

ЗООЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

*На правах рукописи*

БЕЗБОРОДКИНА

Наталья Николаевна

**ОСОБЕННОСТИ ГЛИКОГЕНЕЗА В ГЕПАТОЦИТАХ ПРИ  
ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПЕЧЕНИ**

Научная специальность 1.5.22. Клеточная биология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор

Кудрявцев Борис Николаевич

Санкт-Петербург

2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	21
1.1. Печень и ее роль в организме млекопитающих .....	21
1.2. Гликоген и его роль в различных тканях и клетках млекопитающих .....	22
1.3. Регуляции глюкостатической функции печени и метаболизм гликогена .....	24
1.4. Влияние тканевых и клеточных факторов на метаболизм и содержание гликогена в печени .....	33
1.5. Хронические патологии, связанные с нарушением метаболизма, содержания и структуры гликогена в печени .....	39
1.5.1. Врожденные болезни, связанные с нарушением метаболизма гликогена .....	39
1.5.2. Нарушения метаболизма гликогена ненаследственной природы .....	40
1.6. Характеристика популяции гепатоцитов и метаболизма гликогена при регенерации цирротической печени .....	46
1.7. Структура молекул гликогена. $\alpha$ - и $\beta$ -частицы. Их роль в метаболизме гликогена .....	50
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	66
2.1. Объекты исследования .....	66
2.1.1. Экспериментальные животные .....	66
2.1.2. Клинический материал .....	69
2.2. Методы приготовления препаратов .....	71
2.2.1. Методика приготовления препаратов первичной культуры гепатоцитов крыс для выявления функционирующих митохондрий в живых клетках .....	71
2.2.2. Методика приготовления препаратов-мазков изолированных гепатоцитов ....	71
2.2.3. Методика приготовления гистологических препаратов .....	72
2.2.4. Методика фиксации и подготовки ткани печени для электронно-микроскопического исследования .....	73
2.3. Цитофотометрические методы .....	73
2.3.1. Определение сухой массы гепатоцитов с помощью интерференционного микроскопа .....	73

2.3.2. Методы количественной цитохимии.....	74
2.3.2.1. Выявление и измерение содержания гликогена и его фракций в изолированных гепатоцитах крыс.....	74
2.3.2.2. Определение содержания ДНК в ядрах гепатоцитов.....	76
2.3.2.3. Комбинированный цитохимический метод для количественного определения нескольких компонентов в одной и той же клетке.....	77
2.4. Конфокальная микроскопия и метод FRET (AB) для исследования структуры молекул гликогена.....	79
2.5. Биохимические методы.....	81
2.5.1. Биохимическое исследование сыворотки крови крыс и человека.....	81
2.5.2. Определение концентрации гликогена в печени крыс.....	82
2.5.3. Определение активности ключевых ферментов метаболизма гликогена в печени крыс и человека.....	82
2.6. Морфометрия гистологических срезов печени крыс и человека.....	84
2.7. Морфометрия митохондриального аппарата гепатоцитов крыс.....	85
2.8. Определение вклада процессов пролиферации, полиплоидизации и гипертрофии в увеличение массы печени.....	86
2.9. Статистическая обработка полученных данных.....	86
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....</b>	<b>88</b>
3.1. Морфофункциональные изменения при хроническом поражении печени.....	88
3.1.1. Структура печени крысы и человека в норме и при циррозе.....	88
3.1.2. Состояние митохондриального аппарата гепатоцитов в нормальной и патологически измененной печени крыс.....	93
3.1.3. Характеристика тканеспецифических функций печени крыс и человека при циррозе.....	97
3.1.4. Полиплоидия и гипертрофия гепатоцитов крысы и человека в норме и при хроническом поражении печени.....	100
3.2. Характеристика гликогенеза в нормальной и патологически измененной печени человека, крыс и мышей на разных стадиях пищевого цикла.....	105
3.2.1. Длительное голодание. Концентрация глюкозы в крови, содержание гликогена и активность ключевых ферментов его метаболизма в печени крыс в норме и при экспериментальном циррозе после 48 ч голодания.....	106

3.2.2. Абсорбтивный период. Концентрация глюкозы в крови, содержание гликогена и активность ключевых ферментов его метаболизма в печени крыс в норме и при экспериментальном циррозе после введения голодным животным глюкозы .....	110
3.2.3. Концентрация глюкозы в крови, содержание гликогена в гепатоцитах и активность ключевых ферментов его метаболизма в нормальной и патологически измененной печени в постабсорбтивном периоде человека, крыс и мышей после ночного голодания .....	130
3.2.4. Коморбидность цирроза печени и диабета. Влияние на содержание гликогена в гепатоцитах .....	137
3.3. Пространственная структура молекул гликогена в гепатоцитах крыс и человека в норме и при циррозе печени.....	142
3.3.1. Цитофлуориметрический метод исследования структуры гликогена в отдельных гепатоцитах.....	142
3.3.2. Структура молекул гликогена в гепатоцитах крыс и человека в нормальной и цирротической печени на разных стадиях пищевого цикла.....	152
3.3.3. Анализ структуры молекул гликогена в гепатоцитах крыс и человека с помощью метода FRET.....	160
3.4. Морфофункциональное состояние цирротически измененной печени крыс и человека при использовании различных методов лечения .....	175
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	200
ВЫВОДЫ.....	203
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	205
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	208
БЛАГОДАРНОСТИ.....	278

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность исследования**

Хронические гепатиты (ХГ) различной этиологии — широко распространенные болезни печени человека и животных. Постепенно прогрессируя, ХГ переходит в свою завершающую и наиболее опасную стадию — цирроз печени (ЦП). ЦП — одна из основных причин смертности населения многих стран (Sun et al., 2019; Zhai et al., 2021a) — представляет очень серьезную проблему для здравоохранения и экономики (Mokdad et al., 2014; Scaglione et al., 2015; Sepanlou et al., 2020). Лечение ЦП — сложная задача, окончательного решения которой еще не найдено. Единственным способом радикального излечения этого заболевания в настоящее время считается трансплантация печени. Однако частое отсутствие подходящих доноров, риск отторжения и необходимость пожизненно использовать иммуносупрессию приводят к тому, что трансплантация печени не может считаться рутинной операцией. Высокая стоимость такой операции делают ее недоступной для очень многих пациентов, остро нуждающихся в ней (Jadlowiec et al., 2016).

Развитие цирроза приводит к глубоким изменениям архитектоники печени, подробно описанным в различных работах (Подымова, 1999; Malhi, Gores, 2008; Zhou et al., 2014; Torbenson, Washington, 2020). Подавляющее большинство исследований ЦП проведено на экспериментальных животных. Хотя количественного сравнения ЦП человека с экспериментальными моделями ЦП не проводилось, многие авторы отмечали сходство этого заболевания у человека и животных (Бреслер и др., 1969; Верин, 1984; Michalopoulos, 1990; Chen, Hwang, 1994; Canturk, 1999; Kus, 2004; Planaguma, 2005).

ЦП сопровождается не только сильными изменениями микроскопической структуры печени, но и значительным нарушением её многочисленных функций, в т.ч. глюкостатической. Глюкостатическая функция — одна из основных функций печени, которая заключается в поддержании постоянного уровня глюкозы в крови. Важным механизмом её выполнения является способность клеток паренхимы печени (гепатоцитов) синтезировать гликоген из глюкозы, поступающей из крови или

образующейся путем глюконеогенеза из веществ не углеводной природы, и расщеплять его в соответствии с требованиями организма.

В качестве запасного вещества гликоген содержится практически во всех клетках человека и животных. Со времени его открытия К. Бернардом (1857) прошло более 160 лет. Несмотря на интенсивные исследования метаболизма гликогена, вылившиеся, в частности, в четыре Нобелевские премии (С.С. Cori и G. Cori, 1947; L. Leloir, 1970; E. Sutherland, 1971; E. Krebs и E. Fischer, 1992), сведения о пространственной структуре этого разветвленного полимера глюкозы остаются довольно скудными. Считается, что полностью сформированная молекула гликогена, называемая также  $\beta$ -частицей (Takeuchi et al., 1978; Devos et al., 1983; Rybicka, 1996; Sullivan et al., 2014; Deng et al., 2016; Wang et al., 2022), имеет диаметр около 42 нм и содержит  $\sim 55000$  остатков глюкозы, соединенных  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) и  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) гликозидными связями.  $\beta$ -частица состоит из 12 концентрических ярусов глюкозных остатков, самогликозилирующегося белка гликогенина, находящегося в центре частицы, и многочисленных белков, участвующих в ее формировании и деградации (Shearer, Graham, 2004; Roach et al., 2012). Четыре внешних яруса  $\beta$ -частицы (макрогликоген, МГ) включают  $\sim 95\%$  всех глюкозных остатков, а восемь внутренних ярусов образуют так называемый скелет или прогликоген (ПГ) и содержат около  $5\%$  всех глюкозных остатков молекулы (Melendez-Navia et al., 1993; Rybicka, 1996; Melendez et al., 1999; Shearer, Graham, 2002). Полагают, что ПГ является стабильной промежуточной формой гликогена на пути формирования полной  $\beta$ -частицы (Lomako et al., 1991; 1993; Alonso et al., 1995).

Информация о механизмах формирования  $\beta$ -частиц, их пространственной структуре и ее изменениях в норме и при патологии ограничена. К сожалению, ни один из известных химических или молекулярно-биологических методов не позволяет описать пространственную структуру такой огромной и сложной молекулы с достаточной точностью и полнотой (Brewer, Gentry, 2019; Brust et al., 2020). Почти все предложенные методы применимы к гликогену, выделенному из тканей, что создает опасность нарушения его исходной структуры. Кроме того, имеющиеся методы способны дать информацию о структуре молекул гликогена, находящихся лишь в статичном состоянии. Подавляющее большинство данных о пространственной структуре молекул гликогена основано либо на теоретических представлениях и математических расчетах, либо на результатах определения размеров  $\alpha$ - и  $\beta$ -частиц

гликогена, полученных с помощью электронной микроскопии или эксклюзионной хроматографии (Gunja-Smith et al., 1970; Goldsmith et al., 1982; Melendez-Hevia et al., 1993; Melendez et al., 1997; Sullivan et al., 2014; Rousset et al., 2022). Поэтому разработка метода, позволяющего исследовать пространственную структуру молекул гликогена и ее динамику непосредственно в клетках, является настоятельной необходимостью.

Гликоген служит легкодоступным источником энергии для различных метаболических процессов во многих тканях и органах. Его содержание в печени является чувствительным показателем не только состояния энергетических резервов в гепатоцитах, но также углеводного обмена во всем теле. В норме общее содержание гликогена в клетках печени колеблется достаточно в узких границах и регулируется соотношением скоростей его синтеза и распада (Devos et al., 1983; Rybicka, 1996; Sullivan et al., 2010). Избыток или, напротив, значительное снижение содержания гликогена в гепатоцитах может быть причиной тяжелых болезней печени, которые сопровождаются также нарушением структуры его молекул (Кудрявцева, 1987; Розенфельд, Попова, 1989; Ganesh et al., 2001; Tagliabracci et al., 2007; Mayatepek et al., 2010; Tagliabracci et al., 2011).

Известно, что цирроз часто сочетается с другими болезнями (Олевская и др., 2018), и около 40 % пациентов с ЦП имеют коморбидный статус (Jepsen et al., 2008). Среди наиболее распространенных сопутствующих заболеваний, отмечают сахарный диабет (СД) 2-го типа (Hickman et al., 2007; Garcia-Compean et al., 2009). Показано, что наличие диабета у пациентов с ЦП заметно снижает продолжительность их жизни (Tolman et al., 2007; Garcia-Compean et al., 2015; Kumar, 2018). Однако влияние коморбидности диабета и цирроза на метаболизм и содержание гликогена в гепатоцитах не изучено.

Поэтому оценка метаболизма, содержания и структуры гликогена в гепатоцитах имеет важное значение для определения функционального состояния печени, прогноза ЦП и поиска новых подходов к его лечению.

### **Степень разработанности темы**

Данные о содержании гликогена в цирротической печени, имеющиеся в настоящее время, немногочисленны. Ранее было показано, что содержание гликогена при ЦП ниже, чем в норме (Owen et al., 1981; Krähenbühl et al., 1991; Krähenbühl et al.,

1996, 2003). Тем не менее, результаты этих работ не позволяют сделать однозначный вывод об уровне гликогена в цирротической печени, т.к. они получены с помощью непрямых методов. Надежность этих методов сильно зависит от точности измерения объема фиброзной ткани и паренхимы в исследуемом материале.

Сведения о содержании гликогена в печени больных СД 2-го типа столь же немногочисленны и противоречивы. Хотя было показано, что содержание гликогена в печени диабетиков находится на низком уровне (Whitton, Hems, 1975; Golden et al., 1979), вопрос остается открытым. Это связано с тем, что вся информация о низком содержании гликогена в печени получена, в основном, на животных, у которых диабет индуцировали в течение относительно короткого времени (*short-term* диабет) тогда как диабет у человека развивается в течение многих месяцев и даже лет (*long-term* диабет). Длительное развитие диабета может вызвать адаптивные изменения в тканях организма, как ответ на гипоинсулинемию и гиперглюкагонемию (Friedmann et al., 1963), и повлиять на содержание гликогена в клетках печени.

Во многих работах было показано, что гликоген состоит из двух фракций. Одна из них хорошо извлекается с помощью трихлоруксусной кислоты (ТХУ), в то время как для экстракции другой требуется обработка тканей крепкой щелочью, что объясняется связью этой фракции с белками (Prins, Jeanlos, 1948; Shearer, Graham, 2004; James et al., 2008). Наличие в клетках двух фракций гликогена подтверждено также *in situ* с помощью цитохимических методов (Kugler, Wilkinson, 1961; Кудрявцева и др., 1974). Установлено, что содержание растворимой и нерастворимой в ТХУ фракций гликогена в тканях изменяется при различных физиологических и патологических условиях (Кудрявцева и др., 1992; Adamo, Graham, 1998; Graham et al., 2001; Battram et al., 2004; Shearer, Graham, 2004; Shearer et al., 2005; Wilson, 2009; Granlund et al., 2011). Полученные результаты позволили заключить, что изменения содержания этих фракций свидетельствуют не только об их важной роли в метаболизме гликогена, но также о серьезных перестройках структуры его молекул. Данные о содержании фракций гликогена в клетках могут дать ценную информацию о динамике числа остатков глюкозы, степени заполнения ярусов, количестве белков, участвующих в присоединении-отсоединении остатков глюкозы и других характеристиках молекул гликогена в норме и при патологии (Bezborodkina et al., 2018).



Острая нехватка донорской печени, необходимой для трансплантации пациентам с терминальной стадией цирроза, стимулировала поиск альтернативных подходов лечения этой болезни: искусственные биологические и небιологические конструкции, трансплантация зрелых гепатоцитов и стволовых клеток человека, а также ксеногенных органов и клеток (Burra et al., 2004; Buzhor et al., 2014; Heydari et al., 2020; Mirdamadi et al., 2020). Все эти методы, по-видимому, способны оказать большую помощь при терапии ЦП, однако, они находятся на стадии экспериментов и вряд ли сейчас могут широко применяться в клинической практике. Поэтому в настоящее время активно проводятся исследования, цель которых состоит в усилении потенций самой патологически измененной печени к восстановлению.

Существует много доказательств реверсии цирротических изменений в печени до состояния близкого к норме (Саркисов, Рубецкой, 1965; Powell et al, 1970; Солопаев, 1980; Dufour et al., 1997; Kaplan et al., 1997; Lau et al., 1999; Benyon, Iredale, 2000; Wanless, 2001; Kweon et al., 2001; Hammel et al., 2001). Как правило, в исследованиях, посвященных обратимости ЦП, главное внимание обращают на морфологические изменения в печени и гораздо меньшее — на восстановление ее функций. Между тем, именно степень восстановления функциональной способности патологически измененной печени является ключевым показателем обратимости цирроза. Поэтому анализ содержания и структуры гликогена, важного источника энергии для различных метаболических процессов в гепатоцитах, имеет особое значение для оценки способности органа к восстановлению.

Исходя из вышесказанного, **цель настоящей работы состояла в определении роли клеточных и макромолекулярных механизмов регуляции гликогенеза в гепатоцитах нормальной и патологически измененной печени крыс и человека.** Для достижения цели работы были поставлены следующие задачи:

1. В нормальной и патологически измененной печени крыс и человека определить уровни гликогена в гепатоцитах и активность ключевых ферментов гликогенеза и гликогенолиза на разных стадиях пищевого цикла.

2. В нормальной и цирротической печени крыс и человека установить влияние размера и плоидности гепатоцитов на содержание в них гликогена.

3. Оценить влияние коморбидности цирроза печени и сахарного диабета 2-го типа у человека на содержание гликогена в гепатоцитах.

4. Разработать цитофлуориметрический метод исследования пространственной структуры молекул ( $\beta$ -частиц) гликогена в отдельных гепатоцитах.

5. Установить структуру молекул гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крыс на разных стадиях пищевого цикла.

6. Определить структуру молекул гликогена в гепатоцитах крыс и человека в нормальной и в патологически измененной печени.

7. Оценить степень восстановления структуры и функции цирротической печени крыс и человека после применения различных методов лечения.

### **Научная новизна**

Впервые установлена роль полиплоидии и гипертрофии гепатоцитов в регуляции гликогенеза в нормальной и цирротической печени крысы и человека. Впервые показано влияние коморбидности ЦП и СД 2-го типа на содержание гликогена в гепатоцитах человека. Разработан оригинальный количественный метод изучения пространственной структуры молекул гликогена в отдельных клетках паренхимы печени. Впервые определен вклад числа и размера молекул гликогена в его содержание в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крыс и человека. Впервые определена динамика пространственной структуры молекул гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крыс в ходе гликогенеза. Впервые установлена пространственная структура молекул гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крыс и человека. Впервые проведена оценка пространственной структуры молекул гликогена в гепатоцитах в ходе реабилитации цирроза печени у крыс и человека.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Результаты работы демонстрируют что, несмотря на кардинальную перестройку структуры цирротической печени, содержание гликогена в клетках ее паренхимы, как и в норме, пропорционально дозе генов. В нормальной печени способность гепатоцитов запасать гликоген зависит от размера и массы (веса) клеток, в то время как при циррозе подобная зависимость отсутствует. Полученные данные, с одной стороны, свидетельствуют о сохранении нормальной регуляции процессов транскрипции и трансляции в патологически измененном органе, а с другой, указывают на то, что посттрансляционные механизмы при циррозе значительно нарушены. Следствием этих

нарушений является значительное увеличение концентрации гликогена, изменение его структуры и метаболизма в гепатоцитах цирротической печени. Степень увеличения содержания гликогена в клетках на фоне прогрессии хронического гепатита является показателем тяжести поражения печени и связана, прежде всего, со снижением активности гликогенфосфорилазы *a* и глюкозо-6-фосфатазы. Полученные данные свидетельствуют о том, что содержание гликогена в гепатоцитах при диабете 2-го типа увеличено. Однако коморбидность ЦП и СД не приводит ни к аддитивному, ни к синергическому эффектам.

Разработан оригинальный метод исследования пространственной структуры молекул гликогена в отдельных гепатоцитах. Метод позволяет определять число остатков глюкозы и расстояние между ними на внешних ярусах молекул гликогена. С помощью этого метода установлено, что при циррозе молекулы гликогена мельче, чем в нормальной печени, но их количество в гепатоцитах крыс и человека в несколько раз превышает норму.

Терапия цирроза печени после удаления повреждающего агента заметно снижает содержание гликогена в гепатоцитах и нормализует пространственную структуру его молекул.

### **Методология и методы исследования**

Для решения поставленных в диссертации задач был использован комплекс современных методов клеточной биологии, включающий конфокальную лазерную микроскопию, цитохимические методы, абсорбционную и флуоресцентную цитофотометрию, микроинтерферометрию, электронную микроскопию, метод анализа изображений. В качестве материала для исследований использовали пункционные биопсии печени пациентов с хроническим гепатитом, циррозом печени, сахарным диабетом 2-го типа. Экспериментальными моделями служили белые беспородные крысы, крысы Вистар, мыши линии C57BL/6N и трансгенные гомозиготные мыши OE-NPY<sup>DBH</sup>. Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартного пакета программы Sigma Plot for Windows 11.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA).

### **Структура и объем работы**

Диссертация изложена на 279 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения и списка литературы, включающего 741 источник. Работа иллюстрирована 92-мя рисунками и 19-ю таблицами.

**Личный вклад автора** состоит в самостоятельном определении цели, задач и плана исследований диссертационной работы; сборе материала. Автором самостоятельно проведены подавляющее большинство экспериментов (некоторая часть опытов осуществлена совместно с коллегами и учениками). Интерпретация, статистическая обработка и окончательная оценка полученных экспериментальных данных, сбор и анализ научной литературы, а также написание текста диссертации осуществлены соискателем самостоятельно. В публикациях по теме диссертации Н.Н. Безбородкина или является первым автором, или внесла преобладающий вклад в их подготовку.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных результатов обеспечена исследованием большого объема экспериментального и клинического материала, тщательно разработанной схемой опытов и анализом данных литературы. Результаты, представленные в диссертации, получены с помощью современных, широко апробированных, информативных методов, на сертифицированном оборудовании, при использовании качественных реактивов от надежных производителей и поставщиков. Материалы диссертации опубликованы в ведущих международных и отечественных журналах и перед публикацией прошли тщательное экспертное рецензирование.

Анализ полученных данных проведен с помощью целого комплекса статистических методов. Полученные результаты обработаны с помощью адекватных специализированных программ.

Материалы диссертации были представлены и обсуждены на более чем 30 российских и международных научных мероприятиях, в том числе: XIII Международном конгрессе фармакологов (Мюнхен, Германия, 1998); VI и VII Конгрессах Европейского общества аналитической клеточной патологии (Гейдельберг,

Германия, 1999; Каен, Франция, 2001); Втором фармакологическом конгрессе (Будапешт, Венгрия, 1999); XI Международном конгрессе гистохимии и цитохимии (Йорк, Англия, 2000); XIII и XIV Гейдельбергском симпозиумах по цитометрии (Гейдельберг, Германия, 2000, 2001); Общероссийской конференции с международным участием «Проблемы морфологии (теоретические и клинические аспекты)» (Сочи, 2002); Конференции «Клеточная и тканевая инженерия растений и животных» (Москва, 2002); 21-й ежегодной конференции немецкого общества по цитометрии (DGfZ) (Бонн, Германия, 2011); II Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2012); XXVII и XXVIII конгрессах международного общества по развитию цитометрии (ISAC) (Лейпциг, Германия, 2012; Сан Диего, Калифорния, США, 2013); 23-й конференции азиатско-тихоокеанского общества по изучению печени (APASL) (Сингапур, Сингапур, 2013); III и IV конференциях молодых ученых Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2012, 2014); XVII Всероссийском симпозиуме «Структура и функции клеточного ядра» (Санкт-Петербург, 2014); VI международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологии и медицины» (Ростов-на-Дону, 2015); 30-м ежегодном съезде по клинической цитометрии (Денвер, Колорадо, США, 2015); Международном конгрессе по микроскопии (Коттаям, Керала, Индия, 2015); 38-м и 41-м конгрессах Федерации европейских биохимических обществ (FEBS) (Санкт-Петербург, 2013; Virtual, 2021); Конференции, посвященной 95-летию Академика К. Зуфарова (Ташкент, Узбекистан, 2021).

По теме диссертации опубликовано 16 статей в рецензируемых научных изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, определенные ВАК РФ, 3 отечественных монографии, 1 глава в международной коллективной монографии.

### **Публикации**

Основные результаты по теме диссертации представлены в следующих статьях, опубликованных в рецензируемых изданиях, входящих в Перечень ВАК и приравненных к ним иностранных изданиях:

1. Оковитый С.В., Аркадьева А.В., Безбородкина Н.Н., Сакута Г.А., Ярославцев М.Ю., Шуленин С.Н., Кудрявцев Б.Н. Новый плейотропный эффект симвастатина

- при экспериментальном стеатогепатите у крыс. / С.В. Оковитый, А.В. Аркадьева, Н.Н. Безбородкина, Г.А. Сакута, М.Ю. Ярославцев, С.Н. Шуленин, Б.Н. Кудрявцев // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2007. — Т. 70, вып. 3. — С. 43–45.
2. Безбородкина Н.Н., Оковитый С.В., Кудрявцева М.В., Кирик О.В., Зарубина И.В., Кудрявцев Б.Н. Морфометрия митохондриального аппарата гепатоцитов нормальной и цирротически измененной печени / Н.Н. Безбородкина, С.В. Оковитый, М.В. Кудрявцева, О.В. Кирик, И.В. Зарубина, Б.Н. Кудрявцев // Цитология. — 2008. — Т. 50, вып. 3. — С. 228–236.
  3. Безбородкина Н.Н., Вахтина А.А., Байдюк Е.В., Якупова Г.С., Кудрявцев Б.Н. 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 // Цитология. — 2009. — Т. 51, вып. 5. — С. 417–427.
  4. Безбородкина Н.Н., Киршина Е.И., Мушинская Е.В., Кудрявцев Б.Н. Применение реактивов типа Шиффа с различными спектральными характеристиками для определения легкодоступной и труднодоступной фракций гликогена в отдельных гепатоцитах / Н.Н. Безбородкина, Е.И. Киршина, Е.В. Мушинская, Б.Н. Кудрявцев // Цитология. — 2009. — Т. 51, вып. 12. — С. 1025–1035.
  5. Baidyuk E.V., Shiryayeva A.P., Bezborodkina N.N., Sakuta G.A. Morphology and function of cultured hepatocytes isolated from rats with experimental toxic hepatitis / E.V. Baidyuk, A.P. Shiryayeva, N.N. Bezborodkina, G.A. Sakuta // Cell and Tissue Biology. — 2009. — Vol. 3, Issue 6. — P. 565–572.
  6. Bezborodkina N.N., Shtein G.I., Sivova E.V., Chestnova A.Yu., Kudryavtsev B.N. Analysis of structure of glycogen in rat hepatocytes using cytochemical and FRET methods / N.N. Bezborodkina, G.I. Shtein, E.V. Sivova, A.Yu. Chestnova, B.N. Kudryavtsev // Cell and Tissue Biology. — 2011. — Vol. 5, Issue 5. — P. 417–427.
  7. Bezborodkina Natalia N., Okovity Sergey V., Chestnova Anna Yu., Kudryavtsev Boris N. Hepatocytes of cirrhotic rat liver accumulate glycogen more slowly than normal ones / Natalia N. Bezborodkina, Sergey V. Okovity, Anna Yu. Chestnova, Boris N. Kudryavtsev // Hepatol. Int. — 2013. — Vol. 7. — P. 1084–1090.

8. 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 / N.N. Bezborodkina, A.Yu. Chestnova, S.V. Okovity, B.N. Kudryavtsev // *Exp. Toxicol. Pathol.* — 2014. — Vol. 66, Issue 2-3, — P. 147–154.
9. Chestnova A.Yu., Bezborodkina N.N., Matyukhina N.M., Kudryavtsev B.N. Dynamics of proglycogen and macroglycogen in hepatocytes of normal and cirrhotic rat liver at various stages of glycogenesis. / A.Yu. Chestnova, N.N. Bezborodkina, N.M. Matyukhina, B.N. Kudryavtsev // *Cell and Tissue Biology.* — 2015. — Vol. 9, Issue 2. — P. 133–140.
10. 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 / N.N. Bezborodkina, A.Yu. Chestnova, M.L. Vorobev, B.N. Kudryavtsev // *Cytometry Part A.* — 2016. — Vol. 89, Issue 4. — P. 357–364.
11. Bezborodkina N.N., Chestnova A.Yu., Vorobev M.L., Kudryavtsev B.N. Spatial structure of glycogen molecules in cells / N.N. Bezborodkina, A.Yu. Chestnova, M.L. Vorobev, B.N. Kudryavtsev // *Biochemistry (Moscow).* — 2018. — Vol. 83, Issue 5, — P. 467–482.
12. Ailanen Liisa, Bezborodkina Natalia N., Virtanen Laura, Ruohonen Suvi T., Malova Anastasia V., Okovityi Sergey V., Chistyakova Elizaveta Y., Savontaus Eriika. Metformin normalizes the structural changes in glycogen preceding prediabetes in mice overexpressing neuropeptide Y in noradrenergic neurons / Liisa Ailanen, Natalia N. Bezborodkina, Laura Virtanen, Suvi T. Ruohonen, Anastasia V. Malova, Sergey V. Okovityi, Elizaveta Y. Chistyakova, Eriika Savontaus // *Pharmacol. Res. Perspect.* — 2018. — Vol. 6, Issue 2. — e00389.
13. Bezborodkina Natalia N., Stepanov Andrey V., Vorobev Mikhail L., Chestnova Anna Yu., Stein Grigory I., Kudryavtsev Boris N. Cytochemical analysis of spatial structure of glycogen molecules in rat hepatocytes / Natalia N. Bezborodkina, Andrey V. Stepanov, Mikhail L. Vorobev, Anna Yu. Chestnova, Grigory I. Stein, Boris N. Kudryavtsev // *Journal of Molecular Structure.* — 2021. — Vol. 1228. — 129770.
14. Bezborodkina Natalia N., Okovityi Sergey V., Kudryavtsev Boris N. Postprandial glycogen content is increased in the hepatocytes of human and rat cirrhotic liver /

Natalia N. Bezborodkina, Sergey V. Okovityi, Boris N. Kudryavtsev // *Cells*. — 2021. — Vol. 10, Issue 5. — 976.

15. Prikhodko V.A., Bezborodkina N.N., Okovityi S.V. Pharmacotherapy for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Emerging Targets and Drug Candidates / V.A. Prikhodko, N.N. Bezborodkina, S.V. Okovityi // *Biomedicines*. — 2022. — Vol. 10. — 274.
16. Bezborodkina N.N., Stepanov A.V., Vorobev M.L., Stein G.I., Okovityi S.V., Kudryavtsev B.N. Dynamics of the glycogen  $\beta$ -particle number in rat hepatocytes during glucose refeeding / N.N. Bezborodkina, A.V. Stepanov, M.L. Vorobev, G.I. Stein, S.V. Okovityi, B.N. Kudryavtsev // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2022. — Vol. 23. — 9263.

В других изданиях:

Kudryavtseva M.V., Emelyanov A.V., Sakuta G.A., Bezborodkina N.N., Kudryavtsev B.N. Glycogen-forming function of hepatocytes in the rat regenerating cirrhotic liver after a partial hepatectomy / M.V. Kudryavtseva, A.V. Emelyanov, G.A. Sakuta, N.N. Bezborodkina, B.N. Kudryavtsev // *Tissue and Cell*. — 1998. — Vol. 30, Issue 2. — P. 261–267.

Kudryavtseva M.V., Bezborodkina N.N., Kudryavtsev B.N. Restoration of the glycogen-forming function of hepatocytes in rats with liver cirrhosis is facilitated by a high-carbohydrate diet / M.V. Kudryavtseva, N.N. Bezborodkina, B.N. Kudryavtsev // *Brit. J. Nutrition*. — 1999. — Vol. 81, Issue 6. — P. 473–480.

Кудрявцева М.В., Безбородкина Н.Н., Сек Е.Н., Шапиро И.Я., Барановский А.Ю., Кудрявцев Б.Н. Влияние препарата “Вилон” на гликогенообразовательную функцию гепатоцитов при экспериментальном циррозе печени у крыс / М.В. Кудрявцева, Н.Н. Безбородкина, Е.Н. Сек, И.Я. Шапиро, А.Ю. Барановский, Б.Н. Кудрявцев // *Цитология*. — 2000. — Т. 42, вып. 8. — С. 757–763.

Kudryavtseva M.V., Bezborodkina N.N., Kudryavtsev B.N. Glycogen-forming function of hepatocytes in cirrhotically altered rat liver after treatment the chorionic gonadotropin / M.V. Kudryavtseva, N.N. Bezborodkina, B.N. Kudryavtsev // *Exp. Toxic. Pathol.* — 2001. — Vol. 53, Issue 1. — P. 57–63.

Bezborodkina N., Kudryavtseva M., Kudryavtsev B. Analysis of the activity of key glycogen metabolism enzymes after a partial hepatectomy of normal and cirrhotic rat liver / N.



Bezborodkina, M. Kudryavtseva, B. Kudryavtsev // Proc. Georgian Acad. Sci., Biol. Ser. A. — 2002. — Vol. 28(S). — P. 1–5.

Кудрявцева М.В., Безбородкина Н.Н., Оковитый С.В., Иванова О.В., Кудрявцев Б.Н. Особенности влияния бемитила на метаболизм гликогена в гепатоцитах патологически измененной печени человека / М.В. Кудрявцева, Н.Н. Безбородкина, С.В. Оковитый, О.В. Иванова, Б.Н. Кудрявцев // Цитология. — 2002. — Т. 44, вып. 7. — С. 668–675.

Кудрявцева М.В., Безбородкина Н.Н., Оковитый С.В., Нилова В.К., Иваникова Н.В., Кудрявцев Б.Н. Исследование влияния бемитила на углеводный обмен цирротически измененной печени крыс / М.В. Кудрявцева, Н.Н. Безбородкина, С.В. Оковитый, В.К. Нилова, Н.В. Иваникова, Б.Н. Кудрявцев // Цитология. — 2002. — Т. 44, вып. 2. — С. 166–174.

Оковитый С.В., Безбородкина Н.Н., Улейчик С.Г., Шуленин С.Н. Гепатопротекторы / С.В. Оковитый, Н.Н. Безбородкина, С.Г. Улейчик, С.Н. Шуленин. — М.: ГЭОТАР-Медиа. — 2010. — 112 с. [ISBN 978-5-9704-1455-2]

Bezborodkina Natalia N., Chestnova Anna Yu., Kudryavtsev Boris N. Glycogen metabolism during chronic liver diseases / Natalia N. Bezborodkina, Anna Yu. Chestnova, Boris N. Kudryavtsev — In: P.L. Weiss, B.D. Faulkner (Eds). Glycogen: Structure, Functions in the Body and Role in Disease. — New York: NOVA Publishers, 2013. — P. 47–79. [ISBN 978-1-62948-395-5]

Оковитый С.В., Приходько В.А., Безбородкина Н.Н., Кудрявцев Б.Н. 2022. Гепатопротекторы: руководство для врачей. 2-е изд., перераб. и доп. / С.В. Оковитый, В.А. Приходько, Н.Н. Безбородкина, Б.Н. Кудрявцев. — М.: ГЭОТАР-Медиа. — 2022. — 240 с. [ISBN 978-5-9704-6689-6]

### **Основные научные результаты**

1. Развитие цирроза печени у человека сопровождается более значительными нарушениями ее функций и большей утратой гепатоцитов (>50 %), чем у крыс (~28 %). Полиплоидизация и гипертрофия клеток при циррозе у крыс практически полностью компенсируют убыль гепатоцитов, в то время как у человека эти процессы лишь частично восполняют потерю клеток (Bezborodkina et al., 2021 — стр. 5–7 (личный вклад автора 90 %)).

2. Гликогенез в популяции гепатоцитов при циррозе характеризуется более низкой (на 22 %) скоростью, чем в нормальной печени. Содержание гликогена в клетках нормальной печени прямо зависит от их размера, тогда как при циррозе подобная связь отсутствует. Тем не менее, в ходе гликогенеза содержание гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени сохраняется пропорциональным уровню ploидности клеток (Bezborodkina et al., 2013 — стр. 1084, 1089 (личный вклад автора 90 %); Bezborodkina et al., 2016 — стр. 357, 361, 363 (личный вклад автора 90 %)).

3. Разработан оригинальный микрофлуориметрический метод, позволяющий исследовать содержание легкодоступной (макрогликоген) и труднодоступной (прогликоген) фракций гликогена в одной и той же клетке и получать информацию о структуре гликогена в отдельных клетках, порядке его синтеза и деградации в печени. Метод основан на использовании PAS-реакции с реактивами типа Шиффа разного цвета и FRET (Förster Resonance Energy Transfer) методики (Безбородкина и др., 2009 — стр. 1027–1030, 1035 (личный вклад автора 90 %); Bezborodkina et al., 2011 — стр. 420, 422–423 (личный вклад автора 80 %); Chestnova et al., 2015 — стр. 135, 138–139 (личный вклад автора 80 %)).

4. Содержание гликогена в гепатоцитах трансгенных гомозиготных мышей OE-NPYDβH с фенотипом преддиабета соответствует значениям нормы, составляя  $28,53 \pm 0,97$  и  $30,87 \pm 0,98$  усл.ед. соответственно. Однако структура молекул гликогена значительно отличается от структуры характерной для мышей с фенотипом дикого типа (WT):  $0,62 \pm 0,02$  усл.ед. и  $1,63 \pm 0,02$  усл.ед. соответственно,  $p < 0,001$ . Синтез и накопление гликогена в гепатоцитах OE-NPYDβH мышей происходит преимущественно непрямым путем, через глюконеогенез, а в печени мышей WT используется прямой путь его синтеза (Ailanen et al., 2018, стр. 6, 7 (личный вклад автора 70 %)).

