

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ПРО- И МАКРОГЛИКОГЕНА В ГЕПАТОЦИТАХ НОРМАЛЬНОЙ И ЦИРРОТИЧЕСКОЙ ПЕЧЕНИ КРЫС НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ГЛИКОГЕНЕЗА

© А. Ю. Честнова,^{1,*} Н. Н. Безбородкина,¹ Н. М. Матюхина,^{1,2} Б. Н. Кудрявцев¹

¹ Институт цитологии РАН

² Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург;

* электронный адрес: chestnova.anna@gmail.com

Исследованы содержание и структура гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крыс через разные интервалы времени после введения глюкозы голодным животным. В работе был использован оригинальный цитофлуориметрический метод выявления и количественного определения прогликогена (ПГ) и макрогликогена (МГ) в отдельных гепатоцитах, основанный на использовании реактивов типа Шиффа с различными спектральными характеристиками. Установлено, что содержание МГ в гепатоцитах контрольных крыс увеличивалось уже через 10 мин на 52 % ($P < 0.01$). Содержание МГ в клетках цирротической печени возрастало только через 20 мин на 43 % ($P < 0.05$) после введения глюкозы голодным животным. Коэффициент корреляции между содержанием МГ и общим содержанием гликогена на разных этапах гликогенеза у крыс обеих групп составлял от 0.90 до 0.99 ($P < 0.001$). Увеличение содержания ПГ в гепатоцитах контрольных крыс наблюдалось в интервалах 10—30 и 45—75 мин. Содержание ПГ при циррозе возрастало только через 60 мин после начала гликогенеза, однако через 120 мин оно было выше контрольных значений в 1.5 раза ($P < 0.001$). Коэффициенты корреляции между ПГ и общим содержанием гликогена в клетках в среднем составляли 0.86 ($P < 0.001$) и 0.77 ($P < 0.001$) в контрольной и опытной группах соответственно. Таким образом, изменение общего содержания гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени связано главным образом с изменением уровня МГ. Вклад ПГ наиболее существен в нормальной печени в начале гликогенеза (10—30 мин), а в цирротической — на более поздних его этапах (75—120 мин).

Ключевые слова: прогликоген, макрогликоген, гепатоциты, синтез гликогена, цирроз печени, глюкоза.

Принятые сокращения: МГ — макрогликоген, ПГ — прогликоген.

Гликоген относится к числу важнейших биополимеров, входящих в состав клеток человека и животных. Этот гликопротеид, являющийся основным источником глюкозы, обеспечивает энергией многие метаболические процессы в организме. Метаболизм гликогена отличается необычайной сложностью, и его регуляция осуществляется с помощью сложнейших механизмов, включающих в себя различные ферменты, гормоны, ингибиторы и активаторы ферментов, а также ионы металлов (Ferrer et al., 2003; Greenberg et al., 2006; Jurczak et al., 2008). Нарушения в любом из звеньев этих сложнейших процессов приводят не только к аномальному повышению или снижению содержания гликогена в клетках, но и к изменениям его структуры (Розенфельд, Попова, 1989; Maуatepek et al., 2010). Так, при гликогенозе III типа гликоген характеризуется укороченными концевыми ветвями молекул, а при гликогенозе IV типа накапливаемый гликоген имеет мало точек ветвления, а также очень длинные и редкие боковые ветви (Maуatepek et al., 2010). Мутации в генах, кодирующих лафорин и малин, являются причиной развития болезни Лафора, которая сопровождается накоплением крупных гиперфосфорилированных полиглюкоза-

новых молекул в нейронах, сердце, печени и скелетных мышцах (Ganesh et al., 2001; Tagliabracchi et al., 2007, 2011).

Известно, что цирроз печени, являющийся одним из наиболее распространенных и опасных заболеваний человека, не только приводит к нарушению морфологической структуры печени, но и вызывает различные изменения в метаболизме глюкозы и гликогена. Оказалось, что это заболевание характеризуется не только накоплением гликогена в печени, но также изменением его структуры, о чем свидетельствует изменение соотношения легкодоступной и труднодоступной фракций гликогена в пользу преобладания последней (Кудрявцева и др., 1992; Kudryavtseva et al., 2001).

К сожалению, имеющиеся на сегодняшний день данные о структуре гликогена в гепатоцитах при циррозе печени весьма немногочисленны и характеризуют клеточную популяцию в целом. Поэтому цель данной работы заключалась в исследовании структуры гликогена в отдельных гепатоцитах нормальной и цирротической печени крыс через разные интервалы времени после введения глюкозы голодным животным.

Материал и методика

Животные. Исследования проводили на 54 белых беспородных крысах-самцах. Масса животных составляла 130—140 г в начале эксперимента и 250—300 г — в конце. Крыс содержали на стандартном пищевом рационе. В начале эксперимента животные были разделены на две группы — опытную и контрольную.

Животных опытной группы подвергали хроническому ингаляционному воздействию паров четыреххлористого углерода (CCl_4) (7 мл на 100 л объема) в герметичной камере по 20 мин 3 раза в неделю в течение 6 мес для получения экспериментального цирроза печени. Животных контрольной группы не подвергали воздействию CCl_4 .

Через 1 нед после прекращения воздействия CCl_4 на крыс опытной группы, животных обеих групп подвергали голоданию в течение 48 ч (вода *ad libitum*), после чего им *per os* вводили 30%-ный раствор глюкозы из расчета 4 г на 1 кг массы тела. Сразу после прекращения голодания и через 10—30, 45, 60, 75, 90 и 120 мин после введения глюкозы крыс декапитировали (по 3 животных на каждый срок). Материал (кусочки печени), полученный от каждого животного, использовали для цитофлуориметрических и гистологических исследований.

