

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Безбородкина Наталья Николаевна
старший научный сотрудник Лаборатории клеточной патологии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт цитологии Российской академии наук,
Санкт-Петербург

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Савостьянов Геннадий Александрович
ведущий научный сотрудник Лаборатории эволюции органов
чувств Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт эволюционной физиологии и
биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,
Санкт-Петербург

доктор биологических наук
Шаройко Владимир Владимирович
ведущий научный сотрудник межкафедральной лаборатории
биомедицинской химии Института химии Федерального
государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Санкт-Петербургский государственный
университет», Санкт-Петербург

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «21» октября 2016 года в 13.00 часов на заседании
Диссертационного совета Д 002.230.01 на базе ФГБУН Институт цитологии РАН по адресу:
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4.

Сайт института: <http://www.cytspb.rssi.ru>;
Адрес электронной почты: cellbio@incras.ru;
Факс: (812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте
Института.

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. 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 размер клеток и их плоидность на течение гликогенеза и содержание в них гликогена.

Со времени открытия гликогена К. Бернардом (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 гликогенозы. 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 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 подготовке 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.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Объекты исследования. Работа проведена на двух группах белых беспородных крыс-самцов (по 18 животных в каждой). Животных одной группы (опытной) подвергали ингаляционному воздействию парами четыреххлористого углерода (CCl₄) в герметичной камере по 20 минут 3 раза в неделю в течение 6 мес для получения экспериментального цирроза печени (ЦП). Животных другой группы, не подвергавшихся воздействию CCl₄, использовали в качестве контроля. Через 1 нед после прекращения отравления крыс в обеих группах подвергали голоданию

в течение 48 ч для истощения запасов гликогена в печени, после чего им перорально, с помощью катетера, вводили 30 %-ный раствор глюкозы из расчета 4 г на 1 кг веса тела. Сразу после прекращения голодания и через 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90 и 120 минут после введения глюкозы крыс декапитировали, а извлеченную печень использовали для дальнейших исследований.

Помимо этого, в работе использовали биопсийный материал печени больных хроническим гепатитом (ХГ) (5 чел) и циррозом печени (ЦП) (7 чел), полученный в клинике внутренних болезней № 2 СЗГМУ им. И.И. Мечникова. В качестве контроля использован материал пациентов (7 чел), у которых отсутствовали морфологические и клинические признаки поражения печени.

1.2. Методы приготовления препаратов. Для цитофотометрических исследований приготавливали мазки изолированных гепатоцитов (Кудрявцева и др., 1983). Срезы печени (5–7 мкм), полученные стандартным методом, окрашивали гематоксилин-эозином по Майеру или пикросириусом (Juncueira, 1979).

1.3. Измерение сухой массы, содержания гликогена и ДНК в одной и той же клетке проводили с помощью комбинированного цитофотометрического метода (Кудрявцев и др., 1979). Для определения местоположения клеток на предметное стекло алмазным стеклорезом наносили координатную сетку. Изображения выбранных участков препаратов получали с помощью микроскопа Axioskop (Carl Zeiss, Германия) (объектив Plan-NEOFLUAR 20×/0.50), оборудованного цифровой камерой Leica 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 (рис. 1, а). На каждом препарате отмечали 100–500 клеток.

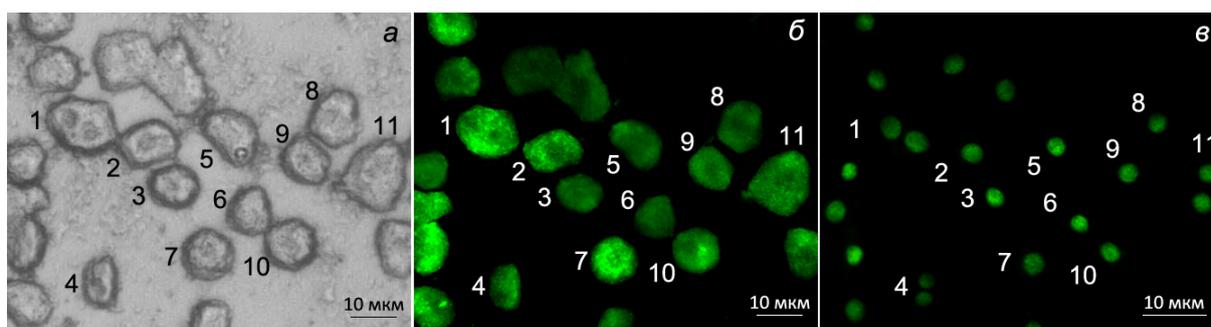


Рис. 1. *а* — изолированные гепатоциты с присвоенными им номерами, фазовый контраст; *б* — те же гепатоциты, окрашенные с помощью флуоресцентной PAS-реакции на гликоген; *в* — те же гепатоциты, ядра которых окрашены с помощью флуоресцентной реакции Фельгена на ДНК. Микроскоп Axioskop (Carl Zeiss, Германия), цифровая камера DFC360FX (Leica Microsystems Inc, Германия). Объектив Plan-NEOFLUAR 20×/0.50.

1.3.1. Определение сухой массы гепатоцитов. Сухую массу гепатоцитов (СМГ) определяли на неокрашенных препаратах-мазках, заключенных в глицерин, по методике, описанной в работах (Бродский, 1966; Бенеке, 1969). СМГ рассчитывали по формуле: $P = \delta S / 100\alpha$, где P — СМГ (в пикограммах, 10^{-12} г); δ — разность хода лучей, прошедших через клетку и через окружающую среду (см^2); S — площадь клетки (мкм^2); α — удельное приращение показателя преломления,

которое для белков в глицерине составляет $0.00095 \text{ см}^3/\text{г}$ (Pellegrino et al., 1963). Разность хода лучей измеряли с помощью интерференционного микроскопа МБИН-4 (ЛОМО, Россия) в монохроматическом свете, используя интерференционный светофильтр ($\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ нм}$) и объектив $40\times/0.65$. Площадь клеток (в мкм^2) определяли с помощью программы ImageJ (НИН, США). Величина α для углеводов значительно отличается от таковой для белков (Бенеке, 1969). Специальные расчеты показали, что даже если углеводы составят 20 % сухой массы гепатоцита, их вклад не превысит 3.2 %. Поэтому влиянием содержания гликогена в гепатоцитах на определение их сухой массы, более чем на 80 % обусловленной содержанием белков (Бродский, 1966), можно было пренебречь.

1.3.2. Определение содержания общего гликогена в гепатоцитах. После измерения СМГ покровное стекло снимали и удаляли глицерин этанолом возрастающей концентрации. Затем препараты окрашивали на гликоген с помощью PAS-реакции, используя в качестве реактива типа Шиффа аурамин- SO_2 (Au-SO_2) (Кудрявцева и др., 1970). Изображения клеток, окрашенных Au-SO_2 (рис. 1, б), получали с помощью флуоресцентного микроскопа Axioskop (Carl Zeiss, Германия), снабженного цифровой камерой DFC360FX (Leica Microsystems Inc, Германия) (объектив Plan-NEOFLUAR $20\times/0.50$). Для возбуждения флуоресценции препаратов, окрашенных Au-SO_2 , и регистрации их флуоресценции использовали набор фильтров Filter Set 10 (Carl Zeiss, Германия). Интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных Au-SO_2 , измеряли с помощью программы ImageJ (НИН, США).