5. Увеличение содержания гликогена в гепатоцитах сопровождается изменениями пространственной структуры его молекул, которые выражаются в большем количестве цепей и ярусов, заполненных остатками глюкозы, а также в увеличении количества белков, связанных с остатками глюкозы на поверхности молекул. При этом внешний слой молекул гликогена в гепатоцитах полностью никогда не заполняется остатками глюкозы и всегда содержит остатки, связанные с белками (Bezborodkina et al., 2021 — стр. 6 (личный вклад автора 80 %)).

6. В гепатоцитах происходит непрерывный синтез и деградация макромолекул ( $\beta$ -частиц) гликогена. Гепатоциты голодных крыс содержат  $1,6 \times 10^8$  частиц гликогена. Рефидинг крыс глюкозой приводит к быстрому увеличению количества частиц в цитоплазме гепатоцитов. Тем не менее, основной вклад в повышение содержания гликогена в клетках вносит наращивание числа остатков глюкозы в его молекулах. Двухчасовой рефидинг крыс глюкозой приводит к увеличению размера молекул гликогена примерно в 2 раза (Bezborodkina et al., 2022 — стр. 7 (личный вклад автора 90 %)).

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. В нормальной и цирротической печени одноядерные и двоядерные гепатоциты различной плоидности не отличаются по скорости накопления гликогена. В гепатоцитах нормальной печени степень накопления гликогена связана с размером клеток, а при циррозе подобная зависимость отсутствует.

2. Содержание гликогена в гепатоцитах цирротической печени крыс и человека значительно превышает норму. Основными причинами гликогеноза гепатоцитов при циррозе являются ослабление гликогенолиза и усиленный глюконеогенез.

3. Разработан оригинальный микрофлуориметрический метод исследования содержания гликогена и пространственной структуры его молекул ( $\beta$ -частиц) в отдельных гепатоцитах. Показано, что в гепатоцитах нормальной печени крыс изменение содержания общего гликогена на ранних стадиях гликогеноза обусловлено синтезом новых молекул ( $\beta$ -частиц), а на поздних — присоединением глюкозных остатков к уже имеющимся в клетках частицам. В гепатоцитах цирротической печени крысы изменение содержания гликогена в процессе гликогеноза обусловлено заполнением внешних ярусов  $\beta$ -частиц. Увеличение содержания гликогена в гепатоцитах человека в ходе развития цирроза печени связано, главным образом, с образованием  $\beta$ -частиц *de novo*.

4. По мере развития цирроза расстояние между цепями глюкозных остатков на внешних ярусах молекул гликогена в гепатоцитах крысы увеличивается, в то время как в гепатоцитах человека — уменьшается.

5. Расстояние между внешними ярусами молекул гликогена уменьшается по мере заполнения их остатками глюкозы, что подтверждает гипотезу о саморегулируемости размера молекул гликогена.

6. Молекулы гликогена в гепатоцитах крыс и человека при циррозе мельче, чем в нормальной печени, а их количество в несколько раз превышает норму.

7. Применение различных методов терапии цирроза не приводит к полному восстановлению исходного долькового строения печени даже по истечении длительного времени наблюдения. Однако терапия цирроза после удаления повреждающего агента заметно снижает содержание гликогена в гепатоцитах и нормализует пространственную структуру его молекул. Лечение цирроза приводит к увеличению числа остатков глюкозы на внешних ярусах молекул гликогена.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Печень и ее роль в организме млекопитающих

Печень — самая крупная железа млекопитающих, ее относительная масса у разных видов колеблется от 1,5 % до 6 % (Prothero, 1982). Абсолютная же масса этого органа весьма различна, например, у синего кита (*Balaenoptera musculus*) она достигает более 1 т, у взрослого человека составляет 1,2–1,8 кг, у крыс и мышей 8–10 г и 2–3 г соответственно, а у одного из самых мелких млекопитающих — малой бурозубки (*Sorex minutus*) — всего 0,18–0,31 г (Ивантер и др., 1985; Шмидт-Ниельсен, 1987; Rogers, Dintzis, 2018).

Клеточная популяция печени состоит из паренхимных и непаренхимных элементов. Последние представлены синусоидальными (эндотелиоциты и клетки Купфера) и перисинусоидальными (клетки Ито и Pit-клетки) клетками. К основным и наиболее многочисленным паренхимным клеткам печени млекопитающих относятся гепатоциты. Они составляют 60–80 % от общего числа клеток и 85–90 % массы печени (Bioulac-Sage et al., 1999; Xu, Zhang, 2018). По разным оценкам среднее число гепатоцитов в печени человека составляет  $100\text{--}250 \times 10^9$  клеток (Bioulac-Sage et al., 1999; Agias et al., 2020), а у крыс в 1 г печени содержится от  $1,96 \times 10^8$  (Кнох, 1976) до  $2,62 \times 10^8$  гепатоцитов (Байдюк, 2013).

Печень занимает стратегическое положение в организме и выполняет до 500 различных метаболических функций, участвуя в обмене белков, липидов, витаминов, секреции желчи, детоксикации, пигментном и минеральном обмене. Она играет центральную роль в углеводном обмене: поддерживает постоянную концентрацию глюкозы в крови, регулирует накопление и распределение глюкозы в периферических тканях. Накапливать глюкозу в форме гликогена способны и другие органы, однако только печень может расщеплять его и обеспечивать поступление свободной глюкозы в систему кровообращения (Kuntz, Kuntz, 2008; Chiang, 2014) (рис. 1.1).

Метаболические пути в печени находятся под жестким нейрогуморальным контролем (Reinke, Asher, 2016), ее иннервация осуществляется ветвями блуждающих нервов и печеночного (симпатического) сплетения, а участие в регуляции обменных процессов принимают гормоны эпифиза, аденогипофиза, надпочечников,

поджелудочной и щитовидной желез (Charni-Natan et al., 2019). Источником энергии для чрезвычайно энергоемких тканеспецифических функций печени служит аэробное окисление углеводов, жиров и белков, поступающих с пищей или хранящихся в различных тканях в виде резервов (Rui, 2014). Основными резервными веществами у животных являются гликоген и триацилглицериды (жиры). При полном окислении последних образуется, в виде АТФ, значительно больше энергии по сравнению с гликогеном. Тем не менее, гликоген имеет два преимущества. Он очень быстро мобилизуется для метаболических нужд организма и, что еще важнее, из него можно получать энергию даже в условиях аноксии.

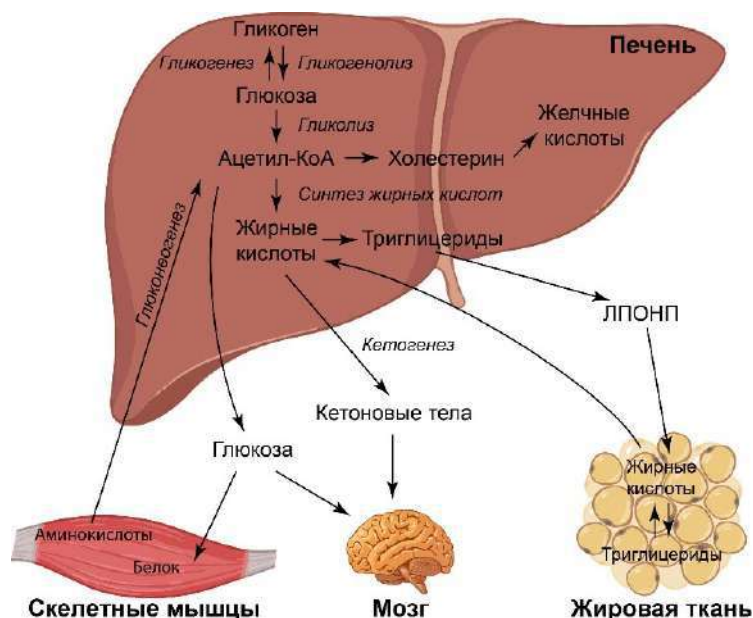


Рисунок 1.1 — Основные метаболические функции печени.

## 1.2. Гликоген и его роль в различных тканях и клетках млекопитающих

Гликоген служит легкодоступным и универсальным источником энергии для метаболических процессов у живых существ с различным уровнем организации: от примитивных гетеротрофных прокариот (архей и бактерий) до высших эукариот — млекопитающих (Ball et al., 2011). Впервые гликоген или, как его раньше называли, животный крахмал, был получен и описан французским физиологом, Клодом Бернаром. К. Бернар обнаружил, что при действии этанола и избытка ледяной уксусной кислоты на гомогенат свежей ткани печени гликоген выпадает в виде белого осадка, а полный его

гидролиз приводит к образованию глюкозы (Bernard, 1857). В дальнейшем было показано, что гликоген содержится почти во всех тканях, но в наибольшей концентрации, 5–7 % от общей массы органа, он присутствует в печени. Общее содержание гликогена в печени составляет примерно 0,4 г у крысы и 70–100 г у человека (Wasserman, 2009; Zois, Harris, 2016). Значительное количество гликогена присутствует также в скелетных мышцах. Хотя концентрация гликогена в них гораздо меньше, чем в печени, его общее количество — выше (Zois, Harris, 2016). Например, у человека оно достигает 400–500 г (Wasserman, 2009; Jensen et al., 2011).

Причина, по которой глюкоза хранится в клетках в виде полимера, связана с низкой осмолярностью этой формы. Запас гликогена в гепатоците примерно соответствует концентрации глюкозы 0,4 М, однако реальная концентрация нерастворимого гликогена в клетке составляет всего 0,01 мкМ. Содержание в цитозоле 0,4 М глюкозы в мономерной высокоосмолярной форме могла бы привести к проникновению воды в клетку и к ее лизису. Кроме того, при внутриклеточной концентрации глюкозы 0,4 М и концентрации глюкозы 5 мМ в крови млекопитающих, изменение свободной энергии, соответствующее переносу глюкозы внутрь клетки против ~ 80-кратного градиента концентрации, было бы недопустимо велико (Нельсон, Кокс, 2012).

В силу своей способности с высокой скоростью расщепляться до глюкозы и быстро откладываться в клетках гликоген играет чрезвычайно важную роль в жизни человека и животных.

**Во-первых**, на поздних этапах эмбриогенеза млекопитающих гликоген в большом количестве накапливается в органах плода, особенно в печени, а затем расходуется в течение первых часов после рождения на энергетические нужды новорожденного (Doljanski, 1960; Kalhan, 2017). Для эмбрионов человека и животных глюкоза, как источник энергии, имеет первостепенное значение (Kalhan, Parimi, 2000; Dowling, McAuliffe, 2013). Ее концентрация в плазме крови поддерживается на постоянном уровне за счет транспорта через плаценту из материнского организма (Mota-Rojas et al., 2011). Рождение и несколько суток после него является критическим этапом в жизни млекопитающих, а накопление перед рождением большого количества гликогена в печени – одним из важнейших адаптивных механизмов (Hers, 1981; Аршавский, 1982; Gruppuso, Brautigan, 1989).

**Во-вторых**, гликоген играет важную роль в мышечном сокращении. Мышцы различного функционального назначения составляют до 40–45 % массы тела млекопитающих (Frontera, Ochala, 2015) и содержание в них гликогена достигает 0,5–2 % от влажной массы мышцы (Розенфельд, Попова, 1989).

**В-третьих**, организму жизненно необходимо поддерживать концентрацию глюкозы в крови в узком физиологическом диапазоне для нормального функционирования нервной ткани, клеток крови и семенников. В состоянии сытости и в постабсорбтивном периоде мозг работает почти исключительно за счет глюкозы, а скорость ее использования оценивается в 117–142 г/день (Nuttall et al., 2008). Еще одна причина жесткой регуляции концентрации глюкозы в крови заключается в ее токсичности. Модификации белков, вызванные их гликозилированием (Degenhardt et al., 1998), окислительные повреждения клеток, индуцированные глюкозой (Huebschmann et al., 2006), и другие вредные эффекты, опосредованные глюкозой, особенно четко проявляются у людей с тяжелыми формами диабета (Cleary et al., 2006).

### 1.3. Регуляции глюкостатической функции печени и метаболизм гликогена

В зависимости от пищевого статуса организма выделяют 5 фаз гомеостаза глюкозы (Ruderman et al., 1976) (табл. 1.1). В абсорбтивной **фазе I** концентрация глюкозы и инсулина в крови повышается, глюкагона — падает. В результате происходит всасывание глюкозы, образующейся в кишечнике при переваривании углеводов: 55 % печенью, 25 % инсулиннезависимыми тканями (мозг, нервы, форменные элементы крови, мозговой слой почек и эпителий семенников) и 15 % инсулинозависимыми тканями (жировая ткань, скелетные мышцы) (Тепперман, Тепперман, 1989). В постабсорбтивной **фазе II** концентрации глюкозы, инсулина и глюкагона возвращаются к исходному уровню. Печень начинает продуцировать глюкозу, главными потребителями которой являются головной мозг, почки, эритроциты, жировая ткань и скелетные мышцы. Типичным постабсорбтивным состоянием у человека является состояние организма после ночного сна. Если пища не поступает в течение суток и более, наступает состояние голодания (**III-V фазы**). На всех стадиях голодания, из-за истощения запасов гликогена, единственным источником глюкозы становится глюконеогенез в печени и почках (Ercan et al., 1994) (табл. 2.1)



Таблица 1.1 — Фазы гомеостаза глюкозы.

	<b>Фаза I</b>	<b>Фаза II</b>	<b>Фаза III</b>	<b>Фаза IV</b>	<b>Фаза V</b>
<b>Источник глюкозы</b>	Экзогенные углеводы	<b>Гликогенез в печени</b> Гликоген	<b>Глюконеогенез в печени</b> Гликоген	Глюконеогенез в печени и почках	Глюконеогенез в печени и почках
<b>Ткани/органы, использующие глюкозу</b>	ВСЕ (печень захватывает около 50 % глюкозы после приема пищи)	ВСЕ (печень, мышцы, жировая ткань — в меньшей степени)	ВСЕ (печень, мышцы, жировая ткань — в меньшей степени)	Мозг, эритроциты, почки, мышцы (небольшое количество)	Эритроциты, почки, мозг (в меньшей степени)
<b>Основной источник энергии для мозга</b>	Глюкоза	Глюкоза	Глюкоза	<b>Глюкоза</b> Кетоновые тела	<b>Кетоновые Тела</b> <b>ГЛЮКОЗА</b>
<b>Когда начинается?</b>	3–4 ч после приема пищи	6–12 ч после приема пищи	Голодание 1 сут	Голодание до 24 сут	Голодание более 1 мес

Таким образом, концентрация глюкозы в крови на разных стадиях пищевого цикла представляет собой баланс между интенсивностью потребления глюкозы периферическими тканями и соотношением скоростей синтеза и распада гликогена в печени.

Гликоген может синтезироваться прямым путем (гликогенез) из поступающей в клетки глюкозы крови и непрямым путем (глюконеогенез) из веществ неуглеводной природы. Деградация гликогена (гликогенолиз) в организме происходит путем гидролиза или фосфоролиза. Гликоген может быть использован в ходе аэробного или анаэробного гликолиза на нужды самой ткани или для продукции глюкозы, а также, через пентозофосфатный путь — для образования НАДФ-Н и пентозофосфатов, необходимых для синтеза жирных и нуклеиновых кислот (рис. 1.2).

В большинстве органов и тканей млекопитающих используются лишь отдельные блоки реакций, связанных с метаболизмом гликогена. Например, в скелетных мышцах (Przybylski et al., 2006), сердце (Chandramouli et al., 2015), мозге (Rojas, Schwartz, 2014) и эритроцитах (Moses et al., 1972) метаболизм гликогена направлен в сторону гликолиза, тогда как в корковом веществе почек (Segura, Ruilope, 2013) и тонком кишечнике

(Mithieux, Gautier-Stein, 2014) метаболизм ориентирован на синтез гликогена через глюконеогенез. Единственным органом у млекопитающих, который обладает полным набором реакций метаболизма гликогена, является печень. При этом она, как правило, не использует глюкозу, образующуюся при гликогенезе, для собственных нужд, а продуцирует ее для потребления другими органами.

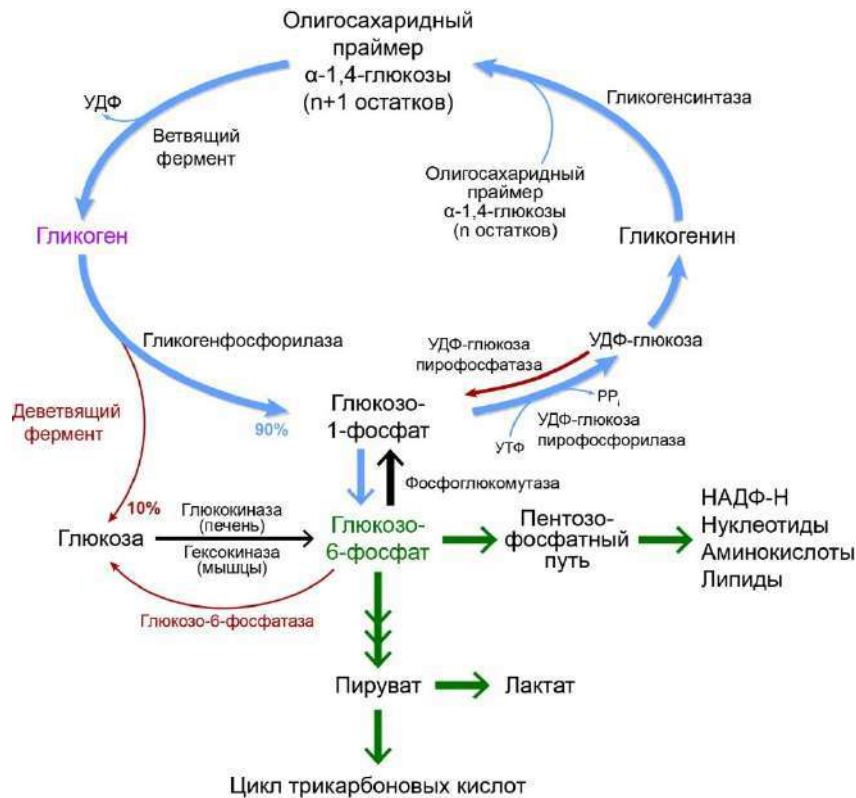


Рисунок 1.2 — Общая схема метаболизма гликогена (Zois, Harris, 2016).

Основная схема реакций гликогенеза и гликогенолиза подробно описана (Bender, Mayes, 2015; Zois, Harris, 2016) и отличается в различных тканях лишь некоторыми деталями.

Синтез гликогена начинается с присоединения УДФ-глюкозы к белку-затравке гликогенину, в качестве акцептора переносимого остатка глюкозы выступает сам гликогенин (Lomako et al, 2004; Chaikuad et al., 2011). У человека есть два гена, кодирующих этот белок — GYG1 и GYG2. Первый их них экспрессируется во всех тканях, а экспрессия второго ограничена печенью, сердцем и поджелудочной железой (Henrissat, Davies, 2000). В отличие от человека, грызуны обладают лишь GYG1 (Zhai et al., 2001).

Дальнейшее формирование полной молекулы гликогена происходит с участием гликогенсинтазы (ГС), ветвящего фермента (ВФ) и других ферментов после окончания самогликозилирования гликогенина. Предполагается, что гликоген никогда не расщепляется в клетках до конца, а его синтез может начинаться сразу, на предсуществующем гликогенине (Calder, Geddes, 1992). Остатки глюкозы переносятся ГС на нередуцирующий конец олигосахарида, образованного на гликогенине, и соединяются между собой  $\alpha$ -1  $\rightarrow$  4 гликозидными связями (рис. 1.3). В результате, формируется полисахаридная цепь, а гликогенин остается внутри молекулы гликогена.

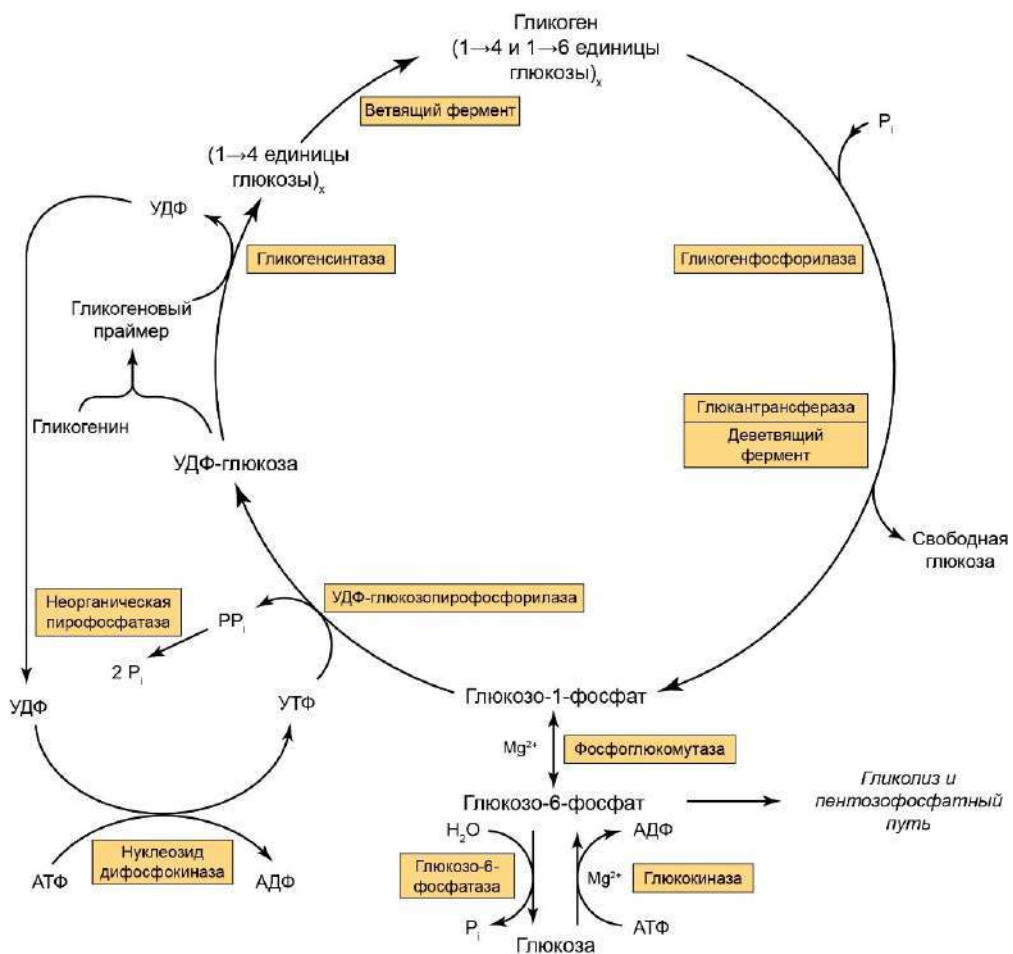


Рисунок 1.3 — Пути гликогенеза и гликогенолиза в печени (по Bender, Mayes, 2015).

Млекопитающие обладают двумя генами, кодирующими ГС: GYS1 экспрессируется в скелетных мышцах и большинстве клеток, способных к синтезу гликогена, а GYS2 — только в печени (Qian et al., 2014). ГС может находиться в неактивном фосфорилированном (в или I форма) и активном нефосфорилированном (а или D форма) состоянии. Глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф) способен преодолеть

инактивирование фермента, связанное с фосфорилированием, и полностью восстановить его активность. Это свойство позволяет определять активность ГС в присутствии и отсутствии Г-6-Ф, а также дает возможность оценить степень фосфорилирования фермента (Aiston et al., 2003). Дополнительный механизм регуляции активности ГС связан с изменением ее внутриклеточной локализации. Показано, что инкубация изолированных из печени голодных крыс гепатоцитов вместе с глюкозой, помимо активации ГС, способствует ее переходу из диффузного распределения в цитоплазме на периферию клетки (Jurczak et al., 2008). Этот факт хорошо согласуется с данными о том, что синтез гликогена начинается вблизи клеточной мембраны гепатоцитов, а по мере его накопления перемещается от периферии клетки внутрь (Fernandez-Novell et al., 2002).

ГС катализирует перенос глюкозидных остатков лишь на линейно расположенный участок цепи. После того как число линейно расположенных остатков глюкозы достигнет 11, цепь начинает разветвляться при участии ветвящего фермента (ВФ). Он образует  $\alpha$ -1,6-глюкозидные связи и приводит к формированию большого числа концевых мономеров. Такая разветвленная структура обуславливает компактность молекул гликогена и дает возможность значительно увеличить скорость его синтеза и деградации (рис. 1.4, а).

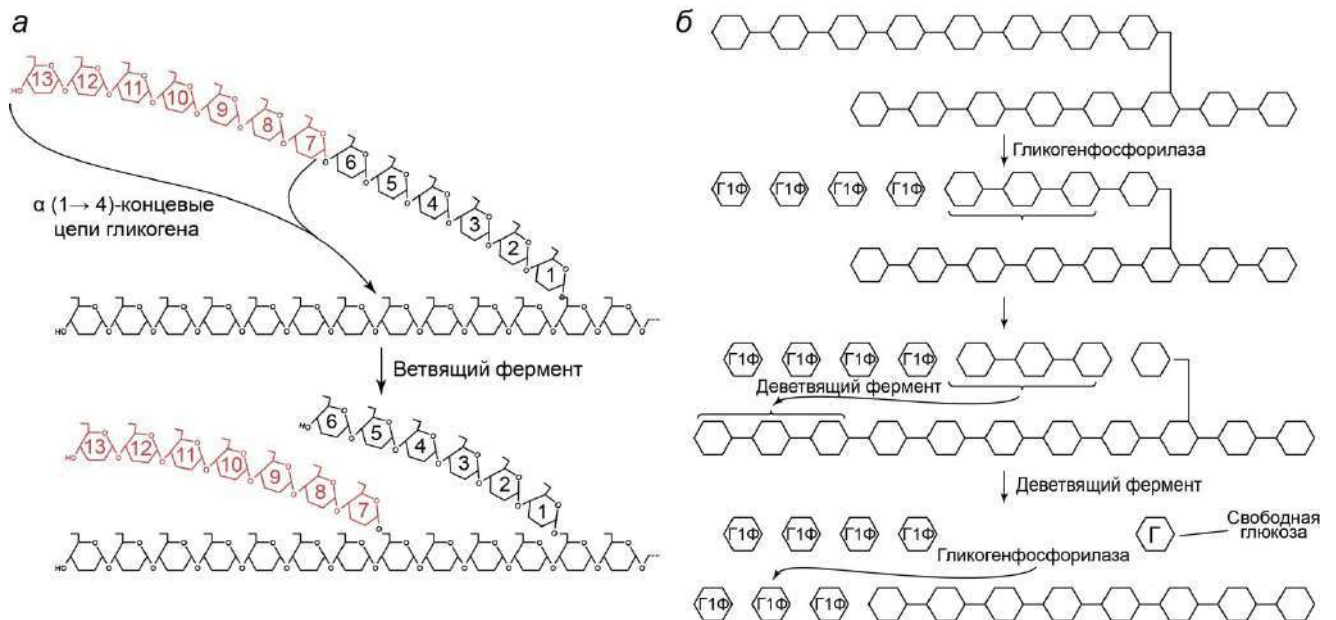


Рисунок 1.4 — (а) Механизм действия ветвящего фермента. Ветви образуются при переносе примерно семи концевых глюкозных остатков с линейного участка цепи на  $C_6$ -ОН-группу остатка глюкозы другой цепи. Новая точка ветвления образуется на расстоянии не менее 4 остатков от любой другой уже существующей точки ветвления. (б) Механизм действия деветвящего фермента (Takusagawa F., 2010).

Как уже упоминалось, деградация гликогена в клетках может идти фосфоролитическим и гидролитическим путем. Последний осуществляется глюкозидазами. Наиболее известна из них  $\alpha$ -амилаза поджелудочной железы и слюны, расщепляющая  $\alpha$ -1,4-гликозидные связи. Подвергаться гидролизу гликоген может и в лизосомах. На этот путь обратили внимание из-за болезни Помпе, при которой происходит мутация в гене лизосомальной  $\alpha$ -глюкозидазы (Hirschhorn, Reuser, 2000) и, как следствие, накопление огромного количества гликогена в лизосомах и везикулярных структурах (Fukuda et al., 2006).

Фосфоролитиз гликогена начинается с образования глюкозо-1-фосфата — реакции, которую катализирует гликогенфосфорилаза (ГФ), ключевой фермент гликогенолиза (рис. 1.3). Его молекулярная структура сложна, но довольно хорошо изучена. Известно, что биологической активностью обладает димер ГФ. Переход ГФ из неактивного в активное состояние происходит за счет присоединения АМФ и сопровождается изменением четвертичной структуры фермента (Rath et al., 2000; Pautsch et al., 2008). При инактивации ГФ также, как и ГС, перемещается из растворимой фракции в т.н. «частичковую» (Green et al., 2004).

ГФ способна расщеплять только линейные цепи ( $\alpha$ -1,4-связи) гликогена, но как только до  $\alpha$ -1,6-ветвления остается примерно 4 остатка глюкозы, ее действие прекращается и начинает работать деветвящий фермент (ДВФ). ДВФ обладает трансферазной и 1,6-глюкозидазной активностями, а его функция заключается в выпрямлении цепи глюкозных остатков в участках ветвления (рис. 1.4, б). Каталитические единицы ДВФ могут действовать независимо одна от другой, предполагая присутствие нескольких активных центров, в том числе для связи с гликогеном (Zhai et al., 2016). Хотя этот фермент был открыт почти 50 лет назад, его трехмерная структура и молекулярная основа функционирования до сих пор мало изучены.

В итоге, благодаря совместному действию ДФВ и ГФ, гликоген расщепляется до Г-1-Ф, который под действием фосфоглюкомутазы трансформируется в Г-6-Ф. Именно Г-6-Ф используется во многих метаболических путях или превращается в свободную глюкозу, поступающую в кровь.

Для поддержания постоянной физиологической концентрации глюкозы в крови гликоген печени используется, главным образом, в промежутках между приемами

пищи. Считается, что в постабсорбтивном периоде у человека около 70–75 % глюкозы образуется за счет гликогенолиза (Kruszynska, 1999). При длительном голодании запасы гликогена в печени истощаются до нескольких процентов от первоначального уровня (Rothman et al., 1991). В этих условиях снабжение тканей глюкозой осуществляется почти целиком за счет глюконеогенеза, протекающего в печени и, в меньшей степени, в корковом слое почек, надпочечниках и тонком кишечнике (Mithieux et al., 2004; Watford, 2005). Источниками глюкозы, синтезируемой *de novo* печенью через глюконеогенез, являются лактат, пируват, глицерин и некоторые аминокислоты.

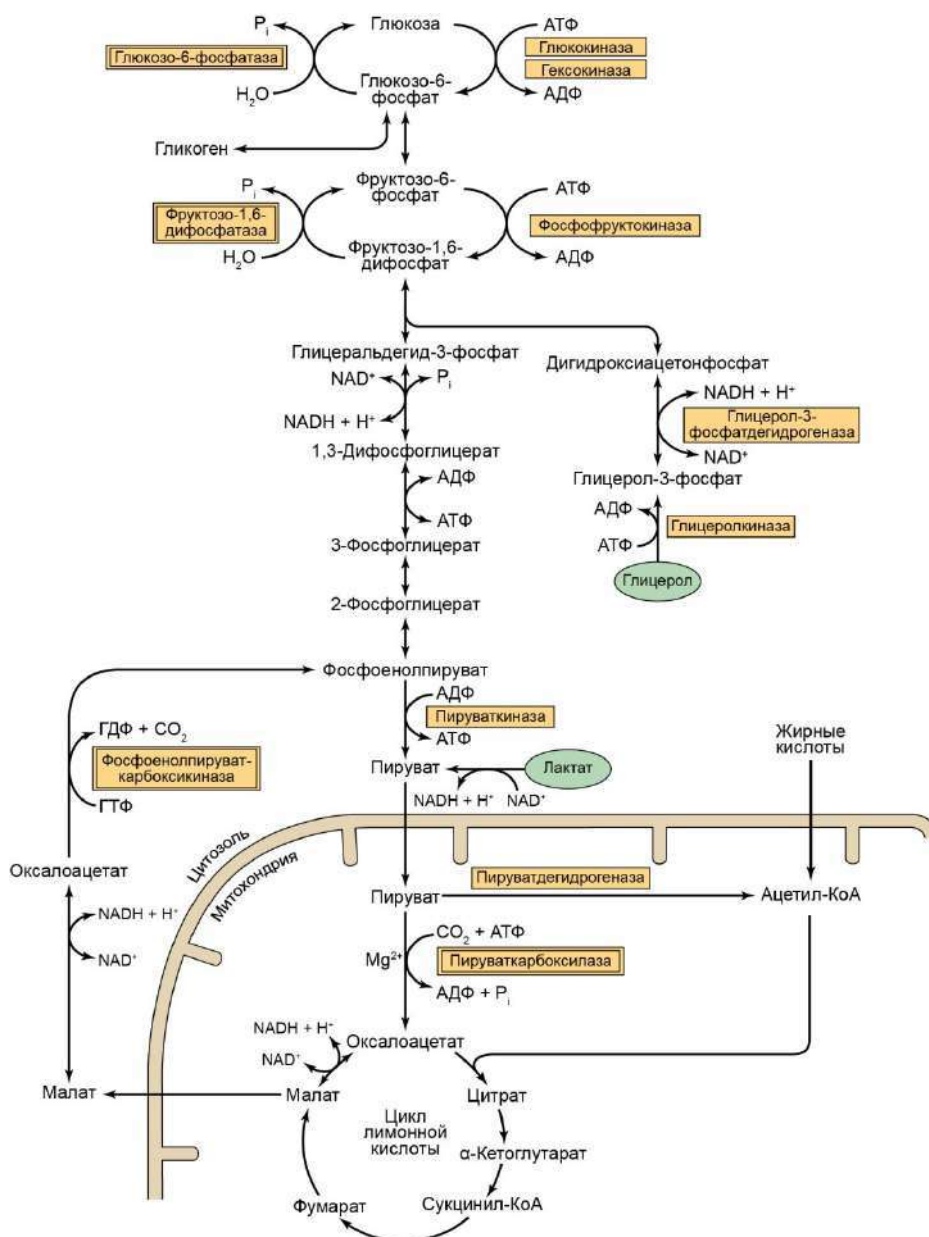


Рисунок 1.5 — Схема глюконеогенеза и гликолиза в печени. Ключевые глюконеогенные ферменты заключены в двойные рамки. АТФ, необходимый для глюконеогенеза, поступает в результате окисления жирных кислот (по Bender, Mayes, 2015).



Практически все реакции глюконеогенеза представляют собой обращение реакций гликолиза и катализируются соответствующими гликолитическими ферментами. Однако, из-за необратимости некоторых из них, в глюконеогенезе существуют свои, обходные, реакции. Одним из главных этапов глюконеогенеза является терминальная реакция, катализируемая глюкозо-6-фосфатазой (Г-6-Фазой) (рис. 1.5).

Этот фермент занимает центральную стратегически важную позицию в регуляции концентрации глюкозы в крови. Известно, что Г-6-Фаза печени имеет молекулярную массу 60–70 кДа (Reczek, Vilee, 1982), состоит из 5 основных полипептидов (Burchell, 1982) и находится у млекопитающих в микросомальной фракции (De Duve et al., 1951). Показано, что Г-6-Фаза содержится также в почках, кишечнике, поджелудочной железе, надпочечниках, семенниках и селезенке, но ее активность в этих органах низка по сравнению с печенью (Burchell, Hume, 1995; Rajas et al., 1999; Croset et al., 2001).

В клетках фермент локализуется преимущественно на внутренней стороне мембран шЭПР, а его субстрат находится в цитозоле (Waddell, Burchell, 1991). С помощью моноклональных антител было показано, что перенос Г-6-Ф через мембрану осуществляется специфической транслоказой T1, а освобождаемые при гидролизе субстрата глюкоза и Фн переносятся в цитозоль транслоказами T2 и T3 соответственно (рис. 1.6) (Rodwell et al., 2015).

