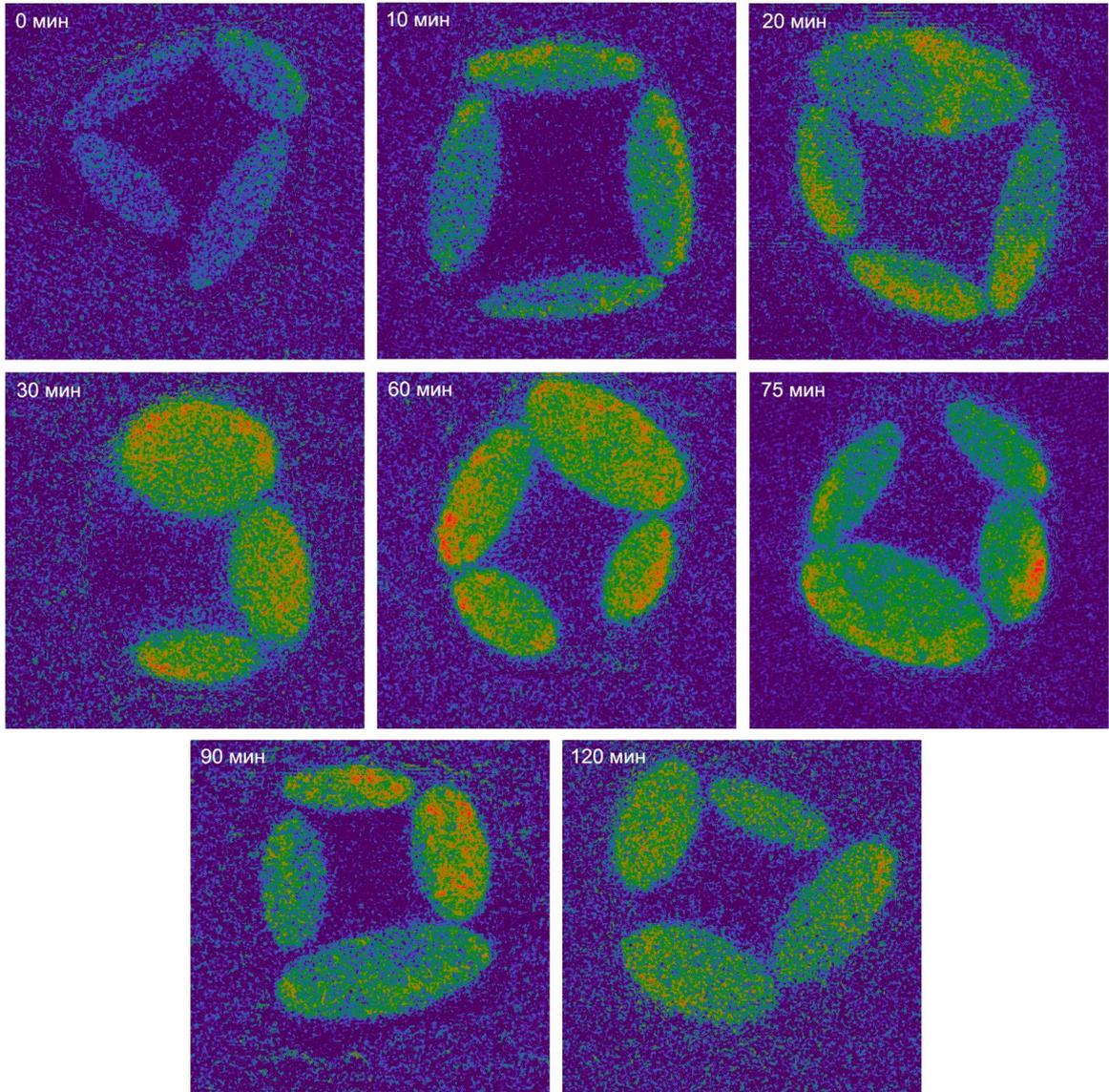


Рис. 70. Распределение сигнала FRET в цитоплазме гепатоцитов крысы на различных этапах гликогенеза.

Примечание: по мере увеличения эффективности FRET (E_{FRET}) цвет локусов, в которых происходит передача энергии от донора к акцептору, изменяется следующим образом: синий→зеленый→оранжевый→красный.

При голодании передача энергии от донора к акцептору слабая. Это проявляется в том, что почти вся клетка окрашена в синий цвет. Зеленый цвет, означающий более высокий уровень

сигнала FRET, заметен лишь на периферии гепатоцитов. Уже через 10 мин после введения глюкозы на периферии клетки появляются оранжевые точки, в которых сигнал FRET выше, чем в зеленых. По мере развития гликогенеза на периферии клеток появляются красные точки, отражающие наиболее высокий сигнал FRET, которые затем распределяются по всей цитоплазме. К концу эксперимента (120-я мин), когда распад гликогена начинает преобладать над его синтезом, количество красных точек уменьшалось, а в некоторых клетках они исчезали.

3.15. Эффективность FRET и ее распределение в цитоплазме гепатоцитов человека в постабсорбтивном периоде (Chestnova et al., 2015b)

E_{FRET} в гепатоцитах нормальной печени человека, в среднем, составила 3 %. По мере развития тяжести поражения печени этот показатель увеличился при ХГ в 1.3 раза ($p < 0.001$), а при ЦП — в 3 раза ($p < 0.001$) по сравнению с нормой (рис. 71).

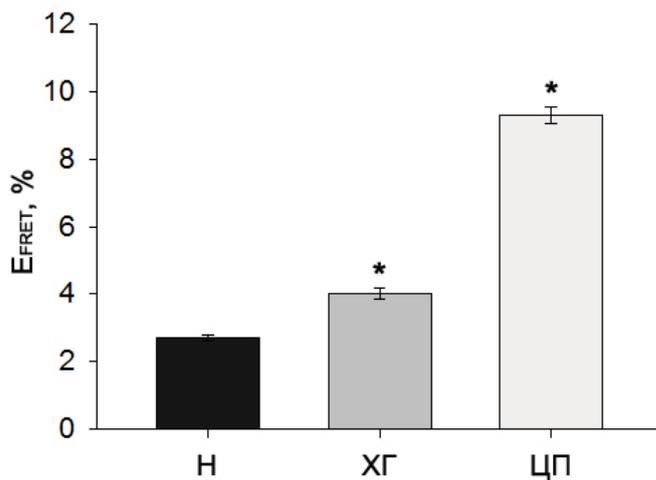


Рис. 71. Эффективность FRET (E_{FRET}) в гепатоцитах человека в норме (Н), при хроническом гепатите (ХГ) и циррозе печени (ЦП).

Примечания: 1) вертикальные отрезки — ошибка среднего; 2) средние значения при ХГ и ЦП отличаются от значения нормы при уровне значимости * — $p < 0.001$.

Исследование зависимости уровня E_{FRET} от степени заполнения внешних ярусов молекул гликогена в гепатоцитах человека показало, что в норме и при ХГ наблюдалась положительная корреляция между этими показателями (рис. 72, а, б), в то время как в гепатоцитах цирротической печени она отсутствовала (рис. 72, в).

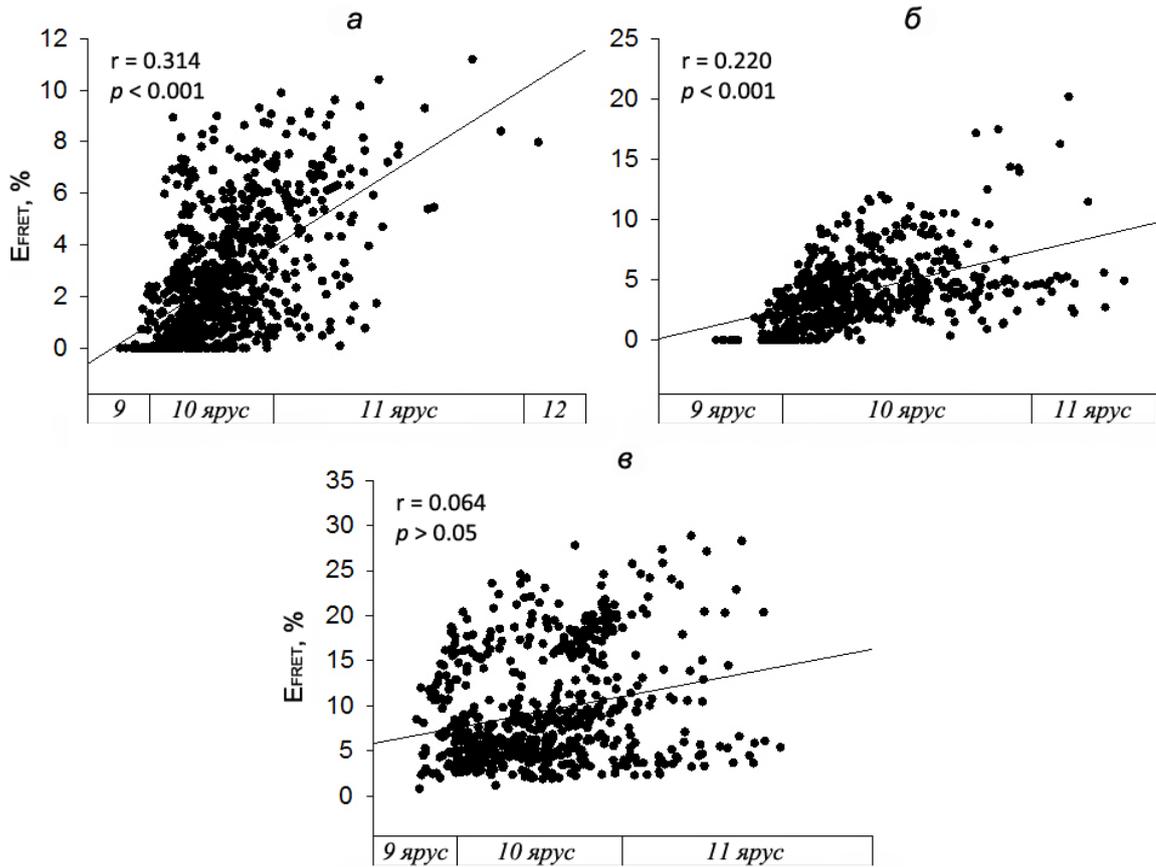


Рис. 72. Зависимость эффективности FRET (E_{FRET}) от степени заполнения внешних ярусов (9–12-го) молекул гликогена в гепатоцитах человека: в норме (*а*), при хроническом гепатите (*б*) и циррозе печени (*в*). **Примечание:** каждая точка на графиках соответствует одной клетке.

3.16. Расстояние между цепями глюкозных остатков в β -частицах гликогена в гепатоцитах человека в постабсорбтивном периоде (Chestnova et al., 2015b)

Определение расстояния между Don и Ac (r) в частицах гликогена, используя формулу (5) (см. раздел 2.6.3 в главе «Материалы и методы исследования»), позволило установить, что в гепатоцитах нормальной печени человека оно составляет, в среднем, 6.14 ± 0.05 нм, при ХГ — 5.69 ± 0.04 нм, а при ЦП — 4.88 ± 0.02 нм ($p < 0.001$) (рис. 73).

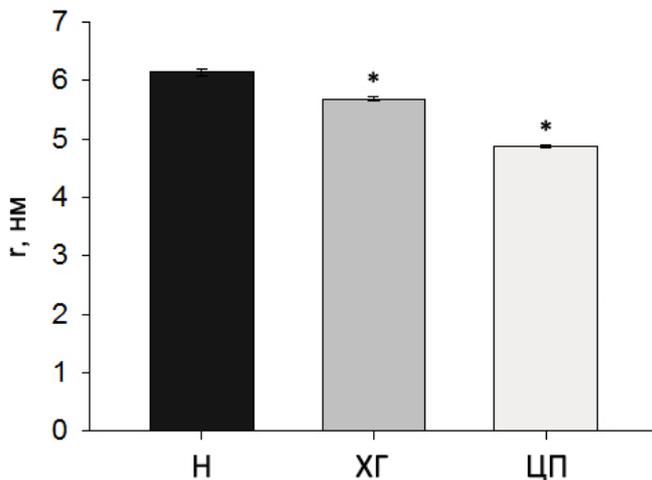


Рис. 73. Расстояние между Don и Ac (r) в молекулах гликогена в гепатоцитах человека в норме (Н), при хроническом гепатите (ХГ) и циррозе печени (ЦП). **Примечания:** 1) вертикальные отрезки — ошибка среднего; 2) средние значения при ХГ и ЦП отличаются от значения нормы при уровне значимости *— $p < 0.001$.

Исследование распределения клеток по r в популяции гепатоцитов показало, что гетерогенность клеток по этому показателю уменьшается по мере развития тяжести поражения печени. В нормальной печени коэффициент вариации для r составил 20.9 %, при ХГ — 16.4 %, а при ЦП — 12.0 % (рис. 74).

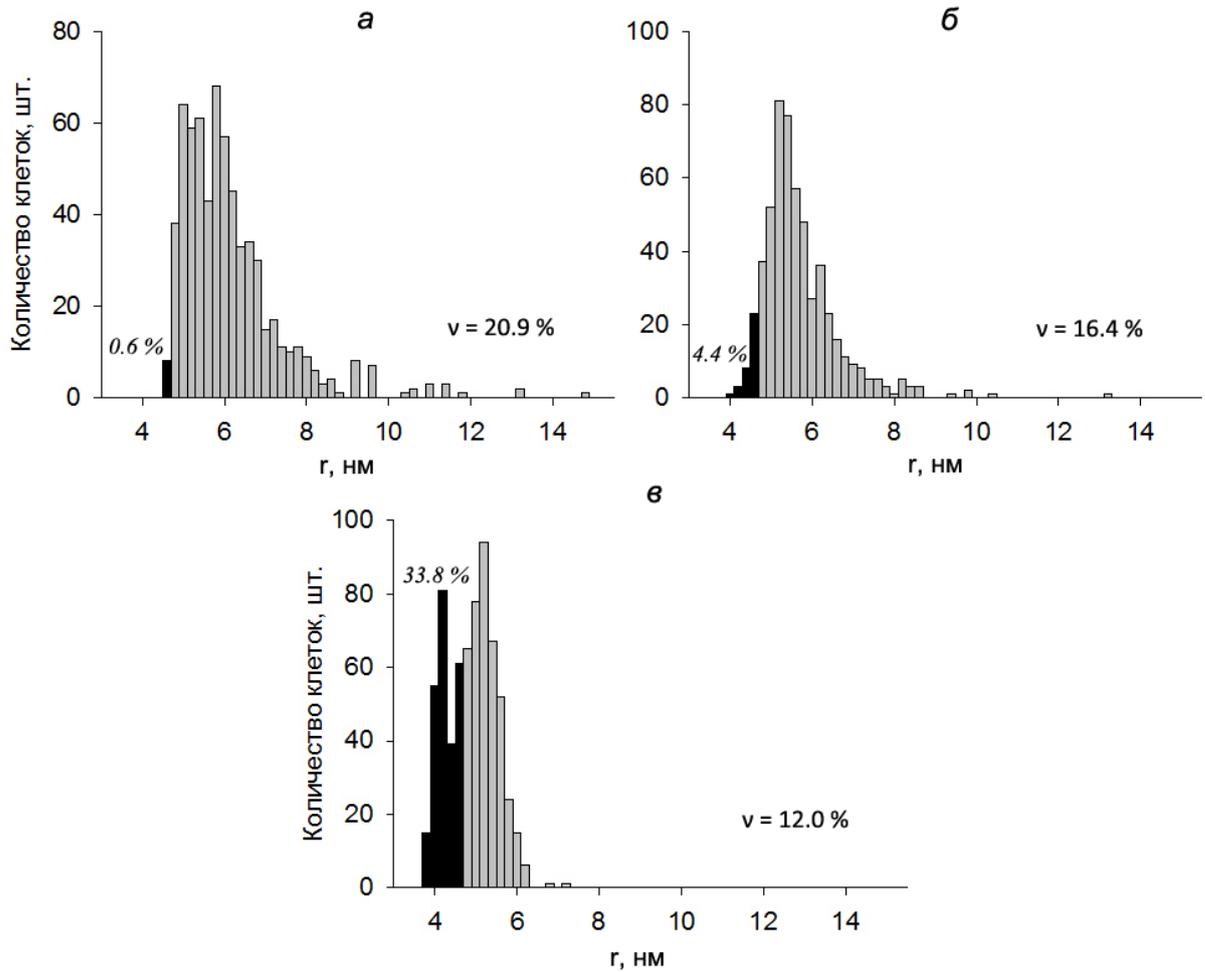


Рис. 74. Гистограммы распределения клеток в популяции гепатоцитов человека по расстоянию между Dpn и Ac (r) в молекулах гликогена в норме (а), при хроническом гепатите (б) и циррозе печени (в).

Примечание: красным цветом обозначена доля клеток с частицами гликогена, в которых расстояние между Dpn и Ac (r) не превышает фёрстеровского взаимодействия.

По мере заполнения внешних ярусов молекул гликогена остатками глюкозы в гепатоцитах человека в норме r , в среднем, уменьшается на 2.94 нм, при ХГ — на 2.03 нм, а при ЦП — на 0.55 нм (рис. 75).

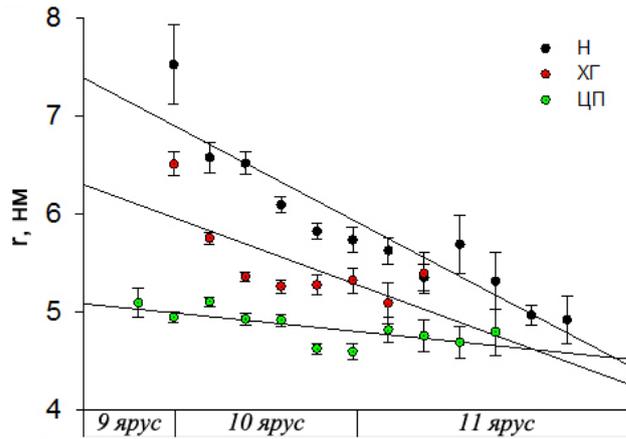


Рис. 75. Зависимость расстояния между Don и Ac (r) от степени заполнения внешних ярусов (9–11-го) молекул гликогена в гепатоцитах человека: в норме (Н), при хроническом гепатите (ХГ) и циррозе печени (ЦП).
Примечание: вертикальные отрезки — ошибка среднего.

Анализ распределения сигнала FRET в цитоплазме гепатоцитов человека (**рис. 76**) показал, что передача энергии от донора к акцептору осуществляется с достаточно высокой эффективностью, поскольку подавляющее большинство зон в цитоплазме гепатоцитов окрашено в «зеленый» цвет. В синий цвет окрашены лишь области наиболее близкие к ядру. При ХГ все области, в которых происходит передача энергии помимо зеленых локусов, содержат большое количество оранжевых точек. В цитоплазме гепатоцитов цирротической печени наблюдаются немногочисленные области зеленого цвета, но значительно большее пространство в ней занимают области, окрашенные в оранжевый и даже красно-малиновый цвет.

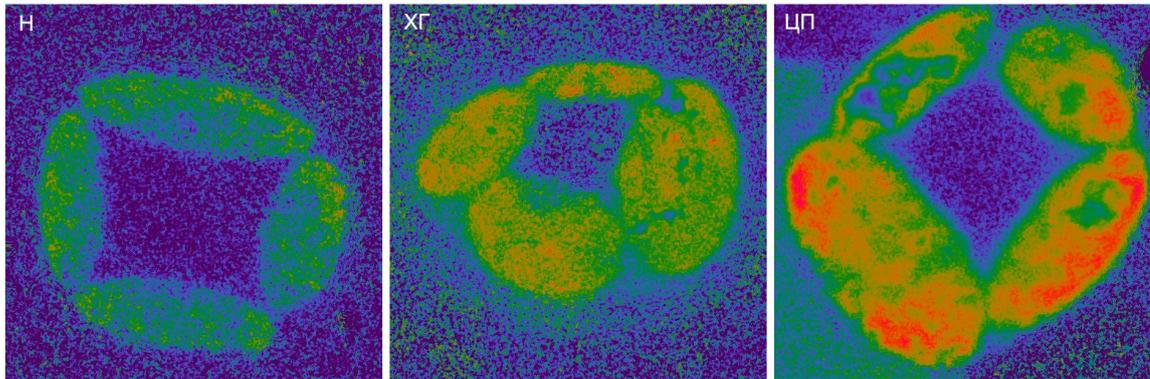


Рис. 76. Распределение сигнала FRET в цитоплазме гепатоцитов человека в постабсорбтивном периоде.
Примечание: по мере увеличения эффективности FRET (E_{FRET}) цвет локусов, в которых происходит передача энергии от донора к акцептору, изменяется следующим образом: синий→зеленый→оранжевый→красный.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Хронические гепатиты различной этиологии — широко распространенные заболевания человека и животных. Основными причинами этих болезней печени у человека являются вирусные инфекции, вызываемые гепатотропными вирусами, прежде всего В и С, а также систематический прием алкоголя, наркотики и различные лекарственные препараты, обладающие побочным гепатотоксическим действием. Наиболее тяжелой и опасной для жизни человека является завершающая стадия развития хронического гепатита — цирроз печени (ЦП). ЦП нередко заканчивается печеночной недостаточностью или гепатоцеллюлярной карциномой. Эффективные способы радикального излечения ЦП в настоящее время отсутствуют (Hackl et al., 2016; Khan, Newsome, 2016; Lopez-Delgado et al., 2016).