Гистологические препараты. Кусочки печени крыс фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине и заливали в парафин по стандартной методике. Затем приготавливали гистологические срезы толщиной 6—7 мкм.

Срезы окрашивали гематоксилин-эозином по Майеру. Кроме того, для выявления соединительной ткани препараты окрашивали пикросириусом (0.01%-ный раствор сириуса красного в насыщенном водном растворе пикриновой кислоты) в течение 1 ч. После окраски препараты споласкивали 0.01 N HCl в течение 2 мин, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заключали в канадский бальзам.

Картирование препаратов-мазков изолированных гепатоцитов. Препараты-мазки изолированных гепатоцитов приготавливали по ранее описанной методике (Кудрявцева и др., 1983). Для того чтобы несколько раз находить местоположение каждой клетки, на предметное стекло с фиксированными клетками с помощью алмазного стеклореза наносили координатную сетку (размер квадратов около 1 мм²). Далее получали изображения выбранных участков препаратов с использованием микроскопа Axioskop (Carl Zeiss, Германия) и цифровой черно-белой высокочувствительной ПЗС-камеры DFC360 FX (1392×1400). Затем на полученных изображениях клеток выбирали неповрежденные, отдельно расположенные гепатоциты, каждому из которых в соответствии с его расположением на предметном стекле присваивали определенный номер (рис. 1).

В процессе работы для получения изображений отдельных участков препаратов был использован объектив 20×0.45. На каждом препарате было обозначено от 100 до 150 клеток.

Выявление ПГ и МГ в отдельных гепатоцитах. Препараты окрашивали с помощью флуоресцентного варианта PAS-реакции. Картированные препараты-мазки изолированных гепатоцитов помещали на 1.5 ч в раствор периодата калия на слабой HNO_3 (200 мг периодата калия и 25 мл 0.23%-ной HNO_3). Далее окисленные препараты промывали в проточной воде в течение 5 мин,

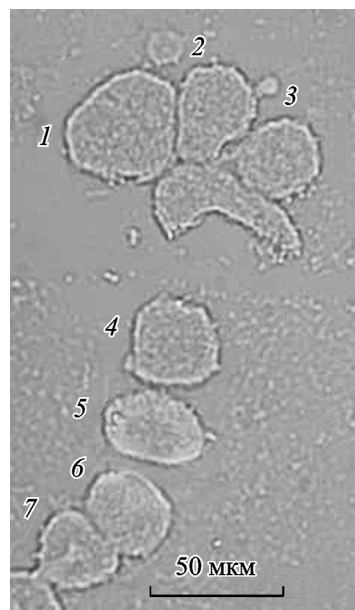


Рис. 1. Картированный препарат изолированных гепатоцитов. 1—7 — номера гепатоцитов.

затем в одной смене дистиллированной воды. После этого препараты помещали вначале на 40 мин в EtBr-SO_2 (100 мл 10⁻⁵ M раствора бромистого этидия и 0.2 мл тионилхлорида) для выявления МГ (рис. 2, а) и после споласкивания в дистиллированной воде — на 50 мин в Au-SO_2 (300 мг аурамина, 100 мл воды и 0.2 мл тионилхлорида) для выявления ПГ (рис. 2, б). По истечении времени окрашивания препараты вынимали из раствора красителя и проводили через три смены дистиллированной и три смены сернистой воды (5 г метабисульфита калия, 950 мл воды и 50 мл HCl) по 3 мин в каждой. После этого препараты в течение 20 мин промывали в проточной воде, споласкивали в дистиллированной воде и обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации (70, 96 и 100 %; по 5 мин в каждой смене спиртов).

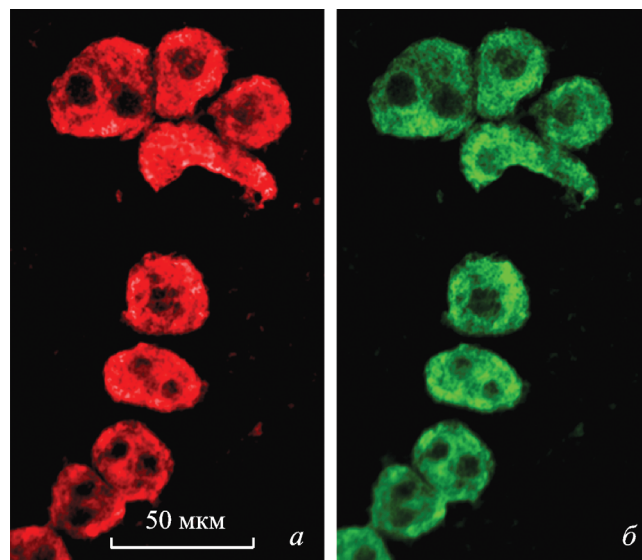


Рис. 2. Выявление в одних и тех же гепатоцитах МГ (а) и ПГ (б) с помощью EtBr-SO_2 и Au-SO_2 соответственно.