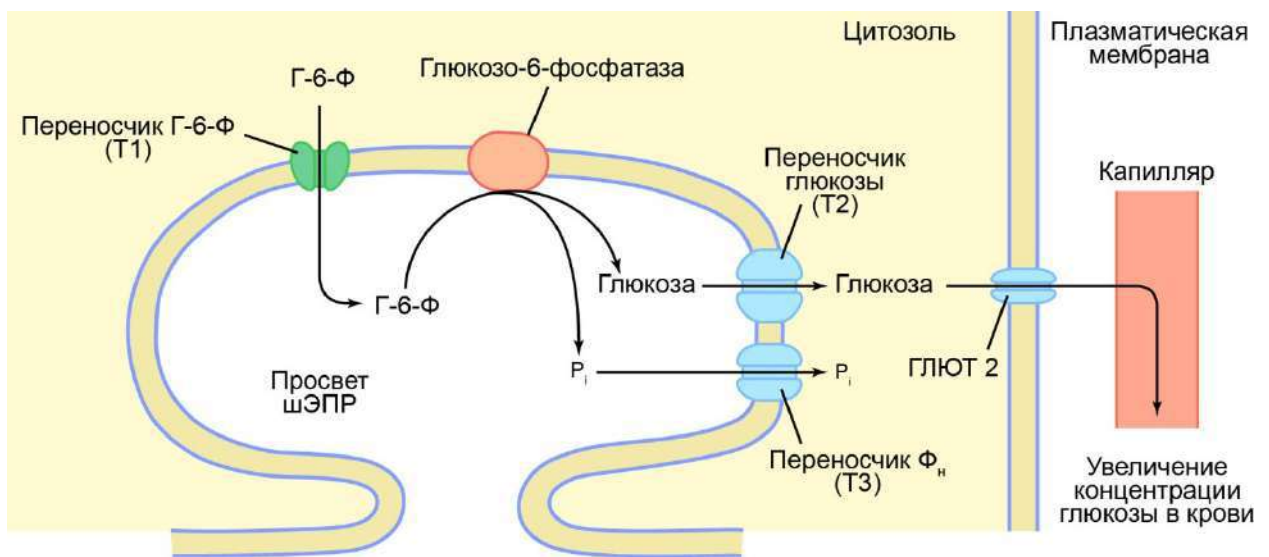


Рисунок 1.6 — Гидролиз Г-6-Ф. Каталитический сайт глюкозо-6-фосфатазы обращен к просвету шероховатого эндоплазматического ретикулума (шЭПР). ГЛЮТ 2 – белок-переносчик глюкозы 2 типа (по Rodwell et al., 2015).

Г-6-Ф образуется на первом этапе одного из важнейших и древнейших метаболических процессов у живых организмов — гликолиза, под действием гексокиназы (рис. 1.5). У многих млекопитающих, в т.ч. человека, есть четыре изоформы гексокиназы (Lowes et al., 1998; Coerver et al., 1998; Ehsani-Zonouz et al., 2001), но только гексокиназа IV или глюкокиназа (ГК) обладает низким сродством к глюкозе ( $K_m$  около 20 ммоль/л), не ингибируется Г-6-Ф и эффективно функционирует при концентрациях глюкозы выше 1 мг/мл (Cornish-Bowden, Cardenas, 1991). Ее доля в общей гексокиназной активности отличается у разных видов млекопитающих: например, в печени крыс, мышей и хомячков она составляет 84–91% (Ureta et al., 1971; Reyes, Cardenas, 1984), а у человека — лишь 40 % (Lowes et al., 1998).

В гепатоцитах ГК находится в комплексе с регуляторным белком GKRP, который действует как конкурентный ингибитор по отношению к глюкозе (Arden et al., 2005) и является наиболее важным посттранскрипционным регулятором (Roncero et al., 2009). Потеря GKRP снижает как количество ГК, так и ее активность (Grimsby et al., 2000).

Показано, что отсутствие ГК в печени человека способствует развитию легкой степени диабета (Malecki, Klupa, 2005). Однако у жвачных животных, кошек и птиц физиологически низкая активность ГК в печени не приводит к диабету. Скорее всего, это обусловлено разным составом пищи и таким способом получения энергии для жизнедеятельности, при котором активность ГК не обязательна для удаления избытка глюкозы из циркуляции (Ureta, 1982; Aschenbach et al., 2010; Polakof et al., 2011; Verbrugghe et al., 2012).

Подавляющее большинство данных о глюкостатической функции, метаболизме и содержании гликогена получено без учета особенностей тканевого строения органа и структуры его клеточной популяции. Как правило, исследования проводились на гомогенатах ткани, изолированных клетках и органоидах, выделенных ферментах или путем определения концентрации метаболитов в притекающей и оттекающей от печени крови и т.д. Между тем, печень представляет орган с высокой организацией метаболизма, четкой гистологической структурой и клеточной популяцией, в которой каждый тип клеток имеет строгую локализацию и выполняет определенную функцию.



## 1.4. Влияние тканевых и клеточных факторов на метаболизм и содержание гликогена в печени

Все метаболические пути, связанные с накоплением и деградацией гликогена, происходят в гепатоцитах. Как клеточный тип они возникают из клеток-предшественников (гепатобластов) в раннем эмбриональном периоде: у человека примерно на 18-е сут, а у крыс — на 10–11-е сут пренатального развития (Zhao, Duncan, 2005; Shin, Monga, 2013) (рис. 1.7).

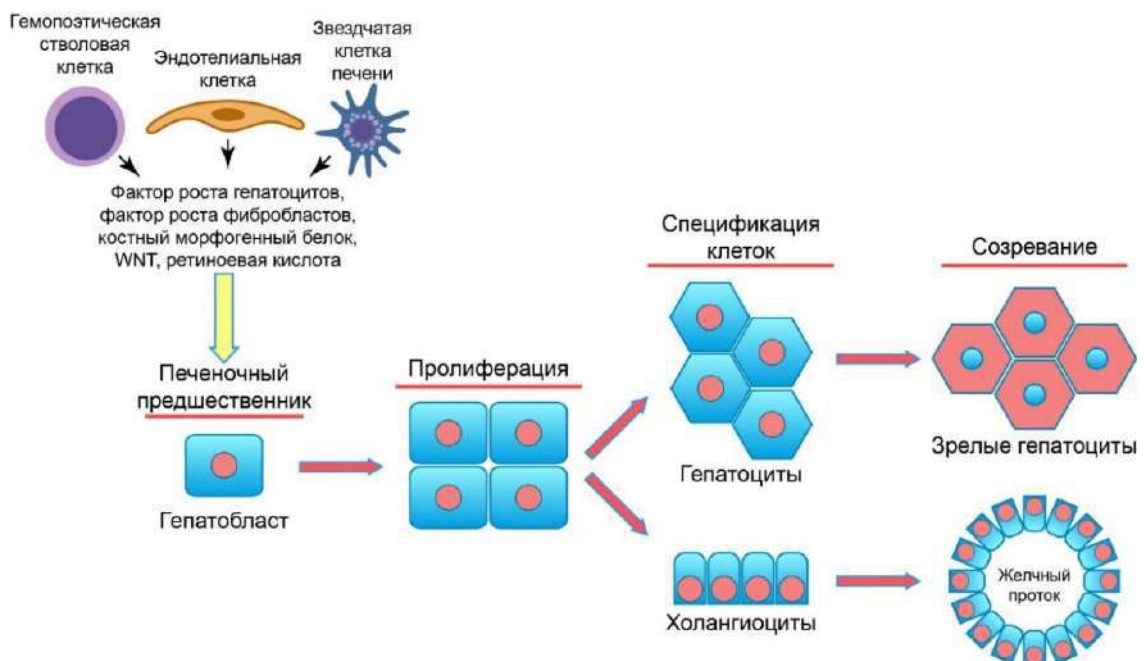


Рисунок 1.7 — Схема морфогенеза печени. Гепатобласты — бипотенциальные стволовые клетки — дифференцируются в гепатоциты или холангиоциты (билиарные эпителиальные клетки). В ходе морфогенеза эти клетки подвергаются созреванию и приобретают дополнительные характеристики, такие как полярность, и становятся способны выполнять ключевые функции печени.

Эмбриональная печень растет с большой скоростью благодаря высокой пролиферативной активности гепатоцитов (Заварзин, 1967), однако после рождения их митотическая активность быстро снижается. У взрослых крыс число гепатоцитов, находящихся в фазе синтеза ДНК, составляет лишь доли процента (Stöcker et al., 1972). На фоне падения пролиферативной активности гепатоцитов происходит их полиплоидизация, наиболее интенсивная в течение первых 3–4 нед после рождения крысят, во время перехода от питания молоком матери на самостоятельное питание пищей, богатой углеводами (James et al., 1979; Бродский, Урываева, 1981; Богданова и

др., 1990). Полагают, что она осуществляется путем чередования ацитокинетических митозов и бимитозов, в результате чего в печени взрослых крыс появляются одноядерные и двухядерные гепатоциты различных классов плоидности —  $2c$ ,  $2c \times 2$ ,  $4c$ ,  $4c \times 2$  и  $8c$  (Brodsky, Uryvaeva, 1977; Donne et al., 2020) (рис. 1.8).

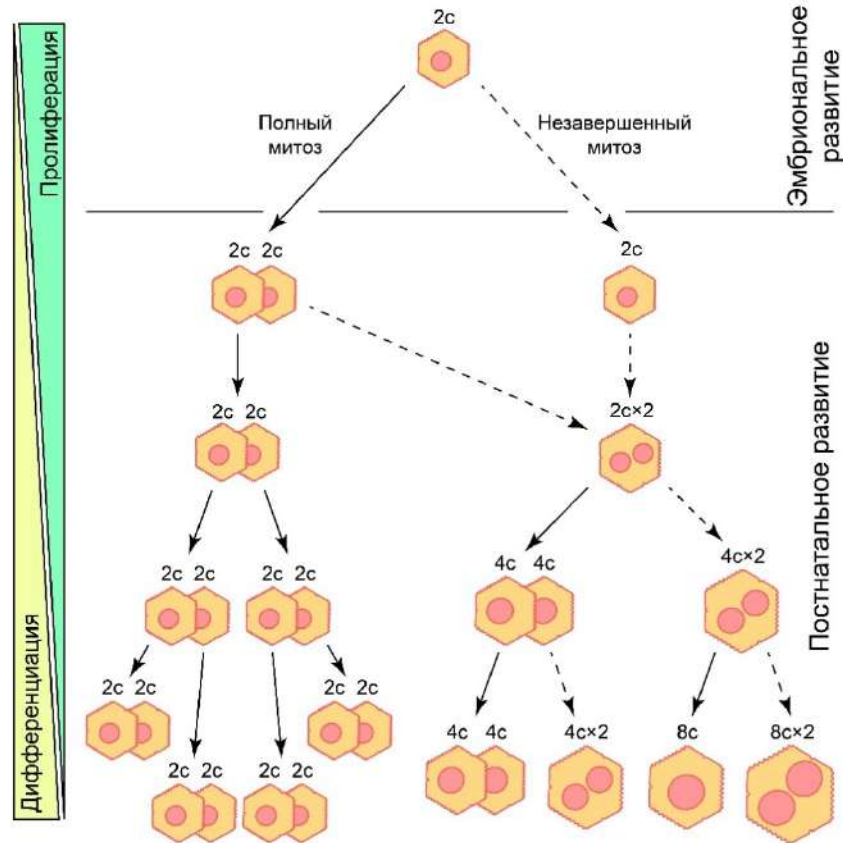


Рисунок 1.8 — Образование гепатоцитов разной плоидности в печени крыс (Оковитый и др., 2022).

В печени взрослых крыс преобладают одноядерные тетраплоидные гепатоциты, на их долю приходится  $\sim 80\%$  популяции клеток паренхимы (Богданова и др., 1990; Сакута, Кудрявцев, 2005). Гепатоциты более высокой плоидности редки, появляются в ходе старения или при гепатопатологиях. В отличие от крыс,  $80\text{--}90\%$  гепатоцитов нормальной печени взрослого человека представлена одноядерными диплоидными клетками. Заметное число полиплоидных гепатоцитов появляется у человека лишь после пятидесяти лет, но даже в 90-летнем возрасте, паренхима печени почти на  $60\%$  состоит из одноядерных диплоидных клеток (Кудрявцев и др., 1982; Watanabe et al., 1984; Kudryavtsev et al., 1993).

Помимо клеточных факторов, метаболизм глюкозы и гликогена в гепатоцитах зависит от структуры паренхимы печени, обусловленной ее уникальным кровоснабжением (Jungermann, 1987). Печень одновременно получает артериальную и венозную кровь, поступающую соответственно из печеночной артерии и портальной вены (рис. 1.9).

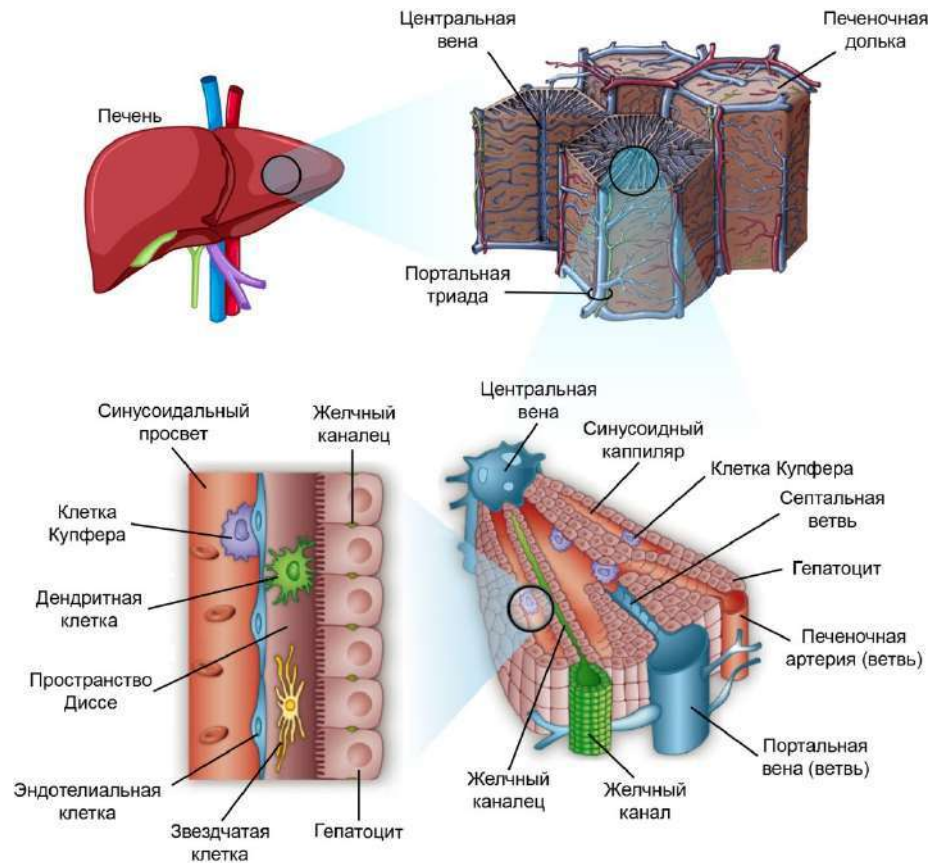


Рисунок 1.9 — Микроскопическое строение печени (схема) (Оковитый и др., 2022).

Традиционно основной морфофункциональной единицей печени считают печеночную дольку. Несколько представлений о ее строении лишь отражают различные стороны структуры и функции этого органа (Sasse et al., 1992; Romert et al., 1993; Teutsch, 2005). Согласно классической точке зрения, дольки имеют форму шестигранных призм. По углам их оснований располагаются портальные тракты с ветвями воротной вены, печеночной артерии, желчными протоками, лимфатическими сосудами и нервными волокнами. В центре дольки находится центральная вена, по которой кровь оттекает в сосуды, несущие кровь в нижнюю полую вену и, далее, в правый желудочек сердца (рис. 1.9, 1.10, а). Вокруг центральной вены расположены трабекулы, состоящие примерно из 20 гепатоцитов (рис. 1.10). У многих видов

животных радиальное направление трабекул в дольках не всегда заметно из-за часто возникающих между ними анастомозов.

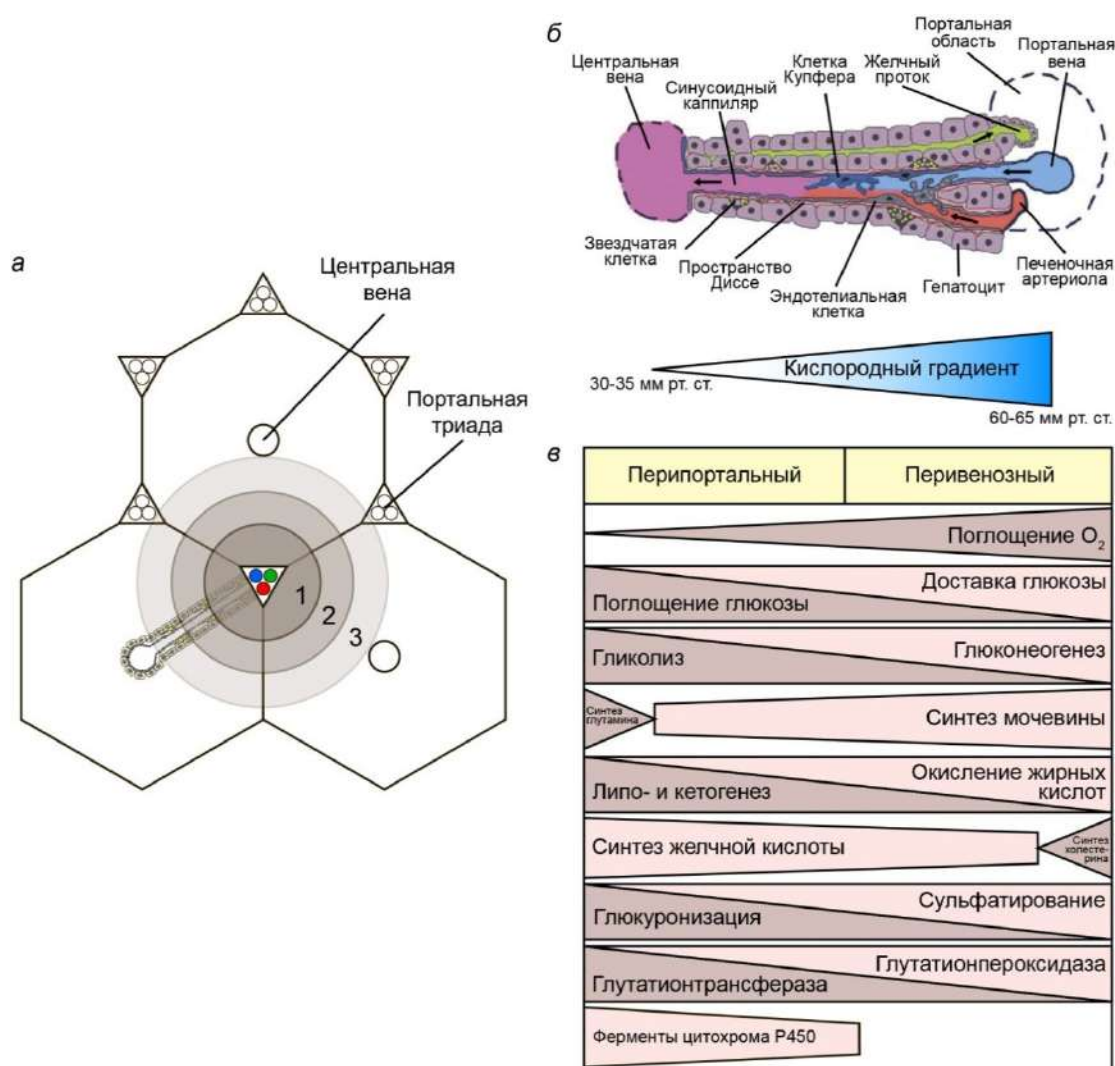


Рисунок 1.10 — Микроструктура печени, кислородный градиент и метаболическая зональность. *а* — Классическая долька печени. Ответвления воротной вены (синяя точка), печеночной артерии (красная точка), желчный проток (зеленая точка). Ацинус и его три зоны. 1 – перипортальная зона; 2 – промежуточная зона; 3 – перивенозная. *б* — Синусоид печени и градиент кислорода. *в* — Функциональная активность ацинуса печени в зависимости от кислородной зональности (по Kietzmann, 2017; Lee-Montiel et al., 2017).

При описании строения печени часто используют понятие «ацинус». Он образован сегментами двух рядом расположенных классических долек (рис. 1.10, *а*) и, в отличие от них, кровоснабжение в ацинусе идет от центральных участков к периферическим (Rappaport, 1981). В ацинусе выделяют три зоны: перипортальную, снабжающуюся кровью с высоким содержанием кислорода, промежуточную и перивенозную. Последняя прилежит к центральной вене и получает кровь с низкой концентрацией кислорода, но обогащенную конечными продуктами клеточного

метаболизма (Kietzmann, 2017) (рис. 1.10, *a*). Зонам 1, 2 и 3 печеночного ацинуса в классической дольке соответствуют портальная, промежуточная и центральная зоны.

Давление кислорода в перипортальной зоне превышает таковое в центральной зоне более чем в 2 раза (Kietzmann, 2017; Lee-Montiel et al., 2017) (рис. 1.10, *b*). Перипортальные гепатоциты, как более «аэробные», обладают большим митохондриальным объемом (20 % v/v) и площадью крист (33000 мкм<sup>2</sup>) по сравнению с клетками из перицентральной зоны, митохондриальный объем у которых составляет 12 % v/v, а общая площадь крист 23000 мкм<sup>2</sup> (Arias et al., 2020). Как следствие, у перипортальных гепатоцитов более высокая скорость дыхания и окислительное фосфорилирование (Sell, 2001).

Градиент концентраций кислорода, субстратов и гормонов, существующий между различными зонами дольки печени, естественно, отражается на обмене глюкозы и гликогена в гепатоцитах, расположенных в этих зонах (рис. 1.10, *в*). У перипортальных клеток выше способность к синтезу глюкозы путем глюконеогенеза. Соответственно, у них более высокая активность Г-6-Фазы (Teutsch et al., 1999), фруктозо-1,6-дифосфатазы (Schmidt et al., 1978) и фосфоенолпируваткарбоксикиназы (Wimmer et al., 1990). В перивенозных гепатоцитах идет интенсивный гликолиз, что проявляется, в частности, в высоком содержании и активности ГК (Toyoda et al., 1995).

Полагают, что перипортальный гликоген синтезируется преимущественно из глюконеогенных предшественников, а перивенозный гликоген — непосредственно из глюкозы (Jungermann, Katz, 1989; Jungermann, Kietzmann, 1997). Вопрос о том, в какой зоне дольки начинается синтез гликогена после приема пищи, и с какой скоростью он протекает в разных зонах, остается открытым. Показано, однако, что перипортальные гепатоциты быстрее накапливают гликоген после кормления голодных крыс смесью глюкозы и фруктозы (Kudryavtseva et al., 1992). Известно также, что в постабсорбтивном периоде содержание гликогена в гепатоцитах портальной зоны нормальной печени человека и крыс выше по сравнению с клетками центральной зоны (Kudryavtseva et al., 1996; Kudryavtseva et al., 2001б).

Гепатоциты сильно отличаются по содержанию гликогена. Различная активность ферментов и концентрация субстратов метаболизма гликогена в индивидуальных клетках играют, по-видимому, наиболее значительную роль в дисперсии клеток по содержанию гликогена. Однако гетерогенность гепатоцитов по уровню плоидности,

размеру и пролиферативной активности также может вносить существенный вклад и влиять на их функциональную активность. Исследование *in situ* показало, что во время синтеза ДНК в гепатоцитах крысят уровень гликогена в клетках разной ploидности падает примерно на 26 %, относительно клеток, находящихся в G<sub>0+1</sub>-фазе клеточного цикла. По мере прохождения гепатоцитами S-фазы клеточного цикла содержание в них гликогена постепенно уменьшается (Шалахметова и др., 1981). Установлено также, что содержание гликогена в одноядерных и двуядерных гепатоцитах различной ploидности в ходе постнатального онтогенеза (Кудрявцева, Шалахметова, 1979; Шалахметова и др., 1981) и в регенерирующей печени крыс (Майтесян, 1983) соответствует их степени ploидности. Однако зависимость содержания гликогена в гепатоцитах от уровня их ploидности исследована лишь для одного вида млекопитающих — крыс. Подобные данные для других видов, в частности, человека, отсутствуют. Кроме того, неясно, зависит ли данная закономерность от пищевого статуса организма и сохраняется ли на разных фазах глюкозного гомеостаза.

Роль размера гепатоцитов на их функцию гораздо менее ясна, чем роль пролиферативной активности и ploидности. Размер клеток — это фундаментальный параметр, оказывающий существенное влияние на общий план строения клеток и их функцию (Jorgensen, Tyers, 2004). Однако подавляющее большинство исследований влияния размера клеток на их функциональную активность посвящено ионозависимым изменениям функции.

Показано, что набухание и обезвоживание гепатоцитов вызывают изменения в потреблении кислорода, продукции глюкозы, скорости глюконеогенеза и гликолиза, активности ключевых ферментов углеводного обмена в этих клетках (Hallgren et al., 2003; Krumschnabel et al., 2003). В целом, гидратация клеток стимулирует анаболические процессы и пролиферацию, а обезвоживание ведет к усилению катаболизма и повышает чувствительность к апоптозу (Schliess, Häussinger, 2003). Быстрые изменения размера гепатоцитов, вызванные их набуханием или дегидратацией, невелики по амплитуде (около 35 %) и не сопровождаются изменениями в клетках количества органоидов и различных структур (Espelt et al., 2008). Напротив, вариабельность массы (размера) гепатоцитов в печени млекопитающих гораздо более масштабная. Так сухая масса и содержание белка в индивидуальных гепатоцитах равной ploидности могут различаться в несколько раз (Завадская и др., 1989; Богданова и др., 1990). Есть предположение, что



количество гликогена, которое может накапливаться в гепатоцитах, сильно зависит от их размера, т.е. чем больше клетка, тем большее количество гликогена она может откладывать в своей цитоплазме (Newsholme, Start, 1975). Вместе с тем, данные, подтверждающие или опровергающие эту гипотезу, до сих пор отсутствуют.

## **1.5. Хронические патологии, связанные с нарушением метаболизма, содержания и структуры гликогена в печени**

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

### **1.5.1. Врожденные болезни, связанные с нарушением метаболизма гликогена**

Гликогеновые болезни (ГБ) или гликогенозы представляют группу генетически обусловленных заболеваний и характеризуются недостаточностью одного из ферментов, связанных с синтезом или деградацией гликогена (рис. 1.11).

Принцип классификации ГБ основан на дефиците какого-либо фермента метаболизма гликогена и типе ткани, в которой он отсутствует. Всего в настоящее время известны двенадцать различных ГБ (Chandramouli et al., 2015; Curtino, Aon, 2019), которые в основном проявляются в эпизодах гипогликемии и гепатомегалии, но варибельность характерных черт этих болезней очень велика.

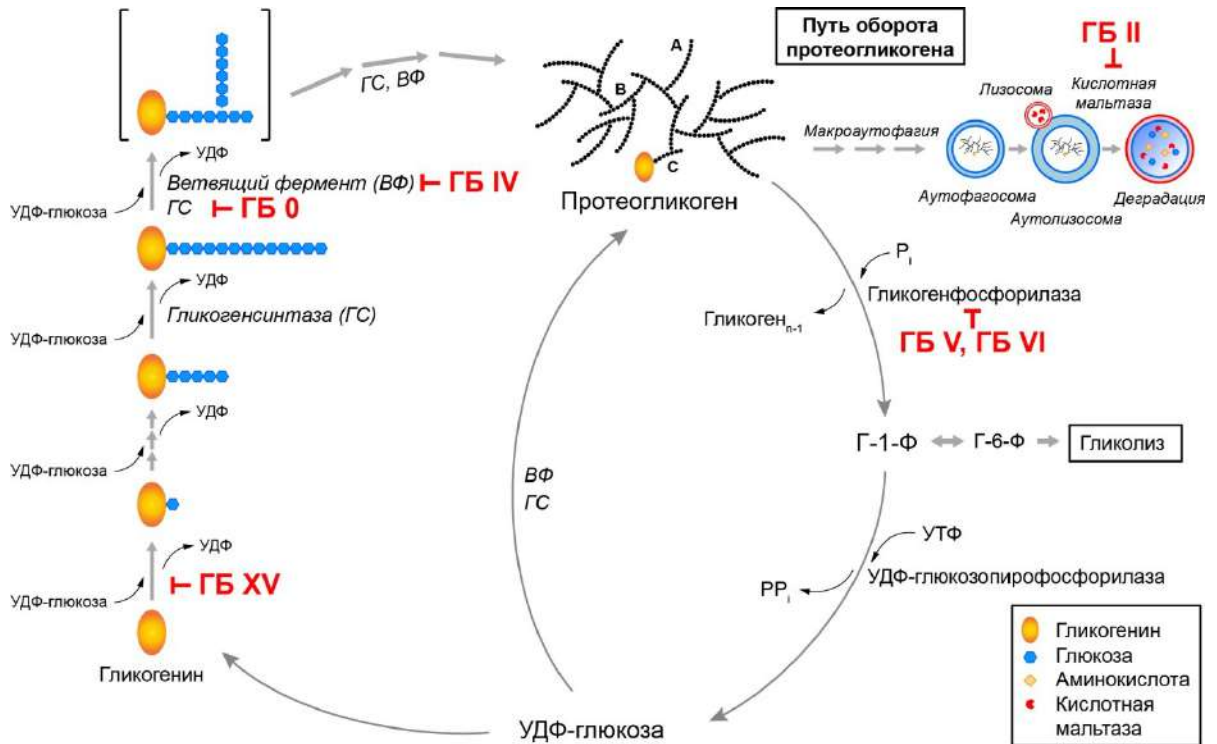


Рисунок 1.11 — Биогенез гликогена и врожденные дефекты его метаболизма, вызывающие гликогеновые болезни у людей (Curtino, Aon, 2019).

Около 80 % всех ГБ печени составляют ее типы I, m, K и n (Ozen, 2007; Curtino, Aon, 2019). Наиболее известными из них являются болезнь Гирке (тип I) и болезнь Кори (тип m). Болезнь Гирке обусловлена дефицитом Г-6-Фазы. Для печени больных ГБ I типа характерны набухшие гепатоциты с цитоплазмой, слабо окрашивающейся на гликоген, но с ядрами, содержащими большое его количество. Болезнь Кори приводит к потере амило-1,6-гликозидазы и вызывает избыточное накопление гликогена с неправильной структурой, что негативно сказывается на функции гепатоцитов. ГБ m-типа составляет около 24 % от всех случаев гликогеновых болезней (Ozen, 2007).

### 1.5.2. Нарушения метаболизма гликогена ненаследственной природы

В сравнении с невысокой (0,002–0,005 %) частотой встречаемости наследственных нарушений, частота приобретенных заболеваний печени, связанных с серьезными отклонениями в обмене глюкозы и гликогена, исключительно высока. Они представляют значительную угрозу здоровью человека, а также экономике многих стран. В Китае, например, заболеваниями печени страдают более 300 млн. жителей (Wang et al., 2019). Среди заболеваний с высокой степенью распространенности стоит



отметить неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП). Около 20–25% случаев НАЖБП классифицируется как неалкогольный стеатогепатит, который зачастую приводит к развитию фиброза, цирроза печени (ЦП) и гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) (Prikhodko et al., 2022).

Однако наиболее глобальными, тяжелыми и опасными для жизни человека болезнями печени являются хронические гепатиты (ХГ) различной этиологии и сахарный диабет (СД).

Хронические гепатиты, терминальной стадией которых является ЦП — широко распространенные заболевания человека и животных. Основными причинами ХГ являются неумеренное употребление алкоголя и лекарственных препаратов, а также заражение через кровь различными вирусами (В, С, D, E и др.) из семейства *Нерадnaviridae* (Mauss et al., 2015). Только носителей этих вирусов насчитывается в мире около 2,3 миллиарда человек (Jefferies et al., 2018). Считается, что алкогольный и «лекарственный» гепатиты являются причиной ЦП у более половины больных ХГ, а вирусный гепатит, как этиологический фактор, ответственен за 10–24 % случаев развития ЦП (Шерлок, Дули, 2002). ЦП представляет собой тяжелое необратимое заболевание и нередко заканчивается летальным исходом. Ежегодная смертность от него составляет ~ 1,16 млн человек (Asrani et al., 2014). Предполагают, что компенсированный ЦП часто протекает незамеченными в течение длительного периода времени и «гистологический» цирроз может иметь до 1% популяции (Schuppan, Afdhal, 2008).

При ЦП происходит гибель гепатоцитов, узелковая трансформация паренхимы и образование фиброзных септ, соединяющих систему портальных сосудов с системой печеночных вен, а его главными диагностическими признаками считают фиброз большей части паренхимы, выраженную регенерацию печеночной ткани, необычно мелкие портальные тракты и избыточное количество центральных вен в дольках, нарушение дольковой структуры органа (Shuppan, Adfhal, 2008; Оковитый и др., 2010). Нужно отметить, что при всей полиэтиологичности повреждений печени основные звенья ее патогенеза сходны между собой (табл. 1.2) (Оковитый и др., 2022).

Таблица 1.2 — Основные патогенетические механизмы развития острых и хронических заболеваний печени.

Заболевания		Ведущий патогенетический механизм
Вирусные гепатиты	Острый и хронический вирусный гепатит В	Цитолиз гепатоцитов связан с активностью Т-киллеров (при наличии HBsAg и HBeAg)
	Острый и хронический вирусный гепатит С	Прямой цитотоксический эффект вируса; иммунный цитолиз
	Острый и хронический вирусный гепатит D	
Аутоиммунный гепатит	Первичный билиарный цирроз печени	Аутоантителозависимая цитотоксичность — иммуноопосредованные некрозы гепатоцитов при аутоиммунном гепатите или холангиоцитов при первичном билиарном циррозе печени
Лекарственные и алкогольные поражения печени	Жировая дистрофия печени без некрозов Острый гепатит, стеатогепатит	Блокада ферментов, участвующих в синтезе липопротеидов, фосфолипидов и др. Усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран гепатоцитов с накоплением высокоактивных форм и соединений кислорода; блокада ферментов, участвующих в детоксикационной функции печени (цитохром P-450 и др. микросомальные ферменты)
Болезнь Вильсона–Коновалова, гемохроматоз		Усиление ПОЛ, активация фиброгенеза
Циррозы печени		Соответствует этиологическому фактору; активация фиброгенеза; аутоантителозависимая цитотоксичность; нарушение системы микросомального окисления

Непрерывная гибель клеток в ходе развития патологического процесса в печени стимулирует регенераторный ответ, основными клеточными механизмами которого являются пролиферация, полиплоидизация и гипертрофия гепатоцитов (рис. 1.12) (Goss, 1966; Богданова и др., 1990; Сакута, Кудрявцев, 2005).

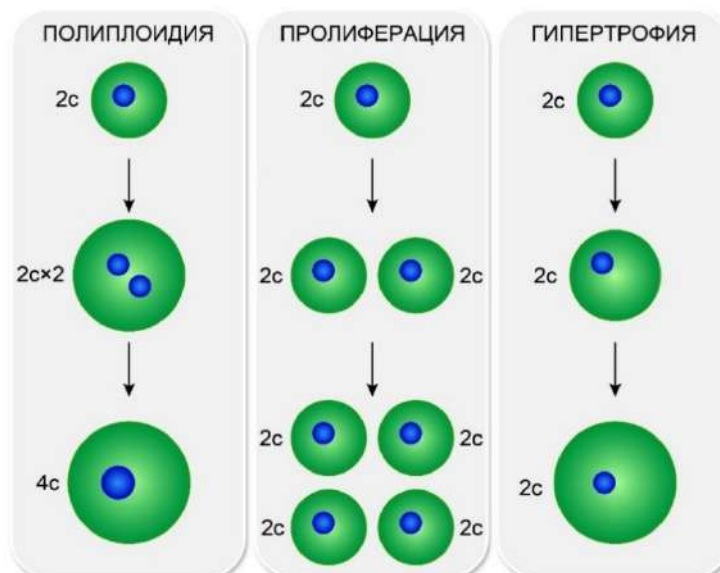


Рисунок 1.12 — Клеточные механизмы регенерации печени (Оковитый и др., 2022).

Ведущую роль в репаративном росте печени при повреждающем действии агентов различной этиологии играют процессы, связанные с синтезом ДНК, – пролиферация и полиплоидизация гепатоцитов, которые приводят к увеличению числа клеток и/или количества геномов в клетках. Проллиферативная реакция паренхимы печени при хроническом воздействии гепатотоксинами характеризуется тем, что вероятность прохождения гепатоцитам полного клеточного цикла снижается. В результате незавершенных клеточных делений в паренхиме увеличивается доля клеток с полиплоидными ядрами. Как следствие, средняя ploидность гепатоцитов значительно возрастает (Завадская, 1989; Кудрявцев и др., 1993). При хроническом отравлении крыс гепатотропным ядом  $CCl_4$  репаративный рост печени примерно на 50 % обеспечивается пролиферацией гепатоцитов, на 30 % — полиплоидизацией клеток и на 20 % — гипертрофией их цитоплазмы (Сакута, Кудрявцев, 1996).

Усиление пролиферативной активности гепатоцитов при повреждении печени и повышение уровня их ploидности свойственно не только животным, но и человеку. ХГ и ЦП различной этиологии, жировой гепатоз, внепеченочный холестаз и другие заболевания печени человек также сопровождаются повышением ploидности гепатоцитов (Koike et al., 1982; Карташова, 1985; Fang et al., 1994, Melchiorri et al., 1994). Однако полиплоидизация гепатоцитов патологической печени человека имеет свои особенности: в отличие от печени крыс и мышей, доля  $2c \times 2$ -гепатоцитов при ХГ у человека не снижается, а возрастает по мере усиления тяжести поражения печени. При

этом плоидность гепатоцитов никогда не достигает столь высоких степеней, как у грызунов (Кудрявцев и др., 1982; 1993).