1.3.3. Определение степени ploидности одноядерных и двоядерных гепатоцитов. После измерения содержания общего гликогена (ОГ) в клетках покровное стекло снимали и удаляли вазелиновое масло с предметного стекла путем его обработки ксилолом и этанолом возрастающей концентрации. Затем окраску клеток на гликоген удаляли путем обработки препаратов 0.05 %-ным NaBH_4 ex tempore. ДНК в ядрах гепатоцитов выявляли на препаратах-мазках с помощью флуоресцентной реакции Фельгена с использованием Au-SO_2 (Кудрявцев, Розанов, 1974) (рис. 1, в). Изображение ядер гепатоцитов, окрашенных Au-SO_2 , получали с помощью флуоресцентного микроскопа (см. выше), используя объектив Plan-NEOFLUAR $40\times/0.75$. Содержание ДНК в клетках измеряли с помощью программы ImageJ (НИН, США). В качестве диплоидного (2с) стандарта при определении ploидности гепатоцитов использовали лимфоциты периферической крови крысы, окрашенные Au-SO_2 по Фельгену. Среднюю ploидность гепатоцитов рассчитывали по формуле: $N(c) = \sum n_i \times 2^i$, где n_i — относительное число гепатоцитов i -го класса ploидности ($i = 0$ — диплоидный класс, $i = 1$ — тетраploидный и т. д.).

1.4. Степень заполнения внешних ярусов молекулы гликогена остатками глюкозы рассчитывали по формуле: $F = 1 \times t_9 + 2 \times t_{10} + 4 \times t_{11} + 8 \times t_{12}$, где F — степень заполнения ярусов, %; x_9, x_{10}, x_{11} и x_{12} — 9, 10, 11 и 12-й ярусы молекулы гликогена; $1x_9$ — при величине отношения $\text{МГ/ПГ} \leq 1$; $2x_{10}$ — при величине отношения $\text{МГ/ПГ} \leq 2$; $4x_{11}$ — при величине отношения $\text{МГ/ПГ} \leq 4$; $8x_{12}$ — при величине отношения $\text{МГ/ПГ} \leq 8$.

1.5. Разработка метода для исследования структуры гликогена в отдельных клетках

включала два этапа: 1) определение кинетики окрашивания гликогена в гепатоцитах с помощью реактивов типа Шиффа, в состав которых входили красители, флуоресцирующие разным цветом, и выбор наилучших условий для выявления прогликогена и макрогликогена в клетках; 2) выбор оптимальных условий для исследования структуры β -частиц гликогена с помощью метода FRET.

1.5.1. Исследование зависимости интенсивности PAS-реакции в гепатоцитах от времени их окрашивания реактивами типа Шиффа. Одним из подходов для изучения структуры и конформационных изменений молекулы гликогена в клетках может быть исследование кинетики его окрашивания с помощью PAS (Periodic Acid-Schiff)-реакции, специфично выявляющей гликоген. После испытания нескольких флуоресцентных красителей в дальнейшей работе использовали два реактива типа Шиффа — бромистый этидий-SO₂ (EtBr-SO₂) и аурамин-SO₂ (Au-SO₂). Реакция на гликоген с обоими реактивами была отрицательной как после предварительной обработки препаратов α -амилазой, так и в том случае, когда препараты не подвергались окислению йодной кислотой перед помещением их в реактив.

Результаты исследования зависимости интенсивности флуоресценции гепатоцитов от времени их окрашивания EtBr-SO₂ или Au-SO₂ свидетельствуют о том, что эта зависимость для обоих реактивов имеет схожий двухступенчатый характер (**рис. 2**). Дальнейший анализ показал, что фракция гликогена, быстро окрашивающаяся в течение 40 минут EtBr-SO₂ или Au-SO₂, извлекается при обработке клеток холодной трихлоруксусной кислотой (ТХУ), в то время, как для экстракции медленно окрашивающейся фракции требуется обработка препаратов горячей КОН. В ряде работ показано, что фракция гликогена, которая не извлекается ТХУ, но экстрагируется при обработке ткани горячей КОН, представляет прогликоген (ПГ). Остальной гликоген представлен макрогликогеном (МГ) (Lomako et al., 1991, 1995; Alonso et al., 1995). Исходя из этого, мы заключили, что фракция гликогена, окрашивающаяся в течение 40 минут после начала обработки препаратов реактивом Шиффа, представляет МГ, а фракция гликогена, окрашивание которой происходит после 50 минут, является ПГ.

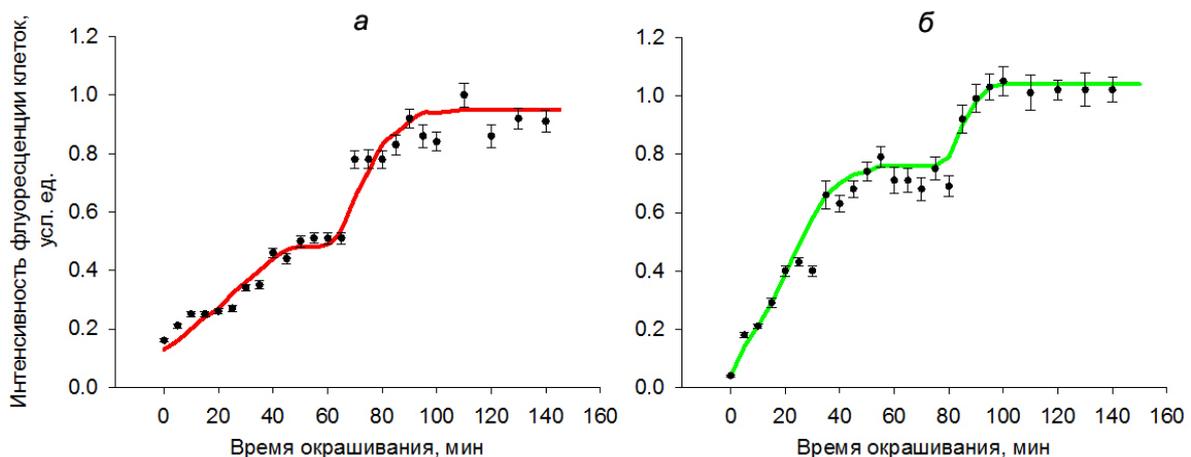


Рис. 2. Зависимость интенсивности флуоресценции гепатоцитов от времени окрашивания их EtBr-SO₂ (**а**) и Au-SO₂ (**б**). **Примечание:** при исследовании зависимостей, представленных на **рис. а** и **б**, использовались клетки, полученные от разных крыс.

1.5.2. *Определение макрогликогена и прогликогена в одной и той же клетке.* Для выявления и количественного определения МГ и ПГ в одной и той же клетке использовали последовательное окрашивание гепатоцитов, предварительно обработанных 0.8 %-ным раствором KIO_4 , приготовленным на 0.23 %-ной HNO_3 , в реактивах типа Шиффа (100 мл 0.00004 %-го EtBr (Sigma-Aldrich, США) или 0.3 %-го Au OO (Reanal, Венгрия) + 0.2 мл $\text{SOCl}_2/100$ мл). Порядок окрашивания препаратов вначале EtBr- SO_2 , а затем Au- SO_2 оказался оптимальным. Окрашивание препаратов в течение 40 минут EtBr- SO_2 выявляло МГ (красная флуоресценция, $\lambda_{\text{max}} \approx 610$ нм) (рис. 3, а), а последующая их окраска Au- SO_2 в течение 50 минут — ПГ (зеленая флуоресценция, $\lambda_{\text{max}} \approx 530$ нм) в клетках (рис. 3, б).