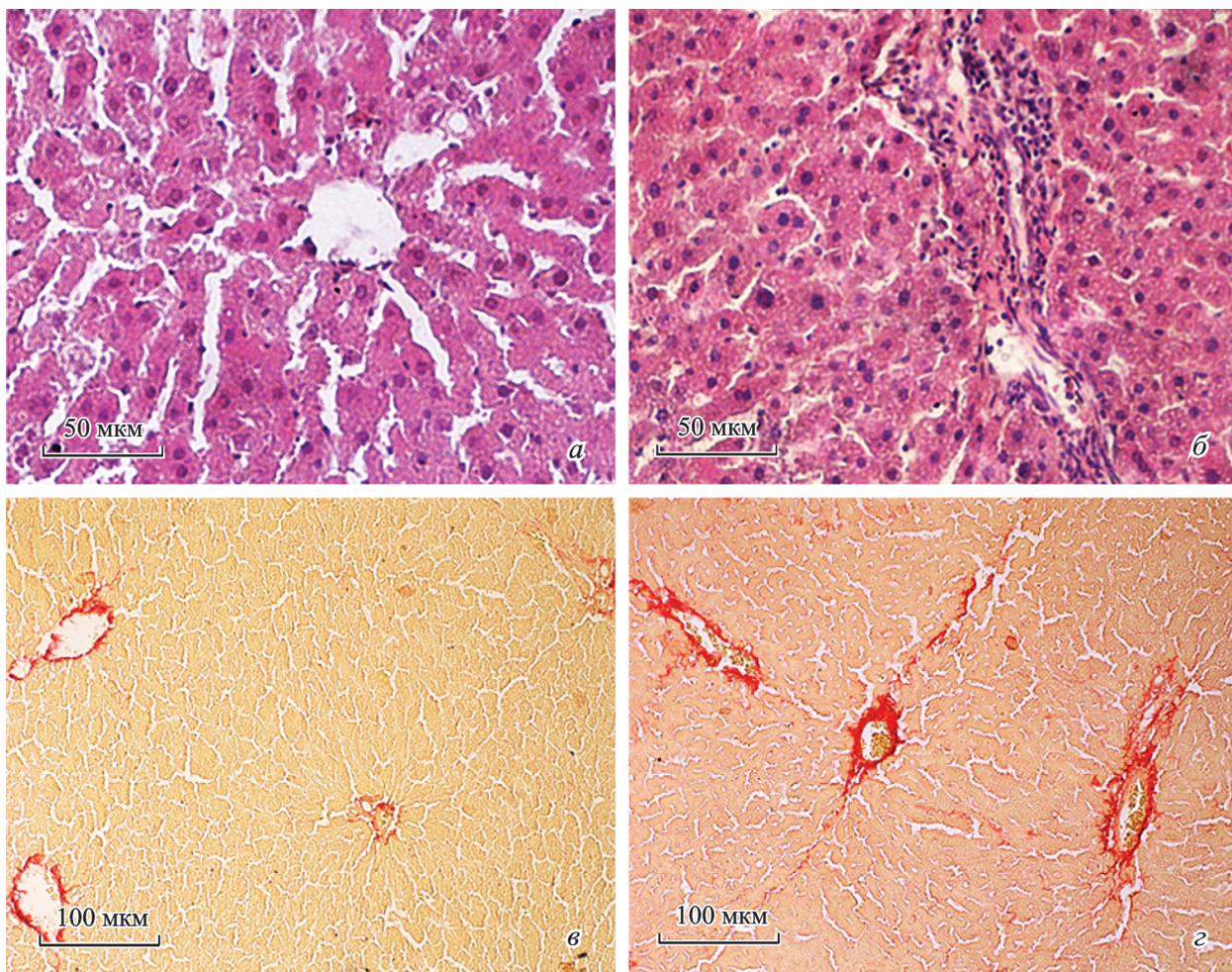


Рис. 3. Гистологические срезы нормальной (а, в) и цирротической (б, з) печени крыс.

Окраска гематоксилин-эозином (а, б) и пикросириусом (в, з). Объектив Plan-NEOFLUAR 40×/0.75 (а, б) и 20×/0.50 (в, з).

Цитофлуориметрия. Изображения клеток, окрашенных Au-SO₂ и EtBr-SO₂, получали с помощью микроскопа Axioskop (Carl Zeiss, Германия), объектива Plan-NEOFLUAR 20×/0.50 и цифровой черно-белой высокочувствительной ПЗС-камеры DFC360 FX (1392×1400). Для возбуждения флуоресценции Au-SO₂ и EtBr-SO₂ были использованы интерференционные светофильтры 450–490 и 546 нм, для регистрации флуоресценции — интерференционные светофильтры 515–565 и 590 нм соответственно. Интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных Au-SO₂ и EtBr-SO₂, была измерена с использованием программы ImageJ. Общее содержание гликогена в каждой клетке было принято равным сумме МГ и ПГ. Для каждого препарата было измерено 100–150 клеток.

Статистическую обработку результатов — сравнение средних величин по критерию Стьюдента и корреляционный анализ с вычислением коэффициентов корреляции (r) — проводили с помощью программы SigmaPlot v 11.0.

Результаты и обсуждение

Хроническая интоксикация животных CCl₄ воспроизводит многие характерные признаки цирроза у человека (Kus et al., 2004; Planaguma et al., 2005). 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 (Шерлок, Дули, 2002). Проведенный нами гистологический анализ срезов печени крыс показал, что у контрольных животных структура паренхимы типична для нормального органа. Она характеризуется радиально расположенными трабекулами гепатоцитов вокруг центральных сосудов, небольшим количеством соединительной ткани и четко выраженными границами портальных сосудов и желчных протоков (рис. 3, а, в).