Разрастание фиброзной ткани, нарушение микроциркуляции и дольковой структуры паренхимы печени достигают своего апогея на конечной стадии ХГ и ЦП и приводят к снижению снабжения гепатоцитов кислородом и необходимыми для их жизнедеятельности веществами, вызывая нарушения многочисленных тканеспецифичных функций печени, в т.ч. метаболизма глюкозы и гликогена (Шерлок, Дули, 2002).

Данные о содержании гликогена в печени больных ЦП противоречивы (Owen et al., 1981; Кудрявцева, 1987; Krähenbühl et al., 2003; Кудрявцева и др., 1992). С одной стороны, было показано, что содержание гликогена в гепатоцитах больных ХГ и ЦП после ночного голодания в несколько раз превышает норму и увеличивается по мере усиления тяжести поражения печени (Кудрявцева, 1987; Кудрявцева и др., 1992), а его распределение в портальной и центральной зонах дольки цирротической печени отличается от нормы и у человека зависит от вирусной или алкогольной этиологии заболевания (Kudryavtseva et al., 20016). С другой стороны, было найдено, что содержание гликогена в цирротической печени ниже, чем в норме (Krähenbühl et al., 1991, 2003).

Повышенный уровень гликогена в гепатоцитах может быть связан с изменением активности ГС и ГФ, ключевых ферментов гликогенеза и гликогенолиза. В некоторых работах было показано снижение активности ГС при экспериментальном ЦП (Giardina et al., 1994; Krähenbühl et al., 1996). Однако большинство данных свидетельствуют о том, что ее активность в цирротической печени крысы и человека не отличается от нормы или чуть ниже ее (Krähenbühl et al., 1991; Кудрявцева и др., 1992; Krähenbühl et al., 2003). Данные о скорости гликогенолиза в цирротической печени также немногочисленны и противоречивы. С одной стороны, обнаружено, что деградация гликогена при ЦП быстрее, чем в норме (Krähenbühl et al., 1991), а с другой — медленнее (Petersen et al., 1999). Возможно, противоречивость данных связана с тем, что исследовался материал печени, полученный при различном пищевом статусе организма.

Хроническое повреждение печени приводит к существенным изменениям не только метаболизма гликогена в этом органе, но и углеводного метаболизма в целом. Целый ряд черт углеводного обмена при ЦП, таких, например, как интолерантность

тканей к глюкозе (Mion et al., 1996), снижение активности ГК печени (Aiston et al., 2001; Wu et al., 2005), резистентность клеток к инсулину (Holstein et al., 2002; Garcia-Compean et al., 2009) сближают цирроз с другим широко распространенным и опасным заболеванием — сахарным диабетом (СД). СД — огромная медицинская, экономическая и социальная проблема во многих странах. В 2021 году уровень заболеваемости СД по данным ВОЗ составил более 537 млн человек, это около 10 % населения планеты в возрасте 20–79 лет, а к 2030 году может достигнуть 643 млн (Ogurtsova et al., 2017; IDF Diabetes Atlas 2021). В настоящее время СД занимает 4–е место среди болезней, которые становятся причиной летального исхода, а наиболее распространенным (90–95 % случаев) является диабет 2-го типа. Генетические факторы играют определенную роль в развитии болезни, особенно при СД 1-го типа, но гораздо большее влияние на становление этого заболевания оказывает образ жизни человека, в частности, пища и уровень физических нагрузок (Xu et al., 2018; Zhang et al., 2022).

Гипергликемия и нарушение гормонального статуса, характерные для больных СД, сопровождаются нарушениями метаболизма гликогена в печени. Однако имеющиеся данные о содержании гликогена в гепатоцитах при СД немногочисленны и противоречивы. С использованием  $^{14}\text{C}$ -меченых предшественников было показано, что синтез гликогена при экспериментальном СД у крыс ухудшен (Friedmann et al., 1970; Whitton, Hems, 1975). При этом в печени крыс с СД обнаружено увеличение вклада непрямого пути синтеза гликогена ( $\text{C}_3$ -предшественники  $\rightarrow$  Г–6–Ф  $\rightarrow$  гликоген) по сравнению с прямым путем его образования (глюкоза  $\rightarrow$  Г–6–Ф  $\rightarrow$  гликоген) (Giaccari, Rosetti, 1992). Вместе с тем, исследования на мышах с наследственным и стрептозотоциновым диабетом не выявили отличий в содержании гликогена в «диабетической» печени по сравнению с контрольной (Stearns, Benzo, 1977; Roesler et al., 1990).

Определение концентрации гликогена и скорости его синтеза показало, что перед приемом пищи в печени пациентов с СД 2-го типа она ниже, чем в контрольной группе ( $227 \pm 6$  и  $275 \pm 10$  ммоль/л печени соответственно,  $p < 0,001$ ), также, как и общая скорость синтеза гликогена после приема пищи (Krssak et al., 2004). Схожие данные были получены Магнуссоном с соавт. (Magnusson et al., 1992), которые нашли, что через 4 ч после приема пищи концентрация гликогена в печени пациентов с СД составила  $131 \pm 20$  ммоль/л печени, а в контроле —  $282 \pm 60$  ммоль/л печени ( $p < 0,05$ ).

Данные об активности ключевых ферментов гликогенеза и гликогенолиза при СД также противоречивы. С одной стороны, было найдено, что активность ГС при СД возрастает (Akatsuka et al., 1983; Niewoehner, Nuttall, 1986), а активность ГФ снижается (Gannon, Nuttall, 1990; Magnusson et al., 1992; Hundal et al., 2000). С другой стороны, было показано, что в печени db/db мышей с наследственным СД уровень ГС не отличается от нормы, а общая активность ГФ и активность ГФа повышены. При этом авторы обнаружили изменения в кинетических свойствах этих ферментов при СД (Roesler et al., 1990). Помимо данных, приведенных выше, Голден с соавт. выявили в печени голодных крыс с СД более низкую активность ГС по сравнению с контрольными животными (Golden et al., 1979).

### **1.6. Характеристика популяции гепатоцитов и метаболизма гликогена при регенерации цирротической печени**

Печень обладает уникальной способностью к регенерации после повреждения (Лиознер, 1960; Taki-Eldin et al., 2012; Gilgenkrantz, Collin de l'Hortet, 2018). В экспериментах на грызунах показано, что при удалении 2/3 нормальной печени восстановление ее массы в полном объеме происходит примерно в течение недели (Nadalin et al., 2004; Kele et al., 2012; Forbes, Newsome, 2016). Однако при ЦП масштаб потери паренхимы печени гораздо выше. За время развития экспериментального цирроза происходит гибель гепатоцитов, соответствующая примерно пятикратному весу исходного органа (Peters, 1962; Бродский, Урываева, 1981; Macdonald et al., 1986).

Несмотря на высокий регенераторный потенциал, непрерывное воздействие на печень различными повреждающими агентами приводит к тому, что скорость гибели гепатоцитов становится выше, чем скорость восполнения их популяции. В итоге, оставшееся количество гепатоцитов не способно поддерживать многочисленные специализированные функции печени, и рано или поздно болезнь заканчивается печеночной недостаточностью, которая характеризуется высокой смертностью.

В современной регенеративной медицине для лечения хронических поражений печени используется два основных подхода — клеточная терапия и тканевая или органная инженерия. Клинические испытания показали, что трансплантация гепатоцитов, полученных из различных источников, через воротную вену является

безопасной и эффективной процедурой, но эта процедура приводит лишь к кратковременной частичной коррекции метаболических нарушений (Fox et al., 1998). Второй подход связан с разработкой искусственных тканей печени и приживлением их у пациентов. Терапевтические подходы, использующиеся в тканевой инженерии, включают имплантируемые конструкции печеночной ткани или всего органа (Kholodenko et al., 2016; Camp et al., 2017; Stevens et al., 2017; Gilgenkrantz, Collin de l'Hortet, 2018). Несмотря на перспективность этих методов, очевидно, что их практический результат для терапии цирроза пока неясен.

Многие полагают, что способов полного излечения ЦП в настоящее время не существует, а имеющиеся методы лечения малоэффективны для предотвращения печеночной недостаточности. Считается, что единственным спасительным вариантом остается трансплантация печени. Первая трансплантация печени человеку была произведена в 1963 году американским хирургом Томасом Старзлом. С тех пор количество подобных операций сильно увеличилось. Так в России в 2019 году были проведены 584 пересадки печени. Несмотря на успехи (~ 85% пациентов выживают в течение 1 года и около 70 % живут 5 лет и более) существует значительный разрыв между спросом и предложением. В России, например, средний срок ожидания трансплантации составляет ~ 3,6 года. Как следствие, по крайней мере, около 15 % пациентов умирают, не дождавшись операции (Chistiakov, 2012; Hannoun, 2016). Помимо дефицита донорского органа, высокая стоимость, послеоперационное отторжение трансплантата и необходимость длительного подавления иммунитета являются дополнительными серьезными проблемами, связанными с трансплантацией печени (Duan et al., 2013). Поэтому крайне важно продолжить поиск эффективных и оперативных способов лечения ЦП, альтернативных трансплантации. Однако независимо от того, какими будут эти подходы, они должны учитывать, что обратное развитие цирротических изменений в печени будет возможным лишь при условии устранения причин, вызвавших эти изменения. Кроме того, эти подходы должны основываться на фундаментальном знании клеточных механизмов регенерации в органе, от которых во многом зависит исход и течение заболеваний печени.

Хотя многие считают, что после определенного момента цирротические изменения в печени неумолимо развиваются в сторону завершающей летальной стадии, ряд авторов допускает, что ЦП может быть обратим (Солопаев, 1963; Саркисов, 1970).

Эта оптимистическая точка зрения основана на том, что в случае устранения причины заболевания, цирротические изменения в печени становятся обратимыми или, по крайней мере, могут подвергаться нормализации. Такая позиция базируется на трех предпосылках. Во-первых, на чрезвычайно высокой способности печени млекопитающих к регенерации, протекающей по типу компенсаторной гипертрофии. Даже после нескольких повторных частичных резекций печени, после которых суммарная масса удаленной ткани превышает исходный в 3–3,5 раза, орган способен достаточно быстро и полно восстанавливать свою дооперационную массу (Моносзон, 1968; Бобылева, Ладыгина, 1975). Во-вторых, на огромных компенсаторных потенциях печени, подтвержденных наблюдениями в эксперименте и в клинике (Давыдовский, 1969; Саркисов и др., 1983; Callea et al., 1991). В-третьих, о возможности "обратного развития" патологических изменений свидетельствуют экспериментальные и клинические данные о том, что после прекращения повреждающего воздействия печень способна восстанавливать свои морфологические и функциональные параметры. При определенных условиях избыточный рост соединительной ткани становится обратимым (Солопаев, 1963; Саркисов, 1970). Показано, что дистрофические и некротические изменения в цирротической печени обратимы и исчезают после устранения патогенного фактора в результате интенсивной пролиферации гепатоцитов (Колпащикова, Алымов, 1970; Саркисов, 1974). В случае экспериментального ЦП после устранения гепатотоксического воздействия наблюдалась определенная нормализация структуры и функции органа (Tarao et al., 1993; Mera et al., 1994; Szende et al., 1994).

Анализ кинетики популяции гепатоцитов через 6 мес после прекращения повреждающего воздействия показал, что средний уровень плоидности гепатоцитов снижался, но оставался на 25 % выше контрольного, а содержание белка у крыс, перенесших цирроз, сопоставимо с нормой. Расчеты показали, что постциррозная регенерация печени осуществляется почти исключительно за счет пролиферации гепатоцитов. При этом полного восстановления структуры и состава клеточной популяции паренхимы не происходит (Сакута, Кудрявцев, 1996). Стоит также отметить, что некоторые функциональные показатели углеводного обмена печени — уровень гликогена в клетках, активность ГФ и ГС — после прекращения воздействия на крыс  $CCl_4$  восстанавливаются быстрее и в более полном объеме (Сакута, Кудрявцев, 1996).



Экспериментальные данные и клинические наблюдения показали, что обратимость структурных и патологических изменений в цирротической печени во многом зависит от степени повреждения органа и при далеко зашедшем патологическом процессе, нормализация этих изменений, по-видимому, невозможна (Okazaki, Maruyama, 1985; Саркисов и др., 1995). С другой стороны, слабая обратимость цирротических изменений может быть обусловлена недостаточной эффективностью регенерации патологического органа. Поэтому можно предположить, что при ее усилении появится возможность повышения полноты восстановления структуры и функции печени.

Репаративная регенерация патологической печени направлена в первую очередь на нормализацию стромально-паренхиматозных взаимоотношений и может происходить как путем увеличения объема функционирующей паренхимы, так и путем резорбции избыточного коллагена. Недостаточность репаративной регенерации может служить предпосылкой для хронизации патологического процесса в органе (DuBois, 1990; LaBrecque, 1994). В связи с этим, важно найти не только способы стимуляции регенеративной активности, но также выявить объективные показатели степени восстановления структуры и функции патологически измененной печени после терапевтического воздействия.

К сожалению, в большинстве исследований регенераторного потенциала и степени обратимости патологических изменений поврежденной печени, основное внимание обращается на динамику структурных изменений в паренхиме, в то время как адекватные характеристики тканеспецифической функциональной активности органа, за исключением некоторых косвенных клинических показателей, практически не изучались. Между тем, только прямые исследования непосредственно на гепатоцитах, которые ответственны за выполнение основных, жизненно важных функций печени, могут дать объективное представление о полноте восстановления этого органа после его повреждения.

Таким образом, имеющиеся в настоящее время данные свидетельствуют о том, что даже через длительное время после устранения патогенного воздействия, несмотря на существенное улучшение показателей структуры ткани и клеточного состава паренхимы, полной нормализации ее структуры и функции не происходит. Поэтому дальнейший поиск методов и условий для успешной терапии цирротической печени и

глубокое понимание механизмов поддержания тканеспецифичных функций в патологически измененном органе представляются крайне актуальными задачами. В частности, это относится к важнейшей функции печени, связанной с синтезом и деградацией гликогена в клетках ее паренхимы.

### 1.7. Структура молекул гликогена. $\alpha$ - и $\beta$ -частицы. Их роль в метаболизме гликогена

Содержание гликогена в гепатоцитах, помимо скоростей его синтеза и распада, определяется также количеством и размером его молекул ( $\beta$ -частиц гликогена) в клетках. Между тем, механизмы формирования и деградации молекул гликогена, динамики их состава и числа в норме и при патологии, роль структурных изменений молекул гликогена в регуляции гликогенеза и гликогенолиза во многом остаются неизвестными.

В различных типах клеток млекопитающих гликоген в основном диффузно распределен в цитоплазме, нередко локализован рядом с гладким эндоплазматическим ретикуломом и вблизи митохондрий (Nielsen et al., 2010) и, по-видимому, может присутствовать в ядрах (Bennett et al., 2008; Levene, Goldin, 2010). Его объем в цитоплазме гепатоцитов варьирует от 0,5 до 19 %, в зависимости от степени сытости организма (Reith et al., 1973). В гепатоцитах гликоген может находиться в виде двух типов гранул:  $\beta$ -частиц (молекул) и  $\alpha$ -частиц, состоящих из нескольких десятков  $\beta$ -частиц (Devos et al., 1983; Sullivan et al., 2014; Deng et al., 2016) (рис. 1.13).

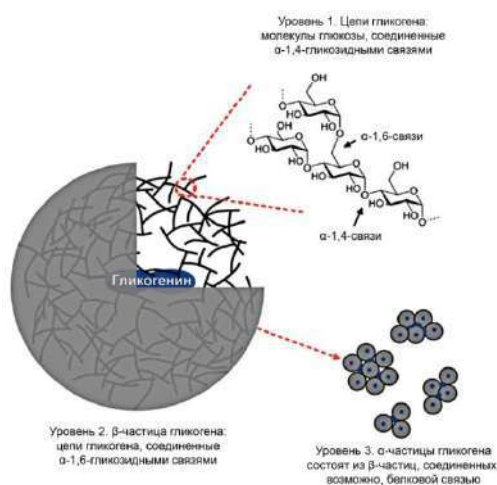


Рисунок 1.13 — Схематическое изображение трех уровней структуры гликогена (Li, Hu, 2020).

В виде отдельных, свободно лежащих в цитоплазме  $\beta$ -частиц гликоген также присутствует в скелетных мышцах и некоторых других тканях; их молекулярный вес составляет  $\sim 10^7$  Да (Wanson, Drochmans, 1968).  $\alpha$ -частицы характерны только для гепатоцитов. Они представляют собой комплекс из 20–40 ковалентно-связанных  $\beta$ -частиц и на электронограммах выглядят как «розетки» различного размера (рис. 1.14). Диаметр  $\alpha$ -частиц может достигать 200–300 нм (Devos et al., 1983; Sullivan et al., 2010).

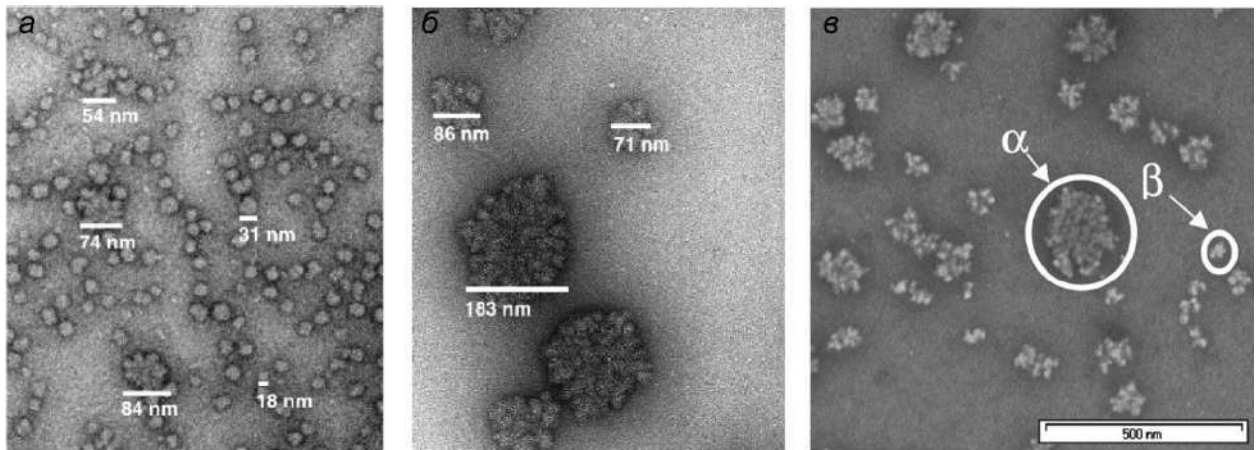


Рисунок 1.14 — Электронограммы частиц гликогена, изолированных из морского брюхоногого моллюска *Crepidula fornicata* (а), печени крысы (б) и печени мыши (в). Гликоген моллюска преимущественно состоит из  $\beta$ -частиц диаметром около 20 нм, а гликоген печени крысы — из  $\alpha$ -частиц (средний диаметр  $\sim 100$  нм) а, б – Sullivan et al., 2010; в – Li, Hu, 2020.

Наличие или отсутствие  $\alpha$ -частиц в ткани может определять порядок деградации гликогена. Считается, что в печени, где много  $\alpha$ -частиц, он упорядочен, тогда как в жировой ткани, где гликоген содержится преимущественно в виде  $\beta$ -частиц, этот процесс идет случайным образом (Devos, Hers, 1980). В гепатоцитах предполагают наличие двух популяций частиц гликогена. Одна из них представлена преимущественно растущими частицами, связанными с ГС. Они присутствуют в клетке при низких концентрациях гликогена, а их количество ограничено. Вторую популяцию составляют частицы, которые достигают своих максимальных размеров и, в принципе, их число не лимитировано (Devos et al., 1983).

Природа связей, удерживающих  $\beta$ -частицы друг с другом при образовании  $\alpha$ -частиц, неясна. Было показано, что эти связи не являются водородными или ионными (Orrell, Bueding, 1964). Накамура полагал, что  $\beta$ -частицы соединяются между собой  $\alpha$ -1,4-гликановыми цепями (Nakamura, 1977). При обработке гликогена 2-меркаптоэтанолом или протеазой размер и форма частиц не менялся, следовательно,

белки, по-видимому, также не обеспечивают связи  $\beta$ -частиц друг с другом при формировании  $\alpha$ -частиц (Hata et al., 1984). Исследование зависимости среднего размера  $\beta$ -частиц гликогена, обработанных диметилсульфоксидом, от концентрации LiBr также показало отсутствие водородных связей или белок-белковых взаимодействий при формировании  $\alpha$ -частиц (Sullivan et al., 2010). Одно из последних предположений заключается в том, что в образовании и стабилизации  $\alpha$ -частиц участвует негликозилированный гликогенин (рис. 1.15) (Tan et al., 2018).

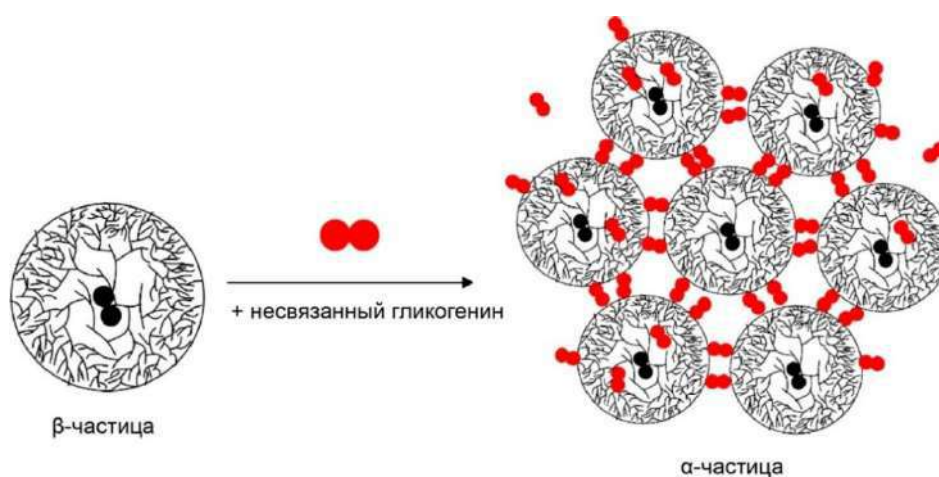


Рисунок 1.15 — Гипотетическая модель сборки  $\alpha$ -частиц гликогена. Гликогенин (праймер) присутствует в ядре всех  $\beta$ -частиц (черный цвет). Негликозилированные димеры гликогенина (красный цвет) нековалентно связывают терминальную  $\alpha$ -(1→4) глюкозу на поверхности  $\beta$ -частицы и таким образом соединяют соседние  $\beta$ -частицы, делая  $\alpha$ -частицы устойчивыми (Tan et al., 2018).

Общее содержание гликогена в клетках печени, т.е. количество его  $\alpha$ - и  $\beta$ -частиц, колеблется в определенных границах и зависит от физиологического состояния организма (Devos et al., 1983; Rybicka, 1996; Sullivan et al., 2010). Данные о распределении частиц гликогена в печени мышей по размеру во время его синтеза, деградации и в период голодания, полученные с помощью эксклюзионной хроматографии, позволили сформулировать «рециклирующую» модель метаболизма гликогена (Sullivan et al., 2014).

Прием пищи повышает концентрацию глюкозы в крови и возникает необходимость в синтезе большого количества гликогена. По мнению авторов модели, формирование в это время (стадии раннего и позднего синтеза) небольших, по сравнению с  $\alpha$ -частицами,  $\beta$ -частиц увеличивает отношение площади поверхности к объему, тем самым повышает сродство ГФа к гликогену и облегчает включение

глюкозы в гликоген (рис. 1.16). В ходе синтеза гликогена  $\alpha$ -частицы, оставшиеся от предыдущего суточного цикла, распадаются на отдельные  $\beta$ -частицы. Если бы этого не происходило, то  $\alpha$ -частицы гликогена, которые не деградировали в течение одного суточного цикла, продолжали бы расти в ходе следующей фазы синтеза, а их средний размер с каждым днем становился бы все больше и больше. Однако этого не наблюдается (Sullivan et al., 2014).

В постабсорбтивном периоде, после завершения синтеза гликогена, происходит медленный выход глюкозы в кровь. Контроль за этим процессом достигается путем объединения  $\beta$ -частиц в более крупные  $\alpha$ -частицы (рис. 1.16). Дегградация гликогена (стадии раннего и позднего распада) в первую очередь затрагивает относительно более мелкие  $\beta$ -частицы и в меньшей степени крупные  $\alpha$ -частицы (Sullivan et al., 2014). Подобный вывод подтверждается тем, что ГФ проявляет большую активность в гликогене с меньшим молекулярным весом (Stetten, Stetten, 1958).

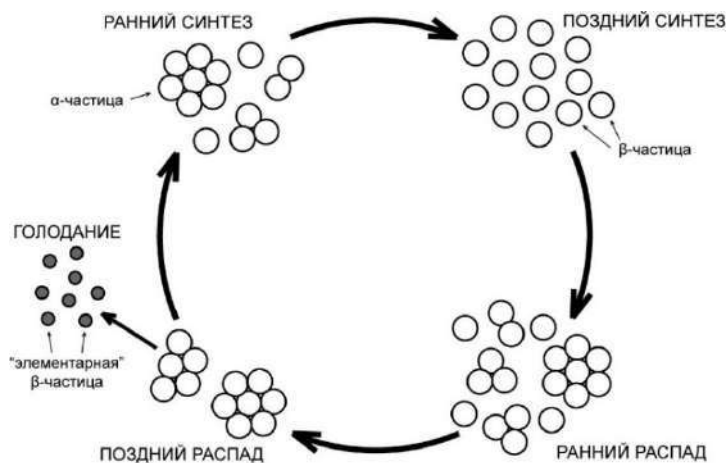


Рисунок 1.16 — Изменения структуры гликогена в печени мышей в течение суток и при голодании (Vezborodkina et al., 2018).

Данные по включению меченой глюкозы в гликоген также указывают на то, что скорость метаболизма более крупных частиц ниже, чем мелких. Дегградация  $\alpha$ -частиц на стадии раннего синтеза сопровождается появлением  $\beta$ -частиц. И этот факт говорит о важной роли площади поверхности молекул гликогена в контроле их дегградации (Geddes, Stratton, 1977).

Интересной особенностью частиц гликогена во время голодания является их небольшая величина и низкий уровень дисперсии по размеру (рис. 1.17). Возможно, это обстоятельство играет энергосберегающую роль. Формирование молекул гликогена *de*

*novo* после поступления пищи требовало бы гораздо больших затрат энергии и больше времени, нежели сохранение в клетках небольших «элементарных» молекул гликогена, к которым может быстро присоединяться большое количество новых остатков глюкозы (Sullivan et al., 2014).

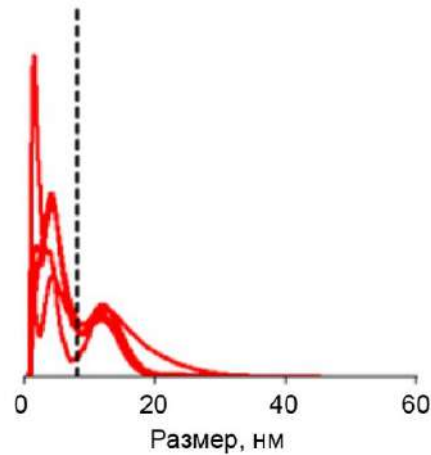


Рисунок 1.17 — Распределение размеров частиц гликогена в печени мышей после 16 ч голодания. Пунктирная линия отделяет пики гликогена от пиков загрязнения (Sullivan et al., 2014).

Характеристики  $\alpha$ -частиц могут отличаться не только в норме, но и при различных заболеваниях. Например, способность к образованию  $\alpha$ -частиц в гепатоцитах у мышей с диабетом ниже, чем у контрольных животных. При этом  $\alpha$ -частицы диабетических мышей более устойчивы к деградации (Gilbert, Sullivan, 2014). Найдено также, что гликоген здоровых мышей имеет бóльшую пропорцию крупных частиц с бóльшим количеством плотно связанных между собой  $\beta$ -частиц, чем гликоген мышей с диабетом (Sullivan et al., 2011).

Со времени открытия гликогена (1857) прошло более 160 лет. За это время достигнуты серьезные успехи в изучении его метаболизма (Roach, 2002; Jensen, Richter, 2012; Zois, Harris, 2016; Petersen et al., 2017). На основании результатов химического анализа по определению длины цепей остатков глюкозы, характера ветвления цепей и распределению молекулярной массы гликогена, изолированного из тканей различных организмов (Gunja-Smith et al., 1970; Goldsmith et al. 1982; Geddes, 1985; Melendez-Hevia et al., 1993; Melendez et al., 1997), а также при использовании данных электронной микроскопии по оценке размера  $\beta$ -частиц (Wanson, Drochmans, 1968) подробно описана структура полисахаридной части молекул гликогена.



Основу молекулярной структуры гликогена составляют остатки D-глюкозы, связанные между собой  $\alpha$ -(1→4) гликозидными связями в цепи, ветвящиеся в результате образования  $\alpha$ -(1→6) связей. Анализ гликогена, изолированного из различных тканей млекопитающих, показал, что длина цепей глюкозных остатков варьирует в небольших пределах и, в среднем, составляет ~ 13 остатков (Melendez-Hevia et al., 1993; Melendez et al., 1997).

На сегодняшний день существуют две основные структурные модели гликогена — Мейера-Бернфельда (Meyer, Bernfeld, 1940) и Уилана (Whelan, 1971). Согласно Мейеру, рост цепей глюкозных остатков происходит равномерно, а нередуцирующие концы всех цепей располагаются на поверхности молекулы. В модели Уилана, как и у Мейера, общее число А-цепей (неразветвленных) примерно равно числу В-цепей (разветвленных), но на поверхности молекулы располагаются только А-цепи. Уилан допускал также присутствие в молекуле гликогена «скрытых» А-цепей. Позднее вывод Мейера и Уилана о приблизительно одинаковом количестве неразветвленных и разветвленных цепей в молекуле гликогена был подтвержден, а «скрытые» А-цепи внутри молекулы обнаружены не были (Goldsmith et al., 1982). Согласно модели Уилана к каждой В-цепи присоединяются две другие цепи и в ходе поступательного ветвления, их количество увеличивается в геометрической прогрессии (рис. 1.18) (Bezborodkina et al., 2018).

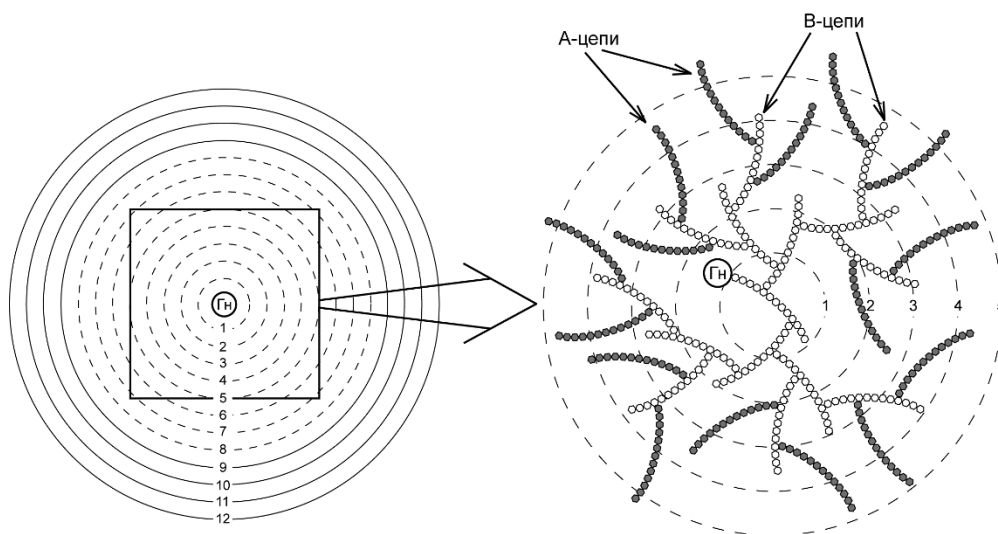


Рисунок 1.18 — Структура гликогена согласно модели Уилана. Полная молекула гликогена ( $\beta$ -частица) имеет сферическую форму с 12 концентрическими ярусами глюкозных остатков. В центре частицы находится самогликозилирующийся белок гликогенин (Гн) (Bezborodkina et al., 2018).

При этом все неразветвленные цепи располагаются на внешнем ярусе<sup>\*)</sup>  $\beta$ -частицы (Goldsmith et al., 1982; Roach et al., 2012). В результате число цепей на ярусе  $n$  вдвое превышает число цепей на ярусе  $n - 1$ , а число наружных А-цепей на ярусе, наиболее удаленном от центра частицы, равно сумме всех В-цепей, расположенных внутри частицы ( $2^n = \sum 2^{n-1}$ ). В этом случае следовало ожидать, что ГФ в ходе каждого цикла расщепления будет удалять половину остатков глюкозы, содержащихся в А-цепях на внешнем ярусе  $\beta$ -частицы. Оказалось, однако, что ГФ удаляет менее 50 % остатков глюкозы внешнего яруса, оставляя на А-цепях нетронутый «огрызок» из 4-х остатков глюкозы, размер которого, по-видимому, слишком мал для действия фермента (Walker, Whelan, 1960). Тем не менее, структура молекулы гликогена позволяет ГФ быстро ввести в метаболический оборот около трети ( $50 \% \times 9/13 = 34,6 \%$ ) всех остатков глюкозы в молекуле даже без участия деветвящего фермента (Shearer, Graham, 2002; Graham et al., 2010).

Математическое моделирование структуры  $\beta$ -частицы позволило предсказать ее максимальный размер, выше которого дальнейший рост невозможен. Если бы молекула гликогена содержала не 12, а 13 ярусов, плотность расположения глюкозных остатков на поверхности молекулы стала бы настолько высокой, что вызвала бы стерические препятствия для функционирования каталитических участков ГС и ГФ (Goldsmith et al., 1982; Melendez-Navia et al., 1993). Ранее к схожей мысли пришли Мадсен и Кори (Madsen, Cori, 1958). Исходя из этого, был сделан вывод о том, размер молекулы гликогена регулируется особенностями ее собственной структуры.

Таким образом, 12-ярусная структура  $\beta$ -частицы оказывается оптимальной по следующим причинам: максимальное количество глюкозы запасается в наименее возможном объеме; большое число нередуцирующих концов на внешнем ярусе позволяет ГФ с высокой скоростью расщеплять гликоген даже без участия ветвящего фермента и максимально быстро обеспечивать клетки необходимым «топливом».

---

<sup>\*)</sup> Ярус - сферическое пространство, которое занимают цепи остатков глюкозы, образованные последовательным ветвлением В-цепей и находящиеся на равном расстоянии от центра частицы. 1-й ярус соответствует пространству, занимаемому «затравочной» цепью, образованной при самогликозилировании гликогенина; 2-й ярус соответствует пространству, которое занимают две цепи остатков, образованные в результате ветвления затравочной цепи; Пространство 3-го яруса включает 4 цепи, образованные путем ветвления двух цепей остатков глюкозы на предыдущем (2-ом ярусе) и т.д.



Теоретически структуру молекул гликогена можно описать всего тремя параметрами, а именно, степенью ветвления ( $r$ ), числом ярусов ( $t$ ) и числом остатков глюкозы в каждой цепи ( $g_c$ ) (табл. 1.3) (Bezborodkina et al., 2018).

Таблица 1.3 — Распределение остатков глюкозы в  $\beta$ -частице гликогена.

№ яруса	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Число остатков глюкозы/ярус	13	26	52	104	208	416	832	1664	3328	6656	13312	26624
Число цепей/ярус	1	3	7	15	31	63	127	255	511	1023	2047	4095
Общее число остатков глюкозы	13	39	91	195	403	819	1651	3315	6643	13299	26611	53235

Значения этих параметров при расчете структуры молекул гликогена составляют:  $r = 2$  (Melendez et al., 1997),  $t_{\max} = 12$  (Melendez et al., 1998) и  $g_c = 13$  (Melendez-Hevia et al., 1993). Организмы разного эволюционного уровня развития (от бактерий до человека) имеют очень близкие значения параметров гликогена (Melendez-Hevia et al., 1993; Melendez et al., 1997). Такое сходство свидетельствует, с одной стороны, о древности структуры гликогена, оптимальность которой эволюция шлифовала на протяжении многих сотен миллионов лет, а с другой — о высокой надежности теоретических представлений о структуре гликогена, основанных на расчетах с использованием названных параметров.

Имеющиеся данные позволяют заключить, что полностью сформированная молекула гликогена ( $\beta$ -частица) имеет следующие структурные параметры:

- диаметр 42–44 нм (Wanson, Drochmans, 1968);
- молекулярный вес  $\sim 10^7$  Да (Wanson, Drochmans, 1968; Geddes, 1986); общее число остатков глюкозы  $\sim 55000$  ( $10^7/180$  – Mr глюкозы);
- отношение числа А-цепей к числу В-цепей  $\sim 1:1$  (Marshall, 1974);
- состоит из 12-ти ярусов остатков глюкозы (Melendez et al., 1997; Goldsmith et al., 1982; Melendez-Hevia et al., 1993), соединенных  $\alpha$ -1-4- и  $\alpha$ -1-6- гликозидными связями. Последние равномерно распределены внутри частицы и составляют 7–10 % от всех гликозидных связей в молекуле (Shearer, Graham, 2002); расстояние между ярусами  $\sim 1.9$  нм (Goldsmith et al., 1982; Shearer, Graham, 2004);

– включает ~ 4095 цепей остатков глюкозы (на 12-ом ярусе ~ 2048 А-цепей), каждая из которых состоит из 13-ти остатков глюкозы (Gunja-Smith et al., 1970; Melendez-Nevia et al., 1993; Melendez et al., 1997). Внутренние В-цепи имеют по две точки ветвления, расположенные на расстоянии не менее 4-х остатков друг от друга (Goldsmith et al., 1982; Whelan, 1971).