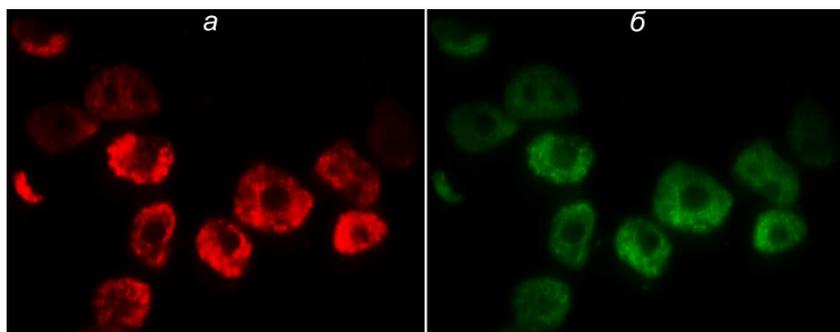


Рис. 3. Гепатоциты, окрашенные EtBr- SO_2 — макрогликоген (а) и Au- SO_2 — прогликоген (б). Микроскоп Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия), цифровая камера DFC420C (Leica Microsystems Inc, Германия). Объектив Plan-NEOFLUAR 20×/0.50.

Специальные эксперименты показали, что отмывка несвязавшегося красителя после окрашивания препаратов EtBr- SO_2 в проточной воде и сернистых водах в течение 30 минут не влияла на реакционную способность альдегидных групп в гликогене.

Изображения окрашенных клеток получали с помощью флуоресцентного микроскопа (см. выше) (объектив Plan-NEOFLUAR 20×/0.50). Для возбуждения и регистрации флуоресценции Au- SO_2 использовали набор фильтров Filter Set 10 (Carl Zeiss, Германия), а для возбуждения и регистрации флуоресценции EtBr- SO_2 — набор фильтров Filter Set 15 (Carl Zeiss, Германия). Интенсивность флуоресценции клеток измеряли с помощью программы ImageJ (НИН, США). Содержание ОГ в каждой отмеченной клетке определяли как сумму содержания МГ и ПГ. В каждом препарате измеряли по 450–500 клеток.

1.6. *Выбор оптимальных условий для исследования структуры β -частиц гликогена с помощью метода FRET.* Вследствие того, что гликоген не обладает кристаллической структурой, применение методов рентгеноструктурного анализа для изучения расположения и взаимодействия олигосахаридных цепей в его молекуле невозможно. Поэтому в данной работе для изучения пространственного взаимодействия олигосахаридных цепей в молекуле гликогена использовали метод FRET (Förster Resonance Energy Transfer). Регистрацию эффективности FRET (E_{FRET}) в различных участках гепатоцита (3–4 участка) (рис. 4) производили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems Inc, Германия),

используя программу FRET АВ (фотообесцвечивание акцептора) (Zal, Gascoigne, 2004; Piston, Kremers, 2007). В качестве донора (Don) использовали Au, а акцептора (Ac) — EtBr.

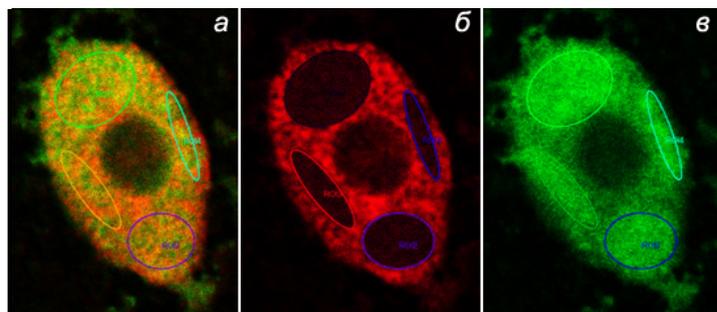


Рис. 4. *а* — гепатоцит с отмеченными областями; *б* — гепатоцит после фотообесцвечивания акцептора в выделенных областях; *в* — повышение флуоресценции донора (Don) после выжигания акцептора (Ac). Лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Leica TCS SP5 (Leica Microsystems Inc, Германия). Объектив 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.

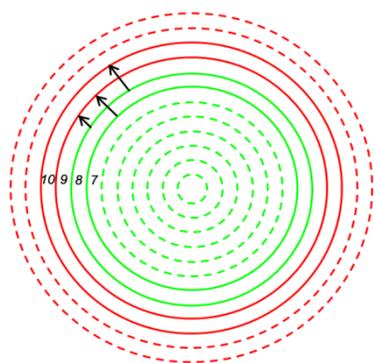


Рис. 5. Схематическое изображение молекулы гликогена. Цифрами отмечены ярусы, между которыми возможен перенос энергии. Расстояние между каждым из ярусов в β -частице гликогена с диаметром ~ 42 нм составляет ~ 1.9 нм (Goldsmith et al., 1982; DiNuzzo, 2013).

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 диаметр 12-ярусной β -частицы гликогена составляет ~ 42 нм, можно предположить, 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 (рис. 5).

Расстояние между Ac и Don в молекулах гликогена рассчитывали по формуле: $r = R_0 \times \sqrt[6]{\frac{1-E_{\text{FRET}}}{E_{\text{FRET}}}}$, где E_{FRET} — значение эффективности FRET; R_0 — критическое расстояние, на котором E_{FRET} составляет 50 % (Piston, Kremers, 2007).

E_{FRET} , как известно, зависит от физических свойств Don и Ac, а именно, степени перекрытия их спектров возбуждения и флуоресценции, ориентации диполей, участвующих в переносе энергии, а главное — расстояния между ними (Piston, Kremers, 2007; Fessenden, 2009). E_{FRET} быстро падает с увеличением расстояния между Don и Ac, поэтому этот метод обладает высокой чувствительностью для исследования молекулярных взаимодействий (Jares-Erijman, Jovin, 2003; Zal, Gascoigne, 2004). FRET регистрируется на расстоянии между Don и Ac от 1 до 10 нм (Sapsford et al., 2006). Фёрстеровское расстояние R_0 (расстояние, на котором $E_{\text{FRET}} = 0.5$) для разных пар Don–Ac значительно отличается. 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

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.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хронический гепатит на стадии цирроза, как известно, характеризуется значительной перестройкой структуры печени. Гистологическое исследование печени крысы и человека, проведенное нами (в автореферате результаты не представлены), подтвердило этот вывод. Найдено, что 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.

2.1. Полиплоидия и гипертрофия гепатоцитов крысы и человека в норме и при хроническом гепатите

Гепатоцеллюлярная недостаточность стимулирует регенерацию патологически измененного органа, важную роль в которой, помимо пролиферации гепатоцитов, играет их полиплоидизация и гипертрофия. Исследование распределения гепатоцитов по классам плоидности в нормальной и цирротически измененной печени крысы показало, что средняя плоидность гепатоцитов при ЦП составила $5.06c$ — на 6.1 % больше, чем в гепатоцитах нормальной печени ($p < 0.05$). Однако преобладающим классом плоидности гепатоцитов в цирротически измененной печени, как и в нормальной, были одноядерные тетраплоидные ($4c$) клетки (70–80 %). В отличие от крысы, модальный класс клеток в печени человека представлен одноядерными диплоидными ($2c$) гепатоцитами. Средняя плоидность гепатоцитов у больных ХГ и ЦП не отличалась от плоидности гепатоцитов в нормальной печени. В патологически измененной печени, как и в нормальной, преобладали $2c$ -клетки, причем при ЦП доля этих клеток увеличилась.

Сухая масса гепатоцита (СМГ) в нормальной печени крысы составила, в среднем, 685 ± 2 пг, но при ЦП она увеличивалась на 39.9 % и достигла 958 ± 5 пг ($p < 0.001$). В нормальной печени человека СМГ равна 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.