В эксперименте ЦП обычно получают путем хронического отравления животных четыреххлористым углеродом (CCl_4). Показано, что хроническая интоксикация животных CCl_4 воспроизводит основные характерные черты ЦП у человека (Chen, Hwang, 1994; Canturk, 1999; Planaguma et al., 2005). Механизм повреждающего действия CCl_4 на гепатоциты заключается в том, что под действием микросомальных оксидаз в клетках образуются продукты его распада — свободные радикалы, которые вызывают повреждение и гибель клеток (Britton, Bacon, 1994). Поскольку системы детоксикации чужеродных веществ, в т.ч. CCl_4 , поступающих в организм млекопитающих, локализованы преимущественно в центральных зонах долек печени, центролобулярные гепатоциты повреждаются сильнее, чем гепатоциты, расположенные в портальных зонах долек печени (Kohn et al., 1991; Kanai et al., 1992). Свободные радикалы, образующиеся при метаболизме CCl_4 , способствуют перекисному окислению липидов эндоплазматического ретикулума, приводя к деструкции его мембран. Каскад реакций, развивающихся дальше, приводит к образованию из липидов мембран всё новых и новых свободных радикалов, которые вторично повреждают другие органеллы и молекулы клетки. Все эти процессы, в конце концов, оказывают разрушающее действие на гепатоциты, вызывая их стеатоз и некроз (Recknagel, Glende, 1973). Показано, что стеатоз, развивающийся вследствие нарушения транспорта триглицеридов, приводит к снижению содержания цитохрома Р-450 и активности глюкозо-6-фосфатазы в гепатоцитах (Cignoli, Castro, 1971; Кудрявцева и др., 1994; Kudyavtseva et al., 2003).

Морфологическая картина развития CCl_4 -цирротического поражения печени подробно описана во многих работах (Zimmerman, 1978; Верин, 1984; Onori, 2000). В результате интоксикации CCl_4 центролобулярный некроз гепатоцитов приводит к замещению зон некроза соединительной тканью и стимуляции пролиферации печеночных клеток в узлах регенерации. При этом соединительная ткань образуется не только у центральных вен, но и по ходу всего

венозного русла. Воспалительная реакция в портальных полях сопровождается разрастанием соединительной ткани и по ходу портальных сосудов. Пролиферация гепатоцитов, стимулированная их гибелью, ведет к возникновению многорядных балок, а в дальнейшем — к беспорядочным скоплениям печеночных клеток.

Гистологическое исследование срезов печени крысы показало, что у контрольных животных структура паренхимы типична для нормального органа. Она характеризуется радиально расположенными трабекулами гепатоцитов вокруг центральных сосудов, небольшим количеством соединительной ткани и четко выраженными границами портальных сосудов и желчных протоков (**рис. 34, а, б**). В отличие от крыс контрольной группы, у животных, подвергавшихся в течение 6 мес хронической интоксикации CCl_4 , развивается типичный ЦП, который характеризуется заметным увеличением объема соединительной ткани (более, чем в 4 раза) (Безбородкина и др., 2008), появлением очагов лейкоцитарных инфильтратов и нарушением дольковой структуры органа (**рис. 34, в, г**).

Микроскопический анализ срезов печени человека подтвердил, что в норме структура паренхимы печени человека, как и у крысы, характеризуется радиально расположенными трабекулами гепатоцитов вокруг центральных вен, четко выраженными портальными сосудами и желчными протоками (**рис. 35, а**). При развитии цирроза происходит значительное нарушение дольковой структуры печени (**рис. 35, б**), в паренхиме наблюдается массовая гибель гепатоцитов и увеличение количества соединительной ткани. Дольковая структура печени человека, как и у крысы, при этом нарушается, образуются так называемые «ложные дольки» (**рис. 35, б**), в которых резко выражен клеточный и ядерный полиморфизм.

Характерной особенностью регенерации печени при хронической интоксикации крыс CCl_4 является то, что каждый раз повреждающее действие токсина на печень происходит на фоне незавершенного регенераторного ответа органа, при достаточно высокой пролиферативной активности ткани. В нашем эксперименте токсические воздействия повторялись каждые 2–3 дня, что вызывало отставание пролиферативных процессов в паренхиме от разрастания соединительной ткани и, как следствие, развитие ЦП. Проллиферативная реакция паренхимы печени при хроническом воздействии гепатотоксином характеризуется, во-первых, тем, что вступление гепатоцитов в клеточный цикл не всегда заканчивается делением клетки. В результате незавершенных митозов в паренхиме печени накапливается значительное количество полиплоидных клеток.

Данные, представленные в **таблице 3**, свидетельствуют о том, что в течение 6 мес гепатотоксического воздействия CCl_4 на печень крысы происходит полиплоидизация ее паренхимы. Основными чертами этого процесса являлось снижение доли $2c \times 2$ -гепатоцитов и увеличение относительного количества высокоплоидных клеток. Через 6 мес хронического

воздействия на крыс CCl_4 количество $2c \times 2$ -гепатоцитов в цирротической печени снизилось на 25 %, в то время как доля октаплоидных гепатоцитов увеличилась примерно в 2.4 раза по сравнению с нормальной печенью крыс того же возраста. Кроме того, в цирротической печени появлялись гепатоциты, не характерные для печени контрольных крыс — одноядерные $16c$ - и даже двуядерные $16c \times 2$ -клетки. Среднее число геномов на клетку в ходе развития экспериментального ЦП возрастало на 6.5 %. Таким образом, в печени крыс, подвергавшихся в течение 6 мес гепатотропному воздействию, происходят значительные изменения в распределении гепатоцитов по классам ploидности, свидетельствующие о повреждении паренхимы и ее регенераторном ответе.

Усиление полиплоидизации клеток печени продемонстрировано во многих экспериментах с воздействием на печень различных токсических веществ, в том числе CCl_4 (Vitalis, 1975; Фактор, Урываева, 1980; Бродский, Урываева, 1981; Melchiorri et al., 1993). Показано, что усиление процессов полиплоидизации в печени при воздействии на нее различными агентами сопровождается значительными изменениями в соотношении классов ploидности клеток ее паренхимы (Туманишвили, 1973; Солопаев, 1980; Завадская, 1989). При хроническом воздействии CCl_4 в печени крыс и мышей отмечено падение относительного числа $2c$ - и $2c \times 2$ -гепатоцитов и появление высокоploидных клеток, не характерных для нормального органа (Фактор, Урываева, 1980; Бродский, Урываева, 1981).

Усиление пролиферативной активности гепатоцитов и, вследствие этого, изменение распределения их по классам ploидности также является характерным признаком различных патологий печени человека, в частности вирусного гепатита, жирового гепатоза, внепеченочного холестаза и цирроза (Koike et al., 1982; Fang et al., 1994; Melchiorri et al., 1994). Считается, что отличительной особенностью полиплоидизации печени человека при хронических патологиях является заметное накопление $2c \times 2$ -гепатоцитов (Кудрявцев и др., 1982, 1993). Данные, представленные в **таблице 4**, свидетельствуют о том, что, в отличие от крысы, развитие ЦП у человека не сопровождается полиплоидизацией паренхимы печени, поскольку уровни ploидности гепатоцитов при ЦП, в среднем, не только не возрастают, но даже снижаются по сравнению с нормой (**Таблица 4**). При этом мы не обнаружили увеличения относительного количества $2c \times 2$ -гепатоцитов по сравнению с нормой (**Таблица 4**).

Интересной особенностью клеточной популяции паренхимы печени при ЦП является увеличение доли одноядерных диплоидных ($2c$) гепатоцитов по сравнению с нормой, как у крысы, так и человека: в цирротической печени крысы доля $2c$ -клеток увеличивается в 2.7 раза, а у человека — на 19 % по сравнению с нормой. Усиленную пролиферацию $2c$ -гепатоцитов при ЦП ранее наблюдали и другие авторы (Сакута, 1997; Сакута, Кудрявцев, 2005; Безбородкина, 2006). По-видимому, это явление связано с более высокой способностью $2c$ -гепатоцитов к

вступлению в митотический цикл по сравнению с клетками более высоких классов ploидности (Урываева, Маршак, 1969; Watanabe, 1970). Полученные данные предполагают, что репаративная регенерация печени у большинства пациентов с ЦП осуществляется в основном за счет пролиферации одноядерных диплоидных гепатоцитов. Полиплоидизация клеток при репаративном росте печени может играть заметную роль лишь у отдельных больных (Кудрявцев и др., 1993).

Известно, что наряду с пролиферацией и полиплоидией, гипертрофия клеток также играет существенную роль в нормальном и репаративном росте различных органов (Бродский и др., 1983; Арефьева и др., 1993; Arosio et al., 1993). Обычно клеточную гипертрофию связывают с увеличением числа геномов в клетке, которое неизбежно приводит к увеличению ее размера (Бродский, Урываева, 1981). Значительно реже производится оценка собственно гипертрофии клеток, не связанной с увеличением ploидности клетки или предмитотическими синтезами. Клеточную гипертрофию, обусловленную увеличением размеров цитоплазмы, рассматривают как своеобразную форму регенерации, обеспечивающую увеличение количества специфических структурных образований внутри клеток и направленную на компенсацию нарушенных функций (Саркисов, 1970; Рябинина, Бенюш, 1973). Определение степени гипертрофии клеток имеет важное значение для понимания механизмов нормального и репаративного роста органа. Точная оценка гипертрофии клетки, не связанной с ее ploидностью, может быть достигнута путем параллельного определения уровня ploидности клетки и объективных показателей ее размера, не зависящих от факторов, модулирующих геометрические параметры клетки. Таким показателем клеточных размеров в изменяющихся условиях эксперимента может быть сухая масса клеток, большую часть которой (до 80 %) составляет общий белок (Гизе, 1959).

Сухая масса гепатоцита (СМГ), измеренная с помощью интерференционного микроскопа, составила у взрослых крыс контрольной группы, содержащихся в обычных условиях, в среднем, 685 ± 2 пг. Эта величина достаточно хорошо согласуется со значениями сухой массы клеток паренхимы печени, измеренной другими авторами. В частности, Тонгиани с соавторами (Tongiani et al., 1976) показали, что СМГ нормальной печени взрослой крысы составляет 603 пг, а Шимер (Schiemer, 1981) установил, что сухая масса цитоплазмы клеток печени взрослой крысы — 594 пг. Поскольку сухая масса ядер гепатоцитов взрослой крысы — около 81 пг (Tongiani et al., 1976), СМГ составит около 675 пг. Еще в одной работе было найдено, что СМГ взрослой крысы составляет 681 ± 21 пг (Завадская и др., 1989).

Определение СМГ крысы при ЦП показало, что сухая масса клеток возрастает по сравнению с нормой на 25–40 % (**Таблица 7**), свидетельствуя о значительной гипертрофии клеток. Схожее и даже большее увеличение СМГ или содержания в них белка при ЦП

различной этиологии отмечалось во многих работах (Tongiani et al., 1976; Завадская и др., 1989; Fang et al., 1994; Melchiorri et al., 1994; Сакута, Кудрявцев, 2005; Bezborodkina et al., 2008). Например, было показано, что при длительном хроническом отравлении крыс CCl_4 СМГ увеличивалась на стадии ЦП на 63 % по сравнению с нормой (Завадская и др., 1989), а при ЦП, вызванном тиацетамидом, СМГ возрастала примерно на 65 % по сравнению с одновозрастным контролем (Tongiani et al., 1976).

Несмотря на наблюдающуюся при ЦП гипоальбуминемию и белковую дистрофию части паренхимы печени, имеются данные о том, что содержание белка в гепатоцитах циррозной печени увеличивается, что может быть обусловлено двумя причинами. С одной стороны, подобное увеличение может быть связано с усилением белок-синтетической активности гепатоцитов, наблюдающейся при интенсивной регенерации печени (Hickenbottom, Hornbrook, 1971; Schreiber et al., 1971; Arosio et al., 1993). С другой стороны, имеются сведения о том, что CCl_4 оказывает повреждающее воздействие на мембранные структуры эндоплазматического ретикулула клетки, приводя тем самым к ухудшению секреции белков, синтезируемых гепатоцитами. В результате этого белки могут накапливаться в цитоплазме гепатоцитов, вызывая их гипертрофию (Ляхович и др., 1973; Серов, 1980; Okazaki, Maruyama, 1985).

Результаты, представленные в **таблице 7**, свидетельствуют также о том, что в каждом классе плоидности СМГ у крыс опытной группы заметно превышает СМГ соответствующей плоидности контрольных крыс. При этом важно отметить, что средние значения СМГ в нормальной и цирротической печени изменяются пропорционально с изменением плоидности клеток (**рис. 43**). Соответствие дозе генов сухой массы клеток и содержания в них белка продемонстрировано во многих работах (James et al., 1979; Шалахметова и др., 1981; Engelmann et al., 1981; Завадская и др., 1989). Данные о том, что СМГ пропорционально возрастает с увеличением уровня плоидности клеток, позволяют определить вклад плоидности клеток и гипертрофии их цитоплазмы в общее увеличение СМГ при ЦП. Расчеты показали, что СМГ в ходе развития ЦП на 15.3 % увеличивается за счет повышения плоидности клеток и, гораздо сильнее, на 84.7 % — за счет роста их цитоплазмы, т.е. гипертрофии клеток.

Результаты интерферометрии показали, что СМГ в нормальной печени человека составляет, в среднем, 585 ± 8 пг, а при ЦП она увеличивается на 6.8 % по сравнению с нормой ($p < 0.05$) и достигает 624.5 ± 10.0 пг. Величины СМГ человека, полученные в представленной работе, согласуются с немногочисленными данными других авторов. В частности, в работе Завадской с соавторами (Завадская и др., 1983) было найдено, что СМГ в нормальной печени человека составляет 431.4 ± 22.1 пг, а при ЦП — 640.0 ± 49.2 пг. Более низкие значения СМГ нормальной печени человека, полученные Завадской с соавторами, возможно, обусловлены тем, что в их работе, в отличие от нашей, измерения СМГ были проведены на биопсийном

материале молодых людей, средний возраст которых составил 29 лет. Средний возраст пациентов в нашей работе составил 44 года.

Расчет относительного вклада полиплоидии и гипертрофии гепатоцитов в увеличение их сухой массы при ЦП позволил установить, что, в отличие от крысы, увеличение СМГ человека при ЦП происходит только за счет роста их цитоплазмы. Полиплоидия не играет какой-либо роли ни в увеличении сухой массы клеток паренхимы цирротической печени, ни в изменении массы органа в целом.

Цирроз связан не только со значительной перестройкой архитектоники печени, но и с существенными сдвигами в метаболизме этого органа, в частности, с нарушением одной из главных его функций — глюкостатической. Синтез и расщепление гликогена, которые происходят в клетках паренхимы печени — гепатоцитах, являются одними из основных механизмов гомеостаза глюкозы в крови. Во время приема пищи гликоген в гепатоцитах накапливается, а при голодании, стрессе, физической нагрузке или в других ситуациях, когда потребности в глюкозе со стороны организма возрастают, гликоген расщепляется до глюкозы, которая поступает в кровь. Регуляция гликогенеза и гликогенолиза в печени, осуществляемая с помощью гормональных, нервных, субстратных и других механизмов, позволяет поддерживать довольно узкие границы концентрации глюкозы в крови. В отличие от нормальной печени, метаболизм гликогена и механизмы его регуляции в цирротически измененной печени исследованы не очень подробно. Показано, тем не менее, что для больных ЦП характерен метаболизм, наблюдающийся у здоровых людей в ходе длительного голодания. Отличительными чертами такого метаболизма являются: образование энергии преимущественно за счет окисления липидов, а не углеводов, как в норме; продукция глюкозы после ночного голодания, главным образом, за счет глюконеогенеза, а не гликогенолиза, как в нормальной печени; усиленный кетогенез и т.д. (Owen et al., 1981, 1983; Schneeweiss et al., 1990; Kruszynska, McIntyre, 1991; Greco et al., 1998; Kruszynska, 1999). Полагают также, что углеводный обмен при ЦП приобретает ряд черт свойственных диабету, основным признаком которого является интолерантность к глюкозе ряда тканей и органов, таких как печень (Shmueli et al., 1993; Petrides et al., 1994; Mion et al., 1996). Считается, что одной из причин невосприимчивости глюкозы печенью у больных ЦП может быть снижение ее способности синтезировать гликоген (Kruszynska, McIntyre, 1991; Riggio et al., 1997).

Данные о синтезе гликогена в цирротической печени, имеющиеся в настоящее время, немногочисленны и противоречивы. С одной стороны, показано, что скорость синтеза гликогена из глюкозы в печени у больных ЦП после ночного голодания не отличается от нормы (Kruszynska et al., 1993; Schneider et al., 1999). С другой стороны, найдено, что содержание

гликогена в цирротической печени человека и крысы после приема пищи существенно ниже, чем в нормальной печени (Krahenbuhl et al., 1991; Giardina et al., 1994; Riggio et al., 1997).

Глюкоза составляет существенную часть углеводов, ежедневно потребляемых человеком и животными с пищей. Поэтому в эксперименте анализ скорости гликогенеза в печени обычно проводят на моделях, при использовании которых запасы гликогена в печени сначала истощают с помощью голодания, после чего животным дают пищу, состоящую из углеводов (Niewoehner et al., 1984; Кудрявцева и др., 1990). Лишение крыс пищи приводит к быстрому снижению веса тела и печени. По нашим данным уже через 24 ч голодания вес тела животных уменьшается на 12.5 %, а печени — на 17.9 %; через 48 ч — на 20.8 % и 27.7 % соответственно (**Таблица 5**). Схожие данные были получены ранее Собероном и Санчезом, которые нашли, что голодание крыс в течение 48 ч приводит к уменьшению веса их печени на 20–25 % (Soberon, Sanchez, 1961). Многие авторы отмечают также, что при голодании, наряду со снижением веса печени, наблюдается значительное уменьшение объема гепатоцитов и содержания в них белка (LeBouton, 1982; James et al., 1986; Belloni et al., 1988).

В ходе голодания, особенно продолжительного, углеводный обмен в печени претерпевает значительные изменения (Bois-Joyeux et al., 1990; Jungermann, 1992). Резервы гликогена, которых хватает примерно на сутки, заметно пустеют. Запасы белка в мышечной ткани, обеспечивающие приток аминокислот для глюконеогенеза в печени, также истощаются. В этих условиях в организме происходят определенные адаптивные изменения, направленные на снижение его потребностей в глюкозе. Показано, например, что энергетические потребности мозга в глюкозе при продолжительном голодании снижаются почти в 3 раза и поддерживаются в основном за счет окисления кетоновых тел, образующихся в печени в результате неполного окисления жирных кислот (Kruszynska, 1999; Авдеева, Воробьева, 2005).

Исследование динамики содержания общего гликогена (ОГ) в гепатоцитах показало, что после введения глюкозы голодным животным в гепатоцитах крыс контрольной группы происходит быстрое накопление гликогена (**рис. 36**). В результате, уже через 10 мин содержание гликогена в гепатоцитах нормальной печени увеличилось примерно в 1.4 раза по сравнению с голодными животными ($p < 0.001$). Максимальное содержание гликогена в гепатоцитах крысы достигалось на 90-й мин эксперимента. В отличие от нормальной печени, в цирротической печени гликоген вначале очень медленно накапливался в клетках после введения глюкозы. Однако затем, начиная с 45-й мин, содержание ОГ в гепатоцитах быстро нарастало и к концу эксперимента превысило его исходный уровень в 3.2 раза (**рис. 36**). Важно отметить, что на всех сроках после введения глюкозы голодным животным, за исключением 120-й мин, содержание ОГ в гепатоцитах контрольных крыс заметно превышало таковое в гепатоцитах крыс с ЦП (в среднем в 1.6 раза).

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что скорость накопления ОГ гепатоцитами цирротической печени ниже, чем клетками нормальной печени (**Таблица 6**). Содержание ОГ в клетках нормальной печени через 10 мин после введения глюкозы голодным крысам увеличилось, в среднем, на 23 % по сравнению с клетками цирротической печени, а через 60 мин — на 69 %. При этом одноядерные и двуядерные гепатоциты различных классов плоидности на разных этапах рефиндинга, как в нормальной, так и цирротической печени не различались ни по скорости накопления ОГ, ни по его содержанию в расчете на геном (**рис. 39**). Заключение о пропорциональности содержания ОГ в гепатоцитах уровню плоидности клеток (**рис. 38**), сделанное нами на основании полученных данных, полностью совпадает с выводами других авторов (Кудрявцев и др., 1979, 1980; Шалахметова и др., 1981; Майтесян и др., 1983).

Содержание ОГ в клетках определяется множеством ферментов, непосредственно участвующих в его метаболизме и еще большим числом различных факторов, регулирующих содержание и активность этих ферментов. Любое нарушение в системе синтеза или распаде гликогена на уровне транскрипции, трансляции или на этапах последующих модификаций генных продуктов в клетках какой-либо плоидности привело бы к отклонению от пропорциональности содержания гликогена в гепатоцитах дозе генов. Однако, несмотря на значительную структурную перестройку паренхимы печени в ходе развития ЦП, этого не наблюдается (**рис. 38**). Среднее содержание ОГ в гепатоцитах различных классов плоидности цирротической печени в расчете на геном остается неизменным.

В отличие от стабильности среднего содержания ОГ в гепатоцитах человека и крысы в расчете на геном, содержание ОГ в разных клетках нормальной печени даже одного и того класса плоидности сильно варьирует (**рис. 40, а** и **рис. 41, а**). Помимо различной плоидности клеток, важными факторами варибельности содержания гликогена в гепатоцитах являются различия, связанные с локализацией клеток в дольке печени, с положением в фазе клеточного цикла, в которой они находятся, а также различия в условиях окружающей их среды. Установлено, что гепатоциты, расположенные в портальной зоне дольки печени, содержат больше гликогена, чем гепатоциты, локализованные в центральной зоне дольки (Кудрявцева и др., 1990, 1995, 2000, 2001; Kudryavtseva et al. 1992). Показано также, что содержание ОГ в гепатоцитах значительно меняется на разных фазах митотического цикла (Кудрявцев и др., 1979; Шалахметова и др., 1980; Майтесян и др., 1983).

В ходе развития патологического процесса в печени гетерогенность условий, в которых гепатоциты выполняют свои многочисленные функции, резко возрастает. В цирротически измененной печени гепатоциты могут локализоваться в дольках различной степени гипертрофированности и повреждения, в очагах воспаления и регенераторных узелках, в окружении тяжелой фиброзной ткани различной толщины и протяженности, в областях с

различной степенью васкуляризации и перестройки сосудистого русла и т.д. (Кудрявцева и др., 2004). В связи с этим неудивительно, что вариабельность клеток по содержанию ОГ возрастает по мере усиления тяжести поражения печени и при ЦП она достигает максимальных значений. Если в нормальной печени коэффициент вариации (v) по содержанию ОГ в 4с-гепатоцитах составлял 21.1–30.8 %, то в цирротически измененной печени он достигал величины 40.5–54.4 % ($p < 0.001$) (рис. 40, б). Схожая закономерность наблюдается и в печени человека. В норме и при ХГ v по содержанию гликогена в 2с-гепатоцитах составлял 53.5 и 48.4 % соответственно, то при ЦП — 71.7 % ($p < 0.001$) (рис. 41).