Поскольку гликоген не обладает кристаллической структурой, методы рентгеноструктурного анализа к нему не применимы. Тем не менее, известно, что полимерная глюкоза, в принципе, способна формировать спиралевидные структуры. Гептамер глюкозы может образовывать левозакрученную спираль с 6,5 остатками глюкозы на оборот и подъемом на остаток 2,4 Å (Goldsmith et al., 1982), а циклический полимер из 26 остатков глюкозы, может формировать двойную спираль (Gessler et al., 1999). Теоретически, наружные А-цепи в β-частице гликогена должны содержать 13 остатков глюкозы, но в действительности из-за постоянного и быстрого оборота гликогена, такая ситуация маловероятна. Например, средняя длина наружных цепей в гликогене из печени человека составляет 7,7 остатков глюкозы (Mercier, Whelan, 1970). Поэтому присутствия спиралевидных структур в больших молекулах гликогена с сильным ветвлением цепей исключить нельзя.

Повторяемость, самоконтроль и самоподобие структуры гликогена на каждом уровне формирования β-частицы дало основание считать ее фракталом (Melendez et al., 1999). Фрактальная структура позволяет быстро создавать и расщеплять молекулу, а также обеспечивает простой механизм регуляции метаболических потоков (Melendez-Nevia et al., 1994). Важное следствие фрактальной структуры гликогена — стабильность его молекулы. Сферическая форма способствует максимуму потенциальной энергии на поверхности в виде глюкозных остатков, предельно увеличивает на поверхности число водородных связей и, в результате, еще более усиливает стабильность молекулы (Melendez et al., 1999).

По традиции гликоген называют полисахаридом или гликаном. Однако, помимо остатков глюкозы, в состав гликогена входят многочисленные белки его метаболизма, в том числе выполняющие регуляторную и каркасную функции (рис. 1.19).

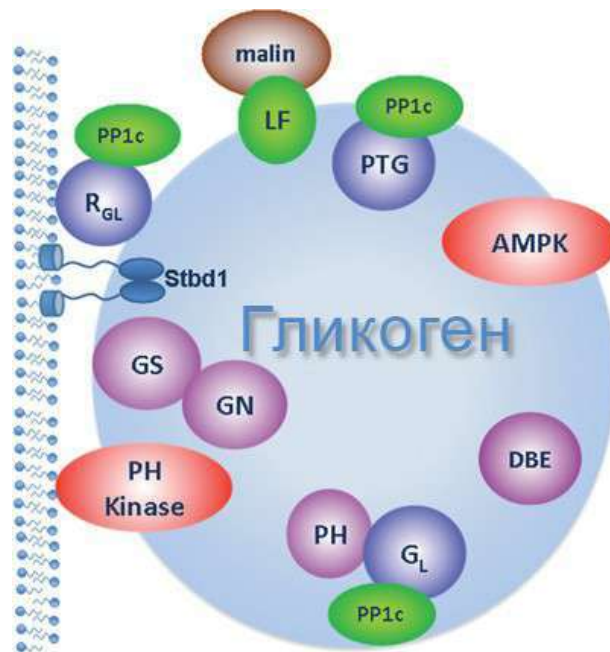


Рисунок 1.19 — Белки  $\beta$ -частицы: ферменты обмена гликогена (розово-лиловый цвет) — гликогенин (GN), гликогенсинтаза (GS), гликогенфосфорилаза (PH) и девятый фермент (DBE); протеинкиназы (красный цвет) — киназа фосфорилазы (PH киназа) и АМФ-активируемая протеинкиназа (АМПК); фосфатазы (зеленый цвет) — каталитическая субъединица 1 типа (PP1c) и лафорин (LF); PP1-гликоген ассоциированные субъединицы (голубой цвет) —  $R_{GL}$ ,  $G_L$  и PTG; Stbd1 белок, связанный с мембраной клетки. Киназа фосфорилазы, Stbd1 и  $R_{GL}$  связаны с мембраной (Roach et al., 2012).

В нормальных условиях пул белков, входящих в состав  $\beta$ -частицы, может составлять до 80 % от ее общего веса (Shearer, Graham, 2004). Частицы гликогена содержат гликогенин и низкомолекулярные белки, принимающие участие в его гликозилировании, ГС и ГФ, ДВФ, различные киназы и фосфатазы, актин (Roach, 2002; Shearer, Graham, 2004; Roach et al., 2012). С молекулами гликогена связаны также лафорин (фосфатаза) и малин (убиквитин-лигаза E3), которые образуют функциональный комплекс и играют важную роль в патогенезе нейродегенеративной болезни Лафора (Garyaly et al., 2014). Не так давно был обнаружен новый белок Stbd1 (генетонин 1), необходимый для прикрепления гликогена к внутриклеточным мембранам (Jiang et al., 2011) и его транспорта в лизосомы (Sun et al., 2016). Протеомный анализ гликогена из печени мышей и крыс подтвердил присутствие в  $\beta$ -частицах большинства вышеназванных белков (Stapleton et al., 2010). Интересным фактом является отсутствие ВФ. Полагают, что он взаимодействует с гликогеном, не образуя прочной связи и легко отделяется от молекулы (Caudwell, Cohen, 1980).

Поверхность  $\beta$ -частицы, представляющая самый внешний ее ярус, является местом работы ферментов. Верхний ярус молекулы гликогена содержит около половины

остатков глюкозы от их общего числа в молекуле и около трети из них доступны для действия ГФ без привлечения ДВФ. Подобная организация молекулы гликогена позволяет с высокой скоростью обеспечивать клетки энергией. Эксперименты с введением  $^{14}\text{C}$ -глюкозы показали, что самый внешний ярус всегда более радиоактивен, чем внутренние ярусы частицы, свидетельствуя о том, что в оборот молекулы гликогена в первую очередь вовлекается поверхность полисахарида (Stetten, Stetten, 1954).

К сожалению, данные о количестве различных белков на поверхности частицы, их взаимодействии и динамике практически отсутствуют. Предполагают, что на поверхности полностью сформированной  $\beta$ -частицы могут располагаться до 40–50 димеров ГФ (Madsen, Corgi, 1958), способных с высокой скоростью расщеплять гликоген благодаря наличию большого числа нередуцирующих концов в его молекуле (Goldsmith et al., 1982). Традиционно считается, что одна молекула гликогена содержит одну молекулу ГС (Roach et al., 2001), но есть данные о том, что  $\beta$ -частица может быть связана с несколькими молекулами ГС (Prats et al., 2009). Возможно, число молекул ГС увеличивается по мере роста частицы гликогена.

Гликоген предназначен для хранения максимального количества глюкозы в наименьшем объеме (Melendez-Navia et al., 1993), но его полимерная структура накладывает ряд геометрических ограничений на ферменты, участвующие во включении и высвобождении глюкозы. Математическое моделирование показало, что нормальная структура частиц гликогена в ходе их роста и деградации может сохраняться при следующих условиях: (1) ГС должна работать преимущественно на внутренних цепях, действуя на невозстановленные концы; (2) перемещение ГС из атакующей точки должно быть гораздо более быстрым, чем ГФ. В противном случае рост частиц гликогена приведет к избыточному и неправильному ветвлению остатков глюкозы (рис. 1.20) (DiNuzzo, 2013).

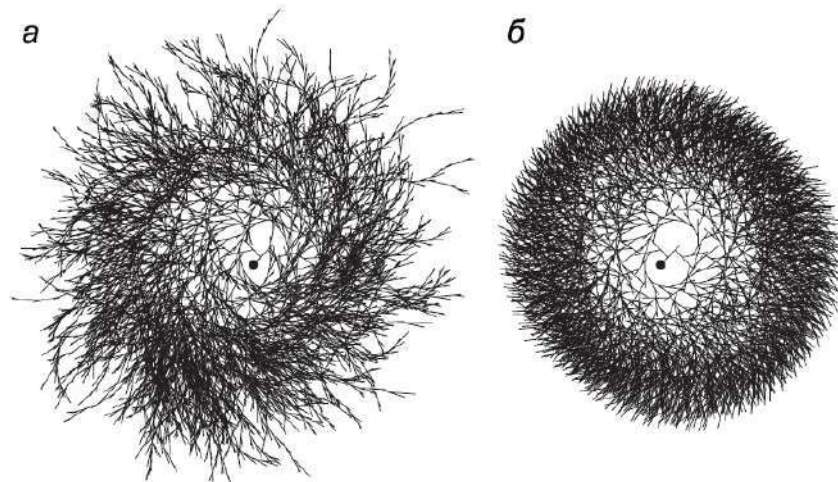


Рисунок 1.20 — Влияние сродства гликогенсинтазы (ГС) к внутренним цепям на однородность структуры молекулы гликогена. (а) Без стерических ограничений для ГС, молекула гликогена становится неоднородной. (б) Если ГС работает преимущественно на внутренних цепях, то структура молекулы гликогена становится однородной. Обе формы содержат одинаковое число глюкозных остатков (DiNuzzo, 2013).

Различная доступность ферментов синтеза и деградации гликогена к остаткам глюкозы приводит в результате к более быстрому обороту внешних областей молекулы гликогена, чем внутренних. Считается, что пространственные ограничения активности ГС и ГФ оптимально способствуют образованию большого количества глюкозы в течение короткого времени и быстром пополнении запасов гликогена. При этом, как показано с помощью изотопного мечения, присоединение и отщепление глюкозных остатков следуют принципу «последним присоединился — первым отсоединился» (Stetten, Stetten, 1954; Devos, Hers, 1979; Elsner et al., 2002).

Ранее, с помощью химических методов было установлено, что гликоген в тканях присутствует в виде двух фракций: лиогликоген и десмогликоген. Первая из них хорошо растворяется в трихлоруксусной кислоте (ТХУ), а другая не растворяется (или плохо растворяется) в ТХУ, но экстрагируется при обработке тканей крепкой щелочью<sup>\*)</sup> (Willstatter, Rhodewald, 1934; Bloom et al., 1951; Weisberg, Rodbard, 1958). Присутствие двух фракций в тканях *in situ* было продемонстрировано в гисто- и цитохимических

<sup>\*)</sup> Примечание: в работах различных авторов фракция гликогена, хорошо экстрагируемая в ТХУ, имела различные названия: лиогликоген, легкодоступная фракция, макрогликоген, а фракция, которая трудно извлекалась при обработке тканей ТХУ и удалялась лишь с помощью КОН, называлась десмогликогеном, труднодоступной фракцией или прогликогеном. Столь же различны и показатели, по которым оценивали содержание или концентрацию той или иной фракции в тканях после обработки их ТХУ или КОН: количество извлекаемой глюкозы, молекулярный вес извлекаемого продукта или интенсивность окрашивания. Несмотря на различную терминологию и разные способы определения фракций гликогена в тканях, всегда подчеркивалось, что в основе различной чувствительности фракций к ТХУ лежат отличия в характере взаимодействия глюкозных остатков с белками.



работах с использованием PAS-реакции (Periodic Acid-Schiff) (Kugler, Wilkinson, 1961; Кудрявцева и др., 1974). Считалось, что десмогликоген, в отличие от лиогликогена, связан с белками (Prins, Jeanlos, 1948). Позже, однако, появилась работа, в которой предполагалось, что десмогликоген является артефактом (Kits Van Heijningen, Kemp, 1955). К схожему заключению пришла Е.Л. Розенфельд, которая показала, что при многократных повторных экстракциях гликогена из печени его можно было выделить с помощью ТХУ практически полностью, не прибегая к использованию щелочи. По мнению авторов «можно было говорить лишь о «легко» и «трудно» экстрагируемом гликогене» (Розенфельд, Попова, 1989). Однако целью этих работ являлось не изучение структуры молекул гликогена, а получение его максимального выхода из тканей. Кроме того, вывод о «легко» и «трудно» экстрагируемом гликогене, скорее подтверждает гипотезу о существовании его фракций и свидетельствует о связанном и не связанном с белками гликогене.

Важной вехой в развитии представлений о пространственной структуре молекул гликогена стало обнаружение двух его форм, разных по пропорции белка и полисахаридной части. Одна представляет классический макромолекулярный гликоген, содержащий ~0,35 % гликогенина, а другая (p400) — гликоген, в котором содержание гликогенина достигало ~10 % (37 кДа/400кДа), вследствие чего она не осаждалась с помощью ТХУ (Lomako et al., 1991). Поскольку фракция p400 *in vitro* превращалась в макромолекулярный гликоген, ее назвали прогликогеном (ПГ). ПГ имеет низкую молекулярную массу (~  $4 \times 10^5$  Да) и служит стабильной промежуточной формой на пути образования макрогликогена (МГ), масса которого составляет ~  $10^7$  Да (Lomako et al., 1991) (рис. 1.21).

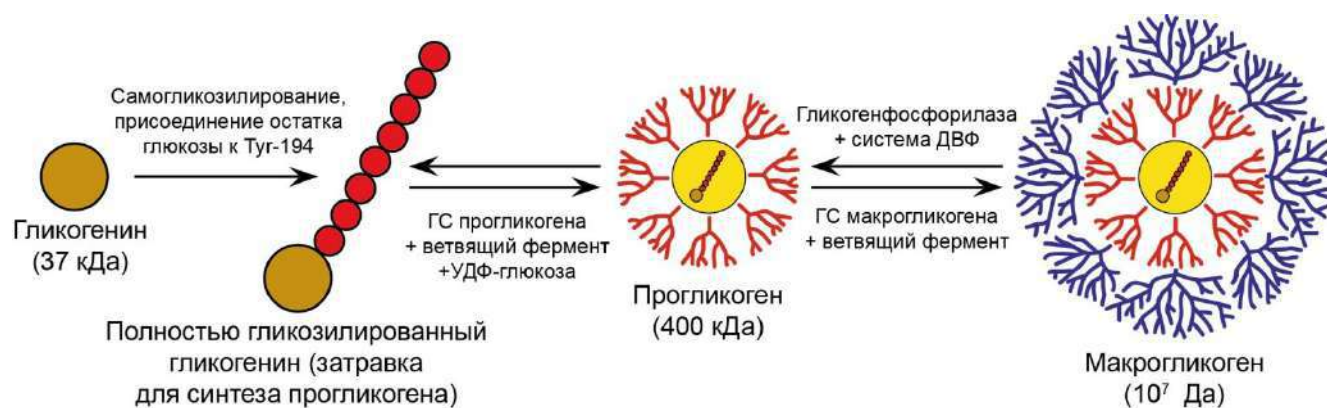


Рисунок 1.21 — Модель биогенеза прогликогена и макрогликогена (Bezborodkina et al., 2018).

Столь сильная разница молекулярных масс МГ и ПГ позволила предположить, что в метаболизме гликогена участвуют только четыре внешних яруса (9–12-й) его молекулы, представляющих МГ, а восемь внутренних ярусов (1–8-й), т.е. ПГ, не принимают в нем участия (Melendez et al, 1997). Подобное различие в метаболизме внешних и внутренних ярусов представлялось разумным механизмом, поскольку запас «топлива» в восьми внутренних ярусах составляет  $\sim 5\%$  от количества глюкозных остатков в полной молекуле гликогена.

Пропорция ПГ к МГ сильно варьирует в зависимости от типа ткани. В скелетных мышцах и сердце ПГ составляет основную массу гликогена, тогда как в печени его доля невелика (Lomako et al., 1993). В связи с этим, изучению динамики и физиологической роли ПГ и МГ в этих тканях уделялось значительное внимание. Теоретически, можно допустить два способа пополнения запасов гликогена в ходе его ресинтеза в клетках:

- 1) путем образования новых гранул гликогена;
- 2) путем увеличения размера уже имеющихся гранул гликогена, т.е. путем увеличения числа ярусов в  $\beta$ -частицах и степени заполнения ярусов остатками глюкозы (рис. 1.22).

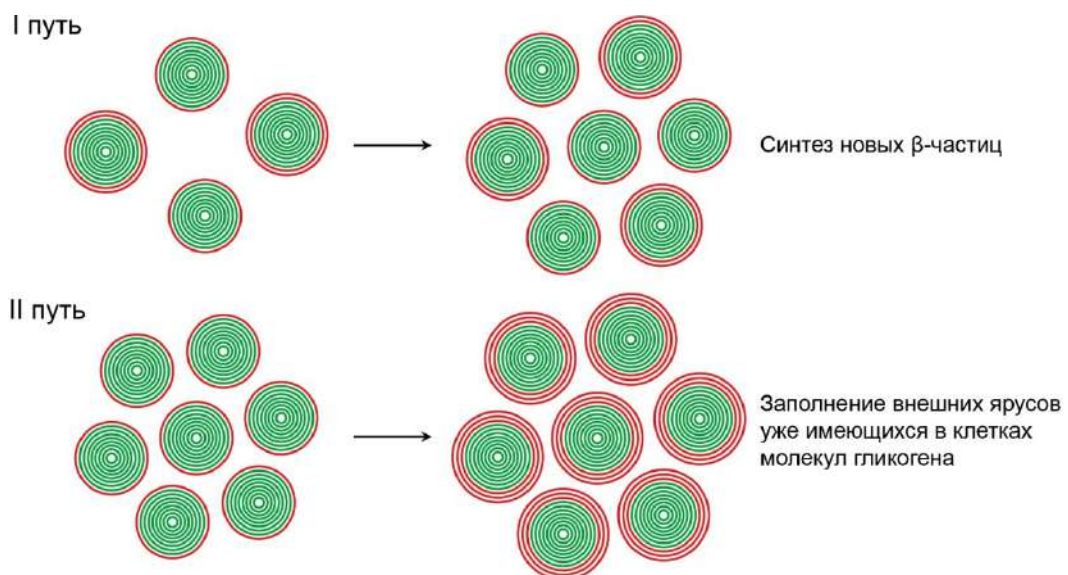


Рисунок 1.22 — Модель накопления гликогена в гепатоцитах (Bezborodkina et al., 2018).

Первый способ предполагает, что число предсуществующих  $\beta$ -частиц в ткани остается постоянным, происходит лишь их рост до более крупных размеров. В этом случае для увеличения содержания гликогена в клетках не нужен синтез новых молекул гликогена. Этот путь, в конце концов, должен привести к снижению доли ПГ и

увеличению доли МГ. Второй способ увеличения содержания гликогена в ткани связан с формированием новых гранул гликогена и должен сопровождаться увеличением ПГ, а также медленным накоплением МГ или отсутствием изменений в его содержании. Очевидно, что такой способ увеличения запасов гликогена требует дополнительного синтеза гликогенина (Bezborodkina et al., 2018).

Поскольку на гликогенине, как основе, строится вся полисахаридная конструкция молекулы гликогена, можно предположить, что его содержание будет определять количество частиц гликогена и динамику его общего содержания в клетках. Действительно, в ряде работ показано, что гликогениновая мРНК увеличивается в 2–3 раза после продолжительной мышечной нагрузки и в первые часы периода восстановления (Kraniou et al., 2000; Shearer et al., 2005). В течение пятичасового восстановления мышцы его количество возрастает на 70 % (Arkininstall et al., 2004; Shearer et al., 2005). Эти данные предполагают, что гликогенин деградирует в ходе физической нагрузки и синтезируется во время отдыха. Однако в другой работе изменений в содержании гликогенина в мышцах при продолжительной физической нагрузке и последующем восстановлении обнаружено не было (Marchand et al., 2007).

Показано, что в течение первых 0–30 мин фазы восстановления скелетных мышечных волокон человека и крысы образование гликогена идет в основном за счет ПГ и лишь спустя несколько часов, когда концентрация гликогена достигает значительной величины, начинается синтез МГ (Adamo, Graham, 1998; Wilson, 2009; Granlund et al., 2011). Оказалось, что скорость деградации гликогена также наиболее высока для ПГ, а катаболизм МГ начинает преобладать лишь после снижения скорости гликогенолиза (Graham et al., 2001). Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что на ранних стадиях восстановления мышц после физической нагрузки синтез гликогена идет за счет формирования новых молекул. Когда их число достигает критического порога, они начинают увеличиваться в размере и вклад МГ в пополнение запасов гликогена становится заметным (Graham et al., 2001; Shearer et al., 2005).

Джеймс с соавторами пришли к противоположному выводу. Исследуя динамику ТХУ-растворимого и ТХУ-устойчивого гликогена в скелетных мышцах крыс при голодании и на различных этапах после получения ими пищи, они сделали заключение о том, что наибольший вклад в изменение содержания общего гликогена вносит ТХУ-растворимая фракция, т.е. МГ. Содержание ТХУ-устойчивого гликогена (прогликогена,



ПГ) оставалось в этих условиях стабильным или увеличивалось незначительно (James et al., 2008).

Таким образом, подавляющее большинство современных данных о пространственной структуре молекул гликогена основано на результатах химического анализа, данных о размерах  $\alpha$ - и  $\beta$ -частиц, полученных с помощью электронной микроскопии или эксклюзионной хроматографии, а также на теоретических представлениях. Математическое описание молекулы гликогена и ее моделирование, установление приблизительных размеров молекулы, определение длины цепей и характера ветвления глюкозных остатков, выявление белков, входящих в состав частицы, установление порядка присоединения и отсоединения остатков глюкозы позволило создать лишь общее представление о структуре  $\beta$ -частицы. Каждый из использованных методов позволил получить важную и ценную информацию о структуре молекул гликогена, но все они имеют принципиальные недостатки. Классические химические методы и метод эксклюзионной хроматографии анализируют выделенный из тканей гликоген, и поэтому всегда есть опасность возникновения ошибок, связанных с нарушением исходной структуры огромных молекул гликогена (Devos et al., 1983; Roach, 2002). Электронная микроскопия дает возможность исследовать  $\alpha$ - и  $\beta$ -частицы гликогена непосредственно в клетках и тканях и получать информацию об их геометрических параметрах, но не позволяет «заглянуть внутрь» частиц. Однако главным недостатком современного представления о пространственной структуре молекулы гликогена является статичность получаемой картины, невозможность дать информацию о ее динамике в различных условиях нормы или патологии. В связи с этим большую ценность представляет поиск методов для исследования структуры молекул гликогена непосредственно в тканях и и/или отдельных клетках.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Объекты исследования

#### 2.1.1. Экспериментальные животные

Основные исследования проведены на 350 белых беспородных крысах-самцах с массой тела в начале эксперимента 120–180 г, а после их завершения — 250–300 г. Кроме того, в экспериментах использовали 50 самцов крыс Вистар с массой тела 180–200 г и 12 самцов мышей (линии C57BL/6N и OE-NPY<sup>DbH</sup>) с массой тела ~35 г.

Крысы были получены из питомника лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская обл., Россия), а мыши предоставлены Институтом биомедицины Университета Турку (Турку, Финляндия). Всех животных содержали в стандартных условиях светового режима: 12-часовой цикл свет/темнота. Доступ к воде и стандартному корму для крыс (Лабораторкорм, Москва, Россия; ГОСТ 2874-82) и для мышей (SDS, Эссекс, Великобритания) был *ad libitum*.

Получение экспериментального цирроза печени (ЦП). Белые беспородные крысы в начале эксперимента были разделены на две группы. Животных одной группы в течение 6 мес подвергали хроническому ингаляционному воздействию паров четыреххлористого углерода (CCl<sub>4</sub>) концентрацией 0,05 г/л в герметичной камере по 20 мин 3 раза в неделю (опытная группа). Животных другой группы в течение того же времени не подвергали какому-либо воздействию, и они служили в качестве контроля (контрольная группа). Все дальнейшие эксперименты, чтобы исключить влияние острого воздействия CCl<sub>4</sub> на печень, проводили спустя одну неделю после прекращения отравления животных (Kudryavtseva et al., 1999).

Получение материала для исследования популяций гепатоцитов нормальной и цирротической печени на разных стадиях пищевого цикла. Для исследования длительного голодания и абсорбтивного периода пищевого цикла 27 крыс из контрольной и 27 из опытной группы предварительно голодали в течение 48 ч (вода *ad libitum*), после чего им перорально вводили 30%-ный раствор глюкозы в концентрации 4 г/кг веса. Сразу после прекращения голодания и через 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90 и 120 мин после введения глюкозы животные подвергались декапитации. Материал (кровь и

кусочки печени), полученный от каждого животного, использовали для цитофотометрических и биохимических исследований.

Для исследования постабсорбтивного периода пищевого цикла крысы из контрольной и опытной группы после ночного голодания подвергались декапитации. Полученный материал (кровь и кусочки печени) использовали для проведения гистологических, цитофотометрических, электронно-микроскопических и биохимических исследований.

Методика применения различных способов терапии ЦП у крыс:

1) Для определения уровня спонтанной регенерации цирротической печени, крыс в течение 6 мес после прекращения гепатотропного воздействия  $\text{CCl}_4$  не подвергали какому-либо дополнительному воздействию (группа БВ);

2) В течение 1, 2, 4 и 6-го мес наряду с воздействием  $\text{CCl}_4$  три раза в неделю крысам делали инъекции 2-этилтиобензимидазола гидробромида (бемитила) в концентрации 12 мг/кг веса (группа БМ) (Кудрявцева и др., 2002б; Kudryavtseva et al., 2003);

3) После прекращения токсического воздействия  $\text{CCl}_4$  крысам проводили операцию частичной гепатэктомии по Хиггинсу и Андерсону (Higgins, Anderson, 1931) под эфирным наркозом с экстирпацией 2/3 печени (группа ЧГ) (Kudryavtseva et al., 1998);

4) В течение 3 мес после последнего сеанса отравления  $\text{CCl}_4$  крысам ежедневно давали, кроме стандартного корма, водный раствор смеси фруктозы (150 г/л) и глюкозы (50 г/л) в соотношении 1:1 (группа УП) (Kudryavtseva et al., 1999);

5) После прекращения 6-месячного воздействия  $\text{CCl}_4$  крысам были сделаны ежедневные (1 раз в день) внутримышечные инъекции: в течение 3 дней — хорионического гонадотропина человека по 170–200 ЕД/животное вместе с 1%-ным раствором АТФ в концентрации 10 мг/кг веса (Солопаева и др., 1967), в течение последующих 20 дней — коллализина (ГИПХ, Санкт-Петербург) из расчета 5 КЕ/животное (группа ХГЧ) (Kudryavtseva et al., 2001а);

6) Ежедневно в течение 5 дней после прекращения токсического воздействия крысам внутрибрюшинно вводили дипептид Lys-Glu (препарат «Вилон», Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, патент РФ №. 2080120, 1997 г.) в концентрации 1,7 мг/кг веса (группа Вилон) (Кудрявцева и др., 2000);

Материал от каждого животного для гистологических, цитофотометрических и биохимических исследований после последнего сеанса отравления  $\text{CCl}_4$  получали через: 7 дней (группа БМ); 2 нед и 1 мес (группа Вилон); 1, 3 и 6 мес (в группах ЧГ, УП, ХГ, БВ).

В качестве контроля для всех групп животных использовались одновозрастные крысы, не отравлявшиеся  $\text{CCl}_4$ , не получавшие терапию, материал у которых брали через аналогичные временные интервалы, одновременно с получением его у крыс опытной группы.

Общая схема эксперимента для белых-беспородных крыс представлена на рисунке 2.1.

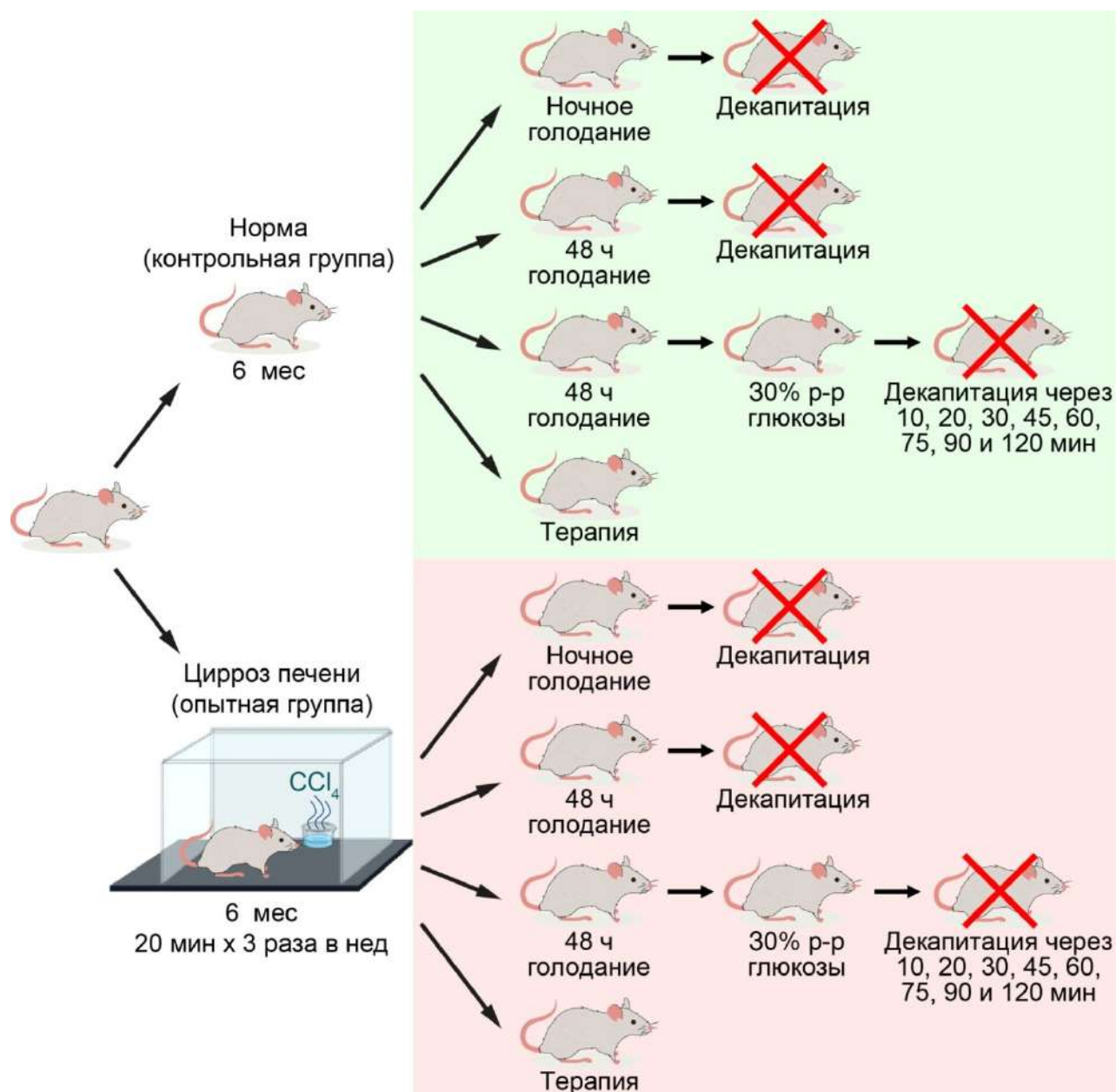


Рисунок 2.1 — Схема экспериментальных процедур для белых беспородных крыс.

Получение экспериментального токсического гепатита у крыс Вистар. В течение 4 нед крысам ежедневно интрагастрально вводили 50%-ный раствор  $CCl_4$  в вазелиновом масле в дозе 0,2 мл/кг, при этом в качестве питья они получали 5%-ный этанол (Weinert, Albracht, 1982; Ищенко, Мичурина, 2005; Оковитый и др., 2007). Через 1 нед после последнего введения  $CCl_4$  крыс умерщвляли, используя тиопенталовый наркоз. Контролем служили одновозрастные крысы, не подвергавшиеся гепатотропному воздействию. Печень животных контрольной и опытной групп использовали для получения первичной культуры гепатоцитов (Baidyuk et al., 2009).

Методика терапии преддиабета 2 типа у мышей. Для исследования терапевтических эффектов метформина использовали трансгенных гомозиготных мышей-самцов линии OE-NPY<sup>DbH</sup> (Ruohonen et al., 2008; Vähätalo et al., 2015) с метаболическим фенотипом гепатостеатоза и преддиабетического состояния (Vähätalo et al., 2015; Ailanen et al., 2017). Контролем служили мыши-самцы линии C57BL/6N (дикий тип, WT). Начиная с 17-недельного возраста, мыши в течение 4 недель получали вместе с питьевой водой метформин (Enzo Life Sciences LTD, Эксетер, Великобритания) из расчета 300 мг/кг/день или воду без метформина. Бутылочки для питья меняли два раза в неделю, а потребление воды измеряли для подтверждения приема препарата (Ailanen et al., 2018). В возрасте 20 недель животным проводили глюкозотолерантный тест путем внутрибрюшинного введения глюкозы в концентрации 1 г/кг массы тела (Vähätalo et al., 2015), после чего мышей усыпляли с помощью  $CO_2$ . Извлеченную печень использовали для проведения цитофотометрических исследований.

Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных (<http://www.nap.edu/catalog/10498.html>), Директивой Совета Европейских сообществ (<https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/cc3a8ccb-5a30-4b6e-8da8-b13348caeb0c/>), рекомендациями ARRIVE (<https://www.nc3rs.org.uk/>) и ICLAS (<https://iclas.org/>).

### 2.1.2. Клинический материал

В работе использовали материал пункционных биопсий печени 114 пациентов, которые проходили лечение в клинике внутренних болезней № 2 СПбГМА им. И.И.

Мечникова. Биопсии получали после ночного голодания, натощак в одно и то же время (с 10 до 12 ч) с помощью метода Мангини. Контрольная группа включала пациентов, у которых отсутствовали клинические, морфологические, иммунохимические и биохимические признаки поражения печени. Больные хроническим вирусным гепатитом (ХВГ) и циррозом печени (ЦП) получали базисную терапию, включающую энтеросорбенты, витамины групп В, К и дезинтоксикационные растворы. Девяти пациентам с ХВГ и девяти пациентам с ЦП на фоне базисной терапии дополнительно проводили лечение 2-этилтиобензимидазолом гидробромидом (бемитилом). Препарат назначался по 0,25 г два раза в сутки после еды тремя короткими курсами по пять дней с перерывами в два дня между ними (Кудрявцева и др., 2002а). Распределение пациентов по группам представлено в таблице 2.1.

Таблица 2.1 — Характеристика пациентов, участвовавших в исследовании.

№ п/п	Диагноз	Общее количество пациентов (мужчин/женщин)	Средний возраст, лет	Средняя продолжительность заболевания, лет
1	Условная норма (контрольная группа)	29 (20/9)	44,0±3,6	—
2	Хронический гепатит	35 (22/13)	42,1±4,9	5,7±1,2
3	Цирроз печени	33 (28/5)	49,9±5,1	6,8±1,3
4	Сахарный диабет 2 типа	12 (12/0)	54,5±4,0	—
5	Сахарный диабет 2 типа и цирроз печени	5 (5/0)	49,6±7,5	—

Всем пациентам проводили биохимический анализ крови, включающий определение концентрации глюкозы и общего билирубина (ОБ), активности аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ). Материал пункционных биопсий использовали для проведения гистологического, цитофотометрического и биохимического анализа. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации 1989 г. (<https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/1760318>). Все

пациенты дали согласия на участие в исследовании, в том числе на публикацию его результатов.

## **2.2. Методы приготовления препаратов**

### **2.2.1. Методика приготовления препаратов первичной культуры гепатоцитов крыс для выявления функционирующих митохондрий в живых клетках**

Изолированные гепатоциты крыс получали по модифицированному методу Сеглена (Seglen, 1976). Для этого печень перфузировали *in situ* через воротную вену в течение 5 мин подогретым до 37°C буфером (рН 7,4), содержащим 8,3 г/л NaCl, 0,5 г/л KCl, 2,4 г/л HEPES, 2 г/л глюкозы и 5,5 мл/л 1 М NaOH с помощью микропомпы. Затем печень извлекали, помещали в стерильную чашку Петри в тот же буферный раствор и дальнейшие манипуляции для получения первичной культуры гепатоцитов проводили в стерильных условиях в ламинар-боксе (Baidyuk et al., 2009). Полученный монослой гепатоцитов инкубировали на покровных стеклах, покрытых за 1 сут слоем 0,1 % желатина, в среде Игла с родамином 123 (10 мкг/мл) (Sigma, США) в течение 30 мин в атмосфере с 5%-ным CO<sub>2</sub> при 37°C (Johnson et al., 1980). Затем инкубационную среду сливали, заливали чистой средой Игла, инкубировали стекла в течение 5 мин в тех же условиях. Данную процедуру повторяли дважды. Для сохранения жизнеспособности гепатоцитов во время микроскопирования покровные стекла с клетками помещали па предметное стекло с предварительно подготовленной герметичной камерой, заполненной подогретой культуральной средой. Флуоресценцию гепатоцитов возбуждали светом 480 нм и проводили качественный анализ митохондрий с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SL (Leica Microsystems Inc., Германия) (Baidyuk et al., 2009).