2.2. Общая характеристика гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крысы и человека

2.2.1. Динамика накопления гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени после введения глюкозы голодным крысам

В нормальной печени поступление глюкозы в клетки стимулирует быстрое накопление в них общего гликогена (ОГ). Содержание ОГ в гепатоцитах уже через 10 минут после введения

глюкозы увеличивалось на 34 % ($p < 0.01$) по сравнению с его содержанием в клетках голодных крыс (0-я минута) (**рис. 6**). На последующих, более поздних этапах, содержание ОГ в гепатоцитах контрольных крыс продолжало нарастать и превысило его исходный уровень в 1.9 раза. 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 минуты, содержание ОГ в гепатоцитах непрерывно увеличивалось и к концу эксперимента превысило исходный уровень в 3.2 раза ($p < 0.001$) (**рис. 6**). На всех сроках после введения глюкозы голодным животным, за исключением 120-й минуты, содержание ОГ в гепатоцитах контрольных крыс заметно превышало таковое в гепатоцитах крыс с ЦП.

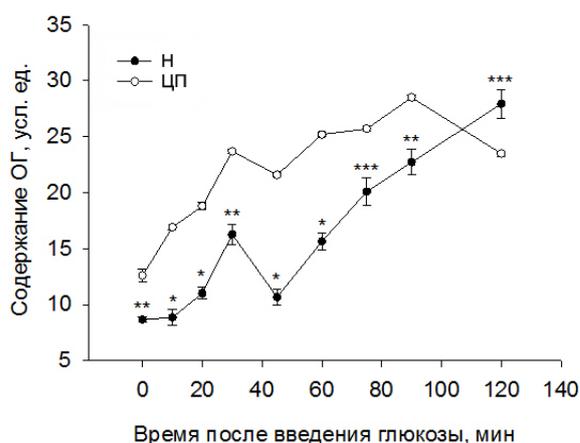


Рис. 6. Изменение содержания общего гликогена (ОГ) в гепатоцитах нормальной (Н) и цирротической печени (ЦП) крысы через разные интервалы времени после введения глюкозы голодным животным. **Примечания:** 1) вертикальные отрезки — ошибка среднего; 2) средние значения при ЦП отличаются от значений нормы при уровне значимости * — $p < 0.001$; ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.05$.

2.2.2. Содержание общего гликогена в гепатоцитах человека в норме, при хроническом гепатите и циррозе печени в постабсорбтивном периоде

При ХГ содержание ОГ в гепатоцитах человека превышало норму на 20 % ($p < 0.001$), а при ЦП — на 130 % ($p < 0.001$). По мере усиления тяжести ХГ увеличивалась и концентрация гликогена в клетках ($p < 0.001$).

2.3. Исследование зависимости содержания общего гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени от степени их плоидности на разных стадиях рефиндинга крыс

Анализ содержания ОГ в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крысы показал, что при голодании и на разных этапах рефиндинга оно изменяется пропорционально степени плоидности клеток. При этом одноядерные гепатоциты, если они имели плоидность равную с двуядерными гепатоцитами, не отличались от последних по содержанию ОГ (**рис. 7**).

ЦП приводит к заметному увеличению вариабельности гепатоцитов крысы и человека по содержанию ОГ. Например, в 4с-гепатоцитах нормальной печени крысы коэффициент вариации (v) клеток по содержанию ОГ составлял 21.1–30.8 %, а при ЦП он достигал 40.5–54.4 % ($p < 0.001$). В нормальной печени человека коэффициент вариации 2с-гепатоцитов по содержанию ОГ составлял 53.5 %, а при ЦП — 71.7 % ($p < 0.001$).

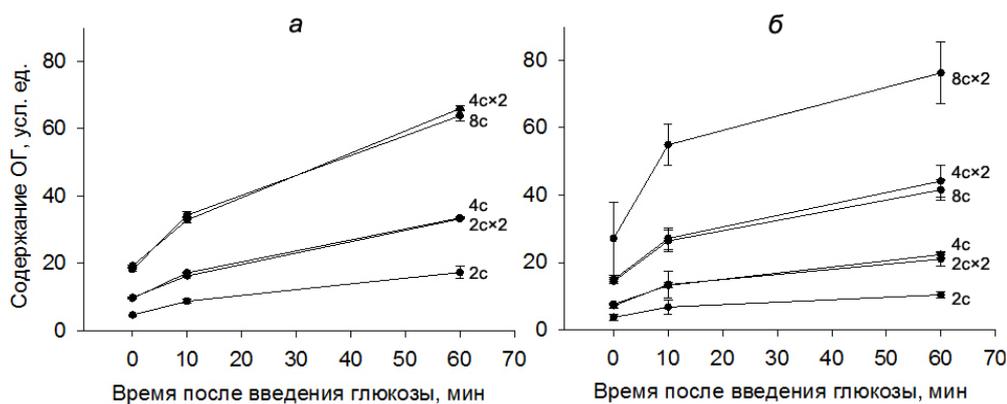


Рис. 7. Динамика содержания общего гликогена (ОГ) в гепатоцитах различных классов плоидности в нормальной (а) и цирротической печени (б) в ходе рефиндинга крыс глюкозой. **Примечание:** вертикальные отрезки — ошибка среднего.

2.4. Изменение сухой массы гепатоцитов различных классов плоидности в нормальной и цирротической печени крысы в ходе гликогенеза

Введение глюкозы голодным крысам приводит не только к увеличению содержания ОГ в гепатоцитах, но и к увеличению СМГ в каждом классе плоидности клеток нормальной и цирротической печени. Сухая масса одноядерных тетраплоидных 4с-гепатоцитов в нормальной печени уже через 10 минут после введения глюкозы возростала на 11.6 % ($p < 0.001$) по сравнению с СМГ у голодных крыс (0-я минута), а при ЦП — на 7.0 % ($p < 0.01$). Через 60 минут СМГ увеличивалась в норме на 29.8 % ($p < 0.001$), а при ЦП — на 17.0 % ($p < 0.01$) (рис. 8).

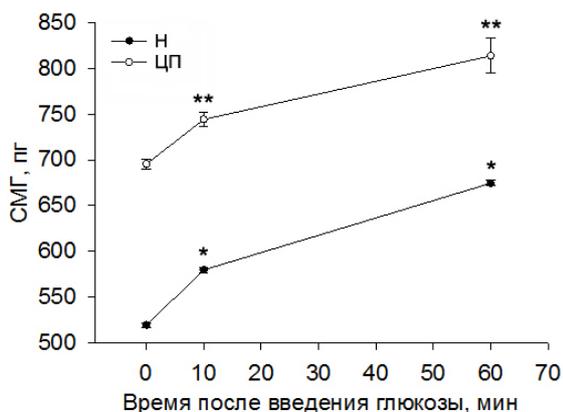


Рис. 8. Зависимость сухой массы 4с-гепатоцитов (СМГ) от времени после введения глюкозы в нормальной (Н) и цирротической печени (ЦП) крысы. **Примечания:** 1) вертикальные отрезки — ошибка среднего; 2) средние значения СМГ на 10-й и 60-й минуте отличаются от значений СМГ у голодных животных (0-я минута) при уровне значимости * — $p < 0.001$; ** — $p < 0.01$.

В ходе рефиндинга СМГ в цирротической печени крысы заметно превышает СМГ соответствующей плоидности в нормальной печени. Однако, несмотря на значительную вариабельность клеток по сухой массе, средние значения СМГ в нормальной и цирротически измененной печени крысы при голодании и на разных этапах рефиндинга изменялись пропорционально степени плоидности клеток.

