

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ СОДЕРЖАНИЕМ ГЛИКОГЕНА В ГЕПАТОЦИТАХ И ИХ РАЗМЕРОМ В НОРМАЛЬНОЙ И ЦИРРОТИЧЕСКОЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

© Н. Н. Безбородкина, А. А. Вахтина, Е. В. Байдюк, Г. С. Якупова, Б. Н. Кудрявцев

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: cellpath@mail.cytspb.rssi.ru*

Исследовали зависимость между размером гепатоцитов и содержанием в них гликогена в нормальной и цирротической печени голодных крыс и у крыс через 10 и 60 мин после введения глюкозы *per os*. Использовали цитофотометрический метод, позволяющий определять в одной и той же клетке содержание гликогена и ДНК, а также измерять ее сухую массу. Показано, что в нормальной и цирротической печени сухая масса гепатоцитов и содержание в них гликогена изменяются пропорционально дозе генов. В гепатоцитах различных классов ploидности нормальной печени наблюдается четкая корреляция между размером клеток и содержанием в них гликогена. В популяции гепатоцитов цирротической печени подобная зависимость отсутствует, по-видимому из-за нарушения дольковой структуры органа и резкого увеличения гетерогенности условий микроокружения гепатоцитов.

Ключевые слова: гепатоциты, рефиндинг, гликоген, ploидность, сухая масса, цирроз печени.

Способность клеток паренхимы печени синтезировать гликоген из глюкозы после приема пищи и расщеплять его в соответствии с требованиями организма — важный механизм поддержания постоянного уровня глюкозы в крови. Гликогенез и гликогенолиз в гепатоцитах осуществляются с помощью ряда ферментов, активность которых регулируется гормональными, нервными, субстратными и другими механизмами. Важную роль в регуляции этих процессов играют также тканевые и клеточные факторы.

Популяция гепатоцитов неоднородна. Гепатоциты различаются не только по своей специфической функциональной активностью, но также по степени ploидности, размеру, местоположению в дольке печени и уровню ДНК-синтетических процессов (Урываева, Маршак, 1969; Урываева, 1988; Кудрявцев и др., 1991; Bircher et al., 1999; Teutsch et al., 1999; Gandillet et al., 2003). Установлено, что активность ферментов метаболизма гликогена и его содержание в гепатоцитах во многом определяются локализацией клеток в дольке печени, степенью их ploидности, а также фазой клеточного цикла, в которой они находятся (Кудрявцев и др., 1979б; Майтесян, 1983; Jungermann, 1992; Rajvanshi et al., 1998; Teutsch et al., 1999; Kudryavtseva et al., 2001). Гораздо менее ясна ситуация с влиянием размера клеток на их функциональную активность, в частности на содержание и скорость синтеза в них гликогена.

Известно, что размеры гепатоцитов сильно варьируют. Показано, например, что объем и сухая масса гепатоцитов, а также содержание в них белка даже для клеток одной ploидности различаются в несколько раз (Майтесян, 1983; Завадская и др., 1989; Богданова и др., 1990). Причины такой вариабельности не совсем ясны. Полагают, однако, что размеры клеток оказывают значительное

влияние на метаболизм и содержание гликогена в гепатоцитах. Некоторые авторы считают, что между размером гепатоцитов и содержанием в них гликогена существует определенная связь и что содержание гликогена выше в тех клетках, которые больше по размеру (Ньюсхолм, Старт, 1977). Цель настоящей работы состояла в проверке этой гипотезы. При этом о размере гепатоцитов судили по их сухой массе, поскольку этот показатель в отличие от объема, площади или линейных размеров клеток не зависит от условий приготовления препарата.

Материал и методика

Работа проведена на двух группах белых беспородных самцов крыс (по 9 в каждой). Крыс содержали на стандартном пищевом рационе, их масса тела в конце эксперимента составляла 300—350 г. Животных одной группы (опытной) в течение 6 мес подвергали хроническому ингаляционному воздействию паров четыреххлористого углерода (CCl₄) в герметичной камере по 20 мин 3 раза в неделю для получения цирроза печени. Животных другой группы, которые не подвергались воздействию CCl₄, использовали в качестве контроля.

Через 1 нед после прекращения отравления крыс опытной и контрольной групп подвергали голоданию в течение 48 ч (вода *ad libitum*) для истощения запасов гликогена в печени. После этого животным *per os* с помощью катетера вводили 30%-ный раствор глюкозы из расчета 4 г на 1 кг массы тела. Сразу после прекращения голодания и затем через 10 и 60 мин после введения глюкозы крыс декапитировали, а извлеченную печень использовали для приготовления мазков изолированных гепатоцитов на предметных стеклах по методике, описанной ранее

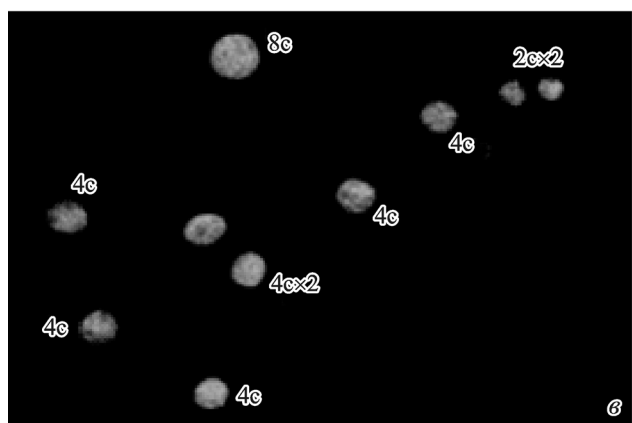
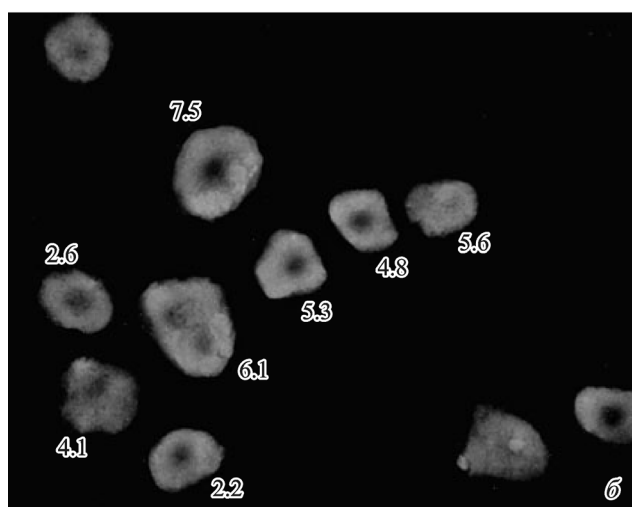
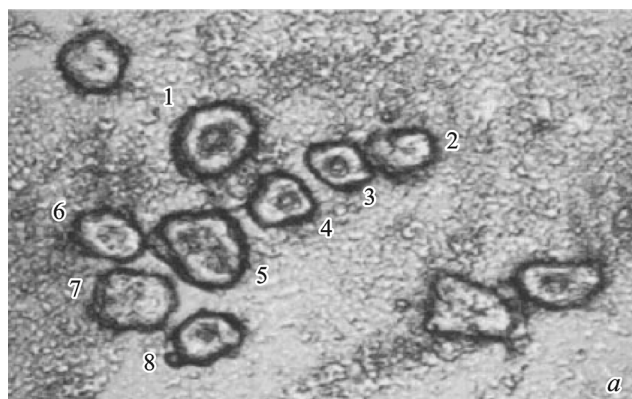


Рис. 1. Сухая масса, содержание гликогена и ДНК в гепатоцитах.

a — гепатоциты крыс; интерференционный микроскоп; об. 40×0.65 . *б* — те же гепатоциты, окрашенные с помощью флуоресцентной PAS-реакции на гликоген; об. 40×0.65 . Цифрами на рисунке отмечено содержание гликогена в гепатоцитах, усл. ед. *в* — те же гепатоциты, ядра которых окрашены с помощью Фельгена на ДНК; об. 90×1.25 .