### **2.2.2. Методика приготовления препаратов-мазков изолированных гепатоцитов**

Препараты для цитофотометрии приготавливали на стандартных предметных стеклах в виде мазков изолированных гепатоцитов. Для этого кусочки печени крыс (~ 2

мм<sup>3</sup>) и биопсии печени человека (~ 1 мм<sup>3</sup>) помещали на 10 мин в фосфатный буфер I (рН 8,0) (475 мл 0,066 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 25 мл 0,067 М KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 мл 0,15 М сахарозы), затем на 15 мин переносили 0,067 М К, Na-фосфатный буфер II (рН 7,4). По истечении указанного срока, используя пинцет, осторожно встряхивая кусочки печени в капле буфера, разносили по поверхности предметного стекла с помощью кварцевого стекла со шлифованным краем полученную взвесь клеток. Сразу после этого мазки изолированных гепатоцитов на предметных стеклах фиксировали при комнатной температуре 100%-ным метанолом, высушивали на воздухе в течение 3–5 мин и убрали на хранение в темное место (Кудрявцева и др., 1983; Bezborodkina et al., 2021б).

Для исследования кинетики окрашивания гепатоцитов реактивами типа Шиффа препараты-мазки изолированных гепатоцитов печени сытых крыс контрольной группы приготавливали на покровных стеклах по методике, описанной выше.

### 2.2.3. Методика приготовления гистологических препаратов

Кусочки печени крысы (~4 мм<sup>3</sup>) и биопсии печени человека (~2 мм<sup>3</sup>) фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине не менее 48 ч при температуре 20–22 °С и заливали в парафиновые блоки. Гистологические срезы толщиной ~ 5 мкм получали с помощью микротомы Reichert (Австрия).

Для выявления соединительной ткани препараты окрашивали пикрофуксином по Ван-Гизону (Биовитрум, Россия) или пикросириусом — 0,01 %-ный раствор сириуса красного F3BA (Bio-Optica Milano SPA, Италия) в насыщенном водном растворе пикриновой кислоты в течение 1 ч. После окраски препараты споласкивали в 30 %-ной уксусной кислоте, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заключали в канадский бальзам. Срезы печени крыс дополнительно окрашивали гематоксилин-эозином по Майеру (Chestnova et al., 2015; Bezborodkina et al., 2021б).

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



## 2.2.4. Методика фиксации и подготовки ткани печени для электронно-микроскопического исследования

Образцы печени фиксировали в течение 24 ч при 4°C в 2,5%-ном растворе глутаральдегида, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4). Последующую (до)фиксацию ткани печени проводили в течение 2 ч при комнатной температуре 1%-ным раствором OsO<sub>4</sub> на том же буфере. После этого кусочки обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации: 30-40-50-60-70-80-90-96-100%. Одновременно с обезвоживанием образцов проводили их контрастирование уранилацетатом (Безбородкина и др., 2008). Для этого в спирты, начиная с 70%-ого, добавляли уранилацетат до концентрации 0,5–1,0% (Комаров, 1987). После обезвоживания в этаноле образцы заключали в аралдит по методу Глауэтров (Glouert, Glouert, 1958). Ультратонкие срезы, приготовленные с помощью ультратома LKB III (Швеция), помещали на медные сетки и дополнительно контрастировали нитратом свинца.

Фотографическую съемку проводили на электронном микроскопе "GEM-100 CX" (Япония) при увеличении 8000х или 20000х.

## 2.3. Цитофотометрические методы

### 2.3.1. Определение сухой массы гепатоцитов с помощью интерференционного микроскопа

Сухую массу гепатоцитов (СМ) крысы и человека измеряли на неокрашенных фиксированных метанолом препаратах-мазках, заключенных в глицерин, по методике, описанной ранее (Бродский, 1966; Бенеке, 1969). Измерения производили с помощью интерференционного микроскопа МБИН-4 (ЛОМО, Россия) в монохроматическом свете, используя интерференционный светофильтр  $\lambda_{\max} = 550$  нм и объектив 40×/0,65.

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

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

где: **M** — сухая масса клетки, пг; **δ** — разность хода лучей, см; **S** — площадь клетки, см<sup>2</sup>, **α** — удельное приращение показателя преломления, см<sup>3</sup>/г, значение которого для белков в глицерине составляет 0,00095 см<sup>3</sup>/г (Pellegrino et al., 1963).

При измерении СМ гепатоцитов вначале определяли оптическую разность хода лучей для клетки и среды (рис. 2.2).

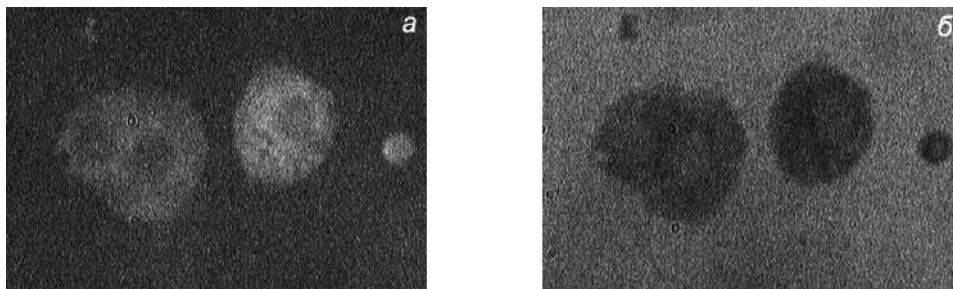


Рисунок 2.2 — Неокрашенные гепатоциты в объективе интерференционного микроскопа: *a* — установка на темное поле; *б* — установка на темный объект. Объектив 40×/0.65.

Оптическую разность хода определяли по формуле:

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

где:  $\delta$  — разность хода лучей, см;  $\varphi_1$ ,  $\varphi_2$  — отсчеты по шкале компенсатора Сенармона, градусы;  $\lambda$  — длина волны света, 550 нм;  $K = 180^\circ$ .

Затем с помощью программы ImageJ (НИН, США) измеряли площадь клетки (в  $\text{мкм}^2$ ). На каждом препарате, в зависимости от задачи, измеряли 100–450 клеток (Bezborodkina et al., 2016).

### 2.3.2. Методы количественной цитохимии

#### 2.3.2.1. Выявление и измерение содержания гликогена и его фракций в изолированных гепатоцитах крыс

Для определения содержания гликогена в гепатоцитах использовали флуоресцентный вариант PAS-реакции (Кудрявцева и др., 1974). Препараты-мазки изолированных гепатоцитов вначале помещали на 1,5 ч в 0,8 %-ный раствор  $\text{KIO}_4$ , приготовленный на 0,23 %-ной  $\text{HNO}_3$ . Далее препараты последовательно промывали в проточной воде в течение 15 мин и в одной смене дистиллированной воды. Для выявления гликогена в гепатоцитах с помощью реактива типа Шиффа использовали флуоресцентный краситель аурамин ОО (Reanal, Венгрия). Окрашивание препаратов проводили при комнатной температуре в течение 90 мин в реактиве типа Шиффа (0,3 %-

ный растворе аурамина-SO<sub>2</sub> (Au-SO<sub>2</sub>) + (0,2 мл хлористого тионила (SOCl<sub>2</sub>)/100 мл раствора красителя). После окрашивания препараты проводили через три смены дистиллированной воды и три смены сернистых вод (5 г K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 950 мл воды, 50 мл 1 N HCl) по 3 мин в каждой для удаления неспецифично связавшегося красителя. Затем препараты в течение 20 мин промывали в проточной воде, споласкивали дистиллированной водой, обезвоживали в спиртах (по 5 мин в двух сменах 70°, 96° и 100° этанола), высушивали на воздухе и хранили в темноте. Перед измерениями препараты заключали в нефлуоресцирующее вазелиновое масло (Kudryavtseva et al., 1999).

Изображения клеток, окрашенных Au-SO<sub>2</sub> (рис. 2.3), получали с помощью флуоресцентного микроскопа Axioskop (Carl Zeiss, Германия), снабженного цифровой камерой DFC360FX (Leica Microsystems Inc., Германия).

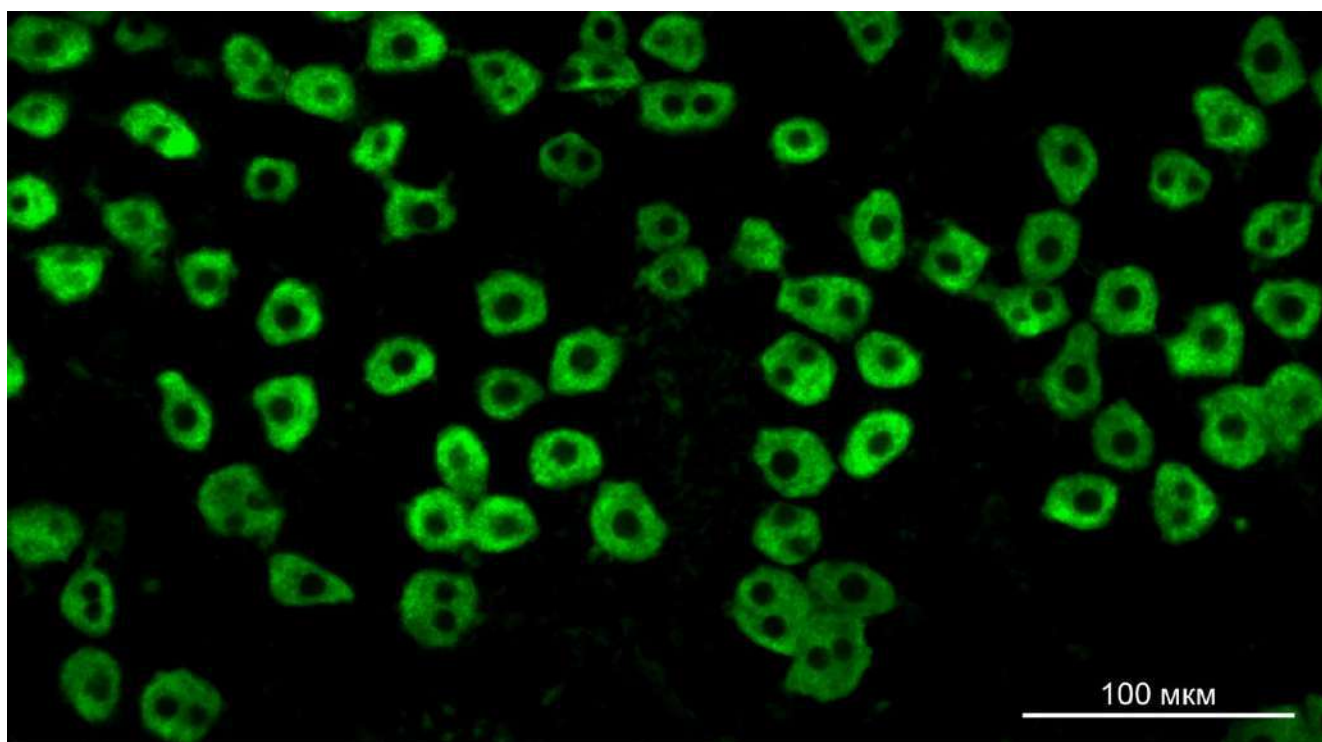


Рисунок 2.3 — Выявление гликогена в гепатоцитах с помощью аурамина-SO<sub>2</sub>.

Для возбуждения флуоресценции препаратов, окрашенных Au-SO<sub>2</sub>, и регистрации их флуоресценции использовали набор фильтров Filter Set 10 (Carl Zeiss, Германия). При измерениях применяли объектив Plan-NEOFLUAR 20×/0,50. Интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных Au-SO<sub>2</sub>, оценивали с помощью программы ImageJ (НИН, США) (Bezborodkina et al., 2021a).

## 2.3.2.2. Определение содержания ДНК в ядрах гепатоцитов

ДНК в ядрах гепатоцитов выявляли на препаратах-мазках с помощью флуоресцентной реакции Фельгена, в которой использовали реактив типа Шиффа — Au-SO<sub>2</sub> (Кудрявцев, Розанов, 1974). Гидролиз препаратов проводили в 6 N HCl при температуре 20–22°C в течение 8 мин. После гидролиза препараты споласкивали в трех сменах дистиллированной воды и окрашивали в течение 1,5 ч в темноте при температуре 4 °C 0,3 %-ным раствором Au-SO<sub>2</sub>, содержащем 0,2 мл SOCl<sub>2</sub>/100 мл. Затем препараты споласкивали в 3 сменах дистиллированной воды, охлажденной до 4 °C, проводили через охлажденные до 4 °C сернистые воды (3 смены по 3 мин в каждой), промывали в проточной воде 20 мин, ополаскивали дистиллированной водой и обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации (70°, 96°, 100°) (по 2 смены этанола каждой концентрации, по 5 мин). После этого препараты высушивали на воздухе и хранили в темноте. Непосредственно перед измерением содержания ДНК в клетках препараты заключали в нефлуоресцирующее вазелиновое масло (Bezborodkina et al., 2016).

Изображения ядер гепатоцитов, окрашенных Au-SO<sub>2</sub>, получали с помощью микроскопа Axioskop (Carl Zeiss, Германия) (объектив Plan-NEOFLUAR 40×/0,75), оборудованного цифровой камерой DFC360FX (Leica Microsystems Inc., Германия). Для возбуждения флуоресценции Au-SO<sub>2</sub> и ее регистрации использовали набор фильтров Filter Set 10 (Carl Zeiss, Германия). Интенсивность флуоресценции ядер гепатоцитов, окрашенных Au-SO<sub>2</sub>, определяли, используя программу ImageJ (НИН, США).

Диплоидным (2c) стандартом при определении плоидности гепатоцитов служили лимфоциты периферической крови крысы, окрашенные Au-SO<sub>2</sub> по Фельгену. Среднюю плоидность гепатоцитов N(c) рассчитывали по формуле (Делоне и др., 1987):

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

где:  $n_i$  — относительное число гепатоцитов  $i$ -того класса плоидности ( $i = 1$  — диплоидный класс,  $i = 2$  — тетраплоидный и т.д.) (Bezborodkina et al., 2016).

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

Для получения количественных данных для одной и той же клетки по нескольким параметрам — сухой массе, содержанию гликогена и степени ploидности, — в работе был использован комбинированный цитохимический метод (Кудрявцев и др., 1979). Метод позволяет выявлять и измерять последовательно один параметр за другим, не затрагивая еще неизмеренные компоненты клетки. Подобный подход дает возможность оценить содержание каждого компонента в клетке практически с той же точностью, какая существует при раздельном их определении.

Применение комбинированного цитохимического метода сопряжено с необходимостью использования нескольких измерительных приборов. Для неоднократного нахождения местоположения каждой клетки, на предметные стекла с помощью алмазного стеклореза наносили координатную сетку с размером квадратов около 1 мм<sup>2</sup>. Для получения изображений выбранных участков препарата (около 100) использовали микроскоп Axioskop (Carl Zeiss, Германия) (объектив Plan-NEOFLUAR 20×/0,50), оборудованный цифровой камерой DFC360FX (Leica Microsystems Inc., Германия). На изображениях выбирали неповрежденные, отдельно расположенные гепатоциты, каждому из которых, в соответствии с его местоположением на предметном стекле, присваивали определенный номер (рис. 2.4). На каждом препарате, в зависимости от задачи исследования, отмечали от 100 до 500 клеток (Bezborodkina et al., 2016).

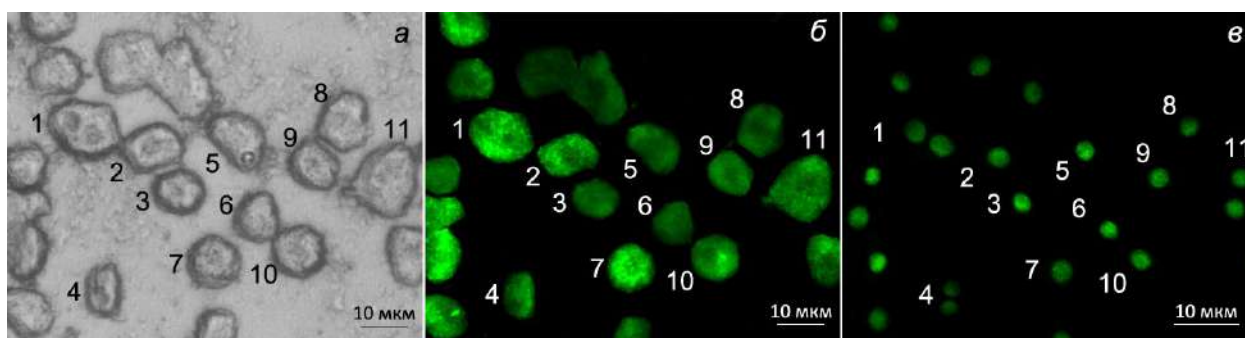


Рисунок 2.4 — Пример использования комбинированного метода: *а* — изолированные гепатоциты с присвоенными им номерами, фазовый интерференционный контраст, *б* — те же гепатоциты, окрашенные с помощью флуоресцентной PAS-реакции на гликоген, *в* — те же гепатоциты, ядра которых окрашены с помощью флуоресцентной реакции Фёльгена на ДНК. Микроскоп Axioskop (Carl Zeiss, Германия), цифровая камера DFC360FX (Leica Microsystems Inc, Германия). Объектив Plan-NEOFLUAR 20×/0,50.

У каждой из отмеченных клеток последовательно измеряли сначала сухую массу (см. раздел 2.3.1). После измерений СМ гепатоцитов покровное стекло снимали, удаляли глицерин путем последовательного проведения препарата через спирты возрастающей концентрации и определяли содержание гликогена в гепатоцитах (см. раздел 2.3.2.1). После измерения содержания гликогена в клетках покровное стекло снимали и удаляли вазелиновое масло с предметного стекла с помощью ксилола и этанола возрастающей концентрации. Затем окраску клеток на гликоген удаляли путем обработки препаратов в течение 20 мин 0,025%-ным борогидридом натрия ( $\text{NaBH}_4$ ). В результате такой обработки альдегидные группы ( $-\text{CHO}$ ), образовавшиеся при окислении остатков глюкозы в гликогене с помощью  $\text{KIO}_4$ , превращаются в первичные спиртовые ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ), теряют способность окрашиваться  $\text{Au-SO}_2$  и не влияют ни на содержание ДНК в клетках, ни на точность ее измерения (рис. 2.5). Наконец, после обработки препаратов  $\text{NaBH}_4$  и окраски их по Фельгену, измеряли содержание ДНК в ядрах гепатоцитов (см. раздел 2.3.2.2). По содержанию ДНК в клетке судили о степени ее плоидности. Число ядер в клетке указывало на то, является ли она одноядерной, двоядерной или многоядерной (Bezborodkina et al., 2016).

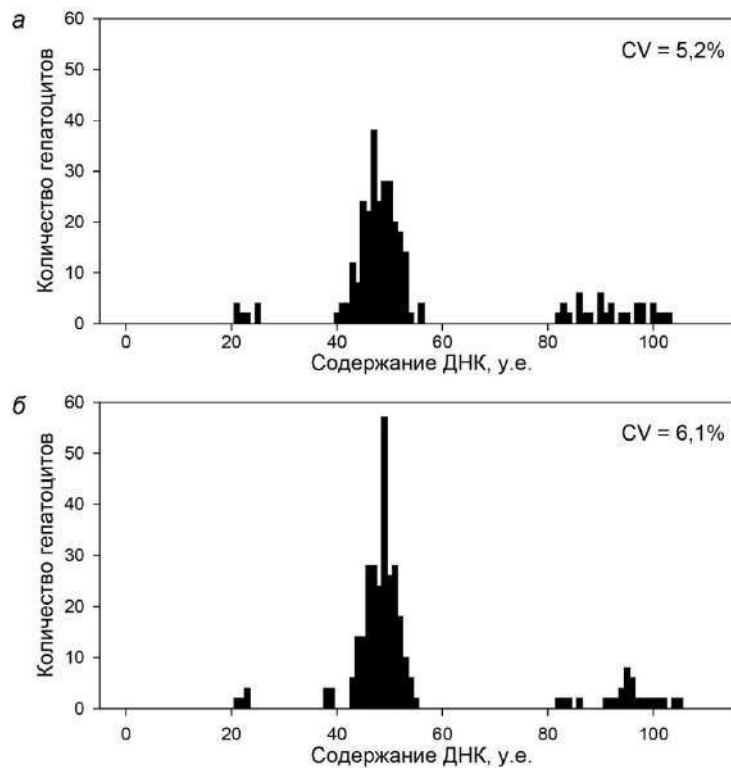


Рисунок 2.5 — Гистограммы распределения гепатоцитов нормальной печени крыс по содержанию в них ДНК: *а* — гепатоциты окрашенные по Фельгену, *б* — гепатоциты окрашенные PAS-реакцией на гликоген, обработанные 0,025%-ным борогидридом натрия и окрашенные по Фельгену. Представлены гепатоциты с содержанием ДНК 4с ( $D.I. = 2$ ), т.к. они являются доминирующим классом клеток в печени крыс.

## 2.4. Конфокальная микроскопия и метод FRET (AB) для исследования структуры молекул гликогена

Регистрацию  $E_{\text{FRET}}$  в нескольких участках гепатоцита (обычно 3–4 участка) (рис. 2.6) производили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems Inc., Германия), используя программу FRET AB (фотообесцвечивание акцептора) (Zal, Gascoigne, 2004; Piston, Kremers, 2007). В качестве донора (Don) использовали аурамин (Au), а акцептора (Ac) — бромистый этидий (EtBr). В процессе фотообесцвечивания интенсивность люминесценции Ac снижалась ~ на 50 %.

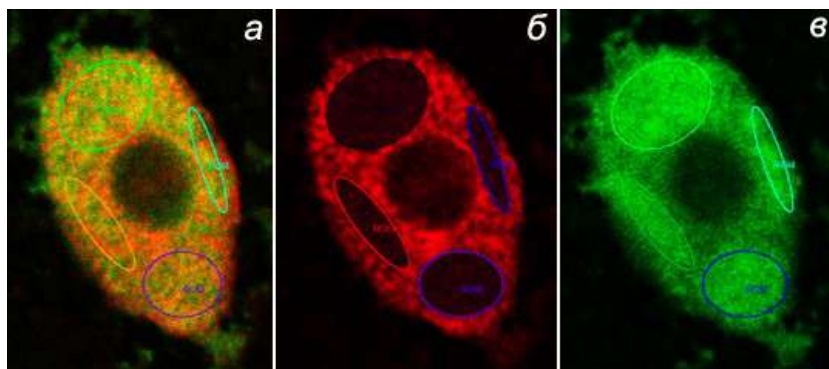


Рисунок 2.6 — Гепатоцит: *а* — с отмеченными областями; *б* — после фотообесцвечивания акцептора в выделенных областях; *в* — повышение флуоресценции донора (Don) после выжигания акцептора (Ac). Лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Leica TCS SP5 (Leica Microsystems Inc., Германия). Объектив HCX PL APO 40×/1.25 Oil.

При определении  $E_{\text{FRET}}$  использовали два лазера — 405 нм (возбуждение Don) и 514 нм (фотообесцвечивание Ac). Мощность лазера 514 нм составляла 30 % от максимальной. При измерениях применяли объектив HCX PL APO 40×/1,25 Oil. В качестве иммерсии использовали Immersol 518F, в качестве среды заключения — нефлуоресцирующее вазелиновое масло. На каждом препарате измеряли не менее 25 клеток (Bezborodkina et al., 2011).

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

$$r = R_0 \times \sqrt[6]{\frac{1 - E_{\text{FRET}}}{E_{\text{FRET}}}} \quad (4)$$

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

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

$$E_{\text{FRET}} = \frac{1}{\left(1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6\right)} \quad (5)$$

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

На рисунке 2.7 приведены спектры поглощения и флуоресценции клеток, окрашенных EtBr-SO<sub>2</sub> или Au-SO<sub>2</sub> в ходе PAS-реакции. Спектры флуоресценции были получены с помощью микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems Inc., Германия). Спектры поглощения Au и EtBr приведены по литературным данным (Gadella, 1999). Важно отметить, что спектр флуоресценции гепатоцитов, окрашенных Au-SO<sub>2</sub> ( $\lambda_{\text{max}} \approx 526$  нм) и спектр поглощения гепатоцитов, окрашенных EtBr-SO<sub>2</sub> ( $\lambda_{\text{max}} \approx 540$  нм), перекрываются между собой.

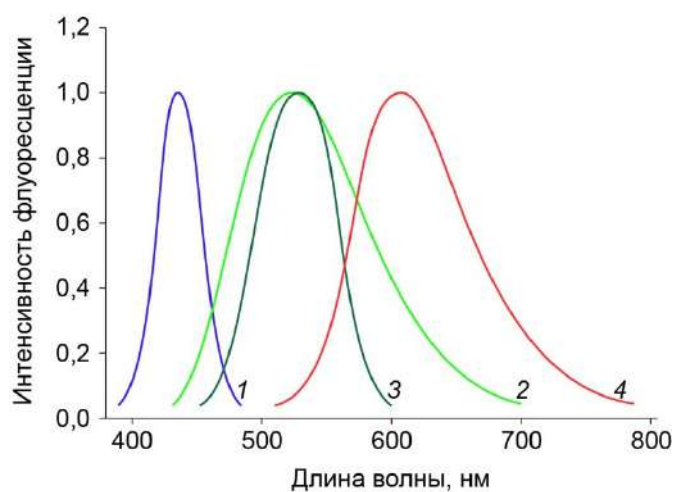


Рисунок 2.7 — Спектры поглощения Au (1), EtBr (3) и спектры флуоресценции Au (2), EtBr (4).

Наши расчеты с использованием программы PhotochemCAD ([www.photochemcad.com](http://www.photochemcad.com)) показали, что значение  $R_0$  для пары Au-EtBr, используемой в данной работе, 3,2 нм. В расчетах использовали значения квантового выхода Au 0,3 (Vieira Ferreira et al., 2004) и коэффициента экстинкции EtBr  $5680 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Lee et al., 2001). Поскольку радиус 12-ярусной  $\beta$ -частицы гликогена составляет около 21 нм



(Rybicka, 1996; Melendez et al., 1999), можно предположить, что в фёрстеровском взаимодействии принимают участие молекулы Don (Au), связанные с остатками глюкозы 7-го и 8-го внутренних ярусов  $\beta$ -частицы, и молекулы Ac (EtBr), находящиеся на 9-м и 10-м внешних ярусах  $\beta$ -частицы (рис. 2.8) (Bezborodkina et al., 2011).

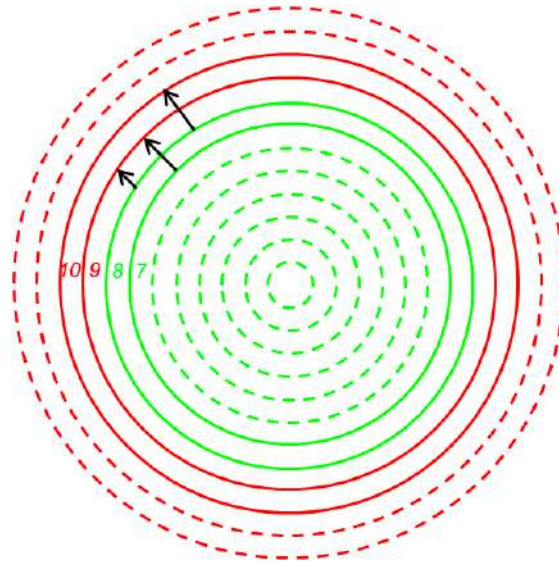


Рисунок 2.8 — Схематическое изображение молекулы гликогена. Цифрами отмечены ярусы, между которыми возможен перенос энергии. Расстояние между каждым из ярусов в  $\beta$ -частице гликогена с диаметром  $\sim 42$  нм составляет  $\sim 1,9$  нм.

## 2.5. Биохимические методы

### 2.5.1. Биохимическое исследование сыворотки крови крыс и человека

Образцы крови крыс и пациентов, полученные в постабсорбтивном периоде пищевого цикла, центрифугировали при 3500 об/мин в течение 10 мин при  $4^{\circ}\text{C}$ . В сыворотке крови с помощью автоматических биохимических анализаторов SMA-12/16 (Technicon Instruments Co., США) и Abbot-spectrum (Abbot Laboratories, США) определяли концентрацию глюкозы, общего билирубина и общего белка, активность аланинаминотрансферазы (АЛАТ), аспаратаминотрансферазы (АсАТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ).

Продукты ПОЛ определяли по скорости окисления липогидроперекисями двухвалентного железа, которое вступает в реакцию с тиоцианатом аммония с образованием соединения, определяемого спектрофотометрически при длине волны 480

нм. Концентрацию диеновых конъюгатов (ДК) оценивали по методу Романовой, Стальной (1977), малонового диальдегида (МДА) — по методу Uchigama и Michera (1978). При определении восстановленного глутатиона использовали метод Seldak и Linday (1968). Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по торможению восстановления нитросинего тетразолия в присутствии НАДН и феназинметасульфата (Дубинина, 1983). Активность каталазы определяли по скорости разложения перекиси водорода. Активность всех вышеперечисленных ферментов относили к содержанию белка в пробах, содержание которого определяли унифицированным методом Лоури (Lowry, 1951).

### **2.5.2. Определение концентрации гликогена в печени крыс**

Кусочки печени растворяли в 30%-ной КОН на кипящей водяной бане в течение 60 мин, центрифугировали на протяжении 30 мин при 1000g, затем последовательно промывали 70, 80 и 96%-ным этиловым спиртом и вновь центрифугировали. Полученный осадок гликогена гидролизовали 2н  $H_2SO_4$  в течение 2,5 ч на кипящей водяной бане. Гидролизат нейтрализовали 5н NaOH до pH 7,8–8,0 и определяли в нем количество образовавшейся глюкозы глюкозооксидазным методом, используя стандартные наборы. Концентрацию гликогена выражали в мкМ глюкозных единиц на г сырой массы печени (Lo et al., 1970; Bezborodkina et al., 2014; Bezborodkina et al., 2021б).

### **2.5.3. Определение активности ключевых ферментов метаболизма гликогена в печени крыс и человека**

Печень крыс и биоптаты больных гомогенизировали в 50мМ Трис-HCl буфере (pH 7,4), содержащем 5мМ ЭДТА, 200мМ сахарозу, 0,01М  $\beta$ -меркаптоэтанол и 0,2 М ФМСФ на льду (1:10). Гомогенат центрифугировали 10 мин при 1000g, 4°C. Полученную надосадочную жидкость повторно центрифугировали 10 мин при 14000g, 4°C. Вновь полученную надосадочную жидкость использовали для определения активности цитоплазматических ферментов. Для определения активности Г-6-Фазы надосадочную жидкость дополнительно центрифугировали при 106000g, 4°C в течение 60 мин для выделения микросомальной фракции (Berteloot et al., 1991).

Активность гликогенсинтазы (ГС) измеряли по количеству включенной в гликоген  $[U-^{14}C]$ -глюкозы, используя в качестве субстрата УДФ- $[U-^{14}C]$ -глюкозу (Amersham, 300 мКи/мМ) (Vardanis, 1992). К 75 мкл 10 мМ Трис-НСl буфера (рН 7,5), содержащего 0,17 мМ ЭДТА, 100 мМ NaF, 2,5 мМ MgSO<sub>4</sub>, 10% гликоген и 0,25 мМ УДФ-глюкозу (40000 имп/мин), добавляли 40 мкл пробы. Для определения активности D-формы ГС смесь инкубировали 10 мин при 30°C в присутствии 7,2 мМ глюкозо-6-фосфата, а при определении активности I-формы фермента — в присутствии 0,17 мМ глюкозо-6-фосфата. Реакцию останавливали путем нанесения 0,5 мл 96% этанола на 1,5 см<sup>2</sup> фильтры (Whatman 3 mm), содержащие 50 мкл реакционной смеси. Затем фильтры отмывали от не включившейся метки в двух сменах 66%-ного этанола по 30 мин в каждой и одной смене ацетона в течение 5 мин. Высушенные фильтры помещали в вials, содержащие сцинтиллятор ЖС-7 и регистрировали количество импульсов с помощью счетчика (Beckman, Индианаполис, США) (Bezborodkina et al., 2014).

Активность гликогенфосфорилазы (ГФ) определяли, используя обратную реакцию синтеза гликогена *in vitro*. Количество  $[U-^{14}C]$ -глюкозы, включившейся в гликоген, измеряли при использовании в качестве субстрата  $[U-^{14}C]$ -глюкозо-1-фосфат (286 мКи/мМ Amersham, США) (Vardanis, 1992). Реакцию проводили в 50 мМ Трис-НСl буфере (рН 6,7), содержащем 100 мМ NaF, 10 % гликогена, 10 мМ глюкозо-1-фосфат (35000 имп/мин). При определении *a*-формы фермента в реакционную смесь добавляли 0,5 мМ кофеин; *b*-форму ГФ активировали добавлением в смесь 10 мМ АМФ. Инкубирование проводили при 37°C в течение 5 мин после внесения 35 мкл пробы. Все последующие операции для счета импульсов были аналогичны описанным выше (Bezborodkina et al., 2014).

Активность глюкозо-6-фосфатазы (Г-6-Фазы) определяли в ресуспендированном осадке микросомальной фракции, используя в качестве субстрата  $[U-^{14}C]$ -глюкозо-6-фосфат (49мКи/мМ, Sigma–Aldrich, США). Для этого 20 мкл микросомальной суспензии и 80 мкл реакционной смеси (рН 6,5), содержащей 50мМ каодиловую кислоту, 2мМ ЭДТА, 10мМ глюкозо-6-фосфат (30000 имп/мин), инкубировали 20 мин при 30°C. После инкубации 50 мкл смеси наносили в колонку с анионообменной смолой Dowex-1 (x8, в ацетатной форме) высотой 1,2 см и промывали двумя порциями воды по 0,5 мл. Эфлюенты собирали в вials и использовали для подсчета импульсов (Bezborodkina et al., 2013).

Активность глюкокиназы (ГК) измеряли в смеси, содержащей 30мМ Трис-НСl (рН 7,5), 50мМ глюкозу, 30мМ MgCl<sub>2</sub>, 50мМ АТФ, 1мМ НАДФ и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (2U/мл). Скорость восстановления НАДФ регистрировали через каждые 15 сек в течение 3 мин при длине волны 340 нм после добавления в кювету спектрофотомера Spocol 11 (Carl Zeiss, Йена, Германия) 1 мл реакционной смеси и 20 мкл гомогената (Ueda et al., 1974; Bezborodkina et al., 2013).

Активность фосфоруктокиназы (ФФК) определяли в 75мМ Трис-НСl буфере (рН 7,5), содержащем 3мМ MgCl<sub>2</sub>, 15мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 30мМ фруктозо-6-фосфат, 15мМ АТФ, 1,5мМ НАДН, 10U/мл альдолазы, 8U/мл триозофосфатизомеразы и 4U/мл глицерофосфатдегидрогеназы. Скорость реакции определяли через каждую минуту в течение 5 мин по убыли НАДН после его добавления в кювету спектрофотомера Spocol 11 (Carl Zeiss, Йена, Германия), содержащую 1,6 мл смеси и 0,1 мл пробы (Uyeda, 1979; Bezborodkina et al., 2013).

Для определения активности фруктозо-1,6-дифосфатазы (Фр-1,6-дФазы) использовали 50мМ Трис-НСl буфер (рН 7,5), содержащий 2мМ MgCl<sub>2</sub>, 40мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,15мМ фруктозо-1,6-дифосфат, 0,3мМ НАДФ, 0,1мМ ЭДТА, 0,7U/мл глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 1U/мл глюкозофосфатизомеразы. Кювету, содержащую 1 мл инкубационной смеси и 20 мкл пробы, предварительно инкубировали при 37°С в течение 5 мин, затем измеряли содержание НАДФ через каждую минуту в течение 5 мин (Tejwani et al., 1976; Bezborodkina et al., 2013).

Общий белок определяли по методу Бредфорда (Bradford, 1976) с использованием в качестве красителя Кумасси бриллиантового голубого G-250. Расчет концентрации белка проводился по стандартной калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой использовали данные, полученные при фотометрировании различных количеств БСА ( $\lambda = 595$  нм).

## **2.6. Морфометрия гистологических срезов печени крыс и человека**

Относительный объем соединительной ткани и паренхимы печени определяли на гистологических срезах, окрашенных гематоксилин-пикрофуксином или пикросириусом, с помощью анализатора изображений «VideoTest», используя объектив 10×/0,30 и интерференционный светофильтр  $\lambda_{\max}=500$  нм. Для каждого животного и

пациента анализировали 20–30 полей зрения. Долю соединительной ткани рассчитывали по формуле:

$$Q = \frac{S_{с.т.}}{S_{п.з.} - S_p} \quad (6)$$

где:  $Q$  — доля соединительной ткани от площади среза;  $S_{п.з.}$  — площадь поля зрения микроскопа ( $\text{мкм}^2$ );  $S_{с.т.}$  — площадь соединительной ткани ( $\text{мкм}^2$ );  $S_p$  — площадь просветов сосудов, разрывов ткани ( $\text{мкм}^2$ ).