2.5. Сухая масса гепатоцитов различных классов плоидности у человека в норме, при хроническом гепатите и циррозе печени в постабсорбтивном периоде

СМГ, как в нормальной, так и в патологически измененной печени человека сильно варьирует в каждом классе плоидности клеток. Тем не менее, как и у крысы, СМГ человека изменяется пропорционально плоидности клеток, как в норме, так и при патологии.

2.6. Зависимость содержания общего гликогена в клетках от их массы в популяции гепатоцитов различных классов плоидности нормальной и цирротической печени крысы

В нормальной печени существует высокая степень корреляции между СМГ и содержанием в них ОГ, т.е. чем больше масса гепатоцита, тем больше гликогена в нем содержится. Подобная зависимость наблюдается в каждом классе плоидности клеток, как при голодании, так и в ходе рефидинга крыс глюкозой, во время интенсивного синтеза гликогена в печени. В тетраплоидном классе гепатоцитов нормальной печени зависимость между массой клеток и содержанием в них ОГ проявляется особенно четко (**рис. 9, а**). В отличие от нормы, при ЦП зависимость между СМГ и содержанием в них ОГ отсутствовала в каждом классе плоидности клеток (**рис. 9, б**).

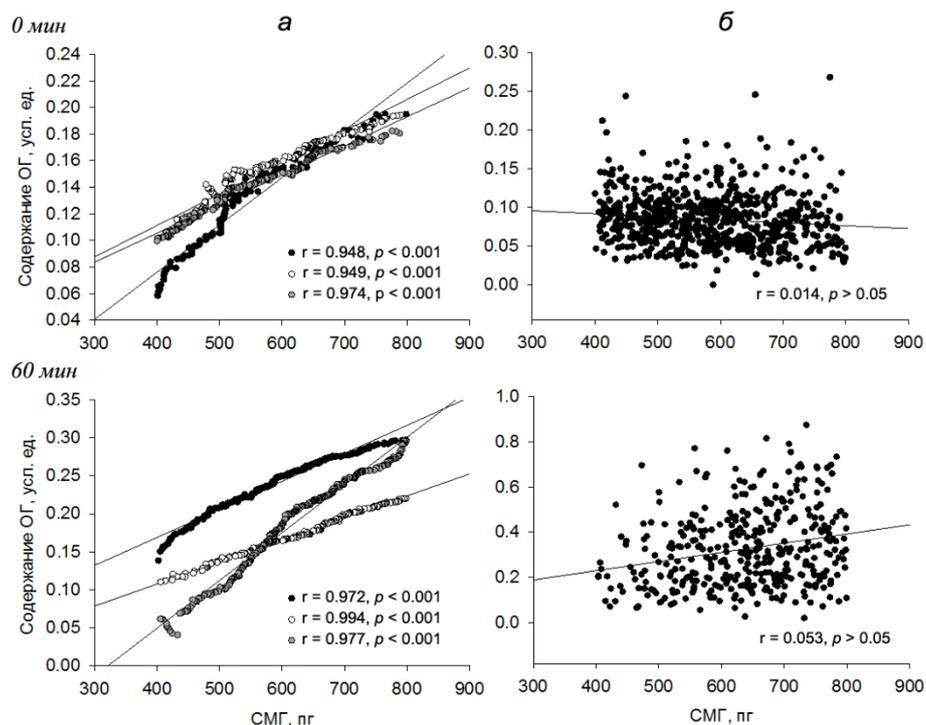


Рис. 9. Зависимость содержания общего гликогена (ОГ) от сухой массы 4с-гепатоцитов (СМГ) нормальной (**а**) и цирротической (**б**) печени в состоянии голода (0-я минута) и через 60 минут после введения глюкозы голодным крысам. **Примечание:** каждая точка на графике соответствует одной клетке.

2.7. Зависимость содержания общего гликогена в клетках от их массы в различных классах плоидности гепатоцитов человека в норме, при хроническом гепатите и циррозе печени

Результаты, представленные на **рис. 10, 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 плоидности клеток. При ХГ зависимость между СМГ и содержанием в них ОГ также присутствует, как и в норме (**рис. 10, б**). Однако у пациентов с ЦП подобная зависимость не наблюдается (**рис. 10, в**).

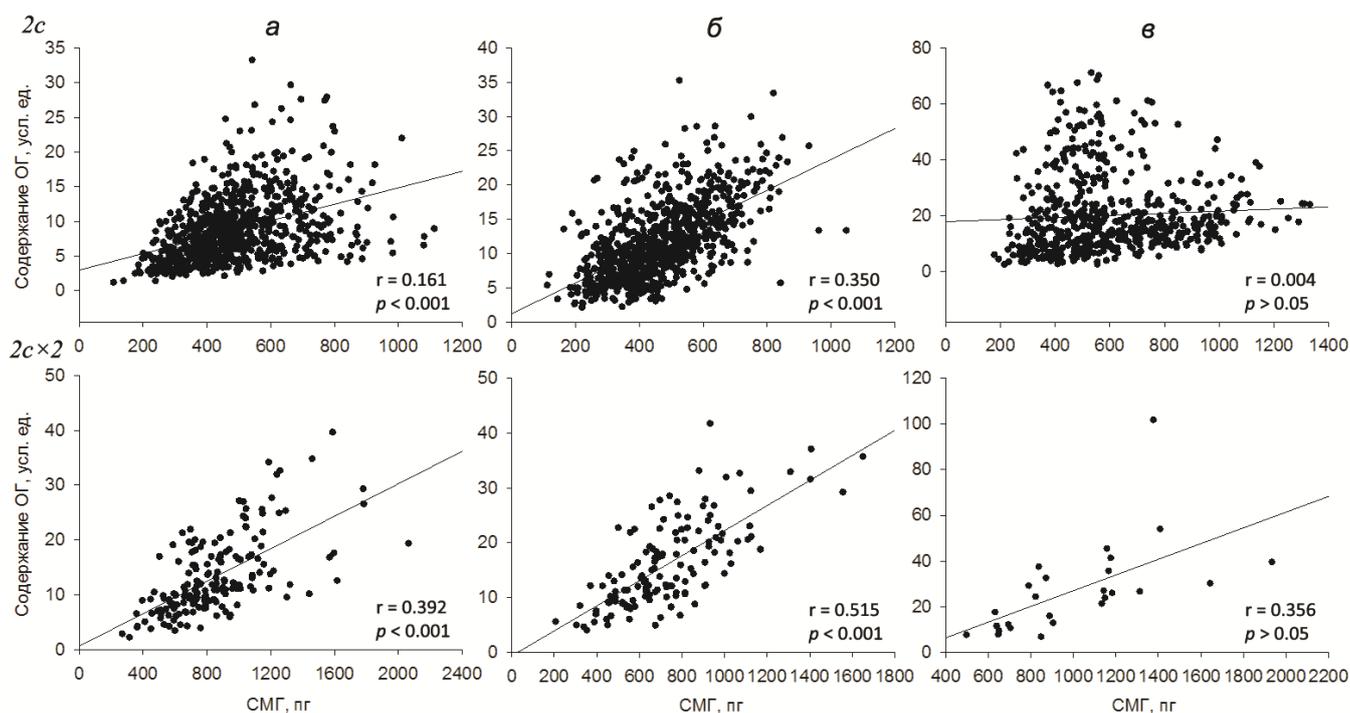


Рис. 10. Зависимость содержания общего гликогена (ОГ) от сухой массы гепатоцитов (СМГ) различных классов плоидности ($2c$ и $2c \times 2$) у человека в норме (*а*), при хроническом гепатите (*б*) и циррозе печени (*в*). **Примечание:** каждая точка на графике соответствует одной клетке.