(Кудрявцева и др., 1983). Полученные препараты фиксировали метанолом, высушивали на воздухе и хранили в темном месте.

Для исследования взаимосвязи между содержанием гликогена в клетках и их размером использовали комбинированный цитофотометрический метод (Кудрявцев и др., 1979а), с помощью которого на картированном препарате последовательно измеряли сухую массу клетки, содержание в ней гликогена и ДНК (рис. 1).

Сухую массу гепатоцитов на препаратах мазков измеряли с помощью интерференционного микроскопа МБИН-3 (ЛОМО, Санкт-Петербург). Измерения производили в два этапа. Вначале определяли оптическую разность хода для гепатоцита и заключающей среды, используя в качестве последней глицерин. Затем с помощью анализатора изображений измеряли площадь клетки (в $\mu\text{м}^2$). Сухую массу гепатоцитов рассчитывали по формуле $P = \delta S / 100\alpha$, где P — сухая масса клетки (в пикограммах), δ — разность хода лучей (в см^2). δ определяли по формуле $\delta = (\varphi_1 - \varphi_2) \lambda / K$, где φ_1 и φ_2 — отсчеты по шкале компенсатора Сенармона, λ — длина волны света (546 нм), $K = 180^\circ$, S — площадь клетки (в $\mu\text{м}^2$), α — удельное приращение показателя преломления, которое для белков в глицерине составляет $0.00095 \text{ см}^3/\text{г}$ (Grampp et al., 1960; Pelligrino et al., 1963).

Для выявления гликогена и ДНК в гепатоцитах использовали флуоресцентные варианты PAS-реакции и реакции Фельгена соответственно. В обеих цитохимических реакциях в качестве реактива типа Шиффа применяли аурамин- SO_2 (Кудрявцева и др., 1972; Кудрявцев, Розанов, 1974). Содержание гликогена и ДНК в клетках измеряли с помощью цитофлуориметра РИФ-1 (Папаян и др., 1974; Кудрявцев и др., 1979б). Возбуждающий свет ($\lambda = 405$ и 436 нм) из спектра излучения ртутной лампы ДРШ-250-2 выделяли с помощью светофильтров ФС-1 (8 мм) и СЗС-24 (4 мм). Для выделения света люминесценции клеток, окрашенных аурамин- SO_2 , использовали комбинацию светофильтров ЖС-18 (1.5 мм) и ЖЗС-19 (1.5 мм). Поиск и фокусировку исследуемых клеток производили в проходящем «зеленом» свете при настройке микроскопа по методу фазового контраста, используя лампу накаливания и светофильтр ЗС-11. Для измерения содержания гликогена и ДНК в клетках использовали объективы 20×0.40 и 40×0.65 соответственно.

Статистическую обработку результатов проводили на персональном компьютере, используя пакеты программ Microsoft Excel, Sigma Plot 9.0 и Basic. Для количественной оценки связи между некоторыми параметрами проводили корреляционный анализ с определением коэффициентов корреляции (r). Достоверность различий между величинами оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Развитие цирроза, как известно, сопровождается значительной перестройкой структуры печени, которая ведет к потере дольковой организации органа, изменению сосудистого русла и увеличению отношения непаренхимных клеток к паренхимным вследствие усиленной пролиферации первых и гибели последних (Reichen et al., 1987; Gressner, Schuppan, 1999; Henderson, 1999; Шерлок, Дули, 2002). Гепатоцеллюлярная недостаточность стимулирует регенерацию патологически измененного органа, основными клеточными механизмами которой являются пролиферация, полиплоидизация и гипертрофия гепатоцитов (Сакута, Кудрявцев, 1996, 2005).

Наши результаты показали, что сухая масса гепатоцита в нормальной печени составляет в среднем 685 ± 2 пг, но при циррозе она увеличивается на 39.9 % и достигает 958 ± 5 пг. Увеличение сухой массы гепатоцитов в ходе развития цирроза отмечалось и другими авторами. В частности, Завадская и соавторы (1989) установили, что в среднем сухая масса гепатоцита нормальной печени крыс

Таблица 1

Сухая масса (пг) гепатоцитов различных классов плоидности в нормальной (контрольная группа) и цирротической (опытная группа) печени крыс через 10 и 60 мин после введения глюкозы голодным животным

Время, мин	Классы плоидности, с					
	2	2×2	4	4×2	8	8×2
Контрольная группа						
0	216.5 ± 6.6 (10)	521.1 ± 9.3 (46)	519.4 ± 2.15 (637)	1015.7 ± 11.7 (116)	1111.6 ± 11.5 (44)	—
10	267.3 ± 5.8 ^a (12)	578.2 ± 8.6 ^a (54)	579.8 ± 2.9 ^a (740)	1037.8 ± 6.9 (168)	1146.0 ± 27.0 (64)	—
60	365.7 ± 17.5 ^a (6)	666.6 ± 8.4 ^a (50)	674.4 ± 3.1 ^a (1078)	1096.9 ± 10.7 ^a (183)	1251.7 ± 34.1 ^a (39)	—
Опытная группа						
0	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	378.8 ± 19.7 ^b (12)	826.7 ± 45.4 ^b (34)	744.1 ± 7.9 ^a (599)	1393.6 ± 22.1 ^a (183)	1423.8 ± 38.7 ^a (86)	2356.1 ± 119.1 (14)
60	369.1 ± 13.7 ^b (43)	722.2 ± 35.2 ^b (47)	813.4 ± 10.0 ^a (593)	1464.1 ± 38.3 ^a (67)	1488.0 ± 47.8 ^a (93)	2507.9 ± 211.8 (10)

Примечание. Результаты для каждой временной точки представляют собой взвешенное среднее из данных 3 крыс; в скобках — число измеренных клеток; сухая масса гепатоцитов достоверно отличается от соответствующего значения у голодных животных при ^a $P < 0.001$, ^b $P < 0.05$.

составляет 577 пг, а в цирротически измененной — 988 пг. Увеличение массы гепатоцита составило здесь 63 %. При исследовании цирроза печени нашли, что сухая масса гепатоцитов крысы увеличивается по сравнению с нормой на 65 % и достигает 995 пг (Tongiani et al., 1976). Другие авторы также показали, что в цирротической печени крыс сухая масса гепатоцитов больше, чем в нормальной печени, однако увеличение сухой массы клеток здесь было не столь значительным, около 21 % (Безбородкина и др., 2008).