На срезах печени крыс, подвергавшихся в течение 6 мес отравлению CCl₄, выявлялись диффузные лейкоцитарные инфильтраты, свидетельствующие об активации воспалительных процессов (рис. 3, б). Кроме воспалительных процессов в ткани печени крыс опытной группы наблюдались признаки фибротизации органа. Паренхима органа прорастала соединительнотканью тяжами, нарушающими дольковую структуру органа. Также при окраске пикросириусом выявлялись утолщенные стенки центральных вен и соединительноткань по ходу синусоидов (рис. 3, з).

Фибротизация синусоидов и центральных вен печени препятствует контакту гепатоцитов с поступающей в ор-



Рис. 4. Общее содержание гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крыс через разные интервалы времени после введения глюкозы голодным животным.

ган кровью, затрудняя их функционирование. Поскольку печень играет ключевую роль в поддержании постоянного уровня глюкозы в крови, ухудшение поглощения глюкозы и отложения ее в гепатоцитах в виде гликогена могут иметь первостепенное значение при развитии интолерантности к глюкозе при циррозе печени. Данные о синтезе гликогена в цирротически измененной печени, имеющиеся в настоящее время, немногочисленны и противоречивы. С одной стороны, было установлено, что синтез гликогена в печени больных циррозом не отличается от такового в печени здоровых людей (Schneiter et al., 1999). С другой стороны, было показано, что содержание гликогена в цирротически измененной печени человека и крысы после приема пищи существенно ниже, чем в нормальной печени (Krahenbuhl et al., 1991; Giardina et al., 1994; Petersen et al., 1999).

Исследование динамики общего содержания гликогена в гепатоцитах показало, что после введения глюкозы голодным крысам происходит быстрое накопление гликогена в гепатоцитах контрольной группы крыс (рис. 4), в результате чего уже через 10 мин содержание гликогена в гепатоцитах нормальной печени было в 1.4 раза выше, чем у голодных животных ($P < 0.001$). Максимальное содержание гликогена в гепатоцитах крыс было зафиксировано через 75 мин эксперимента, оно превышало его исходный уровень в 5.9 раза ($P < 0.001$). В отличие от нормальной печени при циррозе накопление гликогена в гепатоцитах происходило с задержкой и начиналось через 20 мин после введения глюкозы. Однако через 120 мин после начала эксперимента общее содержание гликогена в гепатоцитах крыс опытной группы было в 1.7 раза выше, чем у крыс контрольной группы ($P < 0.001$).

Если в цирротически измененной печени общее содержание гликогена в ходе гликогенеза увеличивалось постоянно, то в нормальной печени процесс накопления гликогена имел ритмический волнообразный характер — периоды быстрого увеличения содержания гликогена чередовались с периодами его уменьшения (рис. 4). О причинах ритмических колебаний содержания гликогена в ходе его синтеза в печени сейчас говорить трудно. В настоящее время известны окологасовые (20—90 мин) ритмы синтеза белка, активности различных ферментов, гормонов, концентрации кальция, концентрации цАМФ и

других клеточных компонентов (Brodsky, 1975; Бродский, Нечаева, 1988; Lloyd, Rossi, 1992; Brodsky, 2006). Установлено, что окологасовые ритмы имеют эндогенную природу, обусловлены межклеточными контактами и являются отражением синхронизации функционально связанных между собой клеток (Бродский, Нечаева, 1988). Можно предположить, что исчезновение ритма накопления гликогена в гепатоцитах крыс опытной группы связано со значительным повреждением дольковой структуры паренхимы печени, которое в свою очередь приводит к нарушению межклеточных связей между гепатоцитами.

Известно, что общее содержание гликогена в клетках печени, а также количество его α - и β -частиц могут значительно меняться в зависимости от пищевого статуса организма (Devos et al., 1983; Sullivan et al., 2010). Показано, что полностью сформированная молекула гликогена (β -частица) состоит из 12 концентрических ярусов. 4 внешних яруса, или макрогликоген, содержат 94—97 % всех глюкозных остатков, а 8 внутренних, которые формируют так называемый скелет, или прогликоген, содержат от 3 до 6 % глюкозных остатков в молекуле гликогена (Rybicka, 1996; Melendez et al., 1999; Shearer, Graham, 2002). Прогликоген обладает мол. массой около 400 кДа и отличается от макрогликогена нерастворимостью в разбавленной трихлоруксусной кислоте (ТХУ), что обусловлено его прочной связью с белками. Полагают, что прогликоген является стабильной промежуточной формой