Данные, представленные в **таблице 7**, свидетельствуют о том, что введение глюкозы голодным крысам сопровождается не только увеличением содержания гликогена в гепатоцитах, но приводит также к увеличению их сухой массы. Через 10 мин после введения глюкозы СМГ в обеих группах животных увеличилась примерно в равной степени (рис. 42). Однако в дальнейшем, более интенсивный рост гепатоцитов наблюдался в контрольной группе крыс, у которых в конце эксперимента сухая масса клеток достигла 674 пг. Естественно предположить, что увеличение СМГ в ходе рефиндинга обусловлено накоплением в них гликогена. Однако оказалось, что это не так, поскольку величина удельного приращения показателя преломления α для углеводов при интерферометрии сухой массы клеток значительно отличается от таковой для белков (Veneke, 1966). Специальные расчеты, проведенные нами, показали, что даже если углеводы составят 20 % от общей СМГ, их вклад в определение СМГ не превысит 3.2 %. Поэтому влиянием содержания гликогена в гепатоцитах на изменение их сухой массы в ходе рефиндинга можно пренебречь. Исходя из того, что СМГ более чем на 80 % обусловлена содержанием в них белков (Бродский, 1966), можно заключить, что глюкоза вызывает быстрый синтез и накопление белков в гепатоцитах голодных крыс. Схожие данные были получены ранее (Princen et al., 1983), которые показали, что введение глюкозы крысам, голодавшим в течение 42–66 ч, приводит к увеличению скорости синтеза альбумина и общего белка в печени.

Известно, что во время голодания в кровь поступает значительное количество аминокислот, образующихся, главным образом, при распаде сократительных белков скелетных мышц. В печени эти аминокислоты используются для образования глюкозы путем глюконеогенеза или расходуются в цикле Кребса для энергетических нужд клеток (Nelson, Cox, 2012). Быстрое увеличение СМГ после введения глюкозы голодным крысам предполагает, что в этом случае, по-видимому, происходит частичное переключение субстратного потока аминокислот, поступающих в печень. Из-за того, что глюкоза начинает поступать в организм, часть аминокислот вместо использования их в процессе глюконеогенеза для образования глюкозы, расходуется на синтез белков в гепатоцитах.

Размер клеток — фундаментальный параметр, который оказывает существенное влияние на общий план их строения и функцию (Jorgensen, Tyers, 2004). Подавляющее большинство работ, в которых изучалась взаимосвязь размера клеток с их функцией, посвящено изучению влияния ионозависимых изменений объема клеток на их метаболизм. Показано, что изменения объема клеток, обусловленные их гидратацией или обезвоживанием, оказывают сильное влияние на многочисленные метаболические пути, включая синтез и распад белков, липогенез, гликолиз и синтез мочевины (Waldegger, Lang, 1998). Однако быстрые изменения размера гепатоцитов, вызванные их набуханием или дегидратацией, не велики по своей амплитуде и не сопровождаются изменением в них количества органоидов или других структур (Espelt et al., 2008). В отличие от изменений объема клеток, вызванных гипер- и гипоосмотическими условиями, интервал колебаний статических размеров гепатоцитов в печени млекопитающих значительно шире.

Определение СМГ нормальной и цирротической печени показало, что вариабельность этого параметра у голодных крыс и на разных этапах рефидинга может достигать 10 раз. Во многом различия между клетками по сухой массе обусловлены различиями в степени их плоидности. Однако даже в пределах одного класса плоидности СМГ также сильно отличается. Например, у голодных крыс сухая масса одноядерных 4с-клеток колеблется от 400 до 798 пг. Причины такой вариабельности не совсем ясны. Известно, однако, что гепатоциты выполняют огромное количество тканеспецифических функций, ряд которых связан с синтезом и секрецией белков. Полагают, что в клетках существуют циркадный, окологосударственный и другие ритмы синтеза белков и выведения их в плазму крови (Brodsky et al., 1992; Brodsky, 2014). При этом различия в содержании белка, включении меченых аминокислот и выведении белка из гепатоцитов могут достигать в максимуме и минимуме окологосударственного ритма 2–4 раз (Новикова, Боровков, 1987). Исходя из этого, можно предположить, что вариабельность СМГ в наших экспериментах, связана, в основном, с колебаниями синтеза и выведения белков из клеток.

Полагают, что размеры клеток оказывают значительное влияние на метаболизм и содержание ОГ в гепатоцитах. Считается, что между размером гепатоцитов и содержанием в них ОГ существует определенная связь, а именно, содержание ОГ выше в тех клетках, которые больше по размеру (Newsholme, Start, 1975). Результаты, представленные на **рис. 47, а; 48, а; 49, а; 51, а** свидетельствуют о том, что в нормальной печени крысы и человека содержание ОГ в гепатоцитах коррелирует с их размером. Подобная зависимость наблюдается в каждом классе плоидности клеток. Зависимость содержания ОГ от размера гепатоцитов хорошо прослеживается у крысы при голодании и в ходе интенсивного синтеза гликогена в печени. Особенно четко, главным образом, из-за большого числа измеренных клеток, эта зависимость проявляется в классе одноядерных тетраплоидных гепатоцитов (**рис. 50, а**). Наличие трех

субпопуляций гепатоцитов в нормальной печени (**рис. 50, а**), по-видимому, отражает присутствие клеток портальной, промежуточной и центральной зон дольки.

В отличие от нормальной печени, в цирротической печени человека и крысы зависимость содержания гликогена в гепатоцитах от размера клеток отсутствует (**рис. 47, б; 48, б; 49, б; 50, б; 51, в**). Исходя из этого, можно предположить, что отсутствие зависимости между размером гепатоцитов и содержанием в них гликогена в цирротической печени связано, прежде всего, с нарушением долькового строения органа, которое приводит к резкому увеличению гетерогенности микроокружения гепатоцитов.

Таким образом, длительное хроническое повреждение печени гепатотропным ядом приводит к кардинальному нарушению ее архитектоники, которое выражается, прежде всего, в нарушении дольковой структуры и изменении клеточного состава этого органа. Несмотря на то, что пролиферация гепатоцитов усиливается в ходе развития ЦП и играет более важную роль, нежели полиплоидия или гипертрофия клеток, в восстановительном росте печени (Сакута, 1997), она не способна в полной мере компенсировать постоянную гибель гепатоцитов. Как следствие, регенерация печени в ответ на повреждение приводит к резкому повышению доли непаренхимных клеточных элементов в органе. Нарушение дольковой структуры печени, приводит к снижению поступления кислорода и необходимых для жизнедеятельности гепатоцитов веществ, создавая условия клеточного голодания и гипоксии. Показано, например, что концентрация внутренних мембран митохондрий, на которых расположены ферменты, катализирующие реакции окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи, снижается в цирротической печени почти в 1.5 раза, а общая протяженность внутренних мембран на одну митохондрию — примерно вдвое (Безбородкина и др., 2008). Результатом этих изменений является значительное снижение эффективности окислительного фосфорилирования и уменьшение продукции АТФ митохондриями (Fernandez-Checa et al., 1993; Harvey et al., 1999; Fukumura et al., 2003). Неудивительно, что столь радикальные изменения условий окружающей среды, в которых осуществляется жизнедеятельность гепатоцитов, влекут за собой серьезные сдвиги в углеводном метаболизме этого органа, в частности, гликогена (Owen, 1981; Kruszynska, McIntyre, 1991; Krähenbühl, Reichen, 1993; Kruszynska, 1999; Petersen et al. 1999; Безбородкина и др., 2008). Данные, полученные в нашей работе, свидетельствуют о том, что структурная перестройка паренхимы цирротической печени приводит не только к ухудшению способности гепатоцитов накапливать гликоген (**рис. 39**), но сопровождается также значительными изменениями его структуры.

Согласно наиболее распространенной на сегодня точке зрения полная молекула гликогена (β -частица) состоит из прогликогена (ПГ) и макрогликогена (МГ). ПГ представлен восемью внутренними ярусами молекулы (~ 5 % остатков глюкозы) и служит платформой для

последующего синтеза МГ. МГ включает 4 внешних яруса молекулы гликогена, которые содержат ~ 95 % остатков глюкозы (Lomako et al., 1991, 1993; Melendez-Hevia et al., 1993; Alonso et al., 1995; Melendez et al., 1997, 1999). Разделение гликогена на ПГ и МГ позволило более детально взглянуть на процесс ресинтеза гликогена после голодания и физической нагрузки.

Во многих работах, проведенных на скелетных мышцах крысы и человека, было показано, что ПГ играет ведущую роль в восстановлении запасов гликогена после их истощения в ходе мышечных сокращений (Adamo et al., 1998; Battram et al., 2004; Wilson 2009; Granlund, 2011). Вклад МГ в накопление гликогена становился заметным лишь на поздних этапах фазы восстановления мышц или после интенсивной и повторяющейся физической нагрузки (Graham et al., 2001; Shearer, Graham, 2004; Shearer et al., 2005). Другими словами, восстановление запасов гликогена в скелетных мышцах у этих видов млекопитающих происходило, в основном, не путем заполнения внешних ярусов молекул гликогена остатками глюкозы и, следовательно, увеличения размера β -частиц, а за счет интенсивного синтеза новых молекул ПГ. Однако скорость восстановления запасов гликогена после их истощения и характер взаимодействия ПГ и МГ во время его ресинтеза гликогена, по-видимому, могут сильно отличаться у разных видов млекопитающих. Показано, например, что, по сравнению с человеком и крысой, ресинтез гликогена в скелетных мышцах лошади во время отдыха после тяжелой продолжительной физической нагрузки происходит гораздо медленнее. Для полного восстановления первоначальных запасов гликогена в скелетных мышцах лошади требуется трое суток, тогда как у человека для этого достаточно 24 часов (Нууррӓ, 2007). Другое важное отличие метаболизма гликогена в скелетных мышцах лошади заключается в том, что ресинтез гликогена после нагрузки происходит у них, главным образом, за счет МГ, особенно в начальном (1–24 ч) периоде отдыха (Bröjer et al., 2006). Различия скоростей ресинтеза ПГ и МГ в скелетных мышцах связывают с уровнем истощения гликогена. Крайние степени его истощения, вероятно, требуют формирования новых гранул гликогена, а не добавления глюкозы к существующим гранулам. Эту гипотезу подтверждают данные, полученные Шерером с соавторами, которые показали, что во время гликогенолиза не наблюдалось изменений в уровне гликогенина, пока не происходило значительного снижения уровня гликогена (Shearer et al., 2005).

Данные, представленные на **рис. 53, а** свидетельствуют о том, что, в отличие от скелетных мышц крысы, гликоген в печени накапливается, главным образом, за счет МГ. Содержание ПГ в гепатоцитах сопоставимо с содержанием МГ лишь у голодных крыс контрольной группы, у которых оно составляет примерно половину всего гликогена (**рис. 53, а**). В дальнейшем, в ходе гликогеноза после введения глюкозы голодным крысам, содержание ПГ слабо изменялось, причем в гепатоцитах нормальной печени на всех стадиях рефидинга оно заметно превышало

такое в клетках цирротической печени (**рис. 52, б**). В гепатоцитах нормальной печени человека доля МГ достигает более высоких значений (~ 88 %) по сравнению с крысой, но при патологии относительное содержание МГ в клетках снижается (**рис. 54**). Эти данные подтверждают результаты более ранних исследований, проведенных на гепатоцитах нормальной и патологически измененной печени крысы и человека (Кудрявцева, 1987; Кудрявцева и др., 1988, 1990; 1992, 1994, 2000, 2001, 2002; Kudryavtseva et al., 2003). Полученные данные позволяют заключить, что, в отличие от скелетных мышц, гликогенез в гепатоцитах крысы после введения глюкозы голодным животным происходит, преимущественно, путем заполнения внешних ярусов уже имеющихся в клетках частиц гликогена, а не за счет образования новых частиц.

Детальный анализ гликогенеза в нормальной и цирротической печени показал, что степень заполнения внешних ярусов частиц гликогена в клетках нормальной печени голодных крыс ниже, чем при ЦП. Гликоген в гепатоцитах нормальной печени голодных крыс, в среднем, состоит из гранул, содержащих прогликогеновую часть (1–8-й ярусы) и заполненный на 90 % 9-й ярус (**рис. 56, а**), а в цирротической печени — из частиц, содержащих 1–9-й ярусы и заполненный ~ на 60 % 10-й ярус (**рис. 56, б**). Все дальнейшие события при рефидинге, в ходе которого остатки глюкозы присоединяются к внешним ярусам МГ, в нормальной печени происходят, в основном, на 10-м ярусе (**рис. 56, а**), а в цирротической печени — на 11-м ярусе β -частиц (**рис. 56, б**). В исследованном временном интервале, несмотря на значительное накопление гликогена в гепатоцитах, клетки, у которых бы весь гликоген состоял только из 12-ярусных частиц, не обнаружены. Однако в единичных клетках степень заполнения внешних ярусов частиц гликогена, как в норме, так и при ЦП, могла достигать 11.3–11.4 яруса.

По сравнению с крысой, степень заполнения внешних ярусов частиц гликогена в гепатоцитах нормальной печени человека оказалась выше. В гепатоцитах нормальной печени крысы максимальное заполнение внешних ярусов молекул гликогена на любой стадии рефидинга ограничивалось 10-м ярусом (**рис. 56, а**), тогда как у человека в гранулах был заполнен не только 11-й ярус, но и 20 % 12-го яруса (**рис. 58**). Соответственно в нормальной печени человека число клеток с высокой степенью заполнения внешних ярусов молекул гликогена оказалось больше, чем у крысы. Отдельные гепатоциты в нормальной печени человека содержали гликоген, состоящий из частиц с почти полностью заполненным 12-м ярусом (11.87–11.95 яруса). Однако в гепатоцитах цирротической печени человека степень заполнения внешних ярусов частиц гликогена оказалась схожей с гепатоцитами крысы с ЦП, в β -частицах которых был полностью заполнен 10-й ярус и часть 11-го (**рис. 56, б** и **рис. 58**). Несмотря на более низкую степень заполнения внешних ярусов молекул гликогена в гепатоцитах цирротической печени человека, содержание ОГ в клетках было в 2.3 раза выше,

чем в гепатоцитах нормальной печени, подтверждая тем самым данные более ранних работ нашей лаборатории (Кудрявцева, 1987; Кудрявцева и др., 1989, 1992, 1994, 2000, 2001, 2002). Этот результат позволяет сделать вывод о том, что число гранул гликогена в гепатоцитах значительно увеличивается по мере развития патологического процесса в печени. Расчеты показали, что, если принять среднее количество β -частиц в гепатоцитах нормальной печени за 1.0, то при хроническом гепатите их число составит 2.06, а при ЦП — 3.25.

Содержание гликогена в гепатоцитах не может расти бесконечно, поэтому должны существовать механизмы, ограничивающие его беспредельное накопление. Действительно, при исследовании скорости накопления гликогена в печени мышей после приема смешанной пищи было найдено, что повышение концентрации гликогена в форме глюкозы до 275–375 мкМ/г сырого веса печени приводит к ингибированию активности гликогенсинтазы (ГС). В отличие от ГС, активность гликогенфосфорилазы *a* (ГФа) увеличивалась с повышением концентрации гликогена в печени (Chen et al., 1993). Эти данные были подтверждены при цитофотометрическом исследовании содержания гликогена в гепатоцитах крысы (Безбородкина, 2006). Автор показала, что предел накопления гликогена в гепатоцитах нормальной печени составляет 240–250 пг (300–310 мкмоль глюкозы в форме гликогена на 1 г сырой печени). Однако в цирротической печени величина предела в накоплении гликогена оказалась выше из-за ухудшения деградации гликогена.

Существование предела в накоплении гликогена в клетках предполагает наличие оборота гликогена, важную роль в котором играют ключевые ферменты гликогенеза и гликогенолиза (ГС и ГФа). Соотношение активностей этих ферментов собственно и определяет содержание и скорость накопления гликогена в гепатоцитах. Существование одновременной активности ГС и ГФа в условиях чистого синтеза гликогена предполагалось уже в ранних работах (Newman, Armstrong, 1978; Katz et al., 1979; Van de Werve, Jeanrenaud, 1987). Позже это было подтверждено на печени голодных анестезированных крыс, у которых скорость распада гликогена составляла около 15 % от скорости его чистого синтеза; у сытых крыс она была еще выше (David et al., 1990). В дальнейшем было установлено, что после введения глюкозы собакам синтез гликогена, глюконеогенез и гликолиз в печени могут протекать одновременно (Moore et al., 1991). При исследовании оборота гликогена у сытых и голодных (12–14 ч ночного голодания) здоровых волонтеров было найдено, что синтез и распад гликогена в печени могут происходить одновременно. Однако относительная скорость оборота гликогена была выше у сытых людей, чем у голодных и составляла 57 % и 31 % соответственно. Авторы пришли к заключению о том, что концентрация гликогена может регулировать скорость гликогенолиза, а оборот гликогена является важным фактором в ограничении его накопления в печени человека (Magnusson et al., 1994).

Данные о скорости оборота гликогена при патологии печени немногочисленны и противоречивы. Измерение оборота гликогена в печени больных диабетом при использовании глюкозы показало, что оборот гликогена у этих пациентов невелик и составляет от 2 до 12 % (Waignot et al., 1991). ЯМР-спектроскопия с использованием ^{13}C - и ^{12}C -глюкозы позволила установить, что чистая скорость гликогенолиза в печени больных ЦП в 3.5 раза ниже, чем у здоровых людей. Расчеты показали, что при ЦП гликогенолиз ответственен лишь за 13 % продукции глюкозы, в то время как в норме его вклад в продукцию глюкозы составлял около 40 %. По сравнению с гликогенолизом скорость глюконеогенеза у больных ЦП оказалась заметно выше, чем у здоровых людей (Petersen et al., 1999). В отличие от вышеприведенных данных, Шнейтер с соавторами при расчете оборота УДФ-глюкозы в ходе непрерывной инфузии ^{13}C -галактозы не нашли различий в обороте УДФ-глюкозы у больных ЦП по сравнению с нормой. На основании этих данных авторы заключили, что послеобеденный синтез гликогена в печени пациентов с прогрессирующим ЦП не изменяется (Schneiter et al., 1999).

Определение активности ГС и ГФа в нормальной и цирротической печени крыс в ходе рефиндинга животных глюкозой, проведенное нами, показало, что активность ГС, как в нормальной, так и цирротической печени быстро растет после введения глюкозы. Тем не менее, в течение исследованного временного интервала активность ГС цирротической печени оказалась на 6.2 % ниже, чем в нормальном органе. В отличие от ГС, активность ГФа в нормальной печени быстро падала после введения глюкозы, но через 60 мин активность ГФа вновь возрастала, быстро достигая уровня характерного для голодных крыс. Активность ГФа в цирротической печени голодных крыс очень низка и в течение первых 30 мин после начала рефиндинга оставалась на столь же низком уровне. После небольшого кратковременного подъема на 75-й мин после введения глюкозы, активность ГФа вновь снижалась до исходного уровня (Vežborodkina et al., 2014).

Таким образом, полученные нами данные подтвердили присутствие одновременной активности ГС и ГФа в клетках нормальной печени и, следовательно, оборота гликогена. Существование предела накопления гликогена в клетках и его оборота предполагает, что некоторое количество глюкозы поступающей в гепатоциты в течение абсорбтивного периода не используется для синтеза гликогена. Скорее всего, эта часть глюкозы в ходе гликолиза превращается в ацетил-коэнзим А и используется в гепатоцитах обычным путем для синтеза жиров (Губарева, 2005).

Содержание ОГ в гепатоцитах определяется, как количеством β -частиц, так и степенью заполнения их внешних ярусов. Максимально четыре внешних яруса молекулы гликогена могут включать ~ 95 % остатков глюкозы или ~ 3850 их цепей (Roach et al., 2012). Исследование распределения гепатоцитов по числу цепей глюкозных остатков, содержащихся в них,

показало, что на ранних этапах гликогенеза (0–45-я мин) клетки нормальной печени крысы достаточно синхронно участвуют в накоплении гликогена. На это указывает небольшой коэффициент вариации распределения клеток по содержанию цепей глюкозных остатков ($v < 20\%$) (**рис. 59**). Однако, начиная с 60-й мин, синхронность накопления гликогена в популяции гепатоцитов резко изменяется, возможно, из-за того, что в это время синтез и деградация гликогена начинают протекать одновременно ($v > 20\%$) (**рис. 59**). В отличие от нормальной печени, при ЦП на всех этапах рефиндинга наблюдается высокая вариабельность гепатоцитов по степени заполнения внешних ярусов частиц гликогена ($v > 20\%$) (**рис. 60**), вероятно, обусловленная повышенной гетерогенностью условий окружающей среды, в которой происходит ресинтез гликогена в гепатоцитах. Интересной особенностью гликогенеза в гепатоцитах нормальной печени крысы (**рис. 61**) является то, что на первых этапах этого процесса (0–30-я мин) накопление гликогена происходит преимущественно за счет увеличения числа гранул, а позднее путем заполнения их внешних ярусов (45, 60 и 90-я мин рефиндинга). При ЦП, в отличие от нормальной печени, процесс заполнения внешних ярусов молекул гликогена выражен на всех этапах рефиндинга (**рис. 62**).