В ходе развития цирроза в паренхиме поддерживается достаточно высокая пролиферативная активность гепатоцитов, которая в определенной мере компенсирует их потерю в результате гибели и приводит к повышению плоидности клеток. В нашем эксперименте плоидность отдельных одноядерных гепатоцитов в цирротической печени достигала уровня 16с, а средняя плоидность гепатоцитов составила 5.06с, что на 6.53 % больше, чем в нормальной печени. Характерной чертой клеточной популяции цирротической печени крыс является не только увеличение доли высокоплоидных клеток, но также резкое снижение в ней количества 2с × 2-гепатоцитов. При этом, несмотря на значительные изменения клеточного состава паренхимы цирротической печени, преобладающим классом плоидности в ней, как и в нормальной печени, оставались одноядерные тетраплоидные (4с) гепатоциты. Интересно, что соотношение одноядерных и двуядерных клеток в цирротической печени также остается близким к норме (81.2 и 18.8 % при циррозе и 80.2 и 19.2 % в нормальной печени). На эту особенность кинетики клеточной популяции паренхимы регенерирующей печени крыс и мышей обращал внимание еще Туманишвили (1973).

Лишение животных пищи даже в течение 2—3 сут приводит к заметному уменьшению массы печени. Пока-

зано, что масса печени крыс в течение 48-часового голодания снижается на 20—25 % (Addis et al., 1936; Soberon, Sanchez, 1961), а масса печени мышей за тот же период голодания уменьшается на 37—41 % (Hutson et al., 1982; Mortimore et al., 1983). Многие авторы отмечают, что при голодании наряду со снижением массы печени наблюдается значительное уменьшение объема гепатоцитов и содержания в них белка (LeBouton, 1982; Uhal, Roehrig, 1982; James et al., 1986; Belloni et al., 1988).

Снижение массы печени и клеток ее паренхимы в ходе голодания сопровождается значительной перестройкой ее углеводного обмена. Запасы гликогена, которых хватает примерно на 12 ч, при более продолжительном голодании снижаются до минимума (Calder, Geddes, 1986; Rothman et al., 1991; Kruszynska, 1999). В результате единственным источником глюкозы становится глюконеогенез, который протекает главным образом в печени и частично в почках, надпочечниках и тонком кишечнике (Rajas et al., 2000; Croset et al., 2001; Mithieux et al., 2004; Watford, 2005). Основными субстратами для глюконеогенеза являются лактат, образующийся путем гликолиза в различных тканях, аминокислоты, высвобождаемые из мышц в ходе катаболизма белков, и глицерол — продукт гидролиза триглицеридов в жировых депо (Kruszynska, 1999; Авдеева, Воробьева, 2005).

Введение глюкозы голодным крысам уже через 10 мин приводит к увеличению сухой массы гепатоцитов, примерно одинаковому в обеих группах животных. Однако через 60 мин сухая масса гепатоцитов в контрольной группе увеличивалась в большей степени, чем в опытной группе (табл. 1). Известно, что удельное приращение показателя преломления для углеводов значительно отличается от такового для белков (Бенеке, 1969). Расчеты свидетельствуют о том, что даже в том случае, если углеводы будут составлять 20 % от общей сухой массы клетки, их

Таблица 2

Содержание гликогена (усл. ед.) в гепатоцитах различных классов плоидности в нормальной (контрольная группа) и цирротической (опытная группа) печени крыс через 10 и 60 мин после введения глюкозы голодным животным

Время, мин	Классы плоидности, с					
	2	2×2	4	4×2	8	8×2
Контрольная группа						
0	4.7 ± 0.3	9.9 ± 0.2	9.6 ± 0.1	19.3 ± 0.3	18.2 ± 0.4	—
10	8.8 ± 0.5 ^a	16.3 ± 0.6 ^a	17.2 ± 0.1 ^a	32.9 ± 0.8 ^a	34.3 ± 0.9 ^a	—
60	17.3 ± 1.8 ^a	33.2 ± 0.8 ^a	33.5 ± 0.2 ^a	65.9 ± 0.8 ^a	63.8 ± 1.7 ^a	—
Опытная группа						
0	3.7 ± 0.8	7.2 ± 0.8	7.6 ± 0.2	14.9 ± 0.6	14.4 ± 0.6	27.1 ± 10.8
10	6.8 ± 2.2	13.4 ± 3.9	13.2 ± 0.7 ^a	27.1 ± 3.2 ^a	26.4 ± 3.1 ^a	54.9 ± 6.1 ^b
60	10.4 ± 1.0 ^a	21.0 ± 2.0 ^a	22.3 ± 0.8 ^a	44.1 ± 4.7 ^a	41.5 ± 3.1 ^a	76.2 ± 9.1 ^b

Примечание. Результаты для каждой временной точки представляют собой взвешенное среднее из данных для 3 крыс; в скобках — число измеренных клеток; содержание гликогена в гепатоцитах достоверно отличается от соответствующего значения у голодных животных при ^a*P* < 0.001, ^b*P* < 0.05, ^c*P* < 0.01.

вклад в определение сухой массы не превысит 3.2 %. Поэтому в условиях, использованных в настоящей работе для измерения сухой массы гепатоцитов, накоплением гликогена в клетках можно пренебречь. Поскольку сухая масса гепатоцитов более чем на 80 % обусловлена содержанием белков (Бродский, 1966), полученные данные позволяют заключить, что введение глюкозы голодным крысам стимулирует синтез и накопление белков в гепатоцитах. Схожие данные были получены ранее (Prinsen et al., 1983): показано, что введение глюкозы крысам, голодавшим в течение 42—66 ч, приводит к увеличению скорости синтеза альбумина и общего белка в печени. Рефининг глюкозой не влиял на содержание мРНК и общей РНК в печени, но восстанавливал размер полирибосом. Авторы пришли к выводу о том, что эффект глюкозы на восстановление содержания белка и синтез альбумина является исключительно посттранскрипционным событием (Prinsen et al., 1983). Полученные нами данные позволяют предположить, что рефининг крыс глюкозой дает возможность частично переключить субстратный поток аминокислот, поступающих в печень во время голодания, с глюконеогенеза на синтез белков.

Результаты, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что в каждом классе плоидности сухая масса гепатоцитов у крыс опытной группы заметно превышает сухую массу гепатоцитов соответствующей плоидности контрольных крыс. Важно при этом отметить, что средние значения сухой массы гепатоцитов в нормальной и цирротической печени изменяются пропорционально с изменением плоидности клеток. Это подтверждает многочисленные данные о том, что сухая масса клеток различных типов и содержание в них белка как в норме, так и при патологии изменяются пропорционально дозе генов (Frederiks et al., 1980; Шалахметова и др., 1981; Engelmann et al., 1981; Завадская и др., 1983; Le Rumeur et al., 1983). Подобный результат позволяет сделать вывод о том, что нашем эксперименте увеличение сухой массы гепатоцитов в ходе развития цирроза обусловлено главным образом ростом цитоплазмы клеток, а не повышением их плоидности.

Цирроз в ходе своего развития приводит к значительной потере числа гепатоцитов. Уровень гепатоцеллюляр-

ной недостаточности и степень нарушения условий окружающей среды, в которых гепатоциты выполняют свои многочисленные функции, в значительной мере определяют прогноз этого заболевания (Шерлок, Дули, 2002). Из данных, представленных в табл. 2, следует, что скорость накопления гликогена в гепатоцитах цирротической печени ниже, чем в клетках нормальной печени. Схожие данные были получены ранее (Безбородкина и др., 2003). Сниженная по сравнению с нормальной печенью способность цирротически измененной печени накапливать гликоген обусловлена комплексом факторов. Прежде всего к ним следует отнести разрастание соединительной ткани и нарушение кровеносного русла, ведущие к гипоксии и ухудшению снабжения гепатоцитов необходимыми веществами (Reichen et al., 1987; Bircher et al., 1999; Henderson, 1999; Шерлок, Дули, 2002). В этой связи принципиальным является ответ на вопрос: сохраняются ли в патологически измененной печени те же закономерности функционирования гепатоцитов, которые характерны для нормального органа?