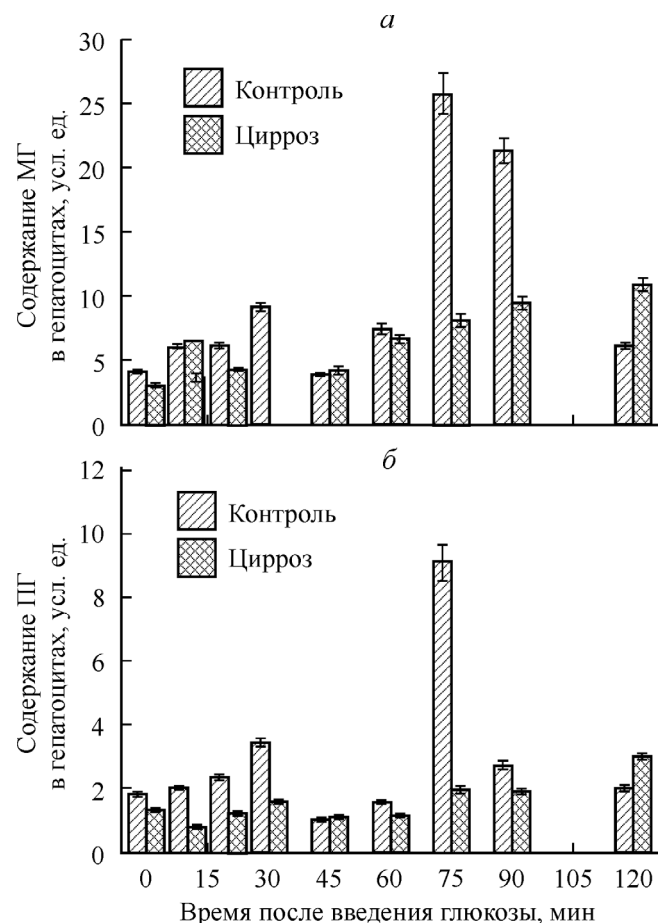


Рис. 5. Содержание МГ (а) и ПГ (б) в гепатоцитах в норме и при циррозе через разные интервалы времени после введения глюкозы голодным животным.

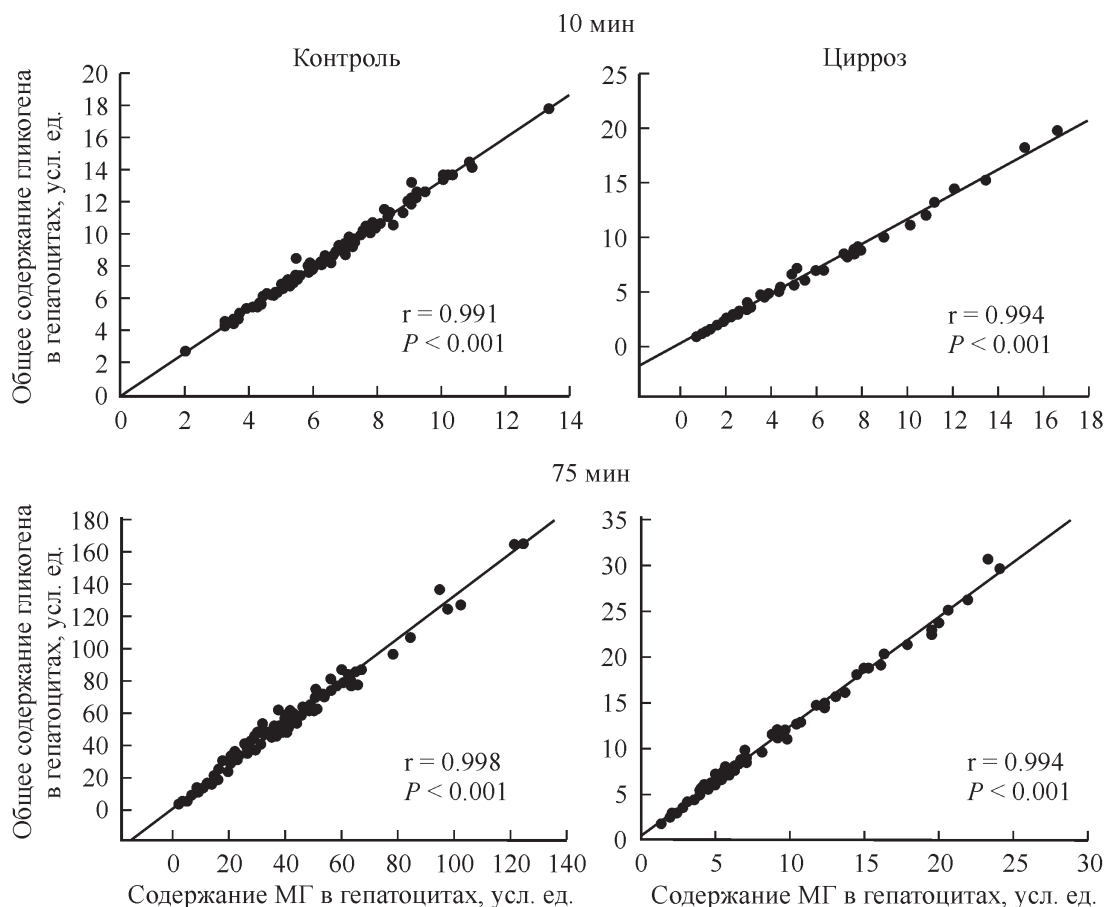


Рис. 6. Зависимость общего содержания гликогена от содержания МГ в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крыс на разных этапах гликогенеза.

гликогена на пути формирования полной β -частицы (Judd et al., 1992; Alonso et al., 1995). Предполагается, что накопление гликогена может происходить либо за счет увеличения числа внешних ярусов его молекулы (увеличение содержания МГ), либо путем образования новых точек инициации его синтеза (увеличение содержания ПГ).

Результаты, представленные на рис. 5 а, свидетельствуют о том, что содержание МГ в гепатоцитах контрольных крыс увеличивалось уже через 10 мин на 52 % ($P < 0.01$). Так же как и в случае с общим содержанием гликогена в гепатоцитах, периоды быстрого увеличения содержания МГ чередовались с периодами его уменьшения. В отличие от контроля содержание МГ в гепатоцитах при циррозе начинало возрастать только через 20 мин после начала гликогенеза (рис. 5, а). Следует отметить, что по мере накопления гликогена в гепатоцитах доля МГ в некоторых клетках крыс обеих групп могла достигать 88 %.