Количество гепатоцитов в печени определяли по формуле:

$$N = P \times R \times \frac{f}{M} \quad (7)$$

где:  $N$  — количество гепатоцитов в печени;  $P$  — сырая масса печени, г;  $R$  — доля паренхимы в печени;  $f$  — коэффициент перехода от сырой массы печени к сухой;  $M$  — средняя сухая масса одного гепатоцита, г. Коэффициент  $f$  принимали равным 0,27 (Bezborodkina et al., 2016; Bezborodkina et al., 2021б).

## 2.7. Морфометрия митохондриального аппарата гепатоцитов крыс

С помощью анализатора изображений «VideoTest» на электроннограммах с увеличением 20000х, проводили измерения периметров митохондрий и длины их крист. Концентрацию внутренних мембран митохондрий (КВММ) рассчитывали по формуле:

$$\text{КВММ} = (p + 2l) \times n \quad (8)$$

Где:  $p$  — средний периметр митохондрий;  $l$  — средняя длина крист в одной митохондрии;  $n$  — количество митохондрий на единицу площади.

Для определения количества митохондрий и занимаемого ими объема на единицу площади клетки использовали электроннограммы, снятые при увеличении 8000х.

Для электронно-микроскопического исследования использовали по 5 крыс из контрольной и опытной группы. Для каждого из животных было проанализировано по 20 гепатоцитов (Безбородкина и др., 2008).

## 2.8. Определение вклада процессов пролиферации, полиплоидизации и гипертрофии в увеличение массы печени

Относительный вклад пролиферации ( $Q_1$ ), полиплоидизации ( $Q_2$ ) и гипертрофии ( $Q_3$ ) гепатоцитов в нормальный и репаративный рост печени крыс и человека рассчитывали, используя следующие формулы (Богданова и др., 1990):

$$Q_1 = \frac{M \times (P_1/P_2) - 1}{M - 1} \quad (9)$$

$$Q_2 = \frac{M \times m_1 \times (g_2 - g_1)}{(M - 1) \times P_2} \quad (10)$$

$$Q_3 = \frac{M \times g_2 \times (m_2 - m_1)}{(M - 1) \times P_2} \quad (11)$$

где:  $M$  — кратность изменения массы паренхимы печени за исследуемый период эксперимента (6 мес). На основании данных о величине митотического индекса, продолжительности митоза в гепатоцитах и уровне некротизации паренхимы при повторных воздействиях  $CCl_4$  было подсчитано, что убыль паренхимы в течение 6 мес воздействия гепатотропным ядом превышает исходную массу примерно в 5 раз. В случае физиологической регенерации убыль массы паренхимы за счет гибели клеток в течение того же периода равна исходной ее массе (Сакута, Кудрявцев, 1996);  $P_1$  и  $P_2$  — сухая масса гепатоцита до начала отравления крыс  $CCl_4$  и по окончании эксперимента соответственно;  $m_1$  и  $m_2$  — средняя сухая масса, рассчитанная на диплоидный гепатоцит перед началом отравления крыс  $CCl_4$  и по окончании эксперимента соответственно;  $g_1$  и  $g_2$  — средняя плоидность гепатоцитов, деленная на 2.

## 2.9. Статистическая обработка полученных данных

Статистическую обработку полученных результатов проводили на персональном компьютере, используя стандартный пакет программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США) и SigmaPlot v. 9.0, v. 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 ( $r$ ). Линейную регрессию рассчитывали по формуле:

$$\bar{y}_x = a + b \cdot x \quad (12)$$

где:  $a$  — свободный член

$$a = \frac{\sum y \cdot \sum x^2 - \sum x \cdot \sum yx}{n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$b$  — коэффициент регрессии

$$b = \frac{n \cdot \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$n$  — количество клеток.

Для оценки достоверности результатов использовали таблицу критических значений корреляции Пирсона.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Морфофункциональные изменения при хроническом поражении печени

#### 3.1.1. Структура печени крысы и человека в норме и при циррозе

Хронические гепатиты (ХГ) — широко распространенные воспалительные заболевания печени человека. Причиной ХГ может быть действие различных токсинов, злоупотребление в течение длительного времени алкоголем, аутоиммунные заболевания, генетические факторы, а также целый ряд метаболических нарушений. Одной из наиболее частых причин ХГ являются инфекции, вызванные гепатотропными вирусами А (РНК, содержащий вирус), В, С, D, G (ДНК, содержащие вирусы) и др. По данным ВОЗ 2019 года одних только носителей гепатита В и С (HBV и HCV) насчитывалось в мире более 350 (296 и 58 соответственно) млн человек (World Health Organization, 2021). ХГ представляет собой непрерывный процесс воспаления, разрушения и регенерации паренхимы печени, который длится более 6 мес и вызывает ее фиброз. Фиброз ткани — обычное явление при патологиях печени. В ходе длительного повреждения печени клетки Ито, фибробласты, внеклеточный матрикс, постепенно замещают поврежденные гепатоциты, что приводит к развитию финальной необратимой стадии ХГ — циррозу печени (ЦП). В свою очередь ЦП обычно заканчивается печеночной недостаточностью и/или гепатоцеллюлярной карциномой (Kalaitzakis et al., 2011; Ganne-Carrié, Nahon, 2019).

Для ЦП характерны узелковая трансформация паренхимы и образование фиброзных септ, соединяющих портальную систему с системой печеночных вен. Основными диагностическими признаками ЦП, помимо фиброза значительной части паренхимы, считают выраженную регенерацию печеночной ткани, необычно мелкие портальные тракты и избыточное количество центральных вен в дольках, а также интенсивное отложение липофусцина в перицентральных гепатоцитах (Schuppan, Afdhal, 2008).

Анализ гистологических срезов печени крыс показал, что структура паренхимы контрольных животных типична для нормального органа: имеет радиально расположенные трабекулы гепатоцитов вокруг центральных сосудов, небольшое



количество соединительной ткани, четко выраженные границы портальных сосудов и желчных протоков (рис. 3.1, *а, б*). На срезах печени крыс с циррозом выявлены диффузные лейкоцитарные инфильтраты, свидетельствующие об активации воспалительных процессов, и признаки фибротизации (рис. 3.1, *в*). Паренхима прорастает соединительнотканными тяжами, нарушающими дольковую структуру органа. Окраска пикросириусом выявляет соединительнотканые волокна по ходу синусоидов (рис. 3.1, *г*) (Bezborodkina et al., 2013б, 2014, 2021).

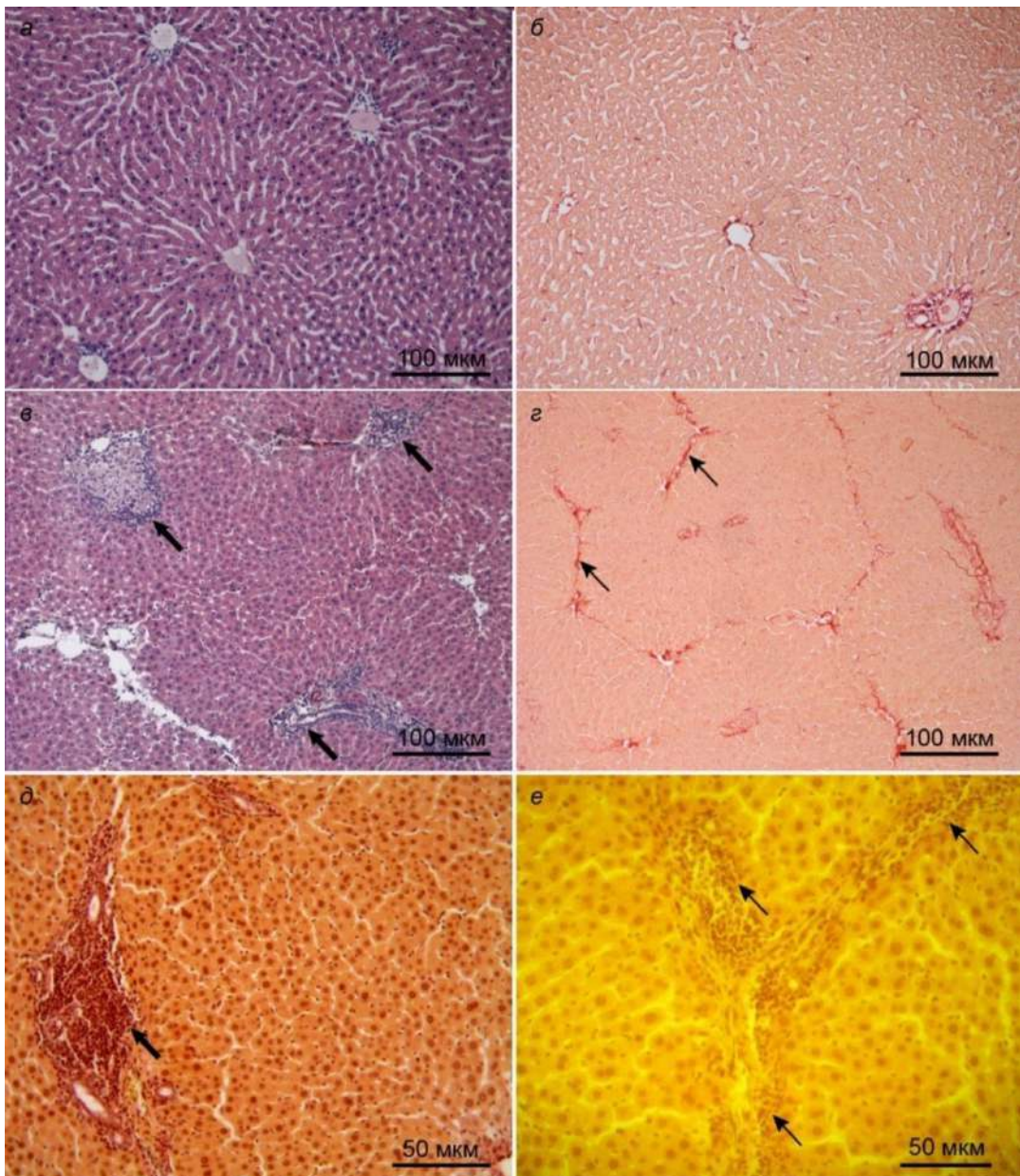


Рисунок 3.1 — Срезы печени крыс: *а, б* — норма; *в, г, д, е* — цирроз печени. *а, в, д* — окраска гематоксилин-эозином; *б, г* — окраска пикросириусом, *е* — окраска по Ван-Гизону. Примечание: жирными стрелками отмечены очаги воспаления (*в, д*), тонкими — соединительно-тканые тяжи по ходу синусоидов (*г, е*).

Морфологическая картина поражения печени при воздействии  $\text{CCl}_4$  описана довольно подробно (Zimmerman, 1978; Onori, 2000). В результате интоксикации  $\text{CCl}_4$  центрлобулярный некроз гепатоцитов приводит к замещению зон некроза соединительной тканью и стимуляции пролиферации клеток в узлах регенерации. При этом соединительная ткань образуется не только у центральных вен, но и по ходу всего венозного русла. Воспалительная реакция в портальных полях также сопровождается разрастанием соединительной ткани по ходу портальных сосудов. Проллиферация гепатоцитов, стимулированная их гибелью, ведет к возникновению многорядных балок, а в дальнейшем — к беспорядочным скоплениям печеночных клеток.

Считается, что ЦП у крыс, вызванный длительным многократным воздействием на крыс  $\text{CCl}_4$ , подобен цирротическому поражению печени у человека (Kohn et al., 1991; Скобелева, 1994; Datsko et al., 2020). Микроскопический анализ срезов печени человека свидетельствует о том, что в норме структура паренхимы печени человека, как и у крысы, характеризуется радиально расположенными трабекулами гепатоцитов вокруг центральных вен, четко выраженными портальными сосудами и желчными протоками (рис. 3.2, а). При формировании цирроза дольковая структура печени человека, как и у крысы, нарушается, образуются так называемые «ложные дольки», в которых резко выражен клеточный и ядерный полиморфизм, в паренхиме наблюдается массовая гибель гепатоцитов, доля соединительной ткани увеличивается (рис. 3.2, б) (Кудрявцева и др., 2002а; Оковитый и др., 2010; Bezborodkina et al., 2021б).

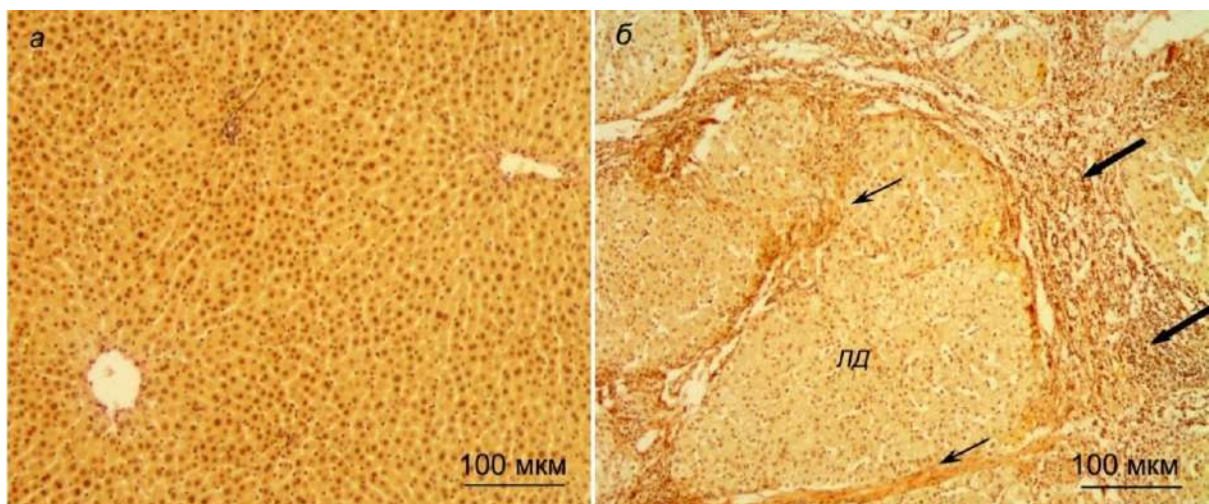


Рисунок 3.2 — Срезы печени человека: а — норма, б — цирроз печени. Окраска гематоксилин-пикрофуксином. Примечания: 1) ЛД — ложная долька печени; 2) жирными стрелками отмечены очаги некроза, тонкими — прослойки соединительной ткани (б).

Фиброплазия кардинально изменяет соотношение между паренхимными и непаренхимными элементами в пользу последних. Взаимоисключающая динамика содержания соединительной ткани и паренхимы в ходе развития ЦП является характерной чертой этой патологии (James et al., 1986; Reichen et al., 1987).

Морфометрия нормальной и цирротической печени крыс установила, что при ЦП доля соединительной ткани увеличивается в 7,7 раза (табл. 3.1). Вместе с тем, масса печени крыс в ходе развития ЦП увеличивается с  $9,72 \pm 0,37$  г до  $11,56 \pm 0,55$  г ( $p < 0,05$ ). Поэтому, несмотря на то что доля паренхимы при циррозе в наших экспериментах уменьшалась на 8,8 % (табл. 3.1), ее абсолютная масса не отличалась от массы паренхимы контрольных животных (Bezborodkina et al., 2021б). Небольшое увеличение массы печени крыс или ее неизменность при патологиях этого органа отмечали и другие авторы (Xu et al., 2010; Wang et al., 2015; Rasineni et al., 2021).

Таблица 3.1 — Некоторые морфометрические параметры печени крыс в норме и при циррозе (ЦП) ( $X \pm S_x$ ,  $n = 5$ ).

Параметр	Контроль	ЦП
Масса печени, г	$9,72 \pm 0,37$	$11,56 \pm 0,55$ <sup>1</sup>
Относительная масса печени, %	$3,00 \pm 0,06$	$4,33 \pm 0,09$ <sup>2</sup>
Доля паренхимы, %	$88,0 \pm 1,1$	$79,2 \pm 1,3$ <sup>2</sup>
Доля соединительной ткани, %	$0,84 \pm 0,07$	$7,31 \pm 0,27$ <sup>2</sup>
Число гепатоцитов в 1 г печени	$2,52 \pm 0,15 \times 10^8$	$1,81 \pm 0,21 \times 10^8$ <sup>1</sup>

<sup>1,2</sup> Достоверно отличается от значения в контроле (<sup>1</sup> $p < 0,05$ , <sup>2</sup> $p < 0,001$ ).

Результаты, представленные в таблице 3.2, свидетельствуют о том, что в отличие от печени крыс доля паренхимы цирротической печени человека уменьшается по сравнению с нормой на 40,4 %, а доля соединительной ткани возрастает почти в 20 раз. В отличие от ЦП у крыс, взаимоисключающая динамика соединительной ткани и паренхимы в ходе развития ЦП у человека прослеживается очень четко (Bezborodkina et al., 2021б).

Таблица 3.2 — Некоторые морфометрические параметры печени человека в норме и при циррозе (ЦП) ( $X \pm S_x$ ).

Параметр	Контроль (n = 10)	ЦП (n = 13)
Доля паренхимы, %	90,6±0,9	54,0±2,5 <sup>2</sup>
Доля соединительной ткани, %	1,79±0,08	36,5±3,3 <sup>2</sup>
Число гепатоцитов в 1 г печени	4,81±0,27×10 <sup>8</sup>	2,32±0,29×10 <sup>8</sup> 2

n — число пациентов в группе; <sup>1,2</sup> достоверно отличается от значения в контроле (<sup>1</sup>p < 0,05, <sup>2</sup>p < 0,001).

Причины столь сильной фибротизации паренхимы печени и более интенсивной гибели гепатоцитов при формировании цирроза у человека, по сравнению с крысами не ясны. По-видимому, они связаны не только и не столько с природой агентов, вызывающих повреждение печени, или с разными методиками получения экспериментального ЦП. При объяснении причин столь серьезных различий в степени патологических изменений между печенью человека и печенью крысы, прежде всего, надо обратить внимание на фундаментальное отличие между этими видами млекопитающих – их размеры и, как следствие, разную скорость метаболизма. Масса тела взрослых крыс, использованных в наших экспериментах, равнялась ~ 0,3 кг, а масса тела человека составляла ~70 кг. Удельная интенсивность метаболизма крыс с массой тела 0,3 кг составляет 94,6 ккал/кг/24 ч, тогда как у взрослого человека с массой тела ~ 70 кг — 24,2 ккал/кг/24 ч (Шмидт-Ниельсен, 1987), т.е. уровень метаболизма у крысы почти в 4 раза выше. Такая существенная разница означает, что у крыс скорость процессов, в том числе пролиферативных, значительно превосходит скорость аналогичных процессов в организме человека. Показано, что в нормальной печени человека доля гепатоцитов в S-фазе клеточного цикла составляет 0,02–0,05 % (Leevy, 1967; Takehara, 1975), в то время как у крыс — 0,2–1,5 % (Рябинина, Бенюш, 1973). Другой показатель пролиферативной активности — митотический индекс — колеблется в нормальной печени человека в пределах 0,0001–0,0007 % (Кудрявцев и др., 1991), тогда как в нормальной печени крыс этот показатель составляет 0,005–0,1 % (Рябинина, Бенюш, 1973; Mangnall et al., 2003). Мелкие соединительно-тканые клетки (фибробласты, макрофаги и др.) обладают более высокой пролиферативной активностью, чем гепатоциты. Поэтому можно предположить, что скорость замещения гибнущих гепатоцитов этими клетками в ходе развития ЦП у человека, будет



значительно выше, чем в печени крыс. Возможно, вследствие этого доля фиброзной ткани в цирротической печени человека значительно превосходит аналогичный показатель у крыс.

Как бы то ни было, увеличение доли соединительной ткани отрицательно сказывается на жизнедеятельности гепатоцитов, что выражается, прежде всего, в затруднении обменных процессов между клетками. Помимо этого, усиленный фиброз печени приводит к нарушению нормального функционирования печеночной дольки из-за образования септ, соединяющих центрлобулярную зону с перипортальной с помощью сосудистых шунтов. Наконец, разрастание соединительной ткани способствует образованию базальной мембраны и преобразованию синусоидов в ригидные капилляры. Все эти процессы вызывают значительную перестройку дольковой структуры печени (рис. 3.1, *в, г, д, е*, рис. 3.2, *б*), ухудшение снабжения гепатоцитов кислородом, питательными веществами и источниками энергии (Bezborodkina et al., 2021б; Оковитый и др., 2022).

### **3.1.2. Состояние митохондриального аппарата гепатоцитов в нормальной и патологически измененной печени крыс**

Универсальным источником энергии для различных процессов в гепатоцитах, как и во многих других типах клеток, служит АТФ, которая образуется путем окислительного фосфорилирования в митохондриях. Примерно 90 % кислорода, потребляемого клетками млекопитающих, используется митохондриями для продукции АТФ путем окислительного фосфорилирования (Javadov et al., 2018). Уровень окислительных процессов, протекающих в клетках, тесно связан с количеством и структурой митохондрий. Печень относится к числу органов наиболее богатых митохондриями. Известно, что один гепатоцит содержит около 2000 митохондрий (David, 1977), которые обладают уникальными свойствами, поскольку объединяют метаболизм углеводов, липидов и белков в единый центр (Degli Esposti et al., 2012).

Электронно-микроскопическое исследование митохондрий в гепатоцитах цирротической печени крыс выявило изменение формы и увеличение размеров этих органоидов (рис. 3.3).

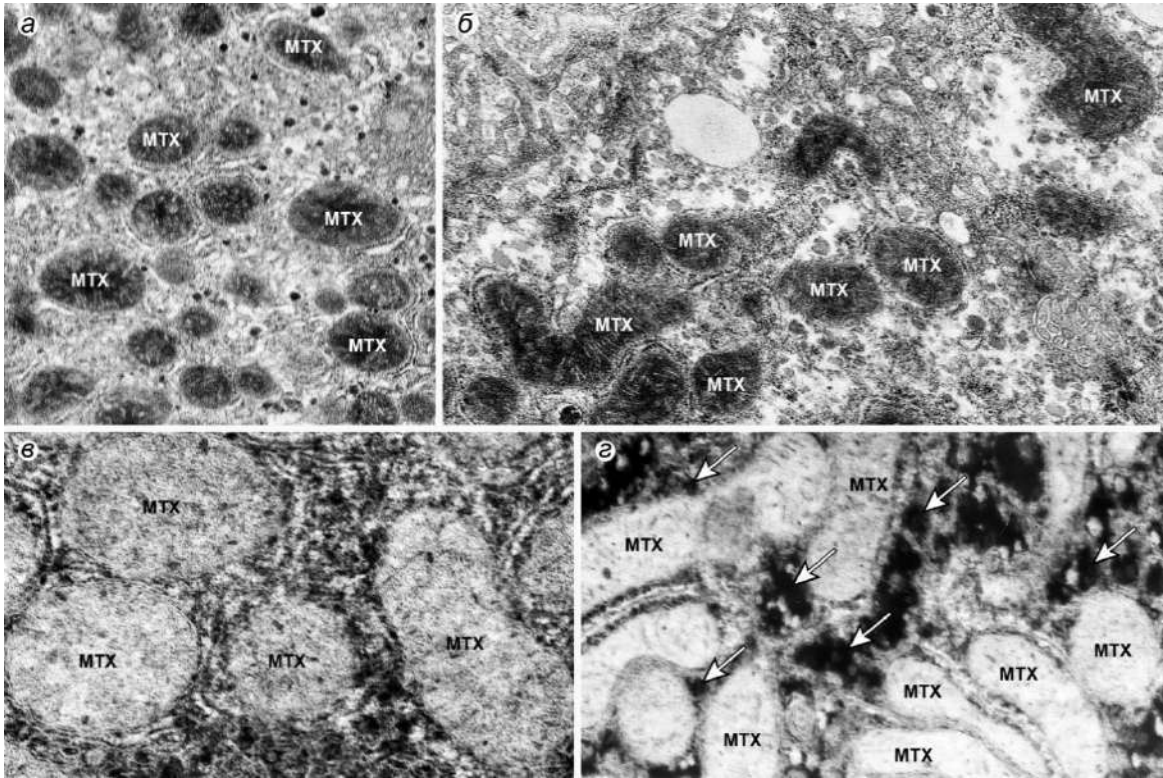


Рисунок 3.3 — Митохондрии гепатоцитов крыс контрольной (а, в) и опытной группы (б, г). а, б — 8000х, в, г — 20000х. Примечание: МТХ — митохондрия. Стрелками отмечены гранулы гликогена.

Однако эти изменения могли быть результатом обработок, применяемых при подготовке ткани для электронно-микроскопических исследований. Поэтому мы исследовали морфологию митохондрий в первичной культуре гепатоцитов, изолированных из печени контрольных крыс и крыс с токсическим гепатитом. Было установлено, что внутрижелудочное введение в течение месяца  $CCl_4$  и замена питьевой воды на 5%-й этанол приводят к фиброзу и жировой дистрофии печени, сопровождаясь при этом воспалением и нарушением ее дольковой структуры (Оковитый и др., 2007). Визуальный анализ гепатоцитов, окрашенных родамином 123, показал, что митохондрии в клетках контрольных и опытных животных немного отличались. В основном, эти отличия выражались в том, что в контроле многие митохондрии имели более удлиненную форму и более равномерное распределение по цитоплазме гепатоцитов, чем в клетках опытных животных (рис. 3.4) (Baidyuk et al., 2009).

Морфометрия митохондриального аппарата гепатоцитов показала, что объемная плотность митохондрий (ОПМ) в цитоплазме клеток контрольных крыс составляет  $19,5 \pm 0,7 \%$ , что хорошо согласуется с данными других авторов (David, 1977; Анацкая,

1999; Das et al., 2012). При этом ОПМ в паренхиме всей печени контрольных крыс составила по нашим данным  $1,667 \pm 0,136$  отн.ед (рис. 3.5, б) (Безбородкина и др., 2008).

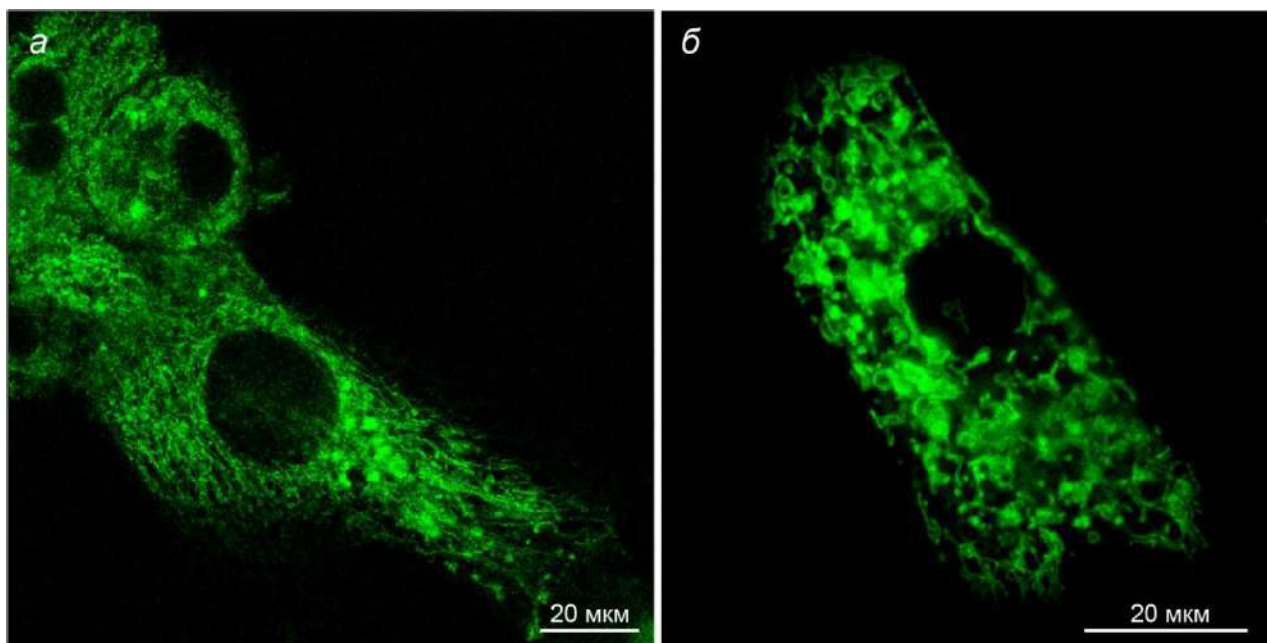


Рисунок 3.4 — Митохондрии живых гепатоцитов, окрашенных родамином 123. *а* — гепатоциты интактных крыс, *б* — гепатоциты крыс после воздействия  $\text{CCl}_4$  и этанолом.

$\text{CCl}_4$ -индуцированный цирроз не приводит к изменению количества митохондрий в паренхиме (рис. 3.5, *а*), но при этом вызывает увеличение ОПМ в среднем на гепатоцит, до  $25,0 \pm 1,0$  % ( $p < 0,01$ ). Схожее значение ОПМ было найдено в гепатоцитах крыс после длительного воздействия этанола (Das et al., 2012). Результаты, представленные на рис. 3.5, *б* свидетельствуют о том, что ОПМ во всей паренхиме цирротической печени превышает контрольное значение на 37,4 % ( $p < 0,01$ ) (Безбородкина и др., 2008).

Увеличение ОПМ в клетках может быть связано, как с усилением окислительного метаболизма в митохондриях, так и с их набуханием, которое сопровождается снижением продукции АТФ (Kaasik et al., 2007; Javadov et al., 2018). Поэтому для выявления природы повышения ОПМ в гепатоцитах при ЦП была проведена морфометрия внутренних мембран митохондрий, на которых, как известно, расположены специфические белки, катализирующие окислительные реакции в дыхательной цепи. Эти белки необходимы для осуществления окислительного фосфорилирования, посредством которого синтезируется бóльшая часть АТФ в клетке.

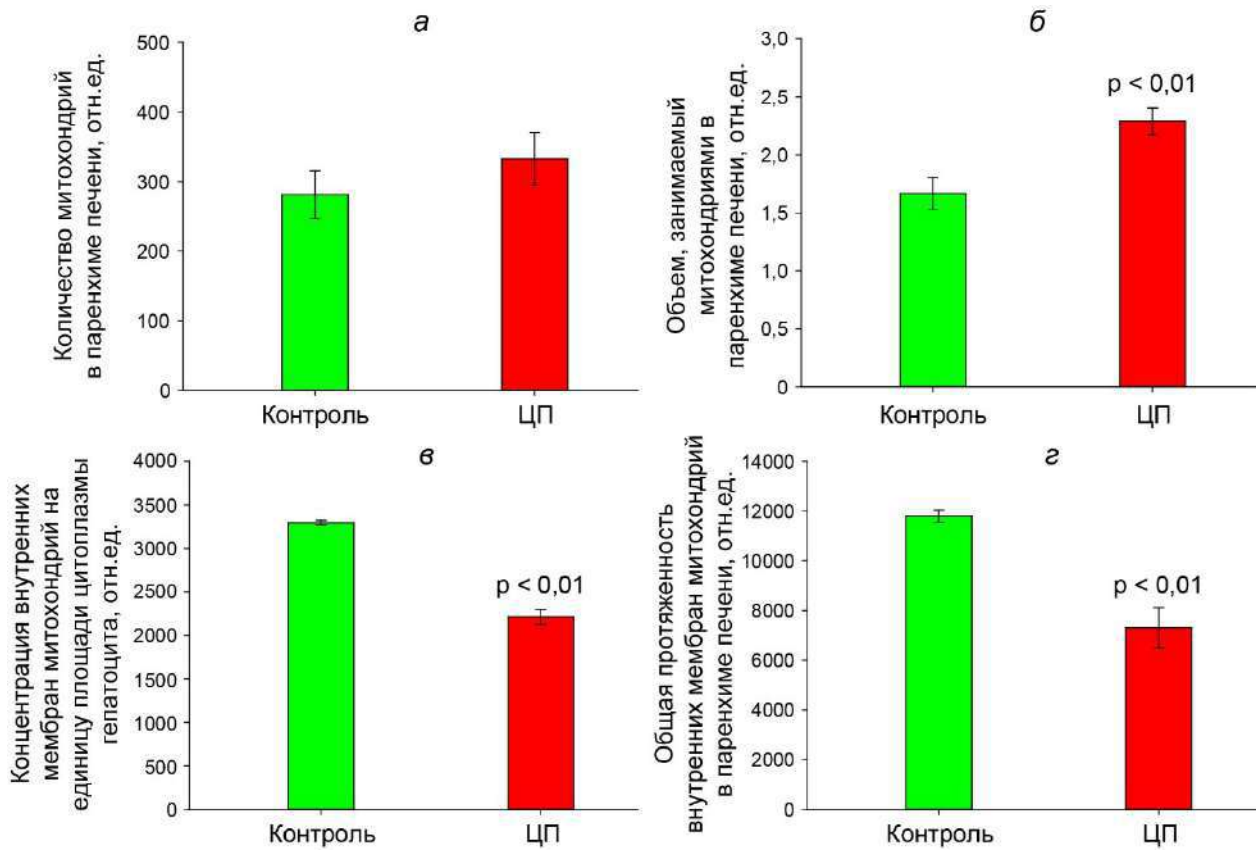


Рисунок 3.5 — Некоторые морфометрические показатели митохондрий гепатоцитов крыс в норме (контроль) и при циррозе печени (ЦП) ( $X \pm S_x$ ,  $n = 5$ ).

Оказалось, что концентрация внутренних мембран митохондрий на единицу площади цитоплазмы гепатоцита при ЦП уменьшается на 30,7 % (рис 3.5, в), а общая протяженность внутренних мембран на одну митохондрию снижается почти вдвое (рис. 3.5, г) (Безбородкина и др., 2008).

Таким образом, полученные данные указывают на то, что при ЦП скорость дыхания и уровень продукции АТФ в митохондриях гепатоцитов значительно снижены по сравнению с нормой, а концентрация внутренних мембран митохондрий, в отличие от их объемной плотности, наиболее адекватно отражает уровни дыхания и образования АТФ в гепатоцитах.

Увеличение размеров митохондрий в гепатоцитах и уменьшение количества крист при различных поражениях печени отмечалось многими авторами (Krähenbühl, Reichen, 1992; Krähenbühl et al., 2000; Welt et al., 2004; Shami et al., 2021). Определение активности ферментов дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов НАДН-дегидрогеназы (I-комплекс), сукцинатдегидрогеназы (II-комплекс), цитохромоксидазы (IV-комплекс) и АТФ-синтазы (V-комплекс) при хронических заболеваниях печени



показало ослабление функции этих органоидов (Fernandez-Checa et al., 1993; Liu et al., 1996; Krähenbühl et al., 2000; Huang et al., 2003; Yang et al., 2004).

Исходя из вышесказанного, можно заключить, что хронические поражения печени такие как, неалкогольная жировая болезнь печени, алкогольный и вирусный гепатиты, первичная гепатокарцинома, тиаоацетамидный и  $\text{CCl}_4$ -циррозы печени и др., несмотря на сильное отличие их патофизиологии, вызывают однотипный дефект митохондриального аппарата гепатоцитов, следствием которого является снижение скорости дыхания митохондрий. Снижение скорости дыхания, в свою очередь, приводит к значительному падению уровня окислительного фосфорилирования, уменьшению продукции АТФ митохондриями и увеличению концентрации активных форм кислорода (Harvey et al., 1999; Fukumura et al., 2003; Middleton, Vergis, 2021). Падение продукции АТФ ухудшает работу АТФ-зависимого натриевого насоса и, далее, ведет к обводнению и гибели клеток (Chara-Dubocq et al., 2018).

### **3.1.3. Характеристика тканеспецифических функций печени крыс и человека при циррозе**

Хорошо известно, что эффективность выполнения гепатоцитами своих многочисленных функций тесно связана со скоростью образования АТФ. Поскольку скорость окислительного фосфорилирования и концентрация АТФ в гепатоцитах при  $\text{CCl}_4$ -циррозе заметно падают, можно ожидать, что нехватка богатых энергией молекул неизбежно отразится на интенсивности тканеспецифических функций печени. Об их уровне обычно судят по активности соответствующих ферментов в ее ткани или концентрации маркерных продуктов метаболизма в сыворотке крови.

Данные, представленные на рисунке 3.6, свидетельствуют о том, что концентрация общего билирубина в сыворотке крыс опытной группы и у больных с циррозом печени возрастает, а общего белка — снижается по сравнению с нормой. Изменения этих показателей при циррозе свидетельствуют о нарушении пигментного обмена в печени и снижении ее протеинсинтетической функции при циррозе. Продолжительность гексеналового сна, отражающая способность системы микросомального окисления гепатоцитов метаболизировать различные ксенобиотики (в т.ч. гексенал), увеличивается у крыс с ЦП более чем в 5 раз ( $p < 0,001$ ) по сравнению с

нормой. Полученные данные свидетельствуют о снижении эффективности системы микросомального окисления в гепатоцитах при патологии (Kudryavtseva et al., 2003; Оковитый и др., 2006; Bezborodkina et al., 2014).