Полученные нами данные (табл. 2) свидетельствуют о том, что содержание гликогена в гепатоцитах цирротической печени при голодании и на разных этапах рефининга, как и в нормальной печени, пропорционально степени плоидности клеток. Этот результат хорошо согласуется с данными, полученными ранее (Кудрявцев и др., 1979б; Завадская и др., 1989). Кроме того, из представленных данных следует, что гепатоциты каждого класса плоидности в нормальной и цирротической печени накапливают гликоген с одинаковой скоростью. При этом одноядерные и двуядерные гепатоциты равной плоидности не различаются по скорости накопления гликогена.

Размер клеток является фундаментальным параметром, 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 исследованию влияния ионозависимых изменений объема клеток на различные показатели их метаболизма. Изменения объема клеток, обусловленные их гидратацией или обезвоживанием, оказывают сильное влияние на мно-

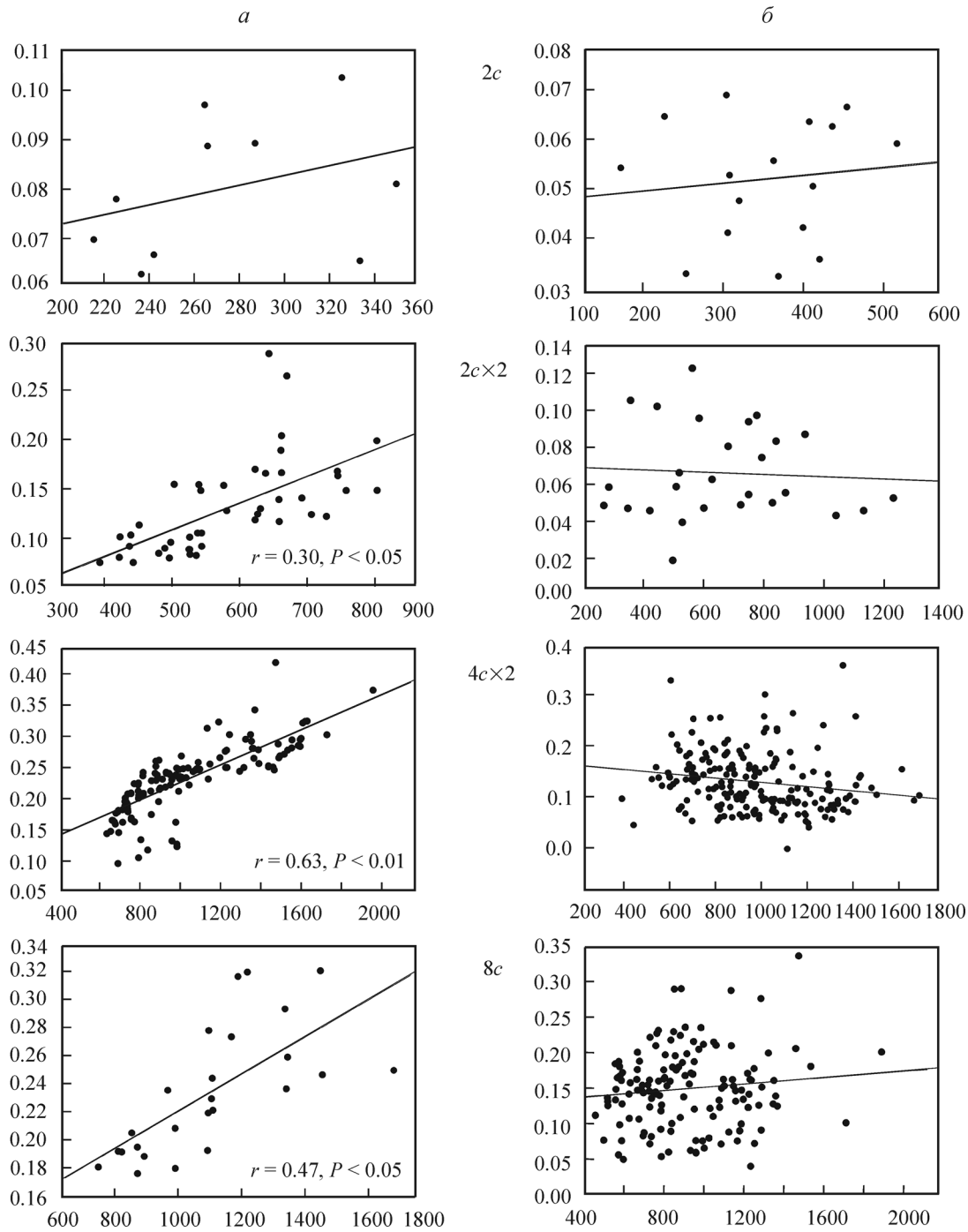


Рис. 2. Зависимость содержания гликогена от сухой массы гепатоцитов различных классов плоидности нормальной (а) и цирротической (б) печени у голодных крыс.

По оси абсцисс — сухая масса, пг; по оси ординат — содержание гликогена, усл. ед.

гочисленные метаболические пути, 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 метаболизма в этих клетках (Hallgren et al., 2003; Krumschnabel et al., 2003). В целом гидратация клеток стимулирует анаболический метаболизм и их пролиферацию, в то время как обезвоживание

клеток ведет к усилению катаболизма и повышает их чувствительность к апоптозу (Schliess, Haussinger, 2003).

Достаточно быстрые изменения размера гепатоцитов, вызванные их набуханием или дегидратацией, не слишком велики по своей амплитуде и не сопровождаются изменением в них количества органоидов или других структур. В отличие от изменений объема клеток, вызванных гипер- и гипосмотическими условиями, интервал колебаний размера гепатоцитов в печени млекопитающих значительно шире.