Содержание ПГ в гепатоцитах нормальной печени изменялось волнообразно на протяжении всего времени эксперимента. Увеличение ПГ наблюдалось в интервалах 0—30 и 45—75 мин, а в интервалах 30—45 и 75—90 мин происходило падение содержания ПГ (рис. 5, б). В отличие от контроля содержание ПГ при циррозе слабо изменялось в первые 60 мин гликогенеза. Тем не менее в конце эксперимента содержание ПГ в гепатоцитах крыс опытной группы было выше его исходной концентрации в 2.3 раза ($P < 0.001$). Следует отметить, что содержание ПГ в гепатоцитах цирротической печени крыс через 120 мин после введения глюкозы было выше, чем в гепа-

тоцитах нормальной печени, в 1.5 раза ($P < 0.01$). Увеличение содержания ПГ на некоторых сроках после введения глюкозы голодным крысам может говорить о появлении дополнительных точек инициации синтеза гликогена в клетке на данных этапах гликогенеза.

Анализ зависимости общего содержания гликогена в гепатоцитах от МГ показал, что накопление гликогена в печени и колебания его содержания в клетках как контрольных, так и опытных крыс на разных этапах гликогенеза связаны главным образом с изменениями содержания МГ. Это подтверждается высоким коэффициентом корреляции (r), который варьировал от 0.906 до 0.998 в контрольной и от 0.915 до 0.997 ($P < 0.001$) в опытной группе (рис. 6).

Несмотря на то что МГ вносит основной вклад в синтез гликогена, коэффициенты корреляции между общим содержанием гликогена и ПГ на некоторых этапах гликогенеза также были высокими и в среднем составляли 0.863 ($P < 0.001$) в норме и 0.772 ($P < 0.001$) при циррозе (рис. 7).

Схожие с нашими данные были получены в исследовании Вилсона (Wilson, 2009), который показал, что скорость ресинтеза МГ в мышцах крыс превышала скорость ресинтеза ПГ в интервале 0—1 ч, но была ниже в интервале 1—4 ч при восстановлении после истощающей физической нагрузки. Интересно отметить, что накопление гликогена в мышцах лошадей после длительных упражнений происходит в большей степени за счет МГ (Bröjer, 2006). Фракция МГ имела ограниченную скорость ресин-

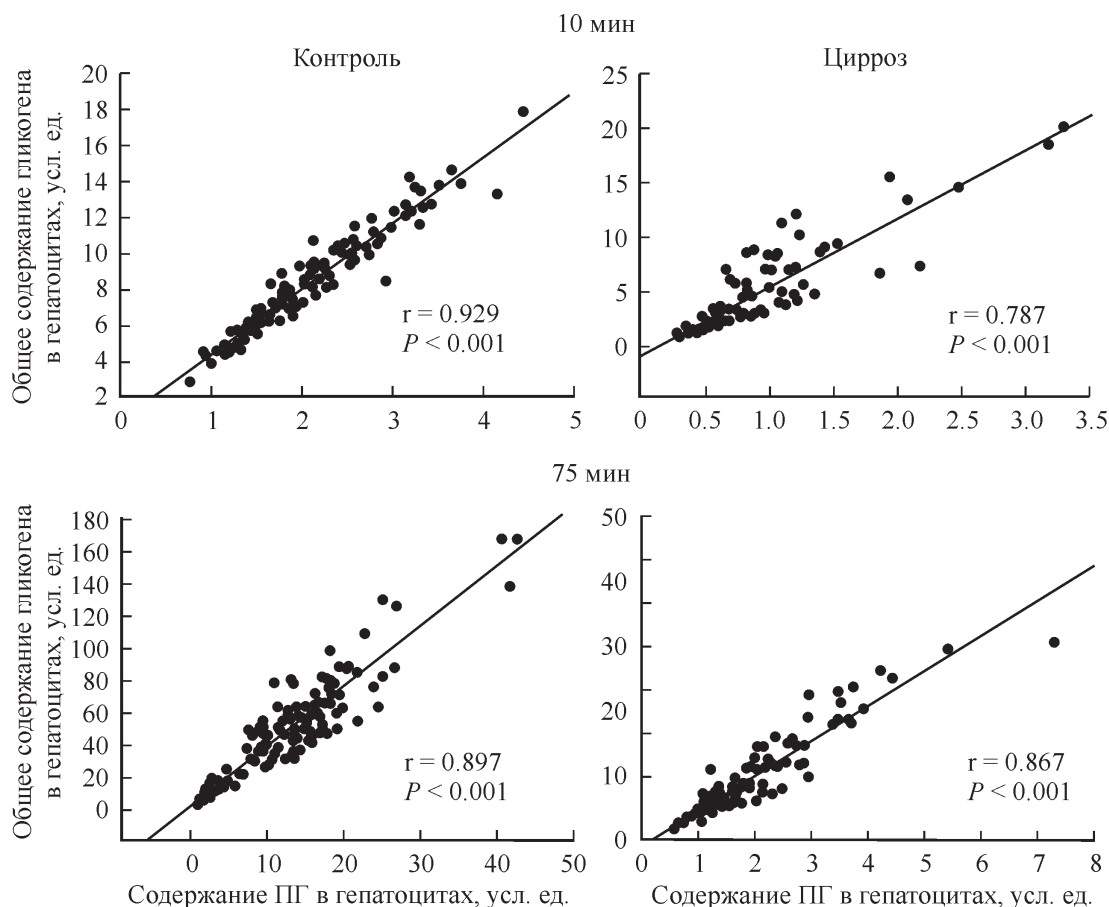


Рис. 7. Зависимость общего содержания гликогена от содержания ПГ в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крыс на разных этапах гликогенеза.