Информация о динамике ярусной структуры гранул гликогена, имеющаяся в литературе, базируется, главным образом, на данных о размерах частиц гликогена в скелетных мышцах человека с помощью методов электронной микроскопии (ЭМ). Электронно-микроскопический анализ распределения частиц гликогена по размеру показал, что их диаметр варьирует от 10 до 44 нм и, в среднем, близок к 25 нм. Это значение примерно соответствует диаметру 7–8-ярусной частицы гликогена (Marchand et al., 2002; Shearer, Graham, 2004; Graham et al., 2010). Гранул с диаметром более 44 нм не было обнаружено, что согласуется с теоретическими представлениями о структуре молекул гликогена (Goldsmith et al., 1982). Элснер с соавторами (Elsner et al., 2002) при ЭМ-исследовании гликогенеза на культивируемых мышечных трубочках показали, что хотя ярусы 9–12-й (диаметр 30.6–42 нм) могут вмещать наибольшее количество остатков глюкозы, размер гранул при стимуляции синтеза гликогена увеличивался лишь с 24.9 до 28.1 нм (ярусы 7→9-й). Авторы заключили, что запасание гликогена в клетках связано не с формированием дополнительных ярусов (9–12-го) на уже имеющихся частицах гликогена, а с образованием новых 7–8-ярусных гранул. В течение гликогенолиза, в ходе которого происходит деструкция некоторого числа гранул, средний диаметр их уменьшался до 24.4 нм. Определение диаметра гранул гликогена в скелетных мышцах человека с помощью ЭМ через различные интервалы времени после продолжительной, но умеренной нагрузки обнаружило, что хотя средний диаметр гранул при восстановлении мышц удваивался, лишь небольшое их количество имело диаметр соответствующий макрогликогену. Увеличение содержания гликогена в мышцах в начале периода восстановления (0–4 ч) происходило, как и в

культивируемых мышечных трубочках, преимущественно за счет увеличения числа гранул, а в последующие 44 ч путем увеличения их объема (Marchand et al., 2007). Немногочисленные исследования размера молекул гликогена в печени мышей с помощью эксклюзионной хроматографии показали, что в течение пищевого цикла α -частицы распадаются на стабильные молекулы гликогена с радиусом ~ 12 нм (Sullivan et al., 2014).

Таким образом, анализ литературы показал, что все имеющиеся в настоящее время исследования по структуре молекул гликогена основаны либо на изучении динамики про- и макрогликогена с помощью цитохимических методик, либо на измерении размера молекул с помощью ЭМ и эксклюзионной хроматографии. Иные подходы для изучения внутренней структуры гликогена отсутствовали. Поэтому в нашей работе для исследования пространственной структуры гликогена в клетках мы применили метод FRET (Förster Resonance Energy Transfer), который позволяет определять расстояние между молекулами-флуорофорами, участвующими в передаче энергии. Фёрстеровское расстояние (R_0) для пары красителей, использованных в данной работе — аурамина-SO₂ (Au-SO₂) (донор, Don) и бромистого этидия-SO₂ (EtBr-SO₂) (акцептор, Ac), составляет по нашим данным 3.2 нм (см. раздел 2.6.4 в главе «Материалы и методы исследования»). Согласно расчетам, среднее расстояние между ярусами молекулы гликогена, общий радиус которой равен ~ 21 нм, составляет ~ 1.9 нм (Goldsmith et al., 1982; Shearer, Graham, 2004; Roach et al., 2012). Мы полагаем (см. раздел 2.4.3, 2.4.5 в главе «Материалы и методы исследования»), что реактив типа Шиффа Au-SO₂ при окрашивании клеток с помощью PAS-реакции выявляет ПГ, т.е. остатки глюкозы, расположенные на ярусах с 1-го по 8-й молекулы гликогена, а EtBr-SO₂ — МГ (остатки глюкозы, расположенные на ярусах с 9-го по 12-й). Следовательно, в фёрстеровском взаимодействии могут участвовать только молекулы Au, связанные с остатками глюкозы ПГ (7-й и 8-й ярусы), которые передают энергию, и молекулы EtBr, связанные с остатками глюкозы МГ (9-й и 10-й ярусы), принимающие энергию излучения (см. раздел 2.6.4 в главе «Материалы и методы исследования», **рис. 33**). Остатки глюкозы, окрашенные Au-SO₂ и расположенные ниже 7-го яруса, а также остатки глюкозы, окрашенные EtBr-SO₂ и расположенные выше 10-го яруса в молекуле гликогена, не могут участвовать в фёрстеровском взаимодействии из-за того, что расстояние между молекулами донора (Au) и акцептора (EtBr) будет превышать R_0 . Таким образом, эффективность FRET (E_{FRET}) при использовании нашего метода будет сильно зависеть от степени заполнения ярусов 9-го и 10-го в молекуле гликогена. Если ярусы 9-й и 10-й не заполнены или почти не заполнены, то энергия излучения Don не может передаваться на Ac. Поэтому наличие в клетках большого количества β -частиц, состоящих только из ПГ, будет снижать уровень E_{FRET} . С другой стороны, даже полное заполнение 11-го и 12-го ярусов не

приведет к повышению E_{FRET} из-за того, что расстояние между 8-м и 11-м ярусами (~ 5.7 нм) будет значительно превышать R_0 (3.2 нм) для пары использованных нами красителей.

Измерение E_{FRET} в индивидуальных гепатоцитах крыс нормальной и цирротической печени через различные интервалы времени после введения голодным крысам глюкозы показало, что в клетках нормальной печени этот показатель, в среднем, \sim в 3.3 раза выше, чем в клетках цирротической печени (**рис. 64**). В начале рефидинга (0–30-я мин) E_{FRET} в гепатоцитах нормальной печени увеличивалась более чем вдвое, но затем оставалась примерно на одном уровне. В гепатоцитах цирротической печени, наоборот, E_{FRET} оставалась стабильной до 75-й мин после начала рефидинга, а затем снижалась примерно в 2 раза. Поскольку в клетках нормальной печени, в отличие от клеток крыс с ЦП, 9-й и, особенно, 10-й ярусы в молекулах гликогена остаются не полностью заполненными (**рис. 56, а**), можно ожидать увеличения E_{FRET} по мере заполнения этих ярусов. Это предположение подтверждается результатами, представленными на **рис. 65** и **рис. 66**, из которых следует, что в клетках нормальной печени, в отличие от клеток цирротической печени, E_{FRET} на многих этапах гликогенеза сильно зависит от увеличения количества остатков глюкозы в молекулах гликогена.

Важным достоинством метода FRET является его высокая чувствительность к изменению расстояния между молекулами Don и Ac (r): при увеличении r , превышающего R_0 для данной пары красителей, E_{FRET} будет падать. r в ходе рефидинга, в среднем, составило 4.401 ± 0.004 нм в гепатоцитах нормальной печени и 5.447 ± 0.009 нм в клетках цирротической печени (**рис. 67**).

Определение r в клетках нормальной и цирротической печени на различных этапах рефидинга показало, что по мере заполнения внешних ярусов гликогена остатками глюкозы, r уменьшается. В среднем, за весь период гликогенеза в гепатоцитах нормальной печени r уменьшается на 1.08 ± 0.18 нм, а в гепатоцитах крыс с ЦП — на 0.64 ± 0.21 нм ($p < 0.05$). Наиболее резкое уменьшение r в норме обнаружено на 0, 75, 90 и 120-й мин после введения глюкозы голодным животным ($\Delta r = 1.48$; 1.4; 1.7 и 1.59 нм соответственно), а при ЦП — лишь на одном сроке (90-я мин), где Δr составило 2.23 нм (**рис. 68** и **рис. 69**).

Таким образом, увеличение E_{FRET} в клетках нормальной печени крысы на начальных стадиях гликогенеза (0–30-я мин) (**рис. 64**) по сравнению с клетками цирротической печени обусловлено, в основном, двумя обстоятельствами. Во-первых, меньшим расстоянием между ЦОГ на 7–10-м ярусах и, во-вторых, меньшей степенью заполнения 10-го яруса молекул гликогена.

Определение E_{FRET} в клетках печени человека позволило установить, что в гепатоцитах нормальной печени этот показатель примерно в 4 раза ниже, чем в гепатоцитах нормальной печени крыс (**рис. 64** и **рис. 71**). E_{FRET} в клетках печени человека увеличивалась по мере развития патологического процесса в органе (**рис. 71**). Как говорилось выше, внешние ярусы в

молекулах гликогена нормальной и патологически измененной печени человека заполнены в большей степени, чем у крысы. В среднем, в β -частицах нормальной печени полностью заполнен 11-й ярус и часть 12-го, а в частицах гликогена патологически измененной печени (при ХГ и ЦП) полностью заполнен 10-й ярус и часть 11-го яруса (**рис. 58**). В этих условиях трудно ожидать столь сильных различий в E_{FRET} между клетками нормальной и цирротической печени человека. Однако анализ распределения гепатоцитов человека по степени заполнения внешних ярусов молекул гликогена показал, что в нормальной печени присутствует заметная доля гепатоцитов ($\sim 5\%$) с небольшой степенью заполнения внешних ярусов, с глюкозными остатками, находящимися на 9-м и 10-м ярусах. Гранулы гликогена в этих клетках собственно и участвуют в фёрстеровской передаче энергии. Количество клеток с частицами, в которых глюкозные остатки находятся на 9-м и 10-м ярусах, увеличивается по мере развития патологического процесса в печени. При ХГ их доля составляет $\sim 30\%$, а при ЦП $\sim 9\%$ (**рис. 63**), что приводит к повышению E_{FRET} .

Определение r в клетках нормальной и цирротической печени человека показало, что при ХГ и ЦП оно меньше, чем в нормальной печени (**рис. 73**). В гепатоцитах нормальной печени человека r составляет, в среднем, 6.14 ± 0.05 нм, при ХГ — 5.69 ± 0.04 нм, а при ЦП — 4.88 ± 0.02 нм. Исследование распределения гепатоцитов по этому показателю позволило установить, что в нормальной печени доля клеток, у которых Don и Ac находятся на расстоянии фёрстеровского взаимодействия, невелика ($\sim 0.6\%$). Однако доля таких клеток увеличивается при усилении поражения печени: при ХГ они составляют $\sim 4.4\%$, а при ЦП $\sim 33.8\%$ (**рис. 74**). Дополнительный анализ показал, что по мере заполнения внешних ярусов молекул гликогена остатками глюкозы в гепатоцитах нормальной и патологически измененной печени человека, r уменьшается, причем в нормальной печени эта зависимость значительно более выражена, чем при ХГ и ЦП ($\Delta r = 2.94, 2.03$ и 0.55 нм соответственно) (**рис. 75**).

Полученные данные позволили заключить, что более высокая E_{FRET} в гепатоцитах цирротической печени человека по сравнению с клетками нормальной печени обусловлена несколькими причинами: 1) большим числом клеток в популяции, в которых глюкозные остатки в частицах гликогена находятся на 9-м и 10-м ярусах (**рис. 63**); 2) меньшим, в среднем, расстоянием между Don и Ac (**рис. 73**); 3) бóльшим числом клеток, в которых Ac и Don, находятся на расстоянии фёрстеровского взаимодействия (**рис. 74**).

Таким образом, FRET-анализ структуры гликогена в гепатоцитах человека показал, что она заметно отличается от структуры гликогена крысы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтез гликогена в гепатоцитах происходит с высокой скоростью, которая сравнима или даже превышает скорость синтеза ДНК, РНК и белков. Минимальная скорость присоединения остатков глюкозы к растущим молекулам гликогена составляет около 6.3×10^3 /мин (Безбородкина и др., 2008). Скорость отщепления остатков глюкозы, по-видимому, еще выше. Очевидно, что столь высокие скорости оборота гликогена в клетках обусловлены специфическим строением его молекул и взаимодействием с различными ферментами его метаболизма, прежде всего с гликогенсинтазой и гликогенфосфорилазой. Однако в настоящее время наши сведения о пространственной структуре молекул гликогена еще очень скудны.

Гипотеза о структуре гликогена, основанная на существовании его особых форм — прогликогена и макрогликогена (Lomako et al., 1991, 1993; Alonso et al., 1995; Melendez et al., 1997), далеко не безупречна (Marchand et al. 2002; James et al. 2008). Тем не менее, несмотря на определенные недостатки, эта гипотеза существенно продвинула наши знания о структуре гликогена. Основываясь на представлениях о прогликогене и макрогликогене, было установлено, что их динамика резко отличается в различных тканях и при различных физиологических состояниях организма. Полученные в нашей работе данные показали, что структура гликогена в гепатоцитах может отличаться у разных видов млекопитающих. Она изменяется при патологии и в ходе гликогенеза. Найдено также, что, в отличие от скелетных мышц, накопление гликогена в гепатоцитах происходит не за счет синтеза его новых молекул, а, главным образом, путем увеличения степени заполнения внешних ярусов уже существующих в гепатоцитах молекул гликогена. Показано, что расстояние между внешними ярусами молекулы гликогена уменьшается по мере увеличения степени их заполнения, и этот результат согласуется с представлением о том, что β -частица способна регулировать свой размер (Madsen, Cori, 1958).

На пути создания более совершенных представлений о пространственной структуре гликогена делаются только первые робкие шаги, к числу которых относится и наша работа. Основной вывод наших исследований довольно оптимистичен. Он заключается в том, что, несмотря на однородность состава огромной молекулы гликогена ($\sim 10^7$ Da), включающей около 55000 остатков глюкозы, ее пространственная структура, несомненно, поддается анализу. Наша работа показала, что исследование структуры гликогена можно проводить не только на гликогене, изолированном из тканей, как это делается обычно, но и в условиях *in situ*. С помощью использованных нами цитофотометрических методов можно получать данные об особенностях структуры гликогена в данной конкретной клетке. Хотя гликоген в ткани находится в сложном взаимодействии с множеством других веществ, высокая чувствительность

и точность использованных нами методов позволяет соотнести содержание и структуру гликогена в клетке с ее специфическими морфологическими и метаболическими особенностями.

Среди перспективных подходов для дальнейшего изучения структуры гликогена в клетках нам представляется использование красителей с различным типом взаимодействия с остатками глюкозы в молекулах гликогена, в сочетании с цитофотометрическими методами исследования. Метод FRET, использованный в данной работе, оказался очень полезным для исследования пространственной структуры гликогена. Дальнейшее его совершенствование в этом направлении связано, на наш взгляд, с применением других методик, нежели FRET AB, и других пар флуоресцирующих красителей для использования их в качестве доноров и акцепторов.

ВЫВОДЫ

1. В процессе гликогенеза сухая масса гепатоцитов и содержание в них гликогена, как в нормальной, так и в цирротической печени крысы, изменяются пропорционально дозе генов.
2. В нормальной печени человека и крысы содержание гликогена в гепатоцитах зависит от размера клеток, а в цирротической печени такая зависимость отсутствует.
3. Разработанный нами микрофлуориметрический метод позволяет оценить содержание и структуру гликогена в отдельных гепатоцитах.
4. В гепатоцитах нормальной печени крысы изменение содержания общего гликогена на ранних стадиях гликогенеза обусловлено синтезом новых β -частиц, на поздних — присоединением глюкозных остатков к частицам, уже имеющимся в клетках; в гепатоцитах цирротической печени крысы изменение содержания общего гликогена на протяжении всего гликогенеза обусловлено лишь заполнением внешних ярусов β -частиц.
5. Увеличение содержания гликогена в гепатоцитах человека в ходе развития цирроза печени связано, главным образом, с образованием β -частиц *de novo*.
6. В гепатоцитах крысы, по мере развития цирроза, расстояние между цепями глюкозных остатков в β -частицах гликогена увеличивается, а в гепатоцитах человека — уменьшается.
7. Расстояние между внешними ярусами β -частиц уменьшается по мере заполнения их остатками глюкозы, подтверждая тем самым гипотезу о саморегулируемости размера частиц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Авдеева Л.В., Воробьева С.А.* 2005. Гормональная регуляция обмена веществ и функций организма. Биохимия. М.: ГЭОТАР-Медиа, с. 545–616.
2. *Алейникова Т.Л., Воробьева С.А.* 2005. Обмен углеводов. Биохимия. М.: ГЭОТАР-Медиа, с. 297–370.
3. *Арефьева А.М., Бродский В.Я., Саркисов Д.С., Панова Н.В., Гвазова И.Г.* 1993. Пloidность и гипертрофия мышечных клеток при инфаркте и пороках сердца человека. Цитология, 35: 55.
4. *Ариавский И.А.* 1982. Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития. М.: Наука, 270 с.
5. *Афанасьев Ю.И., Кузнецов С.Л., Юрина Н.А.* 2004. Гистология, цитология и эмбриология. М.: Медицина, 766 с.
6. *Безбородкина Н.Н.* 2006. Сравнительный анализ метаболизма гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени. Дисс. канд. биол. наук. Институт цитологии РАН. Санкт-Петербург, 254 с.
7. *Безбородкина Н.Н., Оковитый С.В., Кудрявцев Б.Н.* 2008. Углеводный метаболизм при хронических поражениях печени. СПб.: Синтез-Бук, 176 с.
8. *Бенеке Г.* 1969. Применение интерференционной микроскопии для исследования биологических объектов. Введение в количественную цитохимию. М.: Мир, с. 70–92.
9. *Блюгер А.Ф.* 1978. Вирусный гепатит. Рига: Звайгзне, 398 с.
10. *Богданова М.С., Кудрявцева М.В., Кузнецова И.М., Шалахметова Т.М., Завадская Е.Э., Сакута Г.А., Кудрявцев Б.Н.* 1990. Оценка относительного вклада процессов пролиферации, полиплоидизации и гипертрофии клеток в увеличении массы печени на разных стадиях постнатального развития крыс. Цитология, 43: 695–703.
11. *Бродский В.Я.* 1966. Трофика клетки. М.: Наука, 355 с.
12. *Бродский В.Я., Урываева И.В.* 1981. Клеточная полиплоидия. Проллиферация и дифференцировка. М.: Наука, 259 с.
13. *Бродский В.Я., Цирекидзе Н.Н., Арефьева А.М.* 1983. ДНК и белок в постнатальном росте кардиомиоцитов мышцы. Цитология, 25: 434–439.
14. *Верин В.К.* 1984. Дивергентная дифференцировка гепатоцитов и холангиоцитов в эмбриональном и репаративном гистогенезе печени. Дисс. докт. наук. ВИЭМ. Ленинград, 280 с.
15. *Верин В.К.* 2001. Печень. Руководство по гистологии. Частная гистология органов и систем, т. 2. СПб.: СпецЛит, с. 159–172.
16. *Гизе А.* 1959. Физиология клетки. М.: Изд. иностр. лит., 455 с.
17. *Голенченко В.А., Силаева С.А.* 2005. Биосинтез нуклеиновых кислот и белков (матричные биосинтезы). Основы молекулярной генетики. Биохимия. М.: ГЭОТАР-Медиа, с. 140–227.
18. *Губарева А.Е.* 2005. Обмен липидов. Биохимия. М.: ГЭОТАР-Медиа, с. 370–457.

19. *Делоне Г.В., Урываева И.В., Корецкий В.Ф., Бродский В.Я.* 1987. Анализ постнатального роста печени мыши на основе учета числа гепатоцитов, их массы и плоидности. *Онтогенез*, 18: 304–307.
20. *Завадская Е.Э., Кудрявцева М.В., Кудрявцев Б.Н., Смирнова С.А., Скорина А.Д.* 1983. Сухой вес изолированных гепатоцитов человека в норме и при хроническом гепатите. *Цитология*, 25: 447–451.
21. *Завадская Е.Э., Кудрявцева М.В., Кудрявцев Б.Н.* 1989. Изменение сухого веса гепатоцитов при хронической интоксикации крыс СС1₄. *Цитология*, 31: 419–425.
22. *Заварзин А.А.* 1967. Синтез ДНК и кинетика клеточных популяций в онтогенезе млекопитающих. Л.: Наука, 195 с.
23. *Кудрявцев Б.Н., Розанов Ю.М.* 1974. Цитофлуориметрия. Общие принципы. Методы биологии развития. М.: Наука, с. 497–500.
24. *Кудрявцев Б.Н., Кудрявцева М.В., Завадская Е.Э., Шалахметова Т.М., Комаров С.А., Комарова Н.И.* 1979. Метод определения в одной и той же клетке содержания гликогена, ДНК, 3Н-тимидиновой метки и сухого веса. *Цитология*, 21: 74–83.
25. *Кудрявцев Б.Н., Кудрявцева М.В., Завадская Е.Э., Смирнова С.А., Скорина А.Д.* 1982. Полиплоидия в печени человека в норме и при заболевании гепатитом. *Цитология*, 24: 436–444.
26. *Кудрявцев Б.Н., Кудрявцева М.В., Сакута Г.А., Скорина А.Д., Штейн Г.И.* 1993. Исследование полиплоидизации гепатоцитов при некоторых хронических заболеваниях печени у человека. *Цитология*, 35: 70–83.
27. *Кудрявцева М.В., Кудрявцев Б.Н., Розанов Ю.М.* 1970. Определение количества гликогена в клетках печени крыс с использованием флуоресцентного красителя аурамина-SO₂. *Цитология*, 12: 1060–1067.
28. *Кудрявцева М.В., Кудрявцев Б.Н., Розанов Ю.М.* 1972. Влияние продолжительности окисления периодатом на интенсивность и специфичность PAS-реакции с обычным реактивом Шиффа и реагентом типа Шиффа — аурамином SO₂. *Цитология*, 14: 1357–1362.
29. *Кудрявцева М.В., Кудрявцев Б.Н., Розанов Ю.М.* 1974. О двух фракциях гликогена в клетках печени крыс (цитофлуориметрическое исследование). *Цитология*, 16: 851–858.
30. *Кудрявцева М.В., Шалахметова Т.М.* 1976. Микрофлуориметрическое исследование фракций гликогена в клетках печени крыс при различных условиях перфузии печени и питания животных. *Цитология*, 18: 506–509.
31. *Кудрявцева М.В., Шалахметова Т.М.* 1979. Цитофлуориметрическое исследование содержания гликогена и его фракций в клетках печени крыс в течение 1-й нед постнатального онтогенеза. *Цитология*, 21: 566–571.
32. *Кудрявцева М.В., Смирнова С.А., Скорина А.Д., Завадская Е.Э., Кудрявцев Б.Н.* 1980. Цитофлуориметрическое исследование содержания гликогена в клетках паренхимы печени больных гепатитом. *Цитология*, 22: 428–433.