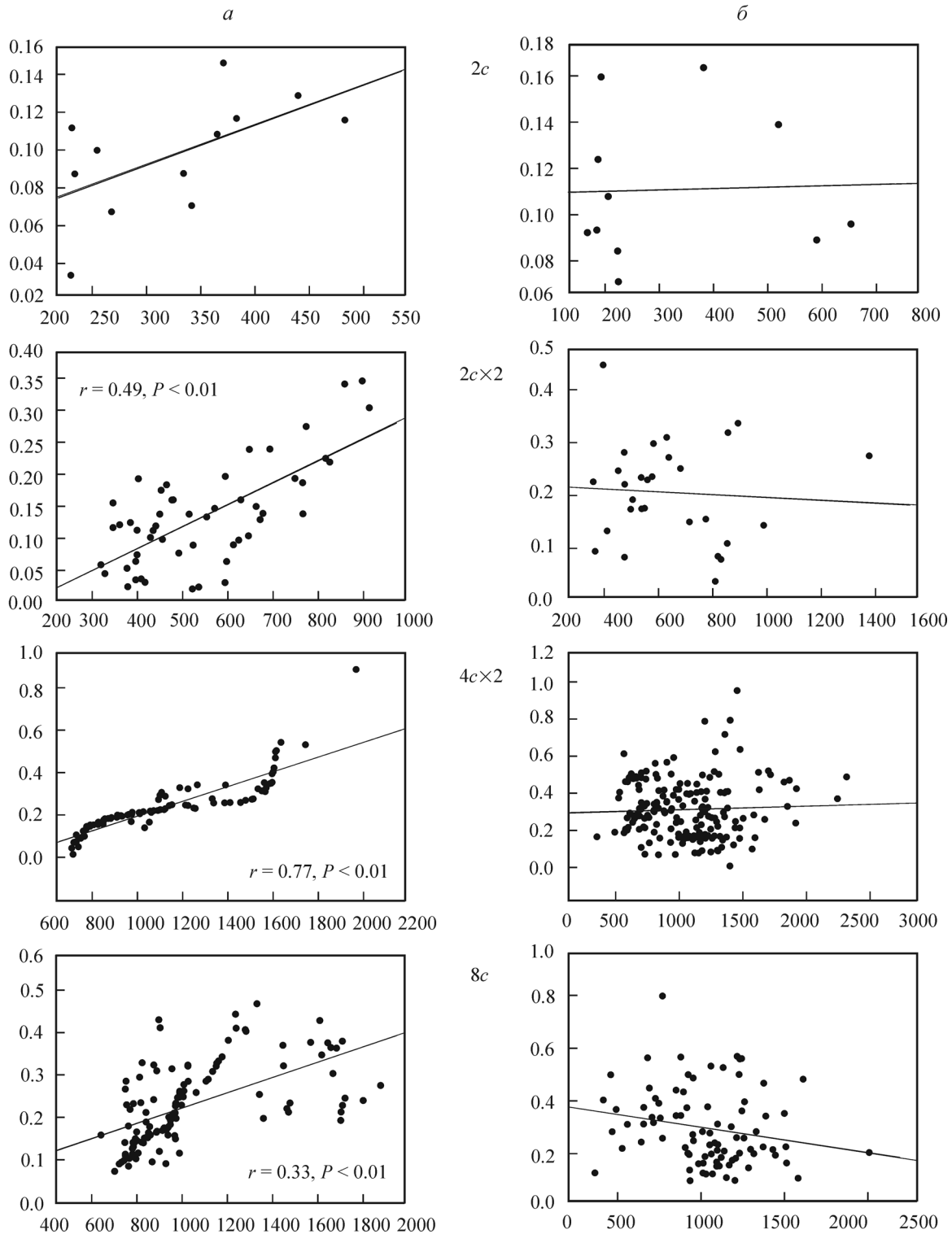


Рис. 3. Зависимость содержания гликогена от сухой массы гепатоцитов различных классов плоидности нормальной (а) и цирротической (б) печени через 10 мин после введения глюкозы голодным крысам.

По оси абсцисс — сухая масса, пг; по оси ординат — содержание гликогена, усл. ед.

Определение сухой массы гепатоцитов в нормальной и цирротической печени показало, что у голодных крыс и на разных этапах рефиндинга этот показатель сильно варьирует. Колебания сухой массы гепатоцитов у голодных крыс достигают 9.2 раза. Во многом вариабельность сухой массы клеток обусловлена различиями в степени их плоидно-

сти. Однако даже в пределах одного класса плоидности сухая масса клеток также сильно различается. Наши данные показали, например, что вариабельность сухой массы в классе одноядерных 4c-клеток у голодных крыс составляет 3.6 раза (от 301 до 1087 пг). Причины столь сильных различий сухой массы гепатоцитов не совсем ясны.

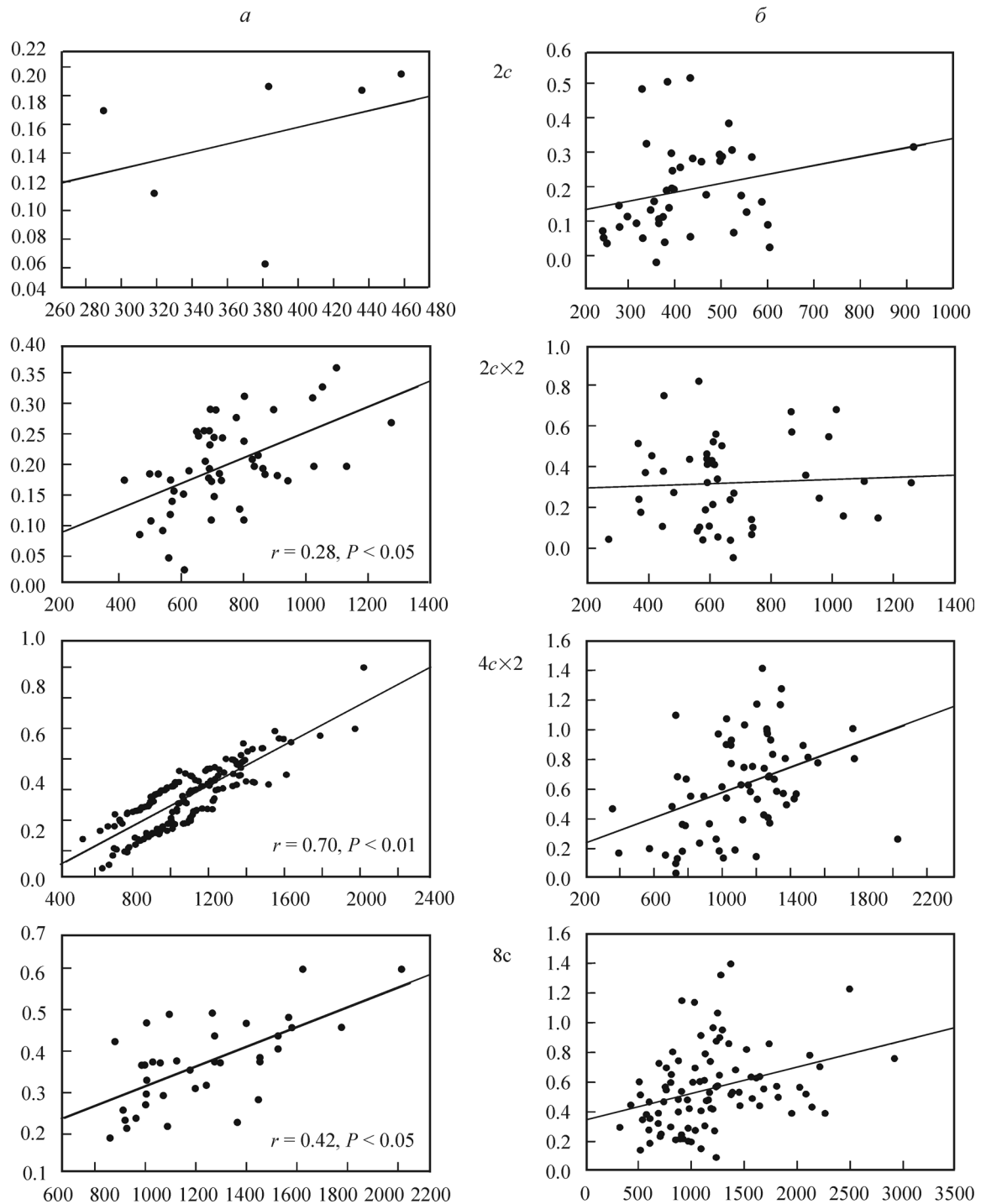


Рис. 4. Зависимость содержания гликогена от сухой массы гепатоцитов различных классов плоидности нормальной (а) и цирротической (б) печени через 60 мин после введения глюкозы голодным крысам.

По оси абсцисс — сухая масса, пг; по оси ординат — содержание гликогена, усл. ед.