теза в течение первого часа и самую высокую скорость в течение оставшихся 24 ч восстановления после физической нагрузки. Увеличение же содержания ПГ было более медленным процессом (Brojer, 2006). Однако другие авторы отмечают, что в мышцах человека и крыс после продолжительных упражнений ресинтез гликогена происходит преимущественно за счет ПГ, в то время как концентрация МГ заметно возрастает лишь через 1—2 ч после завершения упражнений (Shearer, Wilson, 2005; Wilson, 2009).

Одно из объяснений различий между скоростями ресинтеза ПГ и МГ может быть связано с уровнем истощения гликогена. Крайние степени его истощения, вероятно, требуют формирования новых гранул гликогена, а не добавления глюкозы к существующим гранулам. Эту гипотезу подтверждают данные, полученные Шерером и соавторами (Shearer et al., 2005), которые показали, что во время гликогенолиза не наблюдалось изменений в уровне гликогена, пока не происходило значительного снижения уровня гликогена.

Таким образом, исходя из полученных нами данных можно сделать вывод о том, что после введения глюкозы голодным крысам общее содержание гликогена в гепатоцитах изменяется главным образом за счет МГ как в норме, так и при циррозе. При этом следует отметить, что существенный вклад в накопление гликогена в клетках вносит также и ПГ: в нормальной печени — в начале гликогенеза (10—30 мин), а в патологически измененном органе — на его более поздних этапах (75—120 мин).

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 14-04-32378 мол_а и 14-04-00730 а).

Список литературы

- Бродский В. Я., Нечаева Н. В. 1988. Ритм синтеза белка. М.: Наука. 239 с. (Brodsky V. Ya., Nechaeva N. V. 1988. Rhythm of protein synthesis. M.: Nauka. 239 p.)
- Кудрявцева М. В., Емельянов А. В., Сакута Г. А., Скорина А. Д., Слепцова Л. А., Кудрявцев Б. Н. 1992. Цитофлуориметрическое исследование содержания гликогена и его фракций в гепатоцитах больных циррозом печени различной этиологии. Цитология. 34 (11/12): 100—107. (Kudryavtseva M. V., Emelyanov A. V., Sakuta G. A., Skorina A. D., Sleptsova L. A., Kudryavtsev B. N. 1992. A cytofluorometric study of glycogen contents and its fractions in hepatocytes of patients with different causation of liver cirrhosis. Tsitologiya. 34 (11/12): 100—107.)
- Кудрявцева М. В., Завадская Е. Э., Скорина А. Д., Смирнова С. А., Кудрявцев Б. Н. 1983. Метод получения изолированных клеток печени из материала прижизненных пункционных биопсий. Лаб. дело. 9: 21—22. (Kudryavtseva M. V., Zavads-kaya E. E., Skorina A. D., Smirnova S. A., Kudryavtsev B. N. 1983. The method of obtaining isolated liver cells of material lifetime puncture biopsies. Lab.work. 9: 21—22.)
- Розенфельд Е. Л., Попова И. А. 1989. Врожденные нарушения обмена гликогена. М.: Медицина. 240 с. (Rosenfeld E. A., Popova I. A. 1989. Inborn errors of glycogen metabolism. M.: Meditsina. 240 p.)
- Шерлок Ш., Дули Дж. 2002. Заболевания печени и желчных путей. М.: ГЭОТАР-Медиа. 859 с. (Sherlock Sh., Dooley J.