33. *Кудрявцева М.В., Завадская Е.Э.* 1982. Цитофлуориметрическое исследование содержания гликогена и его фракций в клетках печени крыс в условиях его синтеза и распада. *Цитология*, 24: 777–783.
34. *Кудрявцева М.В., Завадская Е.Э., Скорина А.Д., Смирнова С.А., Кудрявцев Б.Н.* 1983. Метод получения изолированных клеток печени из материала прижизненных пункционных биопсий. *Лаб. дело.*, 9: 21–22.
35. *Кудрявцева М.В., Завадская Е.Э., Иванов В.А., Кудрявцев Б.Н.* 1986. Влияние хронической интоксикации крыс CCl_4 и частичной гепатэктомии патологически измененного органа на уровень гликогена в гепатоцитах. *Цитология*, 28: 607–614.
36. *Кудрявцева М.В.* 1987. Гликогеноз клеток печени при хроническом гепатите у человека и его диагностическое значение. *Успехи гепатологии*, 13: 201–211.
37. *Кудрявцева М.В., Скорина А.Д., Кудрявцев Б.Н.* 1988. Цитофлуориметрическое исследование фракций гликогена в клетках печени больных хроническим вирусным и хроническим алкогольным гепатитами. *Цитология*, 30: 705–709.
38. *Кудрявцева М.В., Шашков Б.В., Белоцерковская Э.А., Федоров Л.Ю., Кудрявцев Б.Н.* 1988. Содержание гликогена и его фракций в гепатоцитах человека при травматической болезни. *Цитология*, 30: 1449–1453.
39. *Кудрявцева М.В., Скорина А.Д., Сакута Г.А., Кудрявцев Б.Н.* 1989. Цитофлуориметрическое исследование содержания гликогена в гепатоцитах больных при различных формах алкогольного поражения печени. *Цитология*, 31: 1044–1049.
40. *Кудрявцева М.В., Сакута Г.А., Штейн Г.И., Кудрявцев Б.Н.* 1990. Динамика синтеза гликогена в гепатоцитах различных зон долек печени крыс. *Цитология*, 32: 1010–1018.
41. *Кудрявцева М.В., Емельянов А.В., Сакута Г.А., Скорина А.Д., Слепцова Л.А., Кудрявцев Б.Н.* 1992. Цитофлуориметрическое исследование содержания гликогена и его фракций в гепатоцитах больных циррозом печени различной этиологии. *Цитология*, 34: 100–107.
42. *Кудрявцева М.В., Сакута Г.А., Емельянов А.В., Скорина А.Д., Кудрявцев Б.Н.* 1994. Цитофлуориметрическое исследование содержания гликогена и активности некоторых ферментов его метаболизма в гепатоцитах человека и животных при циррозе печени и в условиях реабилитации. *Цитология*, 36: 200–210.
43. *Кудрявцева М.В., Сакута Г.А., Скорина А.Д., Штейн Г.И., Емельянов А.В., Кудрявцев Б.Н.* 1995. Количественная оценка содержания гликогена в гепатоцитах различных зон дольки печени человека в норме и при хронических гепатитах различной этиологии. *Цитология*, 37: 470–484.
44. *Кудрявцева М.В., Емельянов А.В., Сакута Г.А., Кудрявцев Б.Н.* 1996. Гликогенообразовательная функция гепатоцитов в условиях регенерации циррозной печени крыс после частичной гепатэктомии. *Цитология*, 38: 934–948.
45. *Кудрявцева М.В., Емельянов А.В., Сакута Г.А., Безбородкина Н.Н., Кудрявцев Б.Н.* 1998. Реабилитация гликогенообразовательной функции гепатоцитов цирротически измененной печени крыс в условиях питания высокоуглеводной диетой. *Цитология*, 40: 133–142.

46. *Кудрявцева М.В., Безбородкина Н.Н., Сакута Г.А., Кудрявцев Б.Н.* 1999. Состояние гликогенообразовательной функции гепатоцитов цирротически измененной печени крыс после воздействия хорионическим гонадотропином. *Цитология*, 41: 488–498.
47. *Кудрявцева М.В., Безбородкина Н.Н., Радченко В.Г., Оковитый С.В., Иванова О.В., Кудрявцев Б.Н.* 2000. Метаболическая гетерогенность гликогена в гепатоцитах больных циррозом печени. *Цитология*, 42: 550–554.
48. *Кудрявцева М.В., Безбородкина Н.Н., Нилова В.К., Кудрявцев Б.Н.* 2001. Влияние частичной гепатэктомии на уровень гликогена в гепатоцитах портальной и центральной зон дольки цирротически измененной печени крыс. *Цитология*, 43: 674–680.
49. *Кудрявцева М.В., Безбородкина Н.Н., Оковитый С.В., Кудрявцев Б.Н.* 2002. Исследование влияния бемитила на углеводный обмен цирротически измененной печени крыс. *Цитология*, 44: 166–174.
50. *Кудрявцева М.В., Безбородкина Н.Н., Оковитый С.В., Кудрявцев Б.Н.* 2004. Влияние гепатопротектора 2-этилтиобензимидазола гидробромида (Бемитила) на содержание гликогена в гепатоцитах цирротически измененной печени, находящихся в различных условиях микроокружения. *Цитология*, 46: 735–739.
51. *Ляхович В.В., Цырлов И.В., Мишин В.М., Громова О.А.* 1973. Возможный механизм резистентности эндоплазматических мембран цирротической печени к активации перекисного окисления липидов. *Бюл. эксперим. биол. мед.*, 75: 41–43.
52. *Майтесян Е.С.* 1983. Сравнительный анализ функциональной активности гепатоцитов различных классов плоидности. Автореф. канд. дис. Ленинград, 22 с.
53. *Мамырбаева З.Ж., Шалахметова Т.М., Кудрявцева М.В., Кудрявцев Б.Н.* 1998. Влияние Cd_2^+ и Sr_2^+ на содержание гликогена в гепатоцитах крыс разного возраста. *Цитология*, 40: 432–444.
54. *Нельсон Д., Кокс М.* 2012. Основы биохимии Ленинджера. Биоэнергетика и метаболизм, т. 2. М.: Бином, 640 с.
55. *Новикова Т.Е., Боровков А.Ю.* 1987. Изменение содержания альбумина в гепатоцитах *in vitro*. *Цитология*, 29: 236–239.
56. *Ньюсхолм Э., Старт К.* 1977. Регуляция метаболизма. М.: Мир, 407 с.
57. *Пирс Э.* 1962. Гистохимия. М.: Издательство иностранной литературы, 963 с.
58. *Розенфельд Е.Л., Попова И.А.* 1979. Гликогеновая болезнь. М.: Медицина, 288 с.
59. *Розенфельд Е.А., Попова И.А.* 1989. Врожденные нарушения обмена гликогена. М.: Медицина, 240 с.
60. *Роскин Г.И.* 1957. Микроскопическая техника. М.: Советская наука, 467 с.
61. *Рябинина З.А., Бенюш В.А.* 1973. Полиплоидия и гипертрофия клеток в процессах роста и восстановления. М.: Медицина, 207 с.
62. *Сакута Г.А., Кудрявцев Б.Н.* 1996. Клеточные механизмы регенерации циррозной печени крыс. I. Соотношение процессов пролиферации, полиплоидизации и гипертрофии клеток после прекращения хронического воздействия CCl_4 . *Цитология*, 38: 1158–1171.

63. *Сакута Г.А.* 1997. Клеточные механизмы регенерации цирротически измененной печени. Дисс. канд. биол. наук. Институт цитологии РАН. Санкт-Петербург, 164 с.
64. *Сакута Г.А., Кудрявцев Б.Н.* 2005. Клеточные механизмы регенерации цирротически измененной печени крыс. II. Влияние частичной гепатэктомии на пролиферацию, полиплоидизацию и гипертрофию гепатоцитов. *Цитология*, 47: 379–387.
65. *Саркисов Д.С.* 1970. Регенерация и ее клиническое значение. М.: Медицина, 284 с.
66. *Серов В.В.* 1980. Морфология дистрофических процессов. Итоги науки и техники. Сер. «Патологическая анатомия», т. 2. М.: ВИНТИ, 138 с.
67. *Тепперман Дж., Тепперман Х.* 1989. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. М.: Мир, 656 с.
68. *Туманишвили Г.Д.* 1973. О биологическом значении и причинах возникновения полиплоидных клеток печени. *Цитология*, 15: 635–642.
69. *Урываева И.В., Маршак Т.Л.* 1969. Анализ пролиферации диплоидных и полиплоидных клеток в регенерирующей печени мыши. *Цитология*, 11: 1252–1258.
70. *Фактор В.М., Урываева И.В.* 1980. Полиплоидизация гепатоцитов мышей при многократных воздействиях СС₁₄. *Бюл. exper. биол.*, 11: 614–616.
71. *Хочачка П., Сомеро Дж.* 1977. Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир, 398 с.
72. *Честнова А.Ю., Безбородкина Н.Н., Матюхина Н.М., Кудрявцев Б.Н.* 2014. Динамика содержания про- и макрогликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крыс на разных этапах гликогенеза. *Цитология*, 56: 858–864.
73. *Честнова А.Ю., Безбородкина Н.Н., Малова А.В., Кудрявцев Б.Н.* 2015. Оценка подвижности олигосахаридных цепей молекул гликогена в гепатоцитах здоровой и патологически измененной печени человека. VI международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологии и медицины». Сборник тезисов: 292–293.
74. *Честнова А.Ю.* 2016. Структура β -частиц гликогена в гепатоцитах крыс с циррозом печени. XXIII международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов». Материалы конференции: «Ломоносов-2016» секция «Фундаментальная медицина».
75. *Шалахметова Т.М., Кудрявцева М.В., Комарова Н.И., Завадская Е.Э., Комаров С.А., Кудрявцев Б.Н.* 1980. Содержание гликогена в синтезирующих и несинтезирующих ДНК гепатоцитах недельных крысят. *Цитология*, 22: 658–664.
76. *Шалахметова Т.М., Кудрявцева М.В., Кудрявцев Б.Н.* 1981. Содержание белка в гепатоцитах разной степени плоидности у крыс в постнатальный период развития. *Цитология*, 23: 674–680.
77. *Шерлок Ш., Дули Дж.* 2002. Заболевания печени и желчных путей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 859.
78. *Шмидт Г.А.* 1951. Эмбриология животных. Часть I, 354 с.
79. *Abraham S., Furth E.E.* 1994. Receiver operating characteristic analysis of glycogenated nuclei in liver biopsy specimens: quantitative evaluation of their relationship with diabetes and obesity. *Hum Pathol*, 25: 1063–1068.

80. *Adamo K.B., Graham T.E.* 1998. Comparison of traditional measurement with macroglycogen and proglycogen analysis of muscle glycogen. *J Appl Physiol* (1985), 84: 908–913.
81. *Aiston S., Hampson L., Gomez-Foix A.M., Guinovart J.J., Agius L.* 2001. Hepatic glycogen synthesis is highly sensitive to phosphorylase activity: evidence from metabolic control analysis. *J Biol Chem*, 276: 23856–23866.
82. *Akatsuka A., Singh T.J., Huang K.P.* 1983. Comparison of the liver glycogen synthase from normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Biochem Biophys*, 220: 426–434.
83. *Allison M.E., Wreghitt T., Palmer C.R., Alexander G.J.* 1994. Evidence for a link between hepatitis C virus infection and diabetes mellitus in a cirrhotic population. *J Hepatol*, 21: 1135–1139.
84. *Alonso M.D., Lomako J., Lomako W.M., Whelan W.J.* 1994. Tyrosine-194 of glycogenin undergoes autocatalytic glucosylation but is not essential for catalytic function and activity. *FEBS Lett*, 342: 38–42.
85. *Alonso M.D., Lomako J., Lomako W.M., Whelan W.J.* 1995. A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J*, 9: 1126–1137.
86. *Anthony P.P., Ishak K.S., Nayak N.C., Poulsen H.E., Scheuer P.J., Sobin L.H.* 1978. The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. *J Clin Pathol*, 31: 395–414.
87. *Arias I.M., Popper H., Schachter D., Shafritz D.A.* 1994. *The liver: biology and pathobiology*. N.Y.: Raven Press, 1009 p.
88. *Arkininstall M.J., Bruce C.R., Clark S.A., Rickards C.A., Burke L.M., Hawley J.A.* 2004. Regulation of fuel metabolism by preexercise muscle glycogen content and exercise intensity. *J Appl Physiol* (1985), 97: 2275–2283.
89. *Arnold G.* 1908. Zur morphologie des leberglykogens und zur struktur der leberzelle. *Arch Pathol Anat*, 193: 174–204.
90. *Arosio B., Santambrogio D., Gagliano N., Annoni G.* 1993. Changes in expression of the albumin, fibronectin and type I procollagen genes in CCl₄-induced liver fibrosis: effect of pyridoxol L,2-pyrrolidon-5 carboxylate. *Pharmacol Toxicol*, 73: 301–304.
91. *Bahnak B.R., Gold A.H.* 1982. Effects of alloxan diabetes on the turnover of rat liver glycogen synthase. Comparison with liver phosphorylase. *J Biol Chem*, 257: 8775–8780.
92. *Bao Y., Dawson T.L. Jr, Chen Y.T.* 1996. Human glycogen debranching enzyme gene (AGL): complete structural organization and characterization of the 5' flanking region. *Genomics*, 38: 155–165.
93. *Bao Y., Yang B.Z., Dawson T.L. Jr, Chen Y.T.* 1997. Isolation and nucleotide sequence of human liver glycogen debranching enzyme mRNA: identification of multiple tissue-specific isoforms. *Gene*, 197: 389–398.
94. *Baque S., Guinovart J.J., Ferrer J.C.* 1997. Glycogenin, the primer of glycogen synthesis, binds to actin. *FEBS Lett*, 417: 355–359.
95. *Baskaran S., Roach P. J., De Paoli-Roach A. A., Hurley T. D.* 2010. Structural basis for glucose-6-phosphate activation of glycogen synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 17563–17568.

96. *Battram D.S., Shearer J., Robinson D., Graham T.E.* 2004. Caffeine ingestion does not impede the resynthesis of proglycogen and macroglycogen after prolonged exercise and carbohydrate supplementation in humans. *J Appl Physiol* (1985), 96: 943–950.
97. *Bdolach A., Cochva E., Sobol R.* 1969. Some comments on the PAS reaction of glycogen. *Histochem J*, 1: 267–276.
98. *Belloni A.S., Rebuffat P., Gottardo G., Meneghelli V., Coi A., Mazzocchi G., Nussdorfer G.G.* 1988. A morphometric study of the effects of short-term starvation on rat hepatocytes. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 20: 751–757.
99. *Bendayan M., Londono I., Kemp B.E., Hardie G.D., Ruderman N., Prentki M.* 2009. Association of AMP-activated protein kinase subunits with glycogen particles as revealed in situ by immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem*, 57: 963–971.
100. *Beneke G.* 1966. Application of interference microscopy to biological material. In *Introduction to quantitative cytochemistry*. N.Y.: Academic press, pp. 63–92.
101. *Beratis N.G., LaBadie G.U., Hirschhorn K.* 1978. Characterization of the molecular defect in infantile and adult acid alphasglucosidase deficiency fibroblasts. *J Clin Invest*, 62: 1264–1274.
102. *Bernard C.* 1857. Nouvelles recherches expérimentales sur les phénomènes glycogéniques du foie. *Mém Soc Biol*, 2e série, t. 4. p. 1–7.
103. *Bernard C.* 1857. Sur le mécanisme physiologique de la formation de sucre dans le foie. (part 2). *C R hebd Sci*, t.44, p. 578–586.
104. *Bernard C.* 1857. Remarques sur la formation de la matière glycogène du foie. *C R hebd Acad Sci*, t. 44, p. 1325–1331.
105. *Bernard C.* 1859. De la matière glycogène considérée comme condition de développement de certains tissus, chez le fœtus, avant l'apparition de la fonction glycogénique du foie. *C R hebd Acad Sci*, t. 48, p. 673–684.
106. *Bernard C.* 1877. *Leçons sur le diabète et la glycogenèse animale*. Paris: Baillière, 576 p.
107. *Bernsmeyer C., Heim M.H.* 2009. Insulin resistance in chronic hepatitis C: mechanisms and clinical relevance. *Swiss Med Wkly*, 139: 678–784.
108. *Besford Q.A., Sullivan M.A., Zheng L., Gilbert R.G., Stapleton D., Gray-Weale A.* 2012. The structure of cardiac glycogen in healthy mice. *Int J Biol Macromol*, 51: 887–891.
109. *Bezborodkina N.N., Okovity S.V., Chestnova A.Yu., Kudryavtsev B.N.* 2013. Hepatocytes of cirrhotic rat liver accumulate glycogen more slowly than normal one. *Hepatol Int*, 7: 1084–1090.
110. *Bezborodkina N.N., Chestnova A.Yu., Matyukhina N.M., Kudryavtsev B.N.* 2013. Morphofunctional condition of hepatocytes of rats with CCl₄ induced liver cirrhosis. *Hepatol Int*, 7: S8–S9.
111. *Bezborodkina N.N., Chestnova A.Yu., Okovity S.V., Kudryavtsev B.N.* 2014. Activity of glycogen synthase and glycogen phosphorylase in normal and cirrhotic rat liver during glycogen synthesis from glucose or fructose. *Exp Toxicol Pathol*, 66: 147–154.

112. *Bezborodkina N.N., Chestnova A.Yu., Vorobev M.L., Kudryavtsev B.N.* 2016. Glycogen content in hepatocytes is related with their size in normal rat liver but not in cirrhotic one. *Cytometry A*, 89: 357–364.
113. *Biorn A.C., Graves D.J.* 2001. The amino-terminal tail of glycogen phosphorylase is a switch for controlling phosphorylase conformation, activation, and response to ligands. *Biochemistry*, 40: 5181–5189.
114. *Bioulac-Sage P., Le Bail B., Balabaud C.* 1999. Liver and biliary-tract histology. In *Oxford textbook of clinical hepatology*. Oxford, UK: Oxford University Press, pp. 13–23.
115. *Bircher J., Benhamou J-P., McIntyre N., Rizzetto M., Rodes J.* 1999. In *Oxford textbook of clinical hepatology*. Oxford, UK: Oxford University Press, p. 1086.
116. *Bois-Joyeux B., Chanez M., Peret J.* 1990. Age-dependent glycolysis and gluconeogenesis enzyme activities in starved-refeed rats. *Diabete Metab*, 16: 504–512.
117. *Bollen M.* 2001. Combinatorial control of protein phosphatase-1. *Trends Biochem Sci*, 26: 426–431.
118. *Boucek D., Jirikowic J., Taylor M.* 2011. Natural history of Danon disease. *Genet Med*, 13: 563–568.
119. *Britton R.S., Bacon B.R.* 1994. Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis. *Hepatogastroenterology*, 41: 343–348.
120. *Brodsky V.Y., Uryvaeva I.V.* 1977. Cell polyploidy: its relation to tissue growth and function. *Intern Rev Cytol*, 50: 275–332.
121. *Brodsky V.Y.* 1992. *Ultradian rhythms in life processes: an inquiry into fundamental principles of chronobiology and psychobiology*. London-New York: Springer-Verlag, p. 419.
122. *Brodsky V.Y.* 2014. Circadian (ultradian) metabolic rhythms. *Biochemistry (Mosc)*, 79: 483–495.
123. *Bröjer J., Holm S., Jonasson R., Hedenström U., Essén-Gustavsson B.* 2006. Synthesis of proglycogen and macroglycogen in skeletal muscle of standardbred trotters after intermittent exercise. *Equine Vet J* Suppl, 36: 335–339.
124. *Brown A.M., Ronson B.R.* 2007. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*, 55: 1263–1271.
125. *Burwinkel B., Amat L., Gray R.G., Matsuo N., Muroya K., Narisawa K., Sokol R.J., Vilaseca M.A., Kilimann M.W.* 1998. Variability of biochemical and clinical phenotype in X-linked liver glycogenosis with mutations in the phosphorylase kinase PHKA2 gene. *Hum Genet*, 102: 423–429.
126. *Campbell J.A., Davies G.J., Bulone V., Henrissat B.* 1997. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 326: 929–939.
127. *Canturk N.Z., Canturk Z., Utkan N.Z., Yenisey C., Ozbilim G., Gelen T., Yalman Y.* 1999. The protective effect of vitamin E on gastric mucosal injury in rats with cirrhosis of the liver. *Clin Med J (Engl)*, 112: 56–60.
128. *Cao Y., Mahrenholz A.M., DePaoli-Roach A.A., Roach, P.J.* 1993. Characterization of rabbit skeletal muscle glycogenin: tyrosine 194 is essential for function. *J Biol Chem*, 268: 14687–14693.
129. *Caro J.F., Triester S., Patel V.K., Tapscott E.B., Frazier N.L., Dohm G.L.* 1995. Liver glucokinase: decreased activity in patients with type II diabetes. *Horm Metab Res*, 27: 19–22.