Известно, что гепатоциты выполняют огромное количество тканеспецифических функций, некоторые из которых связаны с синтезом и секрецией белков (альбуминов, трансферрина, церулоплазмينا, факторов свертывания крови и многих других). Полагают, что в клетках существуют циркадный, окологосовой и другие ритмы синтеза белка и его выведения в плазму крови (Бродский, Нечаева, 1988). Показано, например, что различия в содержании белка, включении меченых аминокислот и выделении

белка из гепатоцитов в максимуме и минимуме окологосового ритма могут достигать 2—4 раз (Новикова и др., 1982; Новикова, Боровков, 1987). Исходя из вышесказанного можно предположить, что вариабельность сухой массы гепатоцитов, которая наблюдалась в наших экспериментах, в основном связана с колебаниями синтеза и выведения белков из клеток.

Некоторые авторы полагают, что содержание гликогена в гепатоцитах тесно связано с их размером. Считают-

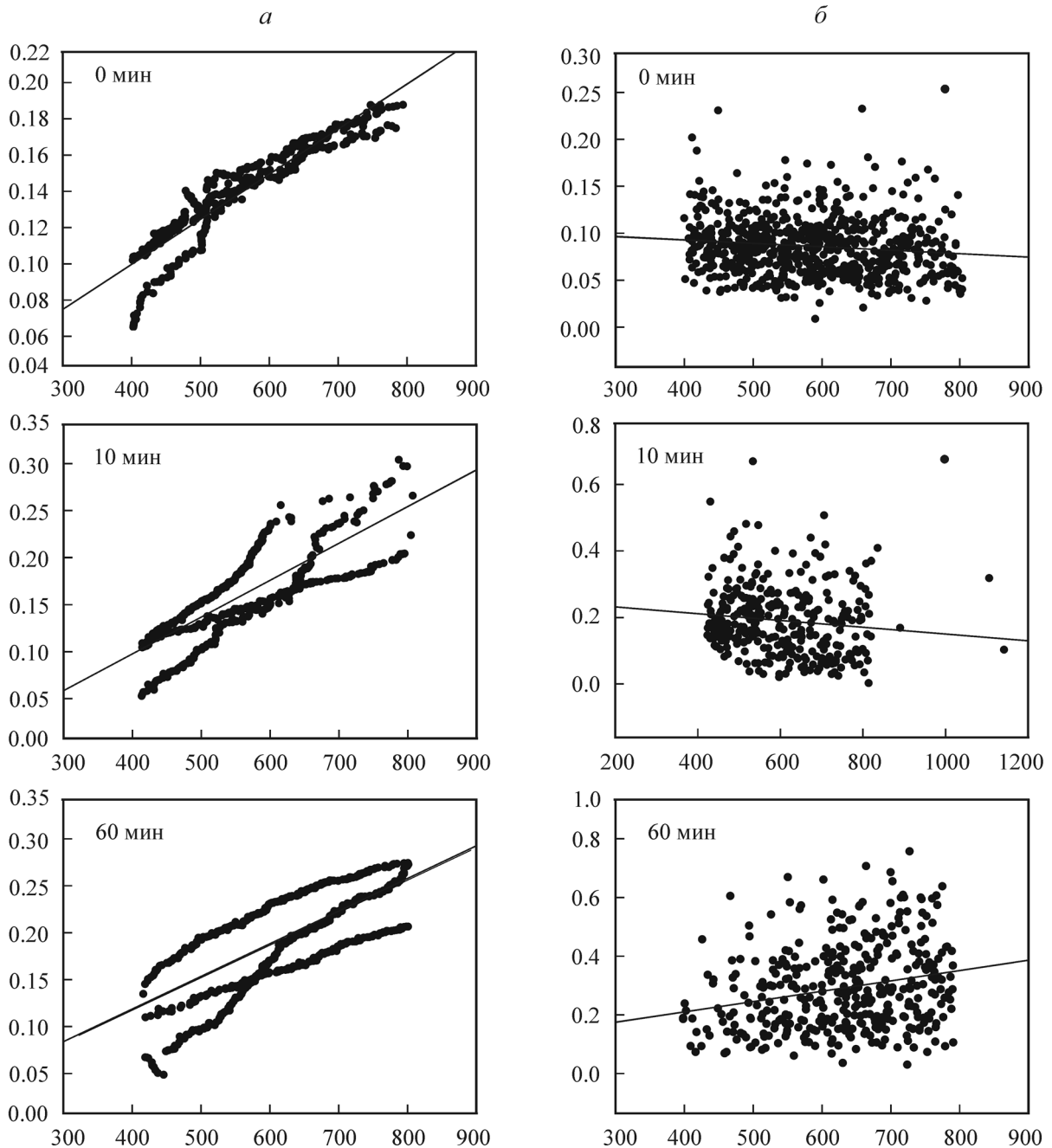


Рис. 5. Тетраплоидные гепатоциты нормальной (а) и цирротической (б) печени крыс на разных этапах рефидинга. Взаимосвязь между содержанием гликогена и размером гепатоцитов.

По оси абсцисс — сухая масса, пг; по оси ординат — содержание гликогена, усл. ед.

ся, что чем больше клетка, тем большее количество гликогена она может откладывать в своей цитоплазме (Ньюсхолм, Старт, 1977). Для того чтобы проверить это предположение, была исследована взаимосвязь между содержанием гликогена в гепатоцитах и их размером в нормальной и цирротической печени у крыс, находящихся в разном пищевом статусе. Кроме того, чтобы исключить влияние ploидности клеток на полученные результаты, эту взаимосвязь исследовали для одноядерных и двуядерных гепатоцитов различной ploидности.

Результаты, представленные на рис. 2, а, 3, а и 4, а, свидетельствуют о том, что в норме существует четкая корреляция между размером гепатоцитов и содержанием

в них гликогена, т. е. чем больше масса клетки, тем больше гликогена она содержит. Подобная зависимость наблюдается в каждом классе ploидности клеток как при голодании, так и через 10 и 60 мин после введения голодного животного глюкозы, во время интенсивного синтеза гликогена в печени (Безбородкина и др., 2003). В цирротической печени зависимость между размером клеток и содержанием в них гликогена отсутствует (рис. 2, б; 3, б; 4, б).

Считается, что основной морфофункциональной единицей печени является печеночная долька, строение которой тесно связано с уникальными особенностями кровоснабжения этого органа. Предложены различные модели

строения долек, которые, однако, не исключают друг друга, а лишь отражают разные стороны структуры и функции печени (Rappaport et al., 1954; Matsumoto, Kawakami, 1982; Lamers et al., 1989; Sasse et al., 1992; Romert et al., 1993; Teutsch et al., 1999; Teutsch, 2005). Согласно этим представлениям, функция гепатоцитов в дольке печени строго организована. В печеночной дольке существует градиент концентраций кислорода, гормонов и различных метаболитов (Thurman et al., 1988; Jungermann, Katz, 1989; Jungermann, 1992; Ikezawa et al., 1998; Sell, 2001). В результате гепатоциты, расположенные в различных зонах дольки печени, получают определенное количество кислорода и питательных веществ, необходимых для их функции. Как следствие гепатоциты, расположенные вокруг портальных и центральных сосудов, имеют разное соотношение одних и тех же ферментов и обладают различным метаболизмом. Выявление в тетраплоидном классе гепатоцитов нормальной печени трех субпопуляций (рис. 5), обладающих высокой корреляционной зависимостью между размером клеток и содержанием в них гликогена, возможно, отражает присутствие клеток, относящихся к портальной, промежуточной и центральному зонам дольки печени.