2.8. Содержания макрогликогена и прогликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крысы и человека

Возможность выявить МГ и ПГ в одной и той же клетке с помощью красителей с разными спектральными характеристиками позволила исследовать изменения содержания этих фракций в гепатоцитах крысы в течение гликогенеза.

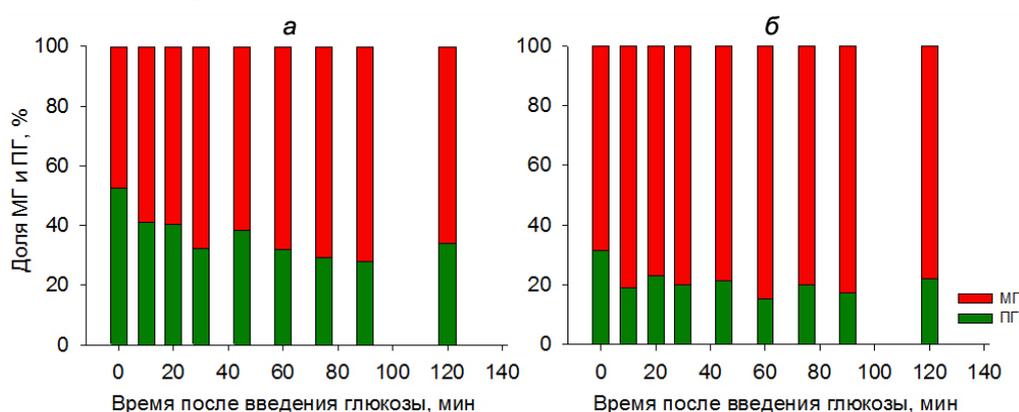


Рис. 11. Доля (%) макрогликогена (МГ) и прогликогена (ПГ) в гепатоцитах нормальной (*а*) и цирротической (*б*) печени крысы через разные интервалы времени после введения глюкозы голодным животным.

Результаты, представленные на **рис. 11**, свидетельствуют о том, что после 48-часового голодания относительное содержание ПГ в гепатоцитах нормальной печени крысы в 1.7 раза превышает таковое в гепатоцитах цирротической. В ходе гликогенеза доля ПГ в гепатоцитах нормальной печени крысы оставалась более высокой, чем при ЦП. Доля ПГ в гепатоцитах нормальной и цирротической печени несколько снижалась в течение гликогенеза, соответственно

возрастало относительное содержание МГ (рис. 11, а, б). Доля МГ в некоторых гепатоцитах как нормальной печени, так и при ЦП на разных стадиях рефиндинга могла достигать 90 %.

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. 12).

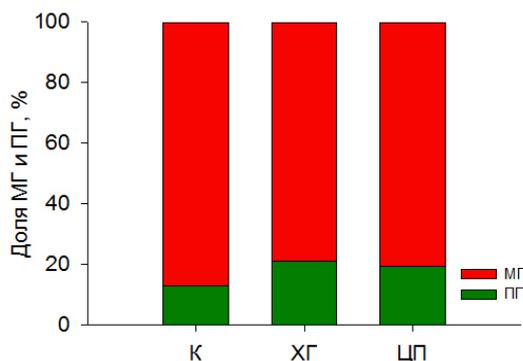


Рис. 12. Доля макрогликогена (МГ) и прогликогена (ПГ) в гепатоцитах человека в норме (Н), при хроническом гепатите (ХГ) и циррозе печени (ЦП).

2.9. Доля остатков глюкозы на внешних ярусах молекул гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крысы и человека

Величина отношения содержания макрогликогена к содержанию прогликогена (МГ/ПГ) позволяет рассчитать относительное число остатков глюкозы, находящихся на внешних (9–12-м) ярусах «средней» β -частицы гликогена в отдельном гепатоците нормальной и цирротической печени в течение гликогенеза, и получить гистограмму распределения клеток в популяции по этому показателю.

Полученные данные (рис. 13, а) свидетельствуют о том, что при голодании (0-я минута) гликоген гепатоцитов нормальной печени крысы состоит из β -частиц, у которых 9-й ярус заполнен на 90 %. В ходе гликогенеза, после введения глюкозы голодным крысам, в молекулах гликогена к 90-й минуте полностью заполняется не только 9-й ярус, но примерно на 80 % заполняется и 10-й (рис. 13, а).

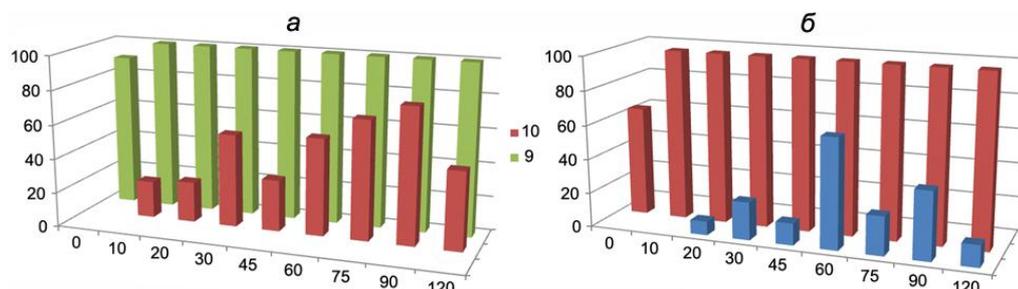


Рис. 13. Доля глюкозных остатков на внешних ярусах молекулы гликогена в нормальной (а) и цирротической (б) печени крысы, %.

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 минут после введения глюкозы полностью заполняется 10-й ярус молекул гликогена (рис. 13, б). В

дальнейшем, все изменения в содержании МГ происходят только в пределах 11-го яруса. Степень заполнения которого в β -частицах при ЦП варьировала в пределах 0–64 %.

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 12-м ярусом (на 20.2 %). По сравнению с нормальной печенью, при ХГ и ЦП степень заполнения внешних ярусов молекул гликогена ниже. В гепатоцитах пациентов с ХГ и ЦП присутствуют частицы гликогена с полностью заполненным 10-м ярусом и 11-м, который заполнен на 31.7 % и 50.0 % соответственно (рис. 14).

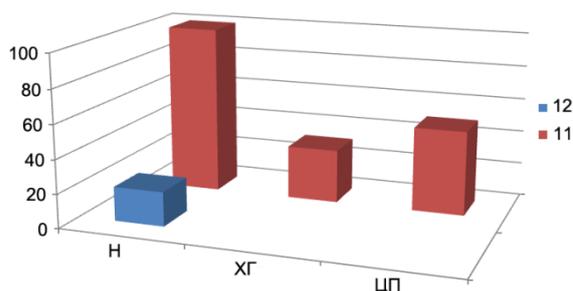


Рис. 14. Доля глюкозных остатков на внешних ярусах молекулы гликогена в гепатоцитах нормальной (Н) печени человека, при хроническом гепатите (ХГ) и циррозе печени (ЦП).

2.10. Динамика заполнения внешних ярусов β -частиц гликогена в популяции гепатоцитов нормальной и цирротической печени крысы в ходе гликогенеза

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.