130. Cavallo-Perin P., Cassader M., Bozzo C., Bruno A., Nuccio P., Dall'Omo A.M., Marucci M., Pagano G. 1985. Mechanism of insulin resistance in human liver cirrhosis. Evidence of a combined receptor and postreceptor defect. *J Clin Invest*, 75: 1659–1665.
131. Caudwell F.B., Cohen P. 1980. Purification and subunit structure of glycogen-branching enzyme from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*, 109: 391–394.
132. Ceulemans H., Bollen M. 2004. Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev*, 84: 1–39.
133. Chandramouli C., Varma U., Stevens E.M., Xiao R.P., Stapleton D.I., Mellor K.M., Delbridge L.M. 2015. Myocardial glycogen dynamics: new perspectives on disease mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 42: 415–425.
134. Chen C., Williams P.F., Catoronson I.D. 1993. Liver and peripheral tissue glycogen metabolism in obese mice: effect of a mixed meal. *Am J Physiol*, 265: E743–E751.
135. Chen M.F., Hwang T.L. 1994. The regeneration of cirrhotic liver after partial hepatectomy: a study using the rat carbon tetrachloride-induced cirrhotic model. *Proc Natl Sci Counc Repub China B*, 18: 71–75.
136. Chen M. 2011. Glycogen storage diseases. In *Molecular Pathology of Liver Diseases*. Germany: Springer, pp. 677–681.
137. Cheng A., Zhang M., Gentry M.S., Worby C.A., Dixon J.E., Saltiel A.R. 2007. A role for AGL ubiquitination in the glycogen storage disorders of Lafora and Cori's disease. *Genes Dev*, 21: 2399–2409.
138. Chestnova A.Yu., Bezborodkina N.N., Kudryavtsev B.N. 2013. Using of combination cytophotometrical method for the determination of dry mass, glycogen and DNA content of hepatocytes in normal and cirrhotic rat liver. *ISAC XXVIII International Congress. Abstract book*: 203–204.
139. Chestnova A.Yu., Malova A.V., Kudryavtsev B.N., Bezborodkina N.N. 2015a. The dependence of the glycogen content in hepatocytes on size in normal and pathological human liver. *30th Annual Clinical Cytometry Meeting and Course. Abstract book*.
140. Chestnova A.Yu., Bezborodkina N.N., Malova A.V., Kudryavtsev B.N. 2015b. Analysis of the glycogen molecules in healthy and pathologically changed human liver using FRET method. *World Congress on Microscopy: Instrumentation, Techniques and Applications on Life Sciences and Materials Sciences. Abstract book*: 55.
141. Cignoli E.V., Castro J.A. 1971. Effect of inhibitors of drug metabolizing enzymes on carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 18: 625–637.
142. Cohen P.T. 2002. Protein phosphatase 1-targeted in many directions. *J Cell Sci*, 115: 241–256.
143. Cori C.F., Cori G.T., Green A.A. 1943. Crystalline muscle phosphorylase. III. Kinetics. *J Biol Chem*, 151: 39–55.
144. Dashty M. 2013. A quick look at biochemistry: carbohydrate metabolism. *Clin Biochem*, 46: 1339–1352.
145. David M., Petit W.A., Laughlin M.R., Shulman R.G., King J.E., Barrett E.J. 1990. Simultaneous synthesis and degradation of rat liver glycogen. An in vivo nuclear magnetic resonance spectroscopic study. *J Clin Invest*, 86: 612–617.

146. *Decker K., Jungermann K., Thauer R.K.* 1970. Energy production in anaerobic organisms. *Angew Chem Int Ed Engl*, 9: 138–158.
147. *Del Olmo J.A., Serra M.A., Rodrigo J.M.* 1996. Liver cirrhosis and diabetes mellitus. *J Hepatol*, 24: 645.
148. *Delgado-Escueta A.V.* 2007. Advances in lafora progressive myoclonus epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 7: 428–433.
149. *Desmet V.J., Van Eyken P., Roskams T.* 1999. Embryology of the liver and intrahepatic biliary tract. In *Oxford textbook of clinical hepatology*. Oxford, UK: Oxford University Press, pp. 51–65.
150. *Devos P., Hers H.G.* 1979. A molecular order in the synthesis and degradation of glycogen in the liver. *Eur J Biochem*, 99: 161–167.
151. *Devos P., Hers H.G.* 1980. Glycogen in rat adipose tissue: sequential synthesis and random degradation. *Biochem Biophys Res Commun*, 95: 1031–1036.
152. *Devos P., Baudhuin P., Van Hoof F., Hers H.G.* 1983. The alpha particulate liver glycogen. A morphometric approach to the kinetics of its synthesis and degradation. *Biochem J*, 209: 159–165.
153. *Didenko V.V.* 2001. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques*, 31: 1106–1116, 1118, 1120–1121.
154. *DiNuzzo M.* 2013. Kinetic analysis of glycogen turnover: relevance to human brain ¹³C-NMR spectroscopy. *J Cereb Blood Flow Metab*, 33: 1540–1548.
155. *Doljanski F.* 1960. The growth of the liver with special reference to mammals. *Intern Rev Cytol*, 10: 217–241.
156. *Elsner P., Quistorff B., Hansen G.H., Grunnet N.* 2002. Partly ordered synthesis and degradation of glycogen in cultured rat myotubes. *J Biol Chem*, 277: 4831–4838.
157. *Engelmann G.L., Richardson A., Katz A., Fierer J.A.* 1981. Age-related changes in isolated rat hepatocytes. Comparison of size, morphology, binucleation, and protein content. *Mech Ageing Dev*, 16: 385–395.
158. *Ercan N., Gannon M.C., Nuttall F.Q.* 1994. Liver glycogen synthase, phosphorylase, and the glycogen concentration in rats given a glucose load orally: a 24-hour study. *Arch Biochem Biophys*, 315: 35–40.
159. *Espelt M.V., Alleva K., Amodeo G., Krumschnabel G., Rossi R.C., Schwarzbaum P.J.* 2008. Volumetric response of vertebrate hepatocytes challenged by osmotic gradients: A theoretical approach. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 150: 103–111.
160. *Fang J.W., Bird G.L., Nakamura T., Davis G.L., Lan J.Y.* 1994. Hepatocyte proliferation as an indicator of outcome in acute alcoholic hepatitis. *Lancet*, 343: 820–823.
161. *Farkas I., Hardy T.A., Goebel M.G., Roach P.J.* 1991. Two glycogen synthase isoforms in *Saccharomyces cerevisiae* are coded by distinct genes that are differentially controlled. *J Biol Chem*, 266: 15602–15607.
162. *Faysoil A., Nardi O., Annane D., Orlikowski D.* 2014. Right ventricular function in late-onset Pompe disease. *J Clin Monit Comput*, 28: 419–421.
163. *Fernandez-Checa J.C., Hirano T., Tsukamoto H., Kaplovitz N.* 1993. Mitochondrial glutathione depletion in alcoholic liver disease. *Alcohol*, 10: 469–475.

164. *Fernandez-Novell J.M., Lopez-Iglesias C., Ferrer J.C., Guinovart J.J.* 2002. Zonal distribution of glycogen synthesis in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett*, 531: 222–228.
165. *Ferre P., Pegorier J.P., Girard J.* 1977. The effects of inhibition of gluconeogenesis in suckling newborn rats. *Biochem J*, 162: 209–212.
166. *Ferrer J.C., Favre C., Gomis R.R., Fernandez-Novell J.M., Garcia-Rocha M., de la Iglesia N., Cid E., Guinovart J.J.* 2003. Control of glycogen deposition. *FEBS Lett*, 546: 127–132.
167. *Fessenden J.D.* 2009. Forster resonance energy transfer measurements of ryanodine receptor type 1 structure using a novel site-specific labeling method. *PloS One*, 4: e7338.
168. *Friedmann B., Goodman E.H. Jr, Weinhouse S.* 1970. Effects of glucose feeding, cortisol, and insulin on liver glycogen synthesis in the rat. *Endocrinology*, 81: 486–496.
169. *Fukuda T., Roberts A., Ahearn M., Zaal K., Ralston E., Plotz P.H., Raben N.* 2006. Autophagy and lysosomes in Pompe disease. *Autophagy*, 2: 318–320.
170. *Fukumura A., Tsutsumi M., Tsuchishima M., Takase S.* 2003. Correlation between adenosine triphosphate content and apoptosis in liver of rats treated with alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*, 27: 12S–15S.
171. *Gadella T.W., Van der Krogt G.N.M.* 1999. GFP-based FRET microscopy in living plant cells. *Trends Plant Sci*, 7: 287–291.
172. *Gahrton G.* 1964. Microspectrophotometric quantitation of the periodic acid-schiff (PAS) reaction in human neutrophil leukocytes based on a model system of glycogen microdroplets. *Exp Cell Res*, 34: 488–506.
173. *Ganesh S., Amano K., Delgado-Escueta A.V., Yamakawa K.* 1999. Isolation and characterization of mouse homologue for the human epilepsy gene, EPM2A. *Biochem Biophys Res Commun*, 257: 24–28.
174. *Ganesh S., Agarwala K.L., Amano K., Suzuki T., Delgado-Escueta A.V., Yamakawa K.* 2001. Regional and developmental expression of Epm2a gene and its evolutionary conservation. *Biochem Biophys Res Commun*, 283: 1046–1053.
175. *Gannon M.C., Nuttall F.Q.* 1990. Quantitation of the glucose area response to a meal. *Diabetes Care*, 13: 1095–1096.
176. *Garcia-Compean D., Jaquez-Quintana J.O., Gonzalez-Gonzalez J.A., Maldonado-Garza H.* 2009. Liver cirrhosis and diabetes: risk factors, pathophysiology, clinical implications and management. *World J Gastroenterol*, 15: 280–288.
177. *Garcia-Rocha M., Roca A., de la Iglesia N., Baba O., Fernandez-Novell J.M., Ferrer J.C., Guinovart J.J.* 2001. Intracellular distribution of glycogen synthase and glycogen in primary cultured rat hepatocytes. *Biochem J*, 357: 17–24.
178. *Gebhard R.* 1992. Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther*, 53: 275–354.
179. *Geddes R., Harvey J.D., Wills P.R.* 1977. The molecular size and shape of liver glycogen. *Biochem J*, 163: 201–209.
180. *Geddes R., Jeyarathan P., Taylor J.A.* 1992. Molecular and metabolic aspects of lysosomal glycogen. *Carbohydr Res*, 227: 339–349.

181. *Gentric G., Celton-Morizur S., Desdouets C.* 2012. Polyploidy and liver proliferation. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 36: 29–34.
182. *Gentry M.S., Worby C.A., Dixon J.E.* 2005. Insights into Lafora disease: malin is an E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates and promotes the degradation of laforin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 8501–8506.
183. *Gentry M.S., Dixon J.E., Worby C.A.* 2009. Lafora disease: insights into neurodegeneration from plant metabolism. *Trends Biochem Sci*, 34: 628–639.
184. *Gerich J.E., Meyer C., Woerle H.J., Stumvoll M.* 2001. Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care*, 24: 382–391.
185. *Ghosh P., Heath A.C., Donahue M.J., Masaracchia R.A.* 1989. Glycogen synthesis in the obliquely striated muscle of *Ascaris suum*. *Eur J Biochem*, 183: 679–685.
186. *Giaccari A., Rosetti L.* 1992. Predominant role of gluconeogenesis in the hepatic glycogen repletion of diabetic rats. *J Clin Invest*, 89: 36–45.
187. *Giardina M.G., Matarazzo M., Sacca L.* 1994. Kinetic analysis of glycogen synthase and PDC in cirrhotic rat liver and skeletal muscle. *Am J Physiol*, 267: E900–E906.
188. *Gilbert R.G., Sullivan M.A.* 2014. The molecular size distribution of glycogen and its relevance to diabetes. *Aust J Chem*, 67: 538–543.
189. *Golden S., Wals P.A., Okajima F., Katz J.* 1979. Glycogen synthesis by hepatocytes from diabetic rats. *Biochem J*, 182: 727–734.
190. *Goldsmith E., Sprang S., Fletterick R.* 1982. Structure of maltoheptaose by difference Fourier methods and a model for glycogen. *J Mol Biol*, 156: 411–427.
191. *Graham T.E., Adamo K.B., Shearer J., Marchand I., Saltin B.* 2001. Pro- and macroglycogenolysis: relationship with exercise intensity and duration. *J Appl Physiol*, 90: 873–879.
192. *Graham T.E., Yuan Z., Hill A.K., Wilson R.J.* 2010. The regulation of muscle glycogen: the granule and its proteins. *Acta Physiol*, 199: 489–498.
193. *Granlund A., Jensen-Waern M., Essen-Gustavsson B.* 2011. The influence of the PRKAG3 mutation on glycogen, enzyme activities and fibre types in different skeletal muscles of exercise trained pigs. *Acta Vet Scand*, 53: 20.
194. *Greenberg C.C., Jurczak M.J., Danos A.M., Brady M.J.* 2006. Glycogen branches out: new perspectives on the role of glycogen metabolism in the integration of metabolic pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291: E1–E8.
195. *Grecco H.E., Verveer P.J.* 2011. FRET in cell biology: still shining in the age of super-resolution? *Chemphyschem*, 12: 484–490.
196. *Greco A.V., Mingrone G., Benedetti G., Capristo E., Tataranni P.A., Gasbarrini G.* 1998. Daily energy and substrate metabolism in patients with cirrhosis. *Hepatology*, 27: 346–350.
197. *Gressner A.M., Schuppan D.* 1999. Cellular and molecular pathobiology, pharmacological intervention, and biochemical assessment of liver fibrosis. *Oxford textbook of clinical hepatology*. Oxford, UK: Oxford University Press, p. 607–629.

198. *Grisham J.W.* 1969. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating liver; autoradiography with thymidine- H_3 . *Cancer Res*, 22: 842–849.
199. *Gruppuso P.A., Brautigam D.L.* 1989. Induction of hepatic glycogenesis in the fetal rat. *Am J Physiol*, 256: E49–E54.
200. *Guidotti J-E., Bregerie O., Robert A., Deley P., Brechot C., Desdouets C.* 2003. Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. *J Biol Chem*, 278: 19095–19101.
201. *Gunja-Smith Z., Marshall J.J., Mercier C., Smith E.E., Whelan W.J.* 1970. A revision of the Meyer-Bernfeld model of glycogen and amylopectin. *FEBS Lett*, 12: 101–104.
202. *Haines J.L., Ozelius L.J., McFarlane H., Menon A., Tzall S., Martiniuk F., Hirschhorn R., Gusella J.F.* 1990. A genetic linkage map of chromosome 17. *Genomics*, 8: 1–6.
203. *Hackl C., Schlitt H.J., Renner P., Lang S.A.* 2016. Liver surgery in cirrhosis and portal hypertension. *World J Gastroenterol*, 22: 2725–2735.
204. *Hallgren N.K., Busby E.R., Mommsen T.P.* 2003. Cell volume affects glycogen phosphorylase activity in fish hepatocytes. *J Comp Physiol B*, 173: 591–599.
205. *Hargreaves M.* 2004. Muscle glycogen and metabolic regulation. *Proc Nutr Soc*, 63: 217–220.
206. *Harvey P.J., Gready J.E., Hickey H.M., Le Couteur D.G., McLean A.J.* 1999. ^{31}P and 1H NMR spectroscopic studies of liver extracts of carbon tetrachloride-treated rats. *NMR Biomed*, 12: 395–401.
207. *Hata K., Hata M., Hata M., Matsuda K.* 1984. A proposed model of glycogen particle. *J Jpn Soc Starch Sci*, 31: 146–155.
208. *Henrissat B., Davies G. J.* 2000. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families, modules, and implications for genomics. *Plant Physiol*, 124: 1515–1519.
209. *Hers H-G.* 1981. The metabolism of glycogen in the liver of foetal and newborn rats. In *Metabolic adaptation to extrauterine life*. Brussels-Luxembourg: ECSC, EEC, EAEC, pp. 3–7.
210. *Hickenbottom R.S., Hornbrook K.R.* 1971. Effects of carbon tetrachloride on the metabolism of liver glycogen in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 178: 383–394.
211. *Hicks J., Wartchow E., Mierau G.* 2011. Glycogen storage diseases: a brief review and update on clinical features, genetic abnormalities, pathologic features, and treatment. *Ultrastruct Pathol*, 35: 183–196.
212. *Hirschhorn R., Reuser A.J.* 2000. Glycogen storage disease type II: acid α -glucosidase (acid maltase) deficiency. In *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. N.Y.: McGraw-Hill, pp. 3389–3420.
213. *Holstein A., Hinze S., Thiessen E., Plaschke A., Egberts E.H.* 2002. Clinical implication of hepatogenous diabetes in liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol*, 17: 677–681.
214. *Hundal R.S., Krssak M., Dufour S., Laurent D., Lebon V., Chandramouli V., Inzucchi S.E., Schumann W.C., Petersen K.F., Landau B.R., Shulman G.I.* 2000. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes*, 49: 2063–2069.
215. *Hurley T.D., Stout S., Miner E., Zhou J., Roach P.J.* 2005. Requirements for catalysis in mammalian glycogenin. *J Biol Chem*, 280: 23892–23899.

216. Hurley T.D., Walls C., Bennett J.R., Roach P.J., Wang M. 2006. Direct detection of glycogenin reaction products during glycogen initiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 348: 374–378.
217. Hyypää S. 2007. Post-exercise muscle glycogen repletion in horses. MTTA Agrifood research reports 107. Finland, 82 pp.
218. Ikesawa Y., Yamatani K., Ogawa A., Ohnuma H., Igarashi M., Daimon M., Manaka H., Sasaki H. 1998. Effects of glucagon on glycogenolysis and gluconeogenesis are region-specific in periportal and perivenous hepatocytes. *J Lab Clin Med*, 132: 547–555.
219. Ivy J.L. 2004. Regulation of muscle glycogen repletion, muscle protein synthesis and repair following exercise. *J Sports Sci Med*, 3: 131–138.
220. Iype P.T., Bhargava P.M., Tasker A.D. 1965. Some aspects of chemical and cellular composition of adult rat liver. *Exp Cell Res*, 40: 233–251.
221. James J., Tas J., Bosch K.S. 1979. Growth patterns of rat hepatocytes during postnatal development. *Europ J Cell Biol*, 19: 222–226.
222. James J., Bosch K.S., Fronik G.M., Houtkooper J.M. 1986. Naphthol-yellow-S-protein content of individual rat hepatocytes as related to food intake and short-term starvation. *Cell Tissue Res*, 243: 165–169.
223. James A.P., Barnes P.D., Palmer T.N., Fournier P.A. 2008. Proglycogen and macroglycogen: artifacts of glycogen extraction? *Metabolism*, 57: 535–543.
224. Jares-Erijman E.A., Jovin T.M. 2003. FRET imaging. *Nat Biotechnol*, 21: 1387–1395.
225. Ji S., Lemasters J.J., Christenson V., Thurman R.G. 1982. Periportal and pericentral pyridine nucleotide fluorescence from the surface of the perfused liver: evaluation of the hypothesis that chronic treatment with ethanol produces pericentral hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79: 5415–5419.
226. Jiang S., Heller B., Tagliabracci V.S., Zhai L., Irimia J.M., DePaoli-Roach A.A., Wells C.D., Skurat A.V., Roach P.J. 2010. Starch binding domain-containing protein 1/genethonin 1 is a novel participant in glycogen metabolism. *J Biol Chem*, 285: 34960–34971.
227. Jorgensen P., Tyers M. 2004. How cells coordinate growth and division. *Curr Biol*, 14: R1014–R1027.
228. Junqueira L.C.U., Bignolas G., Brentan R.R. 1979. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*, 11: 447–455.
229. Jungermann K., Sasse D. 1978. Heterogeneity of liver parenchymal cells. *Trends Biochem*, 3: 198–202.
230. Jungermann K. 1987. Metabolic zonation of liver parenchyma: significance for the regulation of glycogen metabolism, gluconeogenesis and glycolysis. *Diabetes Metab Rev*, 3: 269–293.
231. Jungermann K., Katz J. 1989. Functional specialization of hepatocytes. *Physiol Rev*, 69: 718–745.
232. Jungermann K. 1992. Role of intralobular compartmentation in hepatic metabolism. *Diabetes Metab*, 18: 81–86.
233. Jungermann K., Kietzmann T. 1997. Role of oxygen in the zonation of carbohydrate metabolism and gene expression in liver. *Kidney Int*, 51: 402–412.
234. Jurczak M.J., Danos A.M., Rehrmann V.R., Brady M.J. 2008. The role protein translocation in the regulation metabolism. *J Cell Biochem*, 104: 435–443.

235. *Kalhan S., Parimi P.* 2000. Gluconeogenesis in the fetus and neonate. *Semin Perinatol*, 24: 94–106.
236. *Kanai K., Watanabe J., Asaka Y., Fujimoto S., Kanamura S.* 1992. Postnatal changes in sublobular distribution of NADPH-cytochrome P-450 reductase in rat liver. *Histochem J*, 24: 957–963.
237. *Kasten F.H.* 1959. Schiff-type reagents in cytochemistry. *Histochemie*, 6: 466–500.
238. *Kasten F.H.* 1960. Recent studies on the Feulgen reaction for deoxyribonucleic acid. *Biochem Pharmacol*, 4: 86–98.
239. *Katz N., Teutsch H.F., Jungermann K., Sasse D.* 1977. Heterogenous reciprocal localization of fructose-1,6-bisphosphatase and glucokinase in microdesected periportal and perivenous rat liver tissue. *FEBS Lett*, 83: 272–276.
240. *Katz J., Golden S., Wals P.A.* 1979. Glycogen synthesis by rat hepatocytes. *Biochem J*, 180: 389–402.
241. *Khan R.S., Newsome P.N.* 2016. Non-alcoholic fatty liver disease and liver transplantation. *Metabolism*, doi: 10.1016/j.metabol.2016.02.013.
242. *Kirchner G., Harbers M., Bunsch A., Seitz H.J., Hoppner W.* 1993. Zonation of glucokinase in rat liver changes during postnatal development. *FEBS Lett*, 328: 119–124.
243. *Kits Van Heijningen A.J., Kemp A.* 1955. Free and fixed glycogen in rat muscle. *Biochem J*, 59: 487–491.
244. *Kohno H., Kashimura K., Katon S., Ohkubo Y.* 1991. Changes in transglutaminase activity in carbon tetrachloride-damaged rat liver. *Experientia*, 47: 70–75.
245. *Koike Y., Suzuki Y., Nagata A., Furuta S., Nagata T.* 1982. Studies on DNA content of hepatocytes in cirrhosis and hepatoma by means of microspectrophotometry and radioautography. *Histochemistry*, 73: 549–562.
246. *Kokubun E., Hirabara S.M., Fiamoncini J., Curi R., Haebisch H.* 2009. Changes of glycogen content in liver, skeletal muscle, and heart from fasted rats. *Cell Biochem Funct*, 27: 488–495.
247. *Krähenbühl S., Weber F.L., Brass E.P.* 1991. Decreased hepatic glycogen content and accelerated response to starvation in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Hepatology*, 14: 1189–1195.
248. *Krähenbühl S., Reichen J.* 1993. Decreased hepatic glucose production in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *J Hepatol*, 19: 64–70.
249. *Krähenbühl L., Talos C., Reichen J., Krahenbuhl S.* 1996. Progressive decrease in tissue glycogen content in rats with long-term cholestasis. *Hepatology*, 24: 902–907.
250. *Krähenbühl L., Lang C., Ludes S., Seiler C., Shafer M., Zimmermann A., Krähenbühl S.* 2003. Reduced hepatic glycogen stores in patients with liver cirrhosis. *Liver Int*, 23: 101–109.
251. *Kraniou Y., Cameron-Smith D., Misso M., Collier G., Hargreaves M.* 2000. Effects of exercise on GLUT-4 and glycogenin gene expression in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985), 88: 794–796.
252. *Krssak M., Brehm A., Bernroider E., Anderwald C., Nowotny P., Dalla Man C., Cobelli C., Cline G.W., Shulman G.I., Waldhausl W., Roden M.* 2004. Alterations in postprandial hepatic glycogen metabolism in type 2 diabetes. *Diabetes*, 53: 3048–3056.
253. *Krumschnabel G., Gstir R., Manzl C., Prem C., Pafundo D., Schwarzbaum P.J.* 2003. Metabolic and ionic responses of trout hepatocytes to anisosmotic exposure. *J Exp Biol*, 206: 1799–1808.