Нарушение долькового строения является характерной чертой цирротической печени (Подымова, 1999; Gressner, Schuppan, 1999; Шерлок, Дули, 2002). В результате разрастания соединительной ткани, изменений сосудистого русла и нарушения процессов регенерации в печени значительно ухудшается снабжение гепатоцитов питательными веществами и кислородом, резко возрастает гетерогенность условий, в которых осуществляется их функция (Sikuler et al., 1985; Henderson, 1999; Шерлок, Дули, 2002). Подтверждением этому является то, что при циррозе заметно увеличивается вариабельность гепатоцитов по сухой массе и содержанию гликогена. Если в нормальной печени коэффициент вариации для сухой массы 4с-гепатоцитов составлял 24.9 %, то в цирротической печени — 35.5 % ($P < 0.001$); для гликогена значения коэффициентов вариации в нормальной и цирротической печени составили 34.7 и 45.8 % соответственно ($P < 0.01$).

Исходя из полученных данных можно заключить, что содержание гликогена в гепатоцитах нормальной печени зависит от их размера. Отсутствие корреляции между размером гепатоцитов и содержанием в них гликогена при циррозе свидетельствует об увеличении гетерогенности условий микроокружения и нарушении организации метаболизма гликогена при патологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00971-а).

Список литературы

Авдеева Л. В., Воробьева С. А. 2005. Гормональная регуляция обмена веществ и функций организма. В кн.: Биохимия. М.: ГЭОТАР-Медиа. 545—616.

Безбородкина Н. Н., Кудрявцева М. В., Оковитый С. В., Нилова В. К., Кудрявцев Б. Н. 2003. Динамика содержания гликогена в нормальной и цирротически измененной печени после введения глюкозы голодным крысам. Цитология. 45 (10): 1019—1026.

Безбородкина Н. Н., Оковитый С. В., Кудрявцева М. В., Кирик О. В., Зарубина И. В., Кудрявцев Б. Н. 2008. Морфометрия митохондриального аппарата гепатоцитов нормальной и цирротически измененной печени крыс. Цитология. 50 (3): 228—236.

Бенеке Г. 1969. Применение интерференционной микроскопии для исследования биологических объектов. В кн.: Введение в количественную цитохимию. М.: Мир. 70—92.

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 (7): 695—703.

Бродский В. Я. 1966. Трофика клетки. М.: Наука. 355 с.

Бродский В. Я., Нечаева А. В. 1988. Ритм синтеза белка. М.: Наука. 239 с.

Завадская Е. Э., Кудрявцева М. В., Кудрявцев Б. Н. 1989. Изменение сухого веса гепатоцитов при хронической интоксикации крыс CCl_4 . Цитология. 31 (4): 419—425.

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 (4): 447—451.

Кудрявцев Б. Н., Кудрявцева М. В., Завадская Е. Э., Шалахметова Т. М., Комаров С. А., Комарова Н. И. 1979а. Метод определения в одной и той же клетке содержания гликогена, ДНК, 3H -тимидиновой метки и сухого веса. Цитология. 21 (1): 74—83.

Кудрявцев Б. Н., Кудрявцева М. В., Сакута Г. А., Штейн Г. И. 1991. Кинетика клеточной популяции паренхимы печени человека в разные периоды его жизни. Цитология. 33 (8): 96—109.

Кудрявцев Б. Н., Кудрявцева М. В., Шалахметова Т. М., Завадская Е. Э., Иоффе В. А., Барский И. Я., Папаян Г. В. 1979б. Цитофотометрическое исследование содержания гликогена в гепатоцитах разной ploидности у взрослых крыс. Цитология. 21 (2): 218—221.

Кудрявцев Б. Н., Розанов Ю. М. 1974. Цитофлуориметрия. Общие принципы. В кн.: Методы биологии развития. М.: Наука. 497—500.

Кудрявцева М. В., Завадская Е. Э., Скорина А. Д., Смирнова С. А., Кудрявцев Б. Н. 1983. Метод получения мазков изолированных клеток печени из материала прижизненных пункционных биопсий для цитофотометрических исследований. Лаб. дело. 9: 21—22.

Кудрявцева М. В., Кудрявцев Б. Н., Розанов Ю. М. 1972. Влияние продолжительности окисления периодатом на интенсивность и специфичность PAS-реакции с обыкновенным реактивом Шиффа и реагентом типа Шиффа — аураминем SO_2 . Цитология. 14 (11): 1357—1362.

Майтесян Е. С. 1983. Сравнительный анализ функциональной активности гепатоцитов различных классов ploидности: Автореф. канд. дис. Л. 22 с.

Новикова Т. Е., Боровков А. Ю. 1987. Изменение содержания альбумина в гепатоцитах мыши. Цитология. 29 (2): 236—239.

Новикова Т. Е., Нечаева Н. В., Фатеева В. И., Бродский В. Я. 1982. Околочасовые колебания выделения белка из гепатоцитов в монослойной культуре. Цитология. 14 (1): 35—41.

Ньюсхолм Э., Старт К. 1977. Регуляция метаболизма. М.: Мир. 407 с.

Папаян Г. В., Иоффе В. А., Виноградова Г. Н., Барский И. Я. 1974. Двухлучевой импульсный микрофлуориметр с цифровым отсчетом. Цитология. 16 (3): 395—398.

Подымова С. Д. 1999. Болезни печени. Руководство для врачей. М.: Медицина. 704 с.

Сакута Г. А., Кудрявцев Б. Н. 1996. Клеточные механизмы регенерации цирротической печени крыс. I. Соотношение процессов пролиферации, полиплоидизации и гипертрофии клеток после прекращения хронического воздействия CCl_4 . Цитология. 38 (11): 1158—1171.

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 (5): 379—387.