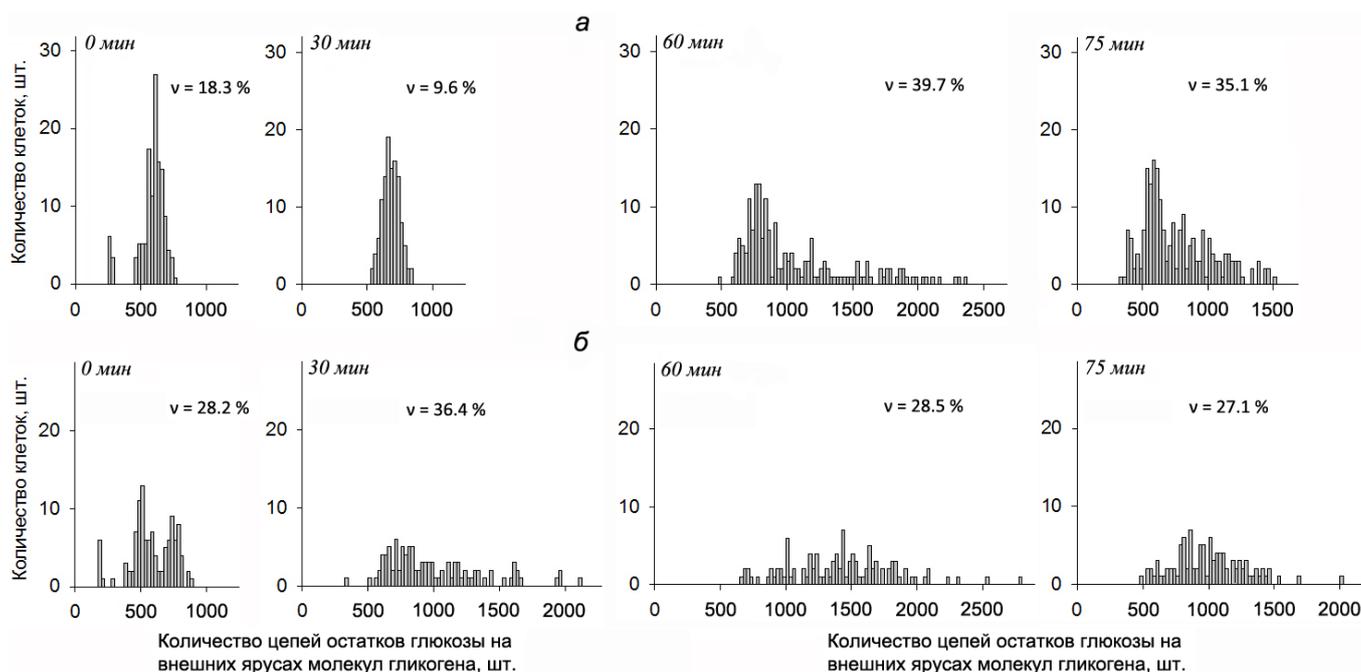


Рис. 15. Гистограммы распределения клеток в популяции гепатоцитов нормальной (а) и цирротической (б) печени крысы по количеству цепей остатков глюкозы на внешних ярусах молекулы гликогена на разных этапах гликогенеза (0, 30, 60 и 75-я минута).

Данные, представленные на **рис. 15, а**, свидетельствуют о том, что на ранних этапах гликогенеза гепатоциты нормальной печени крысы довольно синхронно накапливают гликоген, о чем свидетельствует небольшой коэффициент вариации (v) по количеству цепей остатков глюкозы (ЦОГ) на внешних ярусах (9–12-м) молекул гликогена ($< 20\%$), но на более поздних этапах гликогенеза значения v заметно увеличиваются ($> 20\%$). При ЦП, в отличие от нормы, коэффициент вариации значений ЦОГ в гепатоцитах крысы сохранялся высоким на протяжении всего гликогенеза (23.9–48.9%), свидетельствуя о значительной асинхронности этого процесса в клеточной популяции (**рис. 15, б**).

2.11. Изменение расстояния между цепями глюкозных остатков в β -частицах гликогена в гепатоцитах крысы в ходе гликогенеза

В нормальной печени крысы расстояние между Don и Ac (r) в частицах гликогена уменьшается на 17% ($p < 0.001$) уже через 30 минут после введения глюкозы и далее остается на одном уровне (**рис. 16**). Динамика изменения r в частицах гликогена цирротической печени на первых этапах гликогенеза схожа с нормальной печенью, но после 60-й минуты рефиндинга r увеличивается и к 120-й минуте превышает расстояние у голодных крыс на 11% ($p < 0.001$) (**рис. 16**). В среднем, r в частицах гликогена в нормальной печени меньше, чем в β -частицах цирротической печени, составляя 4.40 ± 0.01 нм и 5.45 ± 0.01 нм соответственно ($p < 0.001$).

По мере заполнения внешних ярусов гликогена остатками глюкозы r уменьшается (**рис. 17**). 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 ($p < 0.05$).

2.12. Расстояние между цепями глюкозных остатков в β -частицах гликогена в гепатоцитах человека в постабсорбтивном периоде

Определение r в частицах гликогена 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 ($p < 0.001$).

По мере заполнения внешних ярусов молекул гликогена остатками глюкозы в гепатоцитах человека r уменьшается: в норме, в среднем, на 2.94 нм, при ХГ — на 2.03 нм, а при ЦП — на 0.55 нм ($p < 0.05$; $p < 0.001$) (**рис. 18**).

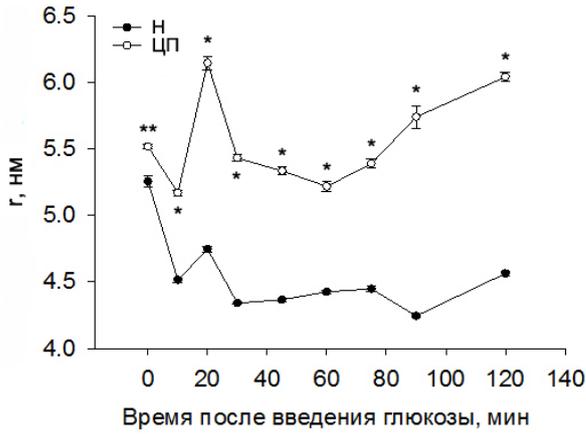


Рис. 16. Расстояние между Don и Ac (r) в молекулах гликогена в гепатоцитах нормальной (Н) и цирротической печени (ЦП) крысы на разных этапах гликогенеза.