254. *Kruszynska Y.T., McIntyre N.* 1991. Carbohydrate metabolism. Oxford textbook of clinical hepatology. Oxford, UK: Oxford University Press, p. 129–143.
255. *Kruszynska Y.T., Meyer-Alber A., Darakshan F., Home P.D., McIntyre N.* 1993. Metabolic handling of orally administered glucose in cirrhosis. *J Clin Invest*, 91: 1057–1066.
256. *Kruszynska Y.T.* 1999. Carbohydrate metabolism. In Oxford textbook of clinical hepatology. Oxford, UK: Oxford University Press, p. 257–286.
257. *Kudryavtsev B.N., Kudryavtseva M.V., Sakuta G.A., Stein G.I.* 1993. Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle. *Virchows Archiv Abteilung B Cell Pathology*, 64: 387.
258. *Kudryavtseva M.V.* 1967. Cytophotometric study of the glycogen formation in the liver of rat embryos. *Evol Biochem*, 3: 309–313.
259. *Kudryavtseva M.V., Sakuta G.A., Stein G.I., Kudryavtsev B.N.* 1992. The metabolic zonation of glycogen in the rat liver cells in the course of its resynthesis. *Tissue and Cell*, 24: 31–25.
260. *Kudryavtseva M.V., Sakuta G.A., Skorina A.D., Stein G.I., Emelyanov A.V., Kudryavtsev B.N.* 1996. Quantitative analysis of glycogen content in hepatocytes of portal and central lobule zones of normal human liver and in patients with chronic hepatitis of different etiology. *Tissue and Cell*, 28: 279–285.
261. *Kudryavtseva M.V., Bezborodkina N.N., Radchenko V.G., Okovity S.V., Kudryavtsev B.N.* 2001. Metabolic heterogeneity of glycogen in hepatocytes of patients with liver cirrhosis: the glycogen of the liver lobule zones in cirrhosis. *Europ J Gastroenterol Hepatol*, 13: 693–697.
262. *Kudryavtseva M.V., Bezborodkina N.N., Okovity S.V., Kudryavtsev B.N.* 2003. Effects of the 2-ethylthiobenzimidazole hydrobromide (bemithyl) on carbohydrate metabolism in cirrhotic rat liver. *Exp Toxic Pathol*, 54: 339–347.
263. *Kugler J.H., Wilkinson W.J.* 1959. A relation between total glycogen content of ox myocardium and its histochemical demonstration. *J Histochem Cytochem*, 7: 298–402.
264. *Kugler J.H., Wilkinson W.J.* 1960. Glycogen fractions and their role in the histochemical detection of glycogen. *J Histochem Cytochem*, 8: 195–199.
265. *Kugler J.H., Wilkinson W.J.* 1961. The basis for the histochemical detection of glycogen. *J Histochem Cytochem*, 9: 498–503.
266. *Kuwajima M., Golden M.S., Katz J., Unger R.H., Foster D.W., McGarry J.D.* 1986. Active hepatic glycogen synthesis from gluconeogenic precursors despite high tissue levels of fructose 2,6-biphosphate. *J Biol Chem*, 261: 2632–2637.
267. *Lamers W.H., Hilberts A., Furt E., Smith J., Jonges G.N., van Noorden C.J., Janzen J.W., Charles R., Moorman A.F.* 1989. Hepatic enzymic zonation: a reevaluation of the concept of the liver acinus. *Hepatology*, 10: 72–76.
268. *Lee C.Y., Ryu H.W., Ko T.-S.* 2001. Binding features of ethidium bromide and their effects on nuclease susceptibility of calf thymus DNA in presence of spermine. *Bull Korean Chem Soc*, 22: 87–89.
269. *LeBouton A.V.* 1982. Routine overnight starvation and immunocytochemistry of hepatocyte albumin content. *Cell Tissue Res*, 227: 423–427.

270. *Levene A.P., Goldin R.D.* 2010. Physiological hepatic nuclear vacuolation — how long does it persist? *Histopathology*, 56: 426–429.
271. *Lim J.A., Li L., Raben N.* 2014. Pompe disease: from pathophysiology to therapy and back again. *Front Aging Neurosci*, 6: 177.
272. *Lodish H., Berck A.* 2003. *Molecular cell biology* (5th edition).
273. *Lohi H., Ianzano L., Zhao X.C., Chan E.M., Turnbull J., Scherer S.W., Ackerley C.A., Minassian B.A.* 2005. Novel glycogen synthase kinase 3 and ubiquitination pathways in progressive myoclonus epilepsy. *Hum Mol Genet*, 14: 2727–2736.
274. *Lomako J., Lomako W.M., Whelan W.J.* 1991. Proglycogen: a low-molecular-weight form of muscle glycogen. *FEBS Lett*, 279: 223–228.
275. *Lomako J., Lomako W.M., Whelan W.J., Dombro R.S., Neary J.T., Norenberg M.D.* 1993. Glycogen synthesis in the astrocyte: from glycogenin to proglycogen to glycogen. *FASEB J*, 7: 1386–1393.
276. *Lomako J., Lomako W.M., Whelan W.J.* 1995. Glycogen metabolism in quail embryo muscle. The role of the glycogenin primer and the intermediate proglycogen. *Eur J Biochem*, 234: 343–349.
277. *Lomako J., Lomako W.M., Whelan W.J.* 2004. Glycogenin: the primer for mammalian and yeast glycogen synthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1673: 45–55.
278. *Lopez-Delgado J.C., Ballus J., Esteve F., Betancur-Zambrano N.L., Corral-Velez V., Manez R., Betbese A.J., Roncal J.A., Javierre C.* 2016. Outcomes of abdominal surgery in patients with liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 22: 2657–2667.
279. *Madsen N.B., Cori C.F.* 1958. The binding of glycogen and phosphorylase. *J Biol Chem*, 233: 1251–1256.
280. *Magnusson I., Rothman D.L., Katz L.D., Shulman R.G., Shulman G.I.* 1992. Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ¹³C nuclear magnetic resonance study. *J Clin Invest*, 90: 1323–1327.
281. *Magnusson I., Rothman D.L., Jucker B., Cline G.W., Shulman R.G., Shulman G.I.* 1994. Liver glycogen turnover in fed and fasted humans. *Am J Physiol*, 266: E796–E803.
282. *Manners D.J.* 1968. Branching enzymes. In *Control of Glycogen Metabolism*. Oslo-London: Universitetsforlaget, Academic Press, pp. 83–100.
283. *Marchand I., Chorneyko K., Tarnopolsky M., Hamilton S., Shearer J., Potvin J., Graham T.E.* 2002. Quantification of subcellular glycogen in resting human muscle: granule size, number, and location. *J Appl Physiol* (1985), 93: 1598–1607.
284. *Marchand I., Tarnopolsky M., Adamo K.B., Bourgeois J.M., Chorneyko K., Graham T.E.* 2007. Quantitative assessment of human muscle glycogen granules size and number in subcellular locations during recovery from prolonged exercise. *J Physiol*, 580(Pt 2): 617–628.
285. *Matsui T., Soya S., Okamoto M., Ichitani Y., Kawanaka K., Soya H.* 2011. Brain glycogen decreases during prolonged exercise. *J Physiol*, 589: 3383–3393.
286. *Mauss S., Berg T., Rockstroh J., Sarrazin C., Wedemeyer H.* 2015. *Hepatology. A Clinical Textbook*. 6th edition. Germany: Flying publisher, p. 654.

287. *Mayatepek E., Hoffmann B., Meissner T.* 2010. Inborn errors of carbohydrate metabolism. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 24: 607–618.
288. *McBride A., Ghilagaber S., Nikolaev A., Hardie D.G.* 2009. The glycogen-binding domain on the AMPK β subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor. *Cell Metab*, 9: 23–34.
289. *McManus J.A.F.* 1946. Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature*, 158: 202.
290. *Meinke M.H., Edstrom R.D.* 1991. Muscle glycogenolysis. Regulation of the cyclic interconversion of phosphorylase a and phosphorylase b. *J Biol Chem*, 266: 2259–2266.
291. *Melchiorri C., Chieco P., Zedda A.I., Coni P., Ledda-Columbano G.M., Columbano A.* 1993. Ploidy and nuclearity of rat hepatocytes after compensatory regeneration or mitogen-induced liver growth. *Carcinogenesis*, 14: 1825–1830.
292. *Melchiorri C., Bolondi L., Chieco P., Pagnoni M., Gramantieri L., Barbara L.* 1994. Diagnostic and prognostic value of DNA ploidy and cell nuclearity in ultrasound-guided liver biopsies. *Cancer*, 74: 1713–1719.
293. *Melendez R., Melendez-Hevia E., Cascante M.* 1997. How did glycogen structure evolve to satisfy the requirement for rapid mobilization of glucose? A problem of physical constraints in structure building. *J Mol Evol*, 45: 446–455.
294. *Melendez R., Melendez-Hevia E., Mas F., Mach J., Cascante M.* 1998. Physical constraints in the synthesis of glycogen that influence its structural homogeneity: a two-dimensional approach. *Biophys J*, 75: 106–114.
295. *Melendez R., Melendez-Hevia E., Canela E.I.* 1999. The fractal structure of glycogen: a clever solution to optimize cell metabolism. *Biophys J*, 77: 1327–1332.
296. *Melendez-Hevia E., Isidore A.* 1985. The game of the pentose phosphate cycle. *J Theor Biol*, 117: 251–263.
297. *Melendez-Hevia E., Torres N.V.* 1988. Economy of design in metabolic pathways: further remarks on the game of the pentose phosphate cycle. *J Theor Biol*, 132: 97–111.
298. *Melendez-Hevia E., Waddell T.G., Shelton E.D.* 1993. Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule. *Biochem J*, 295(Pt 2): 477–483.
299. *Melendez-Hevia E., Waddell T.G., Montero F.* 1994. Optimization of metabolism: the evolution of metabolic pathways toward simplicity through the game of the pentose phosphate cycle. *J Theor Biol*, 166: 201–220.
300. *Melendez-Hevia E., Waddell T.G., Raposo R.R., Lupianez J.A.* 1995. Evolution of metabolism: optimization of glycogen structure. *J Biol Systems*, 3: 177–186.
301. *Miethke H., Wittig B., Nath A., Zierz S., Jungermann K.* 1985. Metabolic zonation in liver of diabetic rats. Zonal distribution of phosphoenolpyruvate carboxykinase, pyruvate kinase, glucose-6-phosphatase and succinate dehydrogenase. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 366: 493–501.
302. *Minassian B.A., Lee J.R., Herbrick J.A., Huizenga J., Soder S., Mungall A.J., Dunham I., Gardner R., Fong C.Y., Carpenter S., Jardim L., Satishchandra P., Andermann E., Snead O.C. 3rd, Lopes-Cendes I., Tsui L.C., Delgado-Escueta A.V., Rouleau G.A., Scherer S.W.* 1998. Mutations in a gene encoding a novel protein tyrosine phosphatase cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat Genet*, 20: 171–174.

303. *Mion F., Galoun A., Agosto E., Minaire Y.* 1996. Carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats: influence of the acute effects of the toxin on glucose metabolism. *Hepatology*, 582–588.
304. *Mithieux G., Gautier-Stein A.* Intestinal glucose metabolism revisited. 2014. *Diabetes Res Clin Pract*, 105: 295–301.
305. *Miyawaki A.* 2011. Development of probes for cellular functions using fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer. *Annu Rev Biochem*, 80: 357–373.
306. *Moorman A.F., de Boer P.A., Charles R., Lamers W.H.* 1991. Pericentral expression pattern of glucokinase mRNA in the rat liver lobulus. *FEBS Lett*, 287: 47–52.
307. *Moore M.C., Cherrington A.D., Clin G., Pagliasotti M.J., Jones E.M., Neal D.W., Badet C., Shulman G.I.* 1991. Sources of carbon for hepatic glycogen synthesis in the conscious dog. *J Clin Invest*, 88: 578–587.
308. *Moses S.W., Chayoth R., Levin S., Lazarovitz E., Rubinstein D.* 1968. Glucose and glycogen metabolism in erythrocytes from normal and glycogen storage disease type III subjects. *J Clin Invest*, 47: 1343–1348.
309. *Moses S.W., Bashan N., Gutman A.* 1972. Glycogen metabolism in the normal red blood cell. *Blood*, 40: 836–843.
310. *Moses S.W.* 2002. Historical highlights and unsolved problems in glycogen storage disease type 1. *Eur J Pediatr*, 161 Suppl 1: S2–S9.
311. *Mota-Rojas D., Orozco-Gregorio H., Villanueva-Garcia D., Bonilla-Jaime H., Suarez-Bonilla X., Hernandez-Gonzalez R., Roldan-Santiago P., Trujillo-Ortega M.E.* 2011. Foetal and neonatal energy metabolism in pigs and human: a review. *Vet Med*, 56: 215–225.
312. *Mu J., Skurat A.V., Roach P.J.* 1997. Glycogenin-2, a novel self-glucosylating protein involved in liver glycogen biosynthesis. *J Biol Chem*, 272: 27589–27597.
313. *Müller M.J., Willmann O., Rieger A., Fenk A., Selberg O., Lautz H.U., Bürger M., Balks H.J., von zur Mühlen A., Schmidt F.W.* 1992. Mechanism of insulin resistance associated with liver cirrhosis. *Gastroenterology*, 102: 2033–2041.
314. *Nakamura M.* 1977. Handbook of starch science. Tokyo: Asakura-shoten, p.18.
315. *Needham J.* 1931. Chemical Embryology. Vol. 3. London and N.Y.: Cambridge Univ. Press, p. 1314.
316. *Nelson D.L., Cox M.M.* 2012. Lehninger principles of biochemistry. Bedford, MA: Macmillan higher education, 1100 p.
317. *Newgard C.B., Moore S.U., Foster D.W., McGarry J.D.* 1983. Studies on the mechanism by which exogenous glucose is converted into liver glycogen in the rat. A direct or indirect pathway? *J Biol Chem*, 258: 8046–8050.
318. *Newman J.D., Armstrong J.M.* 1978. On the activities of glycogen phosphorylase and glycogen synthase in the liver of the rat. *Biochem Biophys Acta*, 544: 225–233.
319. *Newsholme E.A., Start C.* 1975. Regulation in metabolism. London New York Sydney Toronto: John Wiley&Sons, 349 p.
320. *Nielsen J.N., Richter E.A.* 2003. Regulation of glycogen synthase in skeletal muscle during exercise. *Acta Physiol Scand*, 178: 309–319.

321. *Nielsen J., Suetta C., Hvid L.C., Schroder H.D., Aagaard P., Ortenblad N.* 2010. Subcellular localization-dependent decrements in skeletal muscle glycogen and mitochondria content following short-term disuse in young and old men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 299: E1053–E1060.
322. *Niewoehner C.B., Gilboe D.P., Nuttall F.Q.* 1984. Metabolic effects of oral glucose in the liver of fasted rats. *Amer J Physiol*, 246: E89–E94.
323. *Niewoehner C.B., Nuttall F.Q.* 1986. Mechanism of stimulation of liver glycogen synthesis by fructose in alloxan diabetic rats. *Diabetes*, 35: 705–711.
324. *Nishino I., Fu J., Tanji K., Yamada T., Shimojo S., Koori T., Mora M., Riggs J.E., Oh S.J., Koga Y., Sue C.M., Yamamoto A., Murakami N., Shanske S., Byrne E., Bonilla E., Nonaka I., DiMauro S., Hirano M.* 2000. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature*, 406: 906–910.
325. *Nordlie R.C., Sukalski K.A., Munoz J.M., Baldwin J.J.* 1983. Type Ic, a novel glycogenosis. Underlying mechanism. *J Biol Chem*, 258: 9739–9744.
326. *Nuttall F.Q., Gannon M.C., Bai G., Lee E.Y.* 1994. Primary structure of human liver glycogen synthase deduced by cDNA cloning. *Arch Biochem Biophys*, 311: 443–449.
327. *Obel L.F., Muller M.S., Walls A.B., Sickmann H.M., Bak L.K., Waagepetersen H.S., Schousboe A.* 2012. Brain glycogen-new perspective on its metabolic function and regulation at the subcellular level. *Front Neuroenergetics*, 4: 1–15.
328. *Okazaki I., Maruyama K.* 1985. Formation of liver fibrosis to cirrhosis from the aspect of collagen degradation. *Exp Pathol*, 28: 137–138.
329. *Onori P., Morini S., Franchitto A., Sferra R., Alvaro D., Gaudio E.* 2000. Hepatic microvascular features in experimental cirrhosis: a structural and morphometrical study in CCl₄-treated rats. *J Hepatol*, 33: 555–563.
330. *Orrell S.A., Bueding E.* 1964. A comparison of products obtained by various procedures used for the extraction of glycogen. *J Biol Chem*, 239: 4021–4026.
331. *Owen O.E., Reichle F.A., Mazzoli M.A., Kreulen I.* 1981. Hepatic, gut and renal substrate flux in patients with hepatic cirrhosis. *J Clin Invest*, 68: 240–252.
332. *Owen O.E., Caprio S., Reichard G.A., Mozzoli M.A., Boden G., Owen R.S.* 1983. Ketosis of starvation: a revisit and new perspectives. *Clin Endocrinol Metab*, 12: 359–379.
333. *Ozen H.* 2007. Glycogen storage diseases: new perspectives. *World J Gastroenterol*, 13: 2541–2553.
334. *Pautsch A., Stadler N., Wissdorf O., Langkopf E., Moreth W., Streicher R.* 2008. Molecular recognition of the protein phosphatase 1 glycogen targeting subunit by glycogen phosphorylase. *J Biol Chem*, 283: 8913–8918.
335. *Pellegrino C., Ricci P., Tongiani K.* 1963. A quantitative cytochemical and physiological study of the rat adrenal cortex in hypertrophy after unilateral adrenalectomy. *Exp Cell Res*, 31: 167–182.
336. *Peraino C., Pitot H.C.* 1964. Studies on the induction and repression of enzymes in rat liver. II Carbohydrate repression of dietary and hormonal induction of threonine dehydrase and ornithine delta-transaminase. *J Biol Chem*, 239: 4308–4313.

337. *Petersen K.F., Krssak M., Navarro V., Chandramouli V., Hundal R., Schumann W.C., Landau B.R., Shulman G.I.* 1999. Contributions of net hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis to glucose production in cirrhosis. *Am J Physiol*, 276: E529–E535.
338. *Petrides A.S., Vong C., Schulze-Berge D., Matthews D., Strohmeyer G.* 1994. Pathogenesis of glucose intolerance and diabetes mellitus in cirrhosis. *Hepatology*, 19: 616–627.
339. *Pfeifer U.* 1973. Cellular autophagy and cell atrophy in the rat liver during long-term starvation. A quantitative morphological study with regard to diurnal variations. *Virchows Arch B Cell Pathol*, 12: 195–211.
340. *Phillips M.J., Poucell S., Patterson J., Valencia P.* 1987. The liver. An atlas and text of ultrastructural pathology. N.Y.: Raven Press, p. 585.
341. *Pilegaard H., Keller C., Steensberg A., Helge J.W., Pedersen B.K., Saltin B., Neuffer P.D.* 2002. Influence of pre-exercise muscle glycogen content on exercise-induced transcriptional regulation of metabolic genes. *J Physiol*, 541(Pt 1): 261–271.
342. *Piston D.W., Kremers G.J.* 2007. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends Biochem Sci*, 32: 407–414.
343. *Planaguma A., Claria J., Miquel R., Lopez-Parra M., Titos E., Masferrer J.L., Arroyo V., Rodes J.* 2005. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor SC-236 reduces liver fibrosis by mechanisms involving nonparenchymal cell apoptosis and PPARgamma activation. *FASEB J*, 19: 1120–1122.
344. *Powell P.O., Sullivan M.A., Sheehy J.J., Schulz B.L., Warren F.J., Gilbert R.G.* 2015. Acid hydrolysis and molecular density of phytoglycogen and liver glycogen helps understand the bonding in glycogen α (composite) particles. *PloS One*, 10: e0134065.
345. *Prats C., Cadefau J.A., Cusso R., Qvortrup K., Nielsen J.N., Wojtaszewski J.F., Hardie D.G., Stewart G., Hansen B.F., Ploug T.* 2005. Phosphorylation-dependent translocation of glycogen synthase to a novel structure during glycogen resynthesis. *J Biol Chem*, 280: 23165–23172.
346. *Preiss J., Walsh D.A.* 1981. The comparative biochemistry of glycogen and starch. In *Biology of Carbohydrates*. N.Y.: John Wiley and Sons, pp. 199–314.
347. *Prins D.A., Jeanlos R.W.* 1948. Chemistry of the carbohydrates. *Annu Rev Biochem*, 17: 67–96.
348. *Princen J.M., Mol-Backx G.P., Yap S.H.* 1983. Restoration effects of glucose refeeding on reduced synthesis of albumin and total protein and on disaggregated polyribosomes in liver of starved rats: evidence of a post-transcription control mechanism. *Ann Nutr Metab*, 27: 182–193.
349. *Przybylski W., Monin G., Kocwin-Podsiadla M., Krzeczio E.* 2006. Glycogen metabolism in muscle and its effects on meal quality in pigs – a mini review. *Polish J Food and Nutrition Sci*, 15/56: 257–262.
350. *Puthanveetil P., Wang F., Kewalramani G., Kim M.S., Hosseini-Beheshti E., Ng N., Lau W., Pulinilkunnit T., Allard M., Abrahani A., Rodrigues B.* 2008. Cardiac glycogen accumulation after dexamethasone is regulated by AMPK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295: H1753–H1762.
351. *Qian Y., Fang T., Shen B., Zhang S.* 2014. The glycogen synthase 2 gene (*Gys2*) displays parallel evolution between Old World and New World fruit bats. *J Mol Evol*, 78: 66–74.