- Туманишвили Г. Д. 1973. О биологическом значении и причинах возникновения полиплоидных клеток печени. Цитология. 15 (6) : 635—642.
- Урываева И. В. 1988. Клеточное размножение и полиплоидия в печени: Автореф. докт. дис. М. 31 с.
- Урываева И. В., Маршак Т. Л. 1969. Анализ пролиферации диплоидных и полиплоидных клеток в регенерирующей печени мыши. Цитология. 11 (10) : 1252—1258.
- 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 (6) : 674—680.
- Шерлок Ш., Дули Дж. 2002. Заболевания печени и желчных путей. М.: ГЭОТАР-Медиа. 859 с.
- Addis T., Poo L. J., Lew W. 1936. Protein loss from liver during a two day fast. J. Biol. Chem. 115 : 116—118.
- 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.
- Bircher J., Benhamou J.-P., McIntyre N., Rizzetto M., Rodes J. 1999. Oxford textbook of clinical hepatology. Oxford: Oxford Univ. Press. 1086 p.
- Calder P. C., Geddes R. 1986. Digestion of protein associated with muscle and liver glycogen. Carbohydr. Res. 148 : 73—177.
- Croset M., Rajas F., Zitoun C., Hurot J. M., Montano S., Mithieux G. 2001. Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. Diabetes. 50 : 740—746.
- 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 Develop. 16 : 385—395.
- Frederiks W. M., Slob A., Schroder M. 1980. Histochemical determination of histone and non-histone protein content in rat liver nuclei. Histochemistry. 68 : 49—53.
- Gandillet A., Alexandre E., Holl V., Royer C., Bischoff P., Cinqualbre J., Wolf P., Jaecq D., Richert L. 2003. Hepatocyte ploidy in normal young rat. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 134 : 665—673.
- Grampp W., Hallen O., Rosengren B. 1960. Mass determination by interference and X-ray microscopy. Exp. Cell Res. 19 : 437—442.
- Gressner A. M., Schuppan D. 1999. Cellular and molecular pathobiology, pharmacological intervention, and biochemical assessment of liver fibrosis. In: Oxford textbook of clinical hepatology. Oxford: Oxford Univ. Press. 607—629.
- 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.
- Henderson M. J. 1999. Anatomy of the portal venous system in portal hypertension. In: Oxford textbook of clinical hepatology. Oxford: Oxford Univ. Press. 645—653.
- Hutson N. J., Lloyd C. E., Mortimore G. E. 1982. Degradation of intra- and extrahepatic protein by livers of normal and diabetic mice: differential responses to starvation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 79 : 1737—1741.
- Ikezawa 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.
- 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.
- Jorgensen P., Tyers M. 2004. How cells coordinate growth and division. Curr. Biol. 14 : R1014—R1027.
- Jungermann K. 1992. Role of intralobular compartmentation in hepatic metabolism. Diabete a Metabolisme. 18 : 81—86.
- Jungermann K., Katz J. 1989. Functional specialization of hepatocytes. Physiol. Rev. 69 : 718—745.
- Krumschnabel G., Gstir R., Manzl C., Prem C., Pafundo D., Schwarzbaum P. J. 2003. Metabolic and ionic responses of trout hepatocytes to anisotonic exposure. J. Exp. Biol. 206 : 1799—1808.
- Kruszynska Y. T. 1999. Carbohydrate metabolism. In: Oxford textbook of clinical hepatology. Oxford: Oxford Univ. Press. 257—286.
- Kudryavtseva M. V., Bezborodkina N. N., Radchenko V. G., Okovity S. V., Kudryavtsev B. N. 2001. Metabolic heterogeneity of glycogen hepatocytes of patients with liver cirrhosis. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 13 : 693—697.
- Lamers W. H., Hilberts A., Furt E., Smith J., Jonges G. N., van Noorden C. J. F. et al. 1989. Hepatic enzymic zonation: a reevaluation of the concept of the liver acinus. Hepatology. 10 : 72—76.
- Le Bouton A. V. 1982. Routine overnight starvation and immunocytochemistry of hepatocyte albumin content. Cell Tissue Res. 227 : 423—427.
- Le Rumeur E., Guguen-Guillouzo C., Beaumont C., Saunier A., Guillou A. 1983. Albumin secretion and protein synthesis by cultured diploid and tetraploid rat hepatocytes separated by elutriation. Exp. Cell Res. 147 : 247—254.
- Matsumoto T., Kawakami M. 1982. The unit-concept of hepatic parenchyma. A reexamination based on angioarchitectural studies. Acta Pathol. Jap. 32 : 285—314.
- Mithieux G., Rajas F., Gautier-Stein A. 2004. A novel role for glucose 6-phosphatase in the small intestine in the control of glucose homeostasis. J. Biol. Chem. 279 : 44 231—44 234.
- Mortimore G. E., Hutson N. J., Surmacz C. A. 1983. Quantitative correlation between proteolysis and macro- and microautophagy in mouse hepatocytes during starvation and refeeding. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 80 : 2179—2183.
- Pelligrino G., Ricci P. D., Tongiani K. 1963. A quantitative cytochemical and physiological study of the adrenal cortex in hypertrophy after unilateral adrenalectomy. Exp. Cell Res. 31 : 167—182.
- 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-transcriptional control mechanism. Ann. Nutr. Metab. 27 : 182—193.
- Rajas F., Croset M., Zitoun C., Montano S., Mithieux G. 2000. Induction of PEPCK gene expression in insulinopenia in rat small intestine. Diabetes. 49 : 1165—1168.
- 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.
- Rappaport A. M., Borowy Z. J., Lougheed W. M., Lotto N. 1954. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. Anat. Rec. 119 : 11—34.
- Reichen J., Arts F., Schafroth U., Zimmermann A., Heltner Th. B., Zysset T. 1987. Aminopyrine N-Demethylation by rats with liver cirrhosis. Gastroenterology. 93 : 719—726.
- Romert P., Quistorff B., Behnke O. 1993. Histological evaluation of the zonation of colloidal gold uptake by the rat liver. Tissue Cell. 25 : 19—32.
- Rothman D. L., Magnusson I., Katz L. D., Shulman R. G., Shulman G. I. 1991. Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting human with ¹³C NMR. Science. 254 : 573—576.
- Sasse D., Spornitz U. M., Maly I. P. 1992. Liver architecture. Enzyme. 46 : 832.
- Schliess F., Haussinger D. 2003. Cell volume and insulin signaling. Int. Rev. Cytol. 225 : 187—228.
- Sell S. 2001. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. Hepatology. 33 : 738—750.
- Sikuler E., Kravetz D., Groszmann R. J. 1985. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. Amer. J. Physiol. 248 : G618—G625.
- Soberon G., Sanchez E. 1961. Changes in effective enzyme concentration in the growing rat liver. I. Effects of fasting followed by repletion. J. Biol. Chem. 236 : 1602—1606.
- Teutsch H. F. 2005. The modular microarchitecture of human liver. Hepatology. 42 : 317—325.

Teutsch H. F., Schuerfeld D., Groezinger E. 1999. Three-dimensional reconstruction of parenchymal units in the liver of the rat. *Hepatology*. 29 : 494—505.

Thurman R. G., Forchand B. J., Apel E. D., Lemasters J. J. 1988. Role of oxygen in hepatic carbohydrate metabolism and ethanol toxicity. In: *Biomedical and social aspects of alcohol and alcoholism*. Amsterdam: Elsevier. 171—176.

Tongianni R., Lopek N., Puccianelli E. 1976. Hepatocyte population dynamics during hydrocortisone and thioacetamide treatment. *Histochemistry*. 47 : 1—21.

Uhal B. D., Roehrig K. L. 1982. Effect of dietary state on hepatocyte size. *Biosci Rep.* 2 : 1003—1007.

Waldegger S., Lang F. 1998. Cell volume and gene expression. *J. Mebr. Biol.* 162 : 95—100.

Watford M. 2005. Is the small intestine a gluconeogenic organ. *Nutr. Rev.* 63 : 356—360.

Поступила 24 XII 2008

INTERRELATION BETWEEN THE GLYCOGEN CONTENT IN HEPATOCYTES AND THEIR SIZE IN NORMAL AND CIRRHOTIC RAT LIVER

N. N. Bezborodkina, A. A. Vahtina, E. V. Baidyuk, G. S. Yakupova, B. N. Kudryavtsev

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: cellpath@mail.cytspb.rssi.ru

The dependence between the size of hepatocytes and glycogen content in them was investigated in normal and cirrhotic liver from fasting rats as well as from rats in 10 and 60 minutes after *per os* glucose administration. The cytophotometric method used allows glycogen and DNA contents determining in the same cell and its dry mass as well. It has been shown that the dry mass and the glycogen content in hepatocytes from normal and cirrhotic liver are proportional to genes dose. Normal liver hepatocytes of various ploidy classes show distinct correlation between the cell size and the glycogen content. No similar dependence is observed in hepatocytes population from the cirrhotic liver, apparently, because the liver lobule structure is disturbed, and heterogeneity of the hepatocytes microenvironment condition is increased.

Key words: hepatocytes, refeeding, glycogen, ploidy, dry mass, cirrhotic liver.