2002. Liver and biliary tract diseases. M.: GEOTAR-Media. 859 p.)
- Alonso M. D., Lomako J., Lomako W. M., Whelan W. J. 1995. A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J.* 9 : 1126—1137.
- Brodsky V. Ya. 1975. Rhythm of protein synthesis. *J. Theor. Biol.* 55 : 167—200.
- Brodsky V. Ya. 2006. Direct cell-cell communication: a new approach derived from recent data on the nature and self-organization of ultradian (circadian) intracellular rhythms. *Biol. Rev.* 81 : 143—162.
- Bröjer J. 2006. Proglycogen and macroglycogen in equine skeletal muscle. Doct. thesis. Swedish Univ. Agricult. Sci. Uppsala. 51 p.
- Devos P., Baudhuin P., Van Hoof F., Hers H. G. 1983. The alpha-particulate liver glycogen. *Biochem. J.* 209 : 159—165.
- Ferrer J. C., Favre C., Gomis R. R., Fernandez-Novell J. M., Garcia-Rocha M., de la Iglesia N., Cid E., Guinovart J. J. 2003. Control of glycogen deposition. *FEBS Lett.* 546 : 127—132.
- Ganesh S., Agarwala K. L., Amano K., Suzuki T., Delgado-Escueta A. V., Yamakawa K. 2001. Regional and developmental expression of Epm2a gene and its evolutionary conservation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283 : 1046—1053.
- Giardina M. G., Matarazzo M., Sacca L. 1994. Kinetic analysis of glycogen synthase and PDC in cirrhotic rat liver and skeletal muscle. *Amer. J. Physiol.* 267 : E900—E906.
- Greenberg C. C., Jurczak M. J., Danos A. M., Brady M. J. 2006. Glycogen branches out: new perspectives on the role of glycogen metabolism in the integration of metabolic pathways. *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291 : E1—E8.
- Judd C., Lomako J., Lomako W. M., Ozdemir Y., Whelan W. J. 1992. Proglycogen: an intermediate in glycogen synthesis. *FASEB J.* 6 : A1520.
- Jurczak M. J., Danos A. M., Rehrmann V. R., Brady M. J. 2008. The role of protein translocation in the regulation of glycogen metabolism. *J. Cell. Biochem.* 104 : 435—443.
- Krahenbuhl S., Weber F. L., jr., Brass E. P. 1991. Decreased hepatic glycogen content and accelerated response to starvation in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Hepatology.* 14 : 1189—1195.
- 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.
- Kus I., Colakoglu N., Pekmez H., Seckin D., Ogeturk M., Sarilmaz M. 2004. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Acta Histochem.* 106 : 289—297.
- Lloyd D., Rossi E. L. 1992. Ultradian rhythms in life processes: an inquiry into fundamental principles of chronobiology and psychobiology. New York: Springer-Verlag. 419 p.
- Mayatepek E., Hoffmann B., Meissner T. 2010. Inborn errors of carbohydrate metabolism. *Best Practice & Res. Clin. Gastroenterol.* 24 : 607—618.
- Melendez R., Melendez-Hevia E., Canela E. I. 1999. The fractal structure of glycogen: a clever solution to optimize cell metabolism. *J. Biophys.* 77 : 1327—1332.
- Petersen K. F., Krssak M., Navarro V., Chandramouli V., Hundal R., Schumann W. C., Landau B. R., Shulman G. I. 1999. Contributions of net hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis to glucose production in cirrhosis. *Amer. J. Physiol.* 276 : E529—E535.
- Planaguma A., Claria J., Miquel R., Lopez-Parra M., Titos E., Masferrer J. L., Arroyo V., Rodes J. 2005. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor SC-236 reduces liver fibrosis by mechanisms involving non-parenchymal cell apoptosis and PPARgamma activation. *FASEB J.* 19 : 1120—1122.
- Rybicka K. K. 1996. Glycosomes — the organelles of glycogen metabolism. *Tissue and Cell.* 28 : 253—265.
- Schneiter P., Gillet M., Chioloro R., Jequier E., Tappy L. 1999. Hepatic nonoxidative disposal of an oral glucose meal in patients with liver cirrhosis. *Metabolism.* 48 : 1260—1266.
- Shearer J., Graham T. E. 2002. New perspectives on the storage and organization of muscle glycogen. *Can. J. Appl. Physiol.* 27 : 179—203.
- Shearer J., Wilson R. J., Battram D. S., Richter E. A., Robinson D. L., Bakovic M., Graham T. E. 2005. Increases in glycogenin and glycogenin mRNA accompany glycogen resynthesis in human skeletal muscle. *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289 : E508—E514.
- Sullivan M. A., Vilaplana F., Cave R. A., Stapleton D., Gray-Weale A. A., Gilbert R. G. 2010. Nature of α and β particles in glycogen using molecular size distributions. *Biomacromol.* 11 : 1094—1100.
- Tagliabracci V. S., Heiss C., Karthik C., Contreras C. J., Glushka J., Ishihara M., Azadi P., Hurley T. D., DePaoli-Roach A. A., Roach P. J. 2011. Phosphate incorporation during glycogen synthesis and Lafora. *Cell Metab.* 13 : 274—282.
- Tagliabracci V. S., Turnbull J., Wang W., Girard J. M., Zhao X., Skurat A. V., Delgado-Escueta A. V., Minassian B. A., DePaoli-Roach A. A., Roach P. J. 2007. Laforin is a glycogen phosphatase, deficiency of which leads to elevated phosphorylation of glycogen *in vivo*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 104 : 19 262—19 266.
- Wilson R. J. 2009. Relating glycogenin protein levels and glycogen content post-contraction in human and rodent skeletal muscle. A thesis for the degree of Doctor of Philosophy. University of Guelph. 209 p.

Поступила 4 VIII 2014

DYNAMICS OF PRO- AND MACROGLYCOGEN CONTENT IN HEPATOCYTES OF NORMAL AND CIRRHOTIC RAT LIVER AT DIFFERENT STAGES OF GLYCOGENESIS

A. Yu. Chestnova,^{1,*} N. N. Bezborodkina,¹ N. M. Matyukhina,^{1,2} B. N. Kudryavtsev¹

¹ Institute of Cytology RAS and ² V. A. Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, St. Petersburg;

* e-mail: chestnova.anna@gmail.com

The content and structure of glycogen in hepatocytes of normal and cirrhotic rat liver has been studied at definite time intervals after the administration of glucose to starving animals. In the study, an original cytofluorimetric method for detection and quantification of proglycogen (PG) and macroglycogen (MG) content in isolated hepatocytes was applied. This method is based on using Schiff reagents with different spectral characteristics. It has been determined that the content MG content in the hepatocytes of control rats increases in 10 min after initiation of glycogenesis by 52 % ($P < 0.01$). MG content in the cells of cirrhotic liver increased only after 20 min (43 %, $P < 0.05$) after glucose administration to starving animals. The coefficient of correlation between MG content and the total glycogen content in the hepatocytes at different stages of glycogenesis ranged from

0.90 to 0.99 ($P < 0.001$) in both groups of rats. Increase in PG content in hepatocytes of control rats appeared within 10—30 and 45—70 min. In the case of cirrhosis PG content increased only 60 min after the start of glycogenesis, but after 120 min it was 1.5 times higher than the control values ($P < 0.001$). The correlation coefficient between the PG and the total glycogen content in rat liver cells averaged 0.86 ($P < 0.001$) and 0.77 ($P < 0.001$) in control and experimental groups, respectively. Thus, the change in total glycogen content in hepatocytes of normal and cirrhotic liver is associated mainly with the level of MG. In normal cells, contribution of PG is most significant in the early glycogenesis (10—30 min), and in the cirrhotic liver — in the later stages.

Key words: proglycogen, macroglycogen, hepatocytes, synthesis of glycogen, liver cirrhosis, glucose.