352. *Raben N., Nagaraju K., Lee E., Kessler P., Byrne B., Lee L., LaMarca M., King C., Ward J., Sauer B., Plotz P.* 1998. Targeted disruption of the acid alpha-glucosidase gene in mice causes an illness with critical features of both infantile and adult human glycogen storage disease type II. *J Biol Chem*, 273: 19086–19092.
353. *Racine-Samson L., Scoazes J.Y., D'Errico A., Fiorentino M., Christa L., Moreau A., Roda C., Grigioni W.F., Feldman G.* 1996. The metabolic organization of the adult human liver: a comparative study of normal, fibrotic, and cirrhotic liver tissue. *Hepatology*, 24: 104–113.
354. *Rajvanshi P., Liu D., Ott M., Gagandeep S., Schilsky M.L., Gupta S.* 1998. Fractionation of rat hepatocyte subpopulations with varying metabolic potential, proliferative capacity, and retroviral gene transfer efficiency. *Exp Cell Res*, 244: 405–419.
355. *Rappaport A.M., Borowy Z.J., Loughheed W.M., Lotto W.N.* 1954. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology. *Anat Rec*, 119: 11–33.
356. *Rappaport A.M.* 1981. The acinus-microvascular unit of the liver. In *Hepatic circulation in health and disease*. N.Y.: Ravel Press, pp. 175–192.
357. *Recknagel R.O., Glende E.A.* 1973. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of lethal cleavage. *GRC Crit Rev Toxicol*, 2: 263–297.
358. *Reith A., Brdiczka D., Nolte J., Staudte H.W.* 1973. The inner membrane of mitochondria under influence of triiodothyronine and riboflavin deficiency in rat heart muscle and liver: a quantitative electronmicroscopical and biochemical study. *Exp Cell Res*, 77: 1–14.
359. *Richter E.A., Derave W., Wojtaszewski J.F.* 2001. Glucose, exercise and insulin: emerging concepts. *J Physiol*, 535(Pt 2): 313–322.
360. *Riggio O., Merli M., Leonetti F., Giovannetti P., Fonciello M., Folino S., Tamburrano G., Capocaccia L.* 1997. Impaired nonoxidative glucose metabolism in patients with liver cirrhosis: effects of two insulin doses. *Metabolism*, 46: 840–843.
361. *Roach P.J.* 2002. Glycogen and its metabolism. *Curr Mol Med*, 2: 101–120.
362. *Roach P.J., Skurat A.V.* 1997. Self-glucosylating initiator proteins and their role in glycogen biosynthesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 57: 289–316.
363. *Roach P.J., Depaoli-Roach A.A., Hurley T.D., Tagliabracci V.S.* 2012. Glycogen and its metabolism: some new development and old themes. *Biochem J*, 441: 763–787.
364. *Roe J.H., Bailey J.M., Gray R.R., Robinson J.N.* 1961. Complete removal of glycogen from tissues by extraction with cold trichloroacetic acid solution. *J Biol Chem*, 236: 1244–1246.
365. *Roesler W.J., Pugazhenti S., Khandelwal R.L.* 1990. Hepatic glycogen metabolism in the db/db mouse. *Mol Cell Biochem*, 92: 99–106.
366. *Rohr H.P., Hundstad A.C., Bianchi L., Eckert H.* 1970. Morphometric ultrastructural studies on daytime-induced changes in the liver parenchymal cells of rats. *Acta Anat (Basel)*, 76: 102–111.
367. *Rojas J.M., Schwartz M.W.* 2014. Control of hepatic glucose metabolism by islet and brain. *Diabetes Obes Metab*, 1: 33–40.

368. Romert P., Quistorff B., Bhenke O. 1993. Histological evaluation of the zonation of colloidal gold uptake by the rat liver. *Tissue Cell*, 25: 19–32.
369. Ruderman N.B., Aoki T.T., Cahill G.F. 1976. Gluconeogenesis and its disorders in man. In *Gluconeogenesis: its regulation in mammalian species*. N.Y.: John Wiley and Sons, pp. 515–532.
370. Rybicka K.K. 1996. Glycosomes — the organelles of glycogen metabolism. *Tissue Cell*, 28: 253–265.
371. Ryu J.H., Drain J., Kim J.H., McGee S., Gray-Weale A., Waddington L., Parker G.J., Hargreaves M., Yoo S.H., Stapleton D. 2009. Comparative structural analyses of purified glycogen particles from rat liver, human skeletal muscle and commercial preparations. *Int J Biol Macromol*, 45: 478–482.
372. Santer R., Kinner M., Steuerwald U., Kjærgaard S., Skovby F., Simonsen H., Shaiu W.L., Chen Y.T., Schneppenheim R., Schaub J. 2001. Molecular genetic basis and prevalence of glycogen storage disease type IIIA in the Faroe Islands. *Eur J Hum Genet*, 9: 388–391.
373. Sapsford K.E., Berti L., Medintz I.L. 2006. Materials for fluorescence resonance energy transfer analysis: beyond traditional donor-acceptor combinations. *Angew Chem Int Ed Engl*, 45: 4562–4589.
374. Sasse D., Spornitz U.M., Maly I.P. 1992. Liver architecture. *Enzyme*, 46: 8–32.
375. Schiemer H.-G. 1981. Interferenz-mikroskopie in der histochemie. In *Handbuch der histochemie*. Band I. Allgemeine methodic. Teil 4. Stuttgart N.Y.: Gustav Fischer Verlag, pp. 153–252.
376. Schippers H.M., Smit G.P., Rake J.P., Visser G. 2003. Characteristic growth pattern in male X-linked phosphorylase-b kinase deficiency (GSD IX). *J Inherit Metab Dis*, 26: 43–47.
377. Schliess F., Häussinger D. 2003. Cell volume and insulin signaling. *Int Rev Cytol*, 225: 187–228.
378. Schmidt U., Schmid H., Guder W. 1978. Liver cell heterogeneity. The distribution of fructose-bisphosphatase in fed and fasted rats and in man. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem*, 359: 193–198.
379. Schmueli E., Walker M., Alberti G., Record C.O. 1993. Normal splanchnic but impaired peripheral insulin-stimulated glucose uptake in cirrhosis. *Hepatology*, 18: 86–95.
380. Schneeweiss B., Graninger W., Ferenci P., Eichinger S., Grimm G., Schneider B., Laggner A.N., Lenz K., Kleinberger G. 1990. Energy metabolism in patients with acute and chronic liver disease. *Hepatology*, 11: 387–393.
381. Schneiter P., Gillet M., Chioloro R., Jequier E., Tappy L. 1999. Hepatic nonoxidative disposal of an oral glucose meal in patients with liver cirrhosis. *Metabolism*, 48: 1260–1266.
382. Schreiber G., Urban J., Zhringer J., Reutter W., Frosch U. 1971. The secretion of serum protein and the synthesis of albumin and total protein in regenerating rat liver. *J Biol Chem*, 246: 4531–4538.
383. Seglen P.O. 1997. DNA ploidy and autophagic protein degradation as determinants of hepatocellular growth and survival. *Cell Biol Toxicol*, 13: 301–315.
384. Segura J., Ruilope L.M. 2013. Contribution of the kidney to glucose homeostasis. *Med Clin (Barc)*, 2: 26–30.
385. Sell S. 2001. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology*, 33: 738–750.
386. Shearer J., Graham T.E. 2002. New perspectives on the storage and organization of muscle glycogen. *Can J Appl Physiol*, 27: 179–203.

387. *Shearer J., Graham T.E.* 2004. Novel aspects of skeletal muscle glycogen and its regulation during rest and exercise. *Exerc Sport Sci Rev*, 32: 120–126.
388. *Shearer J., Graham T.E., Battram D.S., Robinson D.L., Richter E.A., Wilson R.J., Bakovic M.* 2005. Glycogenin activity and mRNA expression in response to volitional exhaustion in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985), 99: 957–962.
389. *Shrayyef M.Z., Gerich J.E.* 2010. Normal glucose homeostasis. In *Principles of diabetes mellitus*. Germany: Springer, pp. 19–35.
390. *Sjostrom M., Friden J., Ekblom B.* 1982. Fine structural details of human muscle fibres after fibre type specific glycogen depletion. *Histochemistry*, 76: 425–438.
391. *Skurat A.V., Dietrich A.D., Zhai L., Roach P.J.* 2002. GNIP, a novel protein that binds and activates glycogenin, the self-glucosylating initiator of glycogen biosynthesis. *J Biol Chem*, 277: 19331–19338.
392. *Skurat, A.V., Dietrich, A.D., Roach, P.J.* 2006. Interaction between glycogenin and glycogen synthase. *Arch Biochem Biophys*, 456: 93–97.
393. *Slonim A.E., Bulone L., Ritz S., Goldberg T., Chen A., Martiniuk F.* 2000. Identification of two subtypes of infantile acid maltase deficiency. *J Pediatr*, 137: 283–285.
394. *Smythe C., Cohen P.* 1991. The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis. *Eur J Biochem*, 200: 625–631.
395. *Soberon G., Sanchez Q.E.* 1961. *J Biol Chem*, 236: 1602–1606.
396. *Sokal E.M., Trivedi P., Portmann B., Mowat A.P.* 1989. Developmental changes in the intra-acinar distribution of succinate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, glucose-6-phosphatase, and NADPH dehydrogenase in the rat liver. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 8: 522–527.
397. *Stapleton D., Nelson C., Parsawar K., McClain D., Gilbert-Wilson R., Barker E., Rudd B., Brown K., Hendrix W., O'Donnell P., Parker G.* 2010. Analysis of hepatic glycogen-associated proteins. *Proteomics*, 10: 2320–2329.
398. *Stearns S.B., Benzo C.A.* 1977. Structural and chemical alterations associated with hepatic glycogen metabolism in genetically diabetic (db) and in streptozotocin-induced diabetic mice. *Lab Invest*, 37: 180–187.
399. *Stetten M.R., Stetten D. Jr.* 1954. A study of the nature of glycogen regeneration in the intact animal. *J Biol Chem*, 207: 331–340.
400. *Stetten M.R., Stetten D. Jr.* 1958. Influence of molecular size of glycogen on the phosphorylase reaction. *J Biol Chem*, 232: 489–504.
401. *Stöcker E., Schultze B., Heine W., Liebscher H.* 1972. Wachstum und regeneration in parenchymatösen organen der ratte. *Ztschr Zellforsch*, 125: 306–331.
402. *Stuhmeier F., Hillisch A., Cleqq R.M., Diekman S.* 2000. Fluorescence energy transfer analysis of DNA structures containing several bulges and their interaction with CAP. *J Mol Biol*, 302: 1081–1100.
403. *Sugden M.C., Watts D.I., Palmer T.N., Myles D.D.* 1983. Direction of carbon flux in starvation and after refeeding in vitro and in vivo effects of 3-mercaptopropionate. *Biochem Int*, 7: 329–337.

404. *Sullivan M.A., Vilaplana F., Cave R.A., Stapleton D, Gray-Weale A.A., Gilbert R.G.* 2010. Nature of α and β particles in glycogen using molecular size distributions. *Biomacromolecules*, 11: 1094–1100.
405. *Sullivan M.A., O'Connor M.J., Umana F., Roura E., Jack K., Stapleton D.I., Gilbert R.G.* 2012. Molecular insights into glycogen α -particle formation. *Biomacromolecules*, 13: 3805–3813.
406. *Sullivan M.A., Aroney S.T., Li S., Warren F.J., Joo J.S., Mak K.S., Stapleton D.I., Bell-Anderson K.S., Gilbert R.G.* 2014. Changes in glycogen structure over feeding cycle sheds new light on blood-glucose control. *Biomacromolecules*, 15: 660–665.
407. *Tagliabracci V.S., Turnbull J., Wang W., Girard J.M., Zhao X., Skurat A.V., Delgado-Escueta A.V., Minassian B.A., Depaoli-Roach A.A., Roach P.J.* 2007. Laforin is a glycogen phosphatase, deficiency of which leads to elevated phosphorylation of glycogen in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 19262–19266.
408. *Tagliabracci V.S., Girard J.M., Segvich D., Meyer C., Turnbull J., Zhao X., Minassian B.A., Depaoli-Roach A.A., Roach P.J.* 2008. Abnormal metabolism of glycogen phosphate as a cause for Lafora disease. *J Biol Chem*, 283: 33816–33825.
409. *Tagliabracci V.S., Roach P.J.* 2010. Insights into the mechanism of polysaccharide dephosphorylation by a glucan phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 15312–15313.
410. *Tagliabracci V.S., Heiss C., Karthik C., Contreras C.J., Glushka J., Ishihara M., Azadi P., Hurley T.D., DePaoli-Roach A.A., Roach P.J.* 2011. Phosphate incorporation during glycogen synthesis and Lafora disease. *Cell Metab*, 13: 274–282.
411. *Takusagawa F.* 2010. Takusagawa's Note. Chapter-15. Glycogen metabolism. <http://www.indabook.org/d/Chapter-15-3-Takusagawa-s-Note-Reaction-mechanism-1-Formation-of-an-E-PL-P-i-glycogen-ternary-complex-2-Cleavage-of-the-glycosidic-bond-by-an-acid.pdf>, p. 25.
412. *Teutsch H.F., Schuerfeld D., Groezinger E.* 1999. Three-dimensional reconstruction of parenchymal units in the liver of the rat. *Hepatology*, 29: 494–505.
413. *Teutsch H.F.* 2005. The modular microachitecture of human liver. *Hepatology*. 42: 317–325.
414. *Thauer R.K., Jungermann K., Decker K.* 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev*, 41: 100–180.
415. *Thon V.J., Vigneron-Lesens C., Marianne-Pepin T., Montreuil J., Decq A., Rachez C., Ball S.G., Cannon J.F.* 1992. Coordinate regulation of glycogen metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Induction of glycogen branching enzyme. *J Biol Chem*, 267: 15224–15228.
416. *Tongiani R., Lopek N., Puccianelli E.* 1976. Hepatocyte population dynamics during hydrocortisone and thioacetamide treatment. *Histochemistry*, 47: 1–21.
417. *Toyoda Y., Miwa I., Kamiya M., Ogiso S., Nonogaki T., Aoki S., Okuda J.* 1995. Tissue and subcellular distribution of glucokinase in rat liver and their changes during fasting-refeeding. *Histochem Cell Biol*, 103: 31–38.
418. *Van der Kleij B.J.* 1951. A rapid determination of glycogen in tissues. *Biochim Biophys Acta*, 7: 481–482.

419. *Van de Werve G., Jeanrenaud B.* 1987. Liver glycogen metabolism: an overview. *Diabetes Metab Rev*, 3: 47–78.
420. *Vieira Ferreira L.F., Branco T.J.F., Botelho do Rego A.M.* 2004. Luminescence quantum yield determination for molecules adsorbed onto solid powdered particles. *Chem Phys Chem*, 5: 1848–1854.
421. *Vitalis B.* 1975. The effect of a long-term CCl₄ action on the DNA content of rat liver cell nuclei. A cytophotometric study. *Folia Histochem Cytochem (Krakow)*, 13: 207–212.
422. *Wajngot A., Chandramouli V., Schumann W.C., Efendic S., Laudau B.R.* 1991. Quantitation of glycogen/glucose-1-P cycling in liver. *Metabolism*, 40: 877–881.
423. *Waldegger S., Lang F.* 1998. Cell volume and gene expression. *J Membr Biol*, 162: 95–100.
424. *Walker R.P.* 1977. Regulation of liver glycogen metabolism by the portal blood glucose concentration in rats adapted to controlled feeding schedules. *Int J Biochem*, 8: 555–556.
425. *Watanabe M.* 1970. DNA synthesis in polyploid and binucleate hepatic cells in the regenerating rat liver of different ages. *Nagoya J Med Sci*, 33: 1–11.
426. *Watanabe T., Tanaka Y., Kimura Y.* 1984. A cytophotometrical study on the centenarian hepatocyte. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 46: 265–268.
427. *Whitton P.D., Hems D.A.* 1975. Glycogen synthesis in the perfused liver of streptozotocin-diabetic rats. *Biochem J*, 150: 153–165.
428. *Willems P.J., Gerver W.J., Berger R., Fernandes J.* 1990. The natural history of liver glycogenosis due to phosphorylase kinase deficiency: a longitudinal study of 41 patients. *Eur J Pediatr*, 149: 268–271.
429. *Willstätter R., Rhodewald M.* 1934. Protein binding of physiologically important substances. The conditions of glycogen in liver, muscle and leucocytes. *Z Physiol Chem*, 225: 103–124.
430. *Wilson R.J., Gusba J.E., Robinson D.J., Graham T.E.* 2007. Glycogenin protein and mRNA expression in response to changing glycogen concentration in exercise and recovery. *Am J Physiol Endocrinol Metabol*, 292: E1815–E1822.
431. *Wilson R.J.* 2009. Relating glycogenin protein levels and glycogen content post-contraction in human and rodent skeletal muscle. Thesis Univ. Guelph, 209 pp.
432. *Wilson W.A., Boyer M.P., Davis K.D., Burke M., Roach P.J.* 2010. The subcellular localization of yeast glycogen synthase is dependent upon glycogen content. *Can J Microbiol*, 56: 408–420.
433. *Wimmer M., Pette D.* 1979. Microphotometric studies on intraacinar enzyme distribution in rat liver. *Histochemistry*, 64: 23–33.
434. *Wimmer M., Luttringer C., Colombi M.* 1990. The development of the acinar heterotopic pattern of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in the newborn rat. *Histochemistry*, 94: 55–59.
435. *Wolfsdorf J.I., Weinstein D.A.* 2003. Glycogen storage diseases. *Rev Endocr Metab Disord*, 4: 95–102.
436. *Worby C.A., Gentry M.S., Dixon J.E.* 2008. Malin decreases glycogen accumulation by promoting the degradation of protein targeting to glycogen (PTG). *J Biol Chem*, 283: 4069–4076.
437. *Wu C., Okar D.A., Newgard C.B., Lange A.J.* 2002. Increasing fructose 2,6-bisphosphate overcomes hepatic insulin resistance of type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282: E38–E45.

438. Wu C., Okar D.A., Kang J., Lange A.J. 2005. Reproduction of hepatic glucose production as a therapeutic target in the treatment of diabetes. *Current Drug Target — Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 5: 51–59.
439. Yang Z., Vatta M. 2007. Danon disease as a cause of autophagic vacuolar myopathy. *Congenit Heart Dis*, 2: 404–409.
440. Yang X.R., Miller M.A., Yang R., Evans D.F., Edstrom R.D. 1990. Scanning tunneling microscopic images show a laminated structure for glycogen molecules. *FASEB J*, 4: 3140–3143.
441. Young F.G. 1957. Claude Bernard and the discovery of glycogen; a century of retrospect. *Br Med J*, 1: 1431–1437.
442. Zal T., Gascoigne N.R. 2004. Using live FRET imaging to reveal early protein–protein interactions during T cell activation. *Curr Opin Immunol*, 16: 674–683.
443. Zhao R., Duncan S.A. 2005. Embryonic development of the liver. *Hepatology*, 41: 956–967.
444. Zimmerman H.J. 1978. *Hepatotoxicity*. N.Y.: Appleton-Century Crofts, 530 p.

БЛАГОДАРНОСТИ

Прежде всего, автор выражает самые искренние слова благодарности зав. лабораторией, д.б.н., проф. Борису Николаевичу Кудрявцеву за широкий взгляд на научную проблему и помощь на каждом этапе подготовки диссертации; и научному руководителю, к.б.н. Безбородкиной Наталье Николаевне, за плодотворное обсуждение полученных результатов.

Автор выражает благодарность бывшим студентам, проходившим в Лаборатории клеточной патологии преддипломную практику, результаты которых включены в представленную работу: Елене Киршиной, Александре Вахтиной, Екатерине Мушинской, Екатерине Сивовой, Наталье Матюхиной.

Автор благодарен всем замечательным сотрудникам Лаборатории клеточной патологии — к.б.н. Екатерине Викторовне Байдюк, к.б.н. Галине Анатольевне Сакута — за помощь в освоении цитологических и гистологических методов, а самое главное за теплую, дружелюбную атмосферу в лаборатории. Отдельные слова благодарности автор выражает сотрудникам группы конфокальной микроскопии и анализа изображений в клеточной биологии — к.б.н. Григорию Израилевичу Штейну и Михаилу Леонидовичу Воробьеву — за помощь в освоении техник микроскопирования и программ для получения и обработки изображений.

Автор безгранично благодарен своей маме, Елене Арслановне, за любовь и каждодневную поддержку, которую она оказывает, мягко направляя к цели. Автор выражает искреннюю благодарность за понимание и сопереживание своим дорогим родственникам: дяде и тете — Шамилю Арслановичу и Ольге Васильевне.

За поддержку и ценные советы автор выражает признательность своим дорогим, близким друзьям: Елене Проходцевой, Анастасии Дьяченко, Карине Вирронен.

Диссертация посвящена светлой памяти талантливым людям и истинным ученым: к.б.н. Маргарите Васильевне Кудрявцевой, под руководством которой в Лаборатории клеточной патологии проводились работы по выявлению, определению количественного содержания гликогена и его фракций как в изолированных клетках, так и в ткани печени в норме и при различных патологиях; и моему папе, к.ф.-м.н. Юрию Алексеевичу Честнову, который всегда оставался предан своему делу и науке в целом.