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

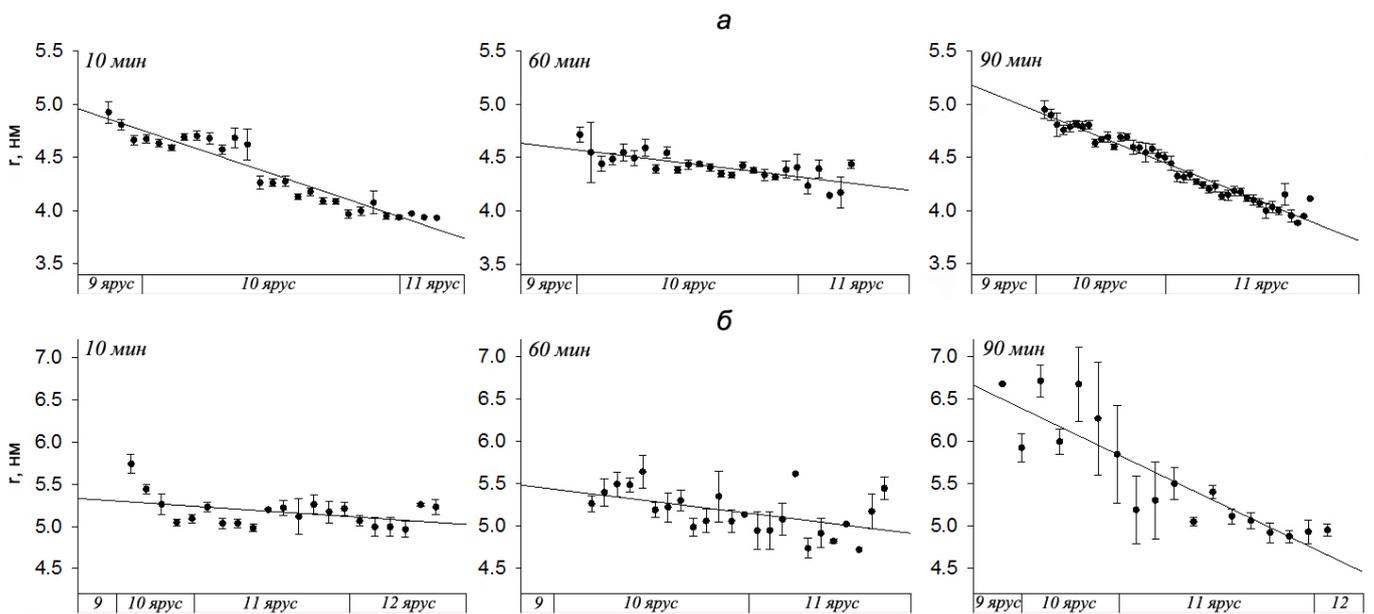


Рис. 17. Зависимость расстояния между Don и Ac (r) от степени заполнения внешних ярусов (9–12-го) молекул гликогена в гепатоцитах нормальной (а) и цирротической (б) печени крысы на разных этапах гликогенеза (10, 60 и 90-я минута). **Примечание:** вертикальные отрезки — ошибка среднего.

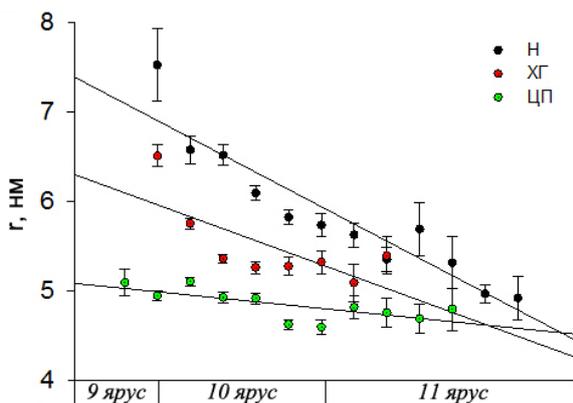


Рис. 18. Зависимость расстояния между Don и Ac (r) от степени заполнения внешних ярусов (9–11-го) молекул гликогена в гепатоцитах человека: в норме (Н), при хроническом гепатите (ХГ) и циррозе печени (ЦП). **Примечание:** вертикальные отрезки — ошибка среднего.

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 ($\sim 10^7$ Да), 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, как нам представляется, может стать 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 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 ОСНОВНЫХ 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 основных тезисов

1. 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.
2. **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.
3. **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.
4. **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.
5. **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.
6. **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.*

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Безбородкина и др.* (2008) Углеводный метаболизм при хронических поражениях печени. СПб.: Синтез-Бук, 176 с.
2. *Бенке.* (1969) Введение в количественную цитохимию. М.: Мир, с. 70–92.
3. *Бродский.* (1966) Трофика клетки. М.: Наука, 355 с.
4. *Кудрявцев, Розанов.* (1974) Цитофлуориметрия. Общие принципы. Методы биологии развития. М.: Наука, с. 497–500.
5. *Кудрявцев и др.* (1979) Цитология, 21: 74–83.
6. *Кудрявцева.* (1987) Успехи гепатологии, 13: 201–211.
7. *Кудрявцева и др.* (1970) Цитология, 12: 1060–1067.
8. *Кудрявцева и др.* (1983) Лаб. дело., 9: 21–22.
9. *Кудрявцева и др.* (1992) Цитология, 34: 100–107.
10. *Розенфельд, Попова.* (1989) Врожденные нарушения обмена гликогена. М.: Медицина, 240 с.
11. *Alonso et al.* (1995) FASEB J, 9: 1126–1137.
12. *Devos et al.* (1983) Biochem J, 209: 159–165.
13. *DiNuzzo.* (2013) J Cereb Blood Flow Metab, 33: 1540–1548.
14. *Ferrer et al.* (2003) FEBS Lett, 546: 127–132.
15. *Fessenden.* (2009) PloS One, 4: e7338.
16. *Ganesh et al.* (2001) Biochem Biophys Res Commun, 283: 1046–1053.
17. *Goldsmith et al.* (1982) J Mol Biol, 156: 411–427.
18. *Greenberg et al.* (2006) Am J Physiol Endocrinol Metab, 291: E1–E8.
19. *James et al.* (2008) Metabolism, 57: 535–543.
20. *Jares-Erijman, Jovin.* (2003) Nat Biotechnol, 21: 1387–1395.
21. *Junqueira.* (1979) Histochem J, 11: 447–455.
22. *Jungermann.* (1992) Diabete Metab, 18: 81–86.
23. *Jurczak et al.* (2008) J Cell Biochem, 104: 435–443.
24. *Kruszynska.* (1999) Oxford textbook of clinical hepatology. Oxford, UK: Oxford University Press, p. 257–286.
25. *Kruszynska, McIntyre.* (1991) Oxford textbook of clinical hepatology. Oxford, UK: Oxford University Press, p. 129–143.
26. *Kudryaviseva et al.* (2001) Europ J Gastroenterol Hepatol, 13: 693–697.
27. *Lee et al.* (2001) Bull Korean Chem Soc, 22: 87–89.
28. *Lomako et al.* (1991) FEBS Lett, 279: 223–228.
29. *Lomako et al.* (1993) FASEB J, 7: 1386–1393.
30. *Lomako et al.* (1995) Eur J Biochem, 234: 343–349.
31. *Madsen, Cori.* (1958) J Biol Chem, 233: 1251–1256.
32. *Marchand et al.* (2002) J Appl Physiol (1985), 93: 1598–1607.
33. *Mayatepek et al.* (2010) Best Pract Res Clin Gastroenterol, 24: 607–618.
34. *Melendez et al.* (1997) J Mol Evol, 45: 446–455.
35. *Melendez et al.* (1999) Biophys J, 77: 1327–1332.
36. *Melendez-Hevia et al.* (1993) Biochem J, 295 (Pt 2): 477–483.
37. *Owen et al.* (1981) J Clin Invest, 68: 240–252.
38. *Pellegrino et al.* (1963) Exp Cell Res, 31: 167–182.
39. *Petersen et al.* (1999) Am J Physiol, 276: E529–E535.
40. *Piston, Kremers.* (2007) Trends Biochem Sci, 32: 407–414.
41. *Rajvanshi et al.* (1998) Exp Cell Res, 244: 405–419.
42. *Rybicka.* (1996) Tissue Cell, 28: 253–265.
43. *Ryu et al.* (2009) Int J Biol Macromol, 45: 478–482.
44. *Sapsford et al.* (2006) Angew Chem Int Ed Engl, 45: 4562–4589.
45. *Shearer, Graham.* (2002) Can J Appl Physiol, 27: 179–203.
46. *Sullivan et al.* (2010) Biomacromolecules, 11: 1094–1100.
47. *Sullivan et al.* (2012) Biomacromolecules, 13: 3805–3813.
48. *Sullivan et al.* (2014) Biomacromolecules, 15: 660–665.
49. *Tagliabracci et al.* (2007) Proc Natl Acad Sci USA, 104: 19262–19266.
50. *Tagliabracci et al.* (2011) Cell Metab, 13: 274–282.
51. *Teutsch et al.* (1999) Hepatology, 29: 494–505.
52. *Yang et al.* (1990) FASEB J, 4: 3140–3143.
53. *Zal, Gascoigne.* (2004) Curr Opin Immunol, 16: 674–683.