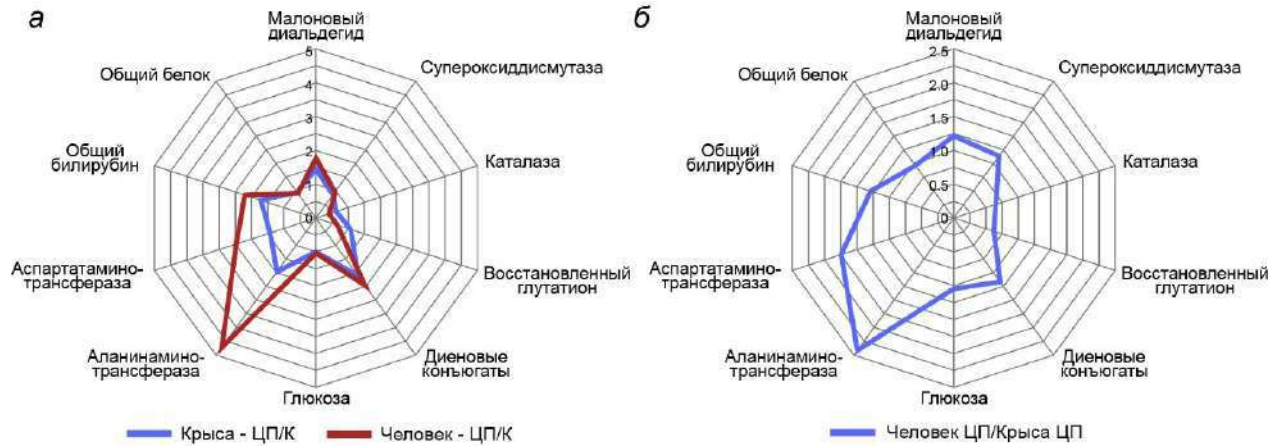


Рисунок 3.6 — Некоторые биохимические показатели сыворотки крови крысы и человека в норме (К) и при циррозе печени (ЦП).

Таким образом, можно заключить, что развитие ЦП сопровождается ослаблением синтеза белков и детоксикационной функции печени. Схожие результаты были получены в других работах (Krähenbühl, Reichen, 1992; Welt et al., 2004; Young et al., 2006; Nishikawa et al., 2014; Wilson et al., 2014; Ju et al., 2016; Kietzmann, 2019). В этих работах было показано, что состояние гипоксии при циррозе приводит к ухудшению ряда функций печени, в том числе барьерной и протеинсинтетической (Скулачев, 1999; Harvey et al., 1999; Schuppan, Afdhal, 2008).

Гипоксия сопровождается хроническими повреждениями печени любой этиологии, повышая продукцию митохондриями кислородсодержащих свободных радикалов и активных форм кислорода (АФК) (Poyton et al., 2009; Wilson et al., 2014; Ju et al., 2016; Prieto, Monsalve, 2017). Усиление продукции АФК является общей характеристикой устойчивого воспалительного ответа на повреждение печени. АФК вызывают цепные реакции с накоплением липидных радикалов, в результате чего изменяются свойства клеточных мембран и образуются различные продукты ПОЛ.

Данные о состоянии про- и антиоксидантных систем у крыс и человека свидетельствуют об однотипных изменениях в ходе развития ЦП, но у человека они выражены сильнее (рис. 3.6, б) (Оковитый и др., 2006; Безбородкина и др., 2008; Bezborodkina et al., 2014; Bezborodkina et al., 2021б).

Концентрации малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в сыворотке крови крыс с ЦП увеличились по сравнению с нормой примерно в 2,1 ( $p < 0,05$ ) и 1,5 ( $p < 0,001$ ) раза соответственно, а в сыворотке крови человека с ЦП — в 2,4 ( $p < 0,01$ ) и 1,8 ( $p < 0,001$ ) раза соответственно. Увеличение концентрации продуктов ПОЛ в ходе длительного патологического процесса связано, прежде всего, с истощением резервов антиоксидантной системы. Полученные результаты указывают на заметное снижение активности антиоксидантной системы при ЦП. Активность каталазы в сыворотке крови человека при ЦП падает по сравнению с нормой в 2,5 ( $p < 0,001$ ) раза, а концентрация восстановленного глутатиона — в 1,5 ( $p < 0,05$ ) раза. Активность каталазы в сыворотке крови крыс снижается при ЦП в 1,5 раза по сравнению с нормой ( $p < 0,05$ ). Сравнение крысы и человека по таким показателям, как общий белок, МДА, супероксиддисмутаза и ДК показало, что патофизиологические условия приводят примерно к одинаковому ответу органа на повреждение (рис. 3.6, б). В то же время данные, приведенные на этом рисунке, свидетельствуют о том, что при циррозе печень человека обладает меньшей способностью обезвреживать билирубин, нейтрализовать свободные радикалы и перекиси. Вследствие этого печень человека оказывается более уязвимой к действию повреждающих агентов, чем печень крысы (Kudryavtseva et al., 2003; Оковитый и др., 2006; Безбородкина и др., 2008; Bezborodkina et al., 2014; Bezborodkina et al., 2021б).

Когда мощности антиоксидантной системы в печени оказывается недостаточно, чтобы противодействовать непрерывному потоку АФК, происходит повреждение мембранных структур клеток (Ohyashiki et al., 1995; Скулачев, 1999), ухудшение функции гепатоцитов, что в конце-концов, вызывает их гибель (цитолиз). О цитолизе в печени обычно судят по увеличению в сыворотке крови уровня индикаторных ферментов — аланинаминотрансферазе (АлАТ) и аспартатаминотрансферазе (АсАТ) (Siegel et al., 2000). Наши данные (рис. 3.6, а) свидетельствуют о том, что активность АлАТ и АсАТ у крыс с  $CCl_4$ -циррозом печени возрастает по сравнению с нормой в 2,0 ( $p < 0,001$ ) и 1,4 ( $p < 0,01$ ) раза соответственно. У больных хроническим гепатитом и циррозом печени уровни АлАТ и АсАТ увеличивались по сравнению с нормой в 4,8 ( $p < 0,001$ ) и 2,0 ( $p < 0,001$ ), 4,7 ( $p < 0,001$ ) и 2,5 ( $p < 0,001$ ) раза соответственно (рис. 3.6, а) (Kudryavtseva et al., 2003; Bezborodkina et al., 2014; Bezborodkina et al., 2021б). Сравнение уровней АлАТ и АсАТ в печени крыс и человека показало, что ЦП у человека сопровождается значительно более выраженным выходом этих ферментов в

кровь, чем при ЦП у крыс. Высокий цитолиз гепатоцитов при ЦП у человека подтверждается более высокой убылью гепатоцитов в ходе формирования ЦП (табл. 3.2).

Имеющиеся данные о числе гепатоцитов в печени крыс, полученные с помощью различных методов, свидетельствуют о том, что их количество варьирует от  $1,29 \times 10^8$  до  $2,64 \times 10^8$  клеток/г сырого веса печени (Iyre et al., 1965; Marcos et al., 2006; Sohlenius-Sternbeck, 2006; Байдюк, 2013). По нашим данным, число гепатоцитов в 1 г нормальной печени крыс составляет  $2,52 \times 10^8$  клеток (таблица 3.1). Хроническое отравление животных  $CCl_4$  в течение 6 мес приводит к снижению числа гепатоцитов до  $1,81 \times 10^8$  клеток/г печени (таблица 3.2). Число гепатоцитов в 1 г нормальной печени человека составляет  $4,81 \times 10^8$ , а в 1 г цирротической —  $2,32 \times 10^8$  клеток (таблица 3.2).

Данные об абсолютном количестве гепатоцитов в нормальной и цирротической печени крыс и человека показывают, что развитие цирроза приводит к уменьшению числа гепатоцитов в 1 г печени: у крыс на 28,2 %, а в печени человека почти вдвое меньше — на 51,8 % (табл. 3.1, табл. 3.2) (Bezborodkina et al., 2021б). Учитывая, что масса печени у человека при циррозе уменьшается на 10–18 % по сравнению с нормой (Arisarntanarak et al., 2014; Simon et al., 2020), общая потеря гепатоцитов в ходе развития ЦП у человека составит примерно 45 %.

Таким образом, полученные нами данные позволяют утверждать, что развитие ЦП в печени человека приводит к более глубоким структурным и функциональным изменениям, нежели у крыс, в частности к более существенной потере гепатоцитов, которая нарастает по мере развития патологического процесса.

#### **3.1.4. Полиплоидия и гипертрофия гепатоцитов крысы и человека в норме и при хроническом поражении печени**

Непрерывная гибель клеток в ходе развития ЦП, стимулирует регенерацию печени, основными клеточными механизмами которой являются пролиферация, полиплоидизация и гипертрофия гепатоцитов (Богданова и др., 1990; Сакута, Кудрявцев, 1996; Сакута, Кудрявцев, 2005). Ведущую роль в репаративном росте печени при остром или хроническом действии агентов различной этиологии, играют ДНК-синтетические процессы — пролиферация и полиплоидизация гепатоцитов, которые

приводят к увеличению числа гепатоцитов в печени и/или количества геномов в клетках (Сакута, Кудрявцев, 1996; Сакута, Кудрявцев, 2005).

Пролиферативная реакция паренхимы печени на хроническое воздействие гепатотоксинами характеризуется снижением вероятности прохождения гепатоцитами полного клеточного цикла. В результате незавершенности клеточных делений в паренхиме появляются двуядерные клетки и клетки с полиплоидными ядрами.

Цитофотометрический анализ распределения гепатоцитов по классам плоидности у крыс с  $CCl_4$ -циррозом печени показал, что состав клеточной популяции паренхимы в этой группе животных значительно отличается от нормы (табл. 3.3) (Bezborodkina et al., 2016).

Таблица 3.3 — Распределение гепатоцитов крыс по классам плоидности в клеточных популяциях нормальной (контроль) и цирротической печени (ЦП) ( $X \pm S_x$ ,  $n = 5$ ).

Группа крыс	Доля гепатоцитов разных классов плоидности, %						Средняя плоидность клеток, с
	2с	2с×2	4с	4с×2	8с	8с×2	
Контроль	0,63±0,24	3,62±0,48	81,84±3,14	9,38±2,90	3,53±1,79	-----	4,46±0,15
ЦП	2,86±0,91 <sup>1</sup>	2,13±1,45	68,51±3,95 <sup>1</sup>	12,68±2,94	12,37±2,82 <sup>1</sup>	1,45±0,62	5,12±0,17 <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Достоверно отличается от значения в контроле при  $p < 0,05$ .

Паренхима цирротической печени крыс характеризуется снижением доли двуядерных гепатоцитов с диплоидными ядрами (2с×2-клетки) и увеличением относительного количества высокоплоидных клеток. Доля одноядерных октаплоидных (8с) гепатоцитов увеличивается в 3,5 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с их количеством у одновозрастных интактных крыс. Кроме того, при ЦП появляются двуядерные гепатоциты с двумя октаплоидными ядрами (8с×2-клетки), которые не встречались в нормальном органе. Отдельные клетки в цирротической печени достигают плоидности 16с и даже 32с (16с×2). В результате, средний уровень плоидности гепатоцитов крыс опытной группы возрастает на 14,8 % ( $p < 0,01$ ) по сравнению с нормой (табл. 3.3).

В отличие от крысы, модальный класс гепатоцитов человека представлен одноядерными диплоидными (2с) гепатоцитами. Средняя плоидность гепатоцитов нормальной печени человека составляла  $2,21 \pm 0,05с$ , а у больных ХГ и она увеличилась

на 13,1 % и 15,8 % соответственно. В паренхиме нормальной и патологически измененной печени преобладали одноядерные клетки с диплоидными ядрами (табл. 3.4).

Таблица 3.4 — Распределение гепатоцитов человека по классам ploидности в норме, при хроническом гепатите (ХГ) и циррозе печени (ЦП) ( $X \pm S_x$ ).

	Доля гепатоцитов разных классов ploидности, %					Средняя ploидность клеток, с
	2с	2с×2	4с	4с×2	8с	
Контроль (n = 7)	89,57±2,28	4,70±1,47	5,73±1,38	–	–	2,21±0,05
ХГ (n = 5)	76,90±4,83 <sup>1</sup>	15,46±2,96 <sup>1</sup>	6,82±1,65	–	0,82±0,36	2,50±0,11 <sup>1</sup>
ЦП (n = 7)	75,19±5,23 <sup>1</sup>	16,22±3,81 <sup>1</sup>	7,07±1,89	1,07±0,58	0,45±0,17	2,56±0,17 <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Достоверно отличается от значения в контроле при  $p < 0,05$ .

Усиление полиploидизации гепатоцитов в ответ на патологическое воздействие характерно для млекопитающих и сопровождается изменениями в соотношении классов ploидности клеток (Maurer et al., 1973; Завадская, 1989; Сакута, Кудрявцев, 1996; 2005). В частности, найдено, что при хроническом воздействии  $CCl_4$  в печени крыс и мышей снижается относительное число 2с- и 2с×2-гепатоцитов, появляются высокоploидные клетки, отсутствующие в нормальном органе (Фактор, Урываева, 1980; Бродский, Урываева, 1981) и, в итоге, ploидность гепатоцитов значительно возрастает (Завадская, 1989; Кудрявцев и др., 1993; Melchiorri et al., 1993; Сакута, Кудрявцев, 1996; 2005).

Усиление пролиферативной активности гепатоцитов при повреждении печени и повышение уровня их ploидности характерно и для человека. Например, ХГ и ЦП различной этиологии, жировой гепатоз, внепеченочный холестаза также сопровождаются заметным повышением ploидности гепатоцитов (Koike et al., 1982; Fang et al., 1994; Melchiorri et al., 1994). Вместе с тем, следует отметить, что полиploидизация гепатоцитов при хронических поражениях печени человека, никогда не достигает столь высоких степеней, как при патологии печени у крыс и мышей. Кроме того, в отличие от крыс и мышей, доля 2с×2-гепатоцитов при хронических патологиях печени человека напротив, заметно возрастает (табл. 3.4), что согласуется с данными, полученными ранее (Кудрявцев и др., 1993).

Важной особенностью клеточной популяции паренхимы печени при циррозе является увеличение в 2,2 ( $p < 0,05$ ) раза доли одноядерных диплоидных (2с)

гепатоцитов у крыс и поддержание высокого процента этих клеток (около 75 %) у человека (табл. 3.3, табл. 3.4). Усиленную пролиферацию 2с-гепатоцитов при ЦП крыс и высокую долю (более 80 %) этих клеток в цирротической печени человека ранее наблюдали и другие авторы (Кудрявцев и др., 1993; Сакута, Кудрявцев, 2005). Этот факт, по-видимому, связан с более высокой способностью 2с-гепатоцитов, по сравнению с полиплоидными клетками, вступать в митотический цикл (Урываева, Маршак, 1969; Watanabe et al., 1970). Ранее было высказано предположение о том, что репаративная регенерация печени осуществляется в основном за счет пролиферации одноядерных диплоидных гепатоцитов, а полиплоидизация клеток в ходе репаративного роста печени играет заметную роль лишь у отдельных пациентов (Кудрявцев и др., 1993).

В процессе физиологической регенерации в интактной печени крыс за 6 мес образуется количество гепатоцитов, превышающее их исходный уровень примерно в 1,8 раза, а в результате репаративной регенерации — в 3,1 раза. Расчеты, основанные на величинах индекса меченых тимидином ядер и митотической активности гепатоцитов, имеющиеся в литературе, демонстрируют еще бóльшие различия между этими способами регенерации. За 6 мес развития экспериментального ЦП происходит убыль паренхимы, равная пятикратному весу исходной печени (Саркисов и др., 1975; Бродский, Урываева, 1981; Macdonald et al., 1986), в то время как в интактной печени за тот же период происходит убыль паренхимы, равная лишь исходному весу органа (Рябинина, Бенюш, 1973; Оттенсен и др., 1980). Таким образом, каждый гепатоцит в течение 6 мес хронического воздействия  $CCl_4$  осуществляет примерно в 2–2,5 раза больше делений, чем в интактной печени, в ходе физиологической регенерации. Тем не менее, несмотря на высокую пролиферативную активность гепатоцитов в ходе развития ЦП, число клеток в поврежденной печени крыс и человека оказалось в итоге значительно меньше, чем в интактной (табл. 3.1, табл. 3.2), что свидетельствует о превышении гибели клеток над увеличением их числа.

Наряду с пролиферацией и полиплоидизацией, важную роль в нормальном и репаративном росте печени играет гипертрофия гепатоцитов (Шалахметова и др., 1981; Арефьева и др., 1993; Arosio et al., 1993; Сакута, Кудрявцев, 2005). Гипертрофия гепатоцитов может быть вызвана двумя причинами: 1) повышением ploидности клеток, которое обычно приводит к пропорциональному увеличению их объема и массы (James

et al., 1979; Бродский, Урываева, 1981; Шалахметова и др., 1981; Gaub et al., 1981; Завадская и др., 1983) и 2) увеличением размера цитоплазмы клеток, которое сопровождается уменьшением ядерно-плазматического отношения, но не связано с повышением ploидности клеток. Полагают, в основе гипертрофии цитоплазмы клеток лежит усиление процессов внутриклеточной регенерации (Саркисов и др., 1975). Эти процессы ведут к увеличению числа и размера различных клеточных структур и органоидов и, в конечном итоге, к увеличению объема и массы клеток.

Клеточную гипертрофию, обусловленную увеличением объема цитоплазмы, рассматривают как своеобразную форму регенерации, увеличивающую количество специфических структур внутри клеток и компенсирующую нарушенные функции (Рябинина, Бенюш, 1973). Анализ гипертрофии клеток важен для понимания механизмов нормального и репаративного роста органа. Точно оценить гипертрофию клетки, не связанную с ее ploидностью, можно, например, путем определения уровня ploидности и массы той же клетки.

Массу клеток обычно определяют цитофотометрически по содержанию в них общего белка после окраски соответствующими красителями, или путем измерения сухой массы (СМ) неокрашенных клеток с помощью интерференционного микроскопа (Бродский, 1966). В отличие от цитофотометрических методов с красителями, интерферометрия позволяет получать данные о СМ клетки, которая примерно на 80 % обусловлена содержанием в них белков (Гизе, 1959), в абсолютных единицах — пикограммах ( $10^{-12}$  г), и дает возможность подсчитать абсолютное число клеток в органе без применения сложных и трудоемких методик.

Измерение СМ гепатоцитов крыс показало, что у контрольных крыс СМ одного гепатоцита составила в среднем  $943 \pm 21$  пг, а в цирротически измененной печени —  $1184 \pm 56$  пг, т.е. при циррозе СМ увеличилась на 25,6 % ( $p < 0,001$ ). Увеличение СМ гепатоцитов крыс и содержания в них белка в ходе развития цирроза отмечалось и другими авторами (Tongiani et al., 1976; Завадская и др., 1983).

Результаты интерферометрии показали, что в нормальной печени человека СМ гепатоцита составляет, в среднем,  $546,0 \pm 29,6$  пг, а при ЦП она увеличивается на 23,7 % по сравнению с нормой ( $p < 0,05$ ) и достигает  $675,4 \pm 41,3$  пг (Bezborodkina et al., 20216). Ранее было найдено, что СМ гепатоцита в нормальной печени человека составляет  $431,4 \pm 22,1$  пг, а при ЦП —  $640,0 \pm 49,2$  пг (Завадская и др., 1983). Более низкие значения



СМ гепатоцитов нормальной печени человека, полученные Завадской с соавторами, по-видимому, обусловлены тем, что измерения СМ гепатоцитов были проведены на биопсийном материале молодых людей, средний возраст которых составил 29 лет, тогда как средний возраст пациентов в нашей работе составил 44 года.

Таким образом, убыль гепатоцитов в ходе патологического процесса в печени крыс полностью компенсируется повышением ploидности клеток и гипертрофией их цитоплазмы. По сравнению с крысами развитие ЦП у человека вызывает более глубокие нарушения архитектоники печени, а полной компенсации потери гепатоцитов и паренхимы печени при циррозе у человека не происходит (Bezborodkina et al., 2021б).

Следует отметить, что даже полное восстановление объема паренхимы цирротической печени и количества в ней гепатоцитов не гарантирует восстановления функции органа. Такая ситуация связана с сильной трансформацией архитектоники печени, в результате которой гепатоциты вынуждены осуществлять свои многочисленные функции в условиях гипоксии, острой нехватки источников энергии, необходимых субстратов. Поэтому одной из первоочередных задач для прогноза и терапии ЦП является оценка состояния ключевых функций печени и понимание механизмов, регулирующих эти функции в патологических условиях.

### **3.2. Характеристика гликогенеза в нормальной и патологически измененной печени человека, крыс и мышей на разных стадиях пищевого цикла**

Очевидно, что углеводный обмен и, в частности, обмен гликогена и глюкозы в печени, которая тесно связана с процессом переработки пищи, будет сильно отличаться на разных этапах пищеварения. Поэтому для определения функциональных возможностей цирротической печени, выявления отклонений от нормы и объяснения их причин, необходимо было провести сравнение метаболизма глюкозы и гликогена в нормальном и патологически измененном органе в ходе пищеварительного цикла и установить клеточные механизмы его регуляции.

### 3.2.1. Длительное голодание. Концентрация глюкозы в крови, содержание гликогена и активность ключевых ферментов его метаболизма в печени крыс в норме и при экспериментальном циррозе после 48 ч голодания

Лишение крыс пищи приводит к быстрому снижению массы их тела и печени. По нашим данным уже через 24 ч голодания масса тела животных уменьшается на 12,5 %, печени — на 17,9 %, а через 48 ч — на 20,8 % и 27,7 % соответственно (рис. 3.7).

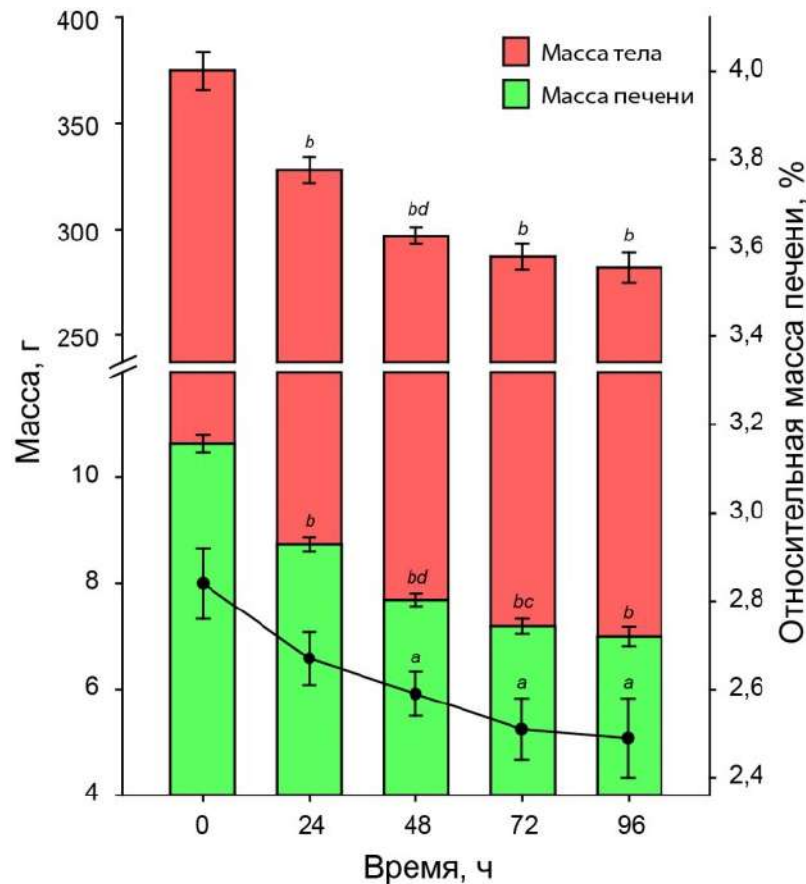


Рисунок 3.7 — Изменение массы тела, массы печени и относительной массы печени крыс в течение голодания,  $X \pm Sx$ . Примечания: 1) отличия от значения до начала голодания (0 ч) при уровне значимости: a —  $p < 0.01$ , b —  $p < 0,001$ ; 2) отличия от предыдущего значения при уровне значимости: c —  $p < 0.01$ , d —  $p < 0,001$ .

Однако после 48 ч эти показатели изменяются гораздо медленнее, чем в начале голодания. Схожие данные были получены Собероном и Санчезом, которые нашли, что голодание крыс в течение 48 ч приводит к уменьшению массы их печени на 20–25 % (Soberon, Sanchez, 1961). Наряду со снижением массы печени, при голодании наблюдается также значительное уменьшение объема гепатоцитов и содержания в них белка (Belloni et al., 1988).

В ходе продолжительного голодания углеводный обмен претерпевает глубокие изменения, а резервы гликогена в печени сильно опустошаются (Bois-Joyeux et al., 1990; Jungermann, 1992). Результаты, представленные в таблице 3.5, свидетельствуют о том, что содержание гликогена в нормальной печени крыс после 48 ч голодания находится на очень низком уровне, что подтверждает имеющиеся данные (Giardina et al., 1994; Minassian et al., 1999).

Таблица 3.5 — Некоторые показатели метаболизма глюкозы и гликогена в крови и печени крыс после 48 ч голодания в норме и при циррозе (ЦП) ( $\bar{X} \pm S_x$ , n = 3).

Показатель	Контроль	ЦП
Концентрация глюкозы в сыворотке крови, ммоль/л	3,24±0,28	3,16±0,14
Концентрация гликогена в печени, мкмоль глюкозных остатков/г сырого веса печени	15,4±0,2	10,4±0,5 <sup>2</sup>
Содержание гликогена в гепатоцитах, усл. ед.	2,09±0,06	1,87±0,02 <sup>1</sup>
Активность глюкозо-6-фосфатазы, нмоль·мин <sup>-1</sup> ·мг белка <sup>-1</sup>	44,2±0,6	43,4±1,3
Активность глюкокиназы, нмоль·мин <sup>-1</sup> ·мг белка <sup>-1</sup>	11,2±0,2	1,9±0,1 <sup>2</sup>
Активность гликогенсинтазы, -Г-6-Ф/+Г-6-Ф	0,19±0,01	0,20±0,01
Активность гликогенфосфорилазы <i>a</i> , нмоль·мин <sup>-1</sup> ·мг белка <sup>-1</sup>	99,0±2,4	44,1±1,6 <sup>2</sup>
Общая активность гликогенфосфорилазы, нмоль·мин <sup>-1</sup> ·мг белка <sup>-1</sup>	162,4±3,1	158,9±1,5

<sup>1,2</sup> Достоверно отличается от значения в контроле (<sup>1</sup>p < 0,05, <sup>2</sup>p < 0,001).

Однако в печени крыс с ЦП содержание гликогена после 48 ч-голодания было еще ниже, чем у контрольных животных (Bezborodkina et al., 2013a; Bezborodkina et al., 2014; Bezborodkina et al., 2016). Несмотря на то, что 48 ч-голодание приводит к резкому снижению концентрации гликогена в печени, подавляющее большинство клеток ее паренхимы содержит гликоген. Анализ гистограммы, представленной на рисунке 3.8, *a*, показал, что после 48 ч голодания гликоген в нормальной печени крыс присутствовал примерно в 70 % гепатоцитов, причем в некоторых клетках его содержание было очень высоким. В отличие от контрольных животных у крыс с ЦП гликоген присутствовал лишь в половине популяции гепатоцитов, но в отдельных клетках его содержание достигало того же уровня, как и у сытых контрольных крыс (рис. 3.8, *б*).

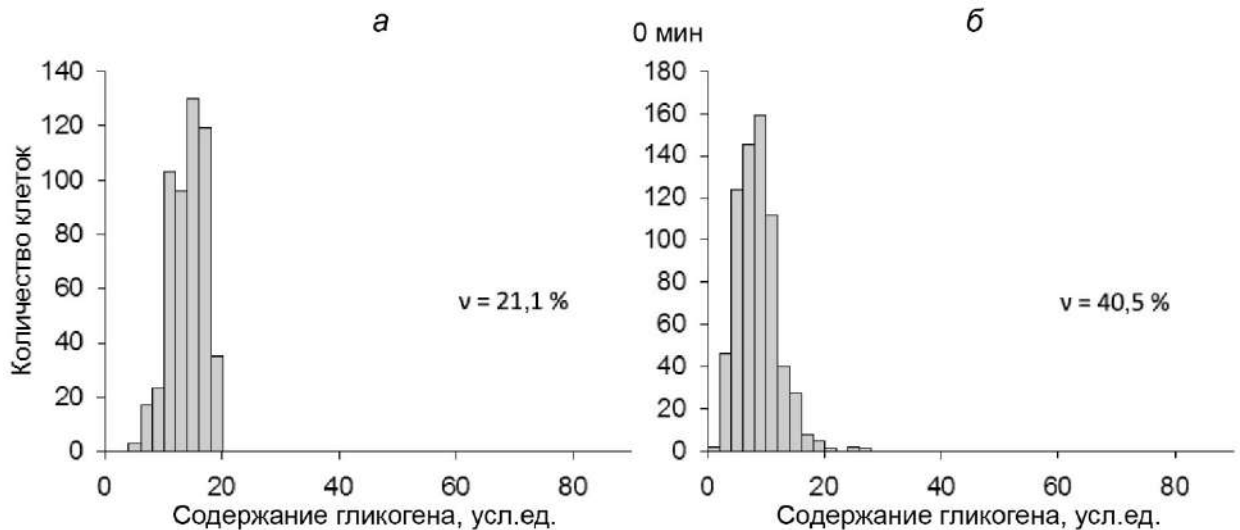


Рисунок 3.8 — Гистограммы распределения содержания гликогена в гепатоцитах в классе одноядерных 4с-клеток контрольной (а) и цирротической (б) печени крысы после 48 ч голодания.

Содержание гликогена в гепатоцитах регулируются активностью ферментов его синтеза и распада, для которых концентрация глюкозы в крови *per se* имеет большое значение. Данные, представленные в таблице 3.5, демонстрируют, что концентрация глюкозы в периферической крови контрольных крыс и крыс с ЦП после 48 ч голодания находится на одинаково низком уровне (Bezborodkina et al., 2014). Схожие данные для крыс, голодавших в течение 40–48 ч, были получены и в других работах (Mlekusch et al., 1981; Calder, Geddes, 1992). Тем не менее, нормальный уровень глюкозы в крови крыс с ЦП при голодании, еще не подразумевает, что процессы, связанные с ее продукцией не нарушены. В ряде работ показано, что после ночного голодания продукция глюкозы печенью при циррозе на 20–40 % ниже нормы (Reichle et al., 1978; Owen et al., 1981; Merli et al., 1986; Johansson et al., 1994). Однако в других работах было найдено, что продукция глюкозы при ЦП является нормальной и поддерживается за счет увеличенных концентраций глюкагона (Keller et al., 1982; Shmueli et al., 1993; Petrides et al., 1994). Определенную ясность в противоречивую информацию о продукции глюкозы цирротической печенью мог бы внести анализ активности ключевых ферментов обмена гликогена.

Исследование Г-6-Фазы, ключевого фермента, отвечающего за продукцию глюкозы печенью, не выявило отличий его активности у голодных крыс с ЦП от контрольных значений (табл. 3.5). Полученные данные указывают на то, что после 48 ч голодания продукция глюкозы цирротической печенью крыс находится в пределах

нормы. Поскольку запасы гликогена в печени после 48 ч голодания находятся на очень низком уровне (табл. 3.5) (Bezborodkina et al., 2014; Bezborodkina et al., 2016), очевидно, что продукция глюкозы при ЦП практически полностью осуществляется за счет глюконеогенеза (Bezborodkina et al., 2013a).

Показано, что глюкоза контролирует активность и количество ГК в печени (Brocklehurst et al., 2004). При голодании активность фермента падает, а в сытом состоянии увеличивается в соответствии с увеличением концентрации глюкозы в крови (Taketa et al., 1976). Так как  $K_m$  ГК для глюкозы составляет величину около 20 мМ (Lowes et al., 1998) скорость фосфорилирования глюкозы при физиологических условиях зависит только от ее внутриклеточной концентрации. Естественно ожидать, что низкая концентрация глюкозы в крови при голодании, будет ингибировать активность ГК и способствовать направлению субстратного потока в печени на продукцию глюкозы.

Определение активности ГК в нормальной печени голодных крыс показало, что в условиях, когда концентрация глюкозы в крови снижена, активность ГК также находится на низком уровне (табл. 3.5) (Bezborodkina et al., 2013a). Этот результат подтверждает данные многих авторов, согласно которым после 48 ч голодания активность ГК в нормальной печени крыс составляет 40–50 % от «сытого» уровня (Vinuela et al., 1963; Perez et al., 1964; Bois-Joyeux et al., 1990; Minassian et al., 1999). По мере увеличения продолжительности голодания происходит дальнейшее снижение активности этого фермента (Minassian et al., 1999), вплоть до ее полной утраты (Vinuela et al., 1963; Panserat et al., 2014). Несмотря на то, что в нашем эксперименте концентрация глюкозы в крови контрольных и опытных крыс после 48 ч голодания находится на одинаковом уровне, активность ГК в цирротической печени составляла лишь 16 % ( $p < 0,001$ ) от контрольных значений (табл. 3.5) (Bezborodkina et al., 2013a).

Интолерантность тканей к глюкозе — одно из характерных проявлений ЦП (Mion et al., 1996), которое связывает его с диабетом. Активность ГК при этих заболеваниях заметно снижена (Rossetti et al., 1993; Caro et al., 1995; Aiston et al., 2001; Wu et al., 2005). Главным механизмом развития интолерантности тканей к глюкозе считают ухудшенную секрецию инсулина и/или нечувствительность к нему клеток. Поскольку активность ГК в печени регулируется опосредованными через инсулин уровнем экспрессии фермента (Iynedjian, 1993) и его внутриклеточной компарментализацией (Agius, 1994),

нарушения секреции этого гормона или его связывания клетками, могут привести к столь резкому снижению активности ГК при ЦП.

Определение активности ГС у крыс с ЦП после 48 ч голодания показало, что она не отличается от активности фермента в нормальной печени (табл. 3.5) (Bezborodkina et al., 2014). В отличие от наших данных, Джардина с соавторами на модели тиоацетамидного ЦП показали, что после 24 ч голодания активность ГС в печени крыс снижена по сравнению с нормой (Giardina et al., 1994). Сходные данные были получены для крыс с биллиарным ЦП, который вызывали перевязкой желчного протока. При этом падение общей и активной форм ГС коррелировало со снижением количества гепатоцитов в печени (Krähenbühl et al., 1996). С другой стороны, было найдено, что при  $CCl_4$ -индуцированном ЦП у крыс уровень активной формы ГС не отличался от нормы (Krähenbühl et al., 1991).

По нашим данным активность ГФа в цирротической печени крыс после 48 ч голодания была ниже нормы более чем на 50 % ( $p < 0,001$ ) (табл. 3.5) (Bezborodkina et al., 2014). Поскольку активация ГФ осуществляется с помощью цАМФ-зависимого механизма (Rath et al., 2000; Roach, 2002), а при ЦП уровень продукции цАМФ падает (Francavilla et al., 1978; Высоцкая и др., 1998), можно предположить, что снижение активности аденилатциклазы и концентрации цАМФ, влияют на падение уровней ГФа в цирротической печени (Bezborodkina et al., 2014).

Таким образом, углеводный метаболизм у крыс с ЦП, голодавших в течение 48 ч, существенно отличается от обмена в печени голодных крыс контрольной группы. Главные различия по нашим данным состоят в падении ~ в 6 раз активности ГК и снижении активности ГФа почти вдвое.

### **3.2.2. Абсорбтивный период. Концентрация глюкозы в крови, содержание гликогена и активность ключевых ферментов его метаболизма в печени крыс в норме и при экспериментальном циррозе после введения голодным животным глюкозы**

Поступление пищи после голодания вызывает значительные изменения обмена веществ в различных органах, в т.ч. печени. Абсорбтивный период пищевого цикла характеризуется депонированием гликогена и преимущественным использованием

глюкозы для энергетических потребностей организма. Считается, что после приема углеводов продолжительность абсорбтивного периода, составляет около 2-х часов (Niewoehner et al., 1984). В течение этого времени глюкоза практически полностью абсорбируется из кишечника, а ее концентрация в плазме крови повышается.

По нашим данным, пероральное введение 30%-й глюкозы голодным крысам приводит к быстрому увеличению ее концентрации в периферической крови, как у крыс контрольной, так и опытной групп. Тем не менее, через 2 ч концентрация глюкозы у крыс с ЦП была на 14,2 % ( $p < 0,05$ ) меньше, чем у контрольных животных (рис. 3.9) (Bezborodkina et al., 2014). Максимальная концентрация в крови контрольных крыс достигала  $\sim 9$  мкМ/л через 90 мин после *per os* введения глюкозы. Ранее было показано, что введение 50%-й глюкозы голодным крысам вызывает через 10 мин повышение концентрации глюкозы в крови до 9 мкМ/мл, а через 20 мин — до 12 мкМ/мл (Niewoehner et al., 1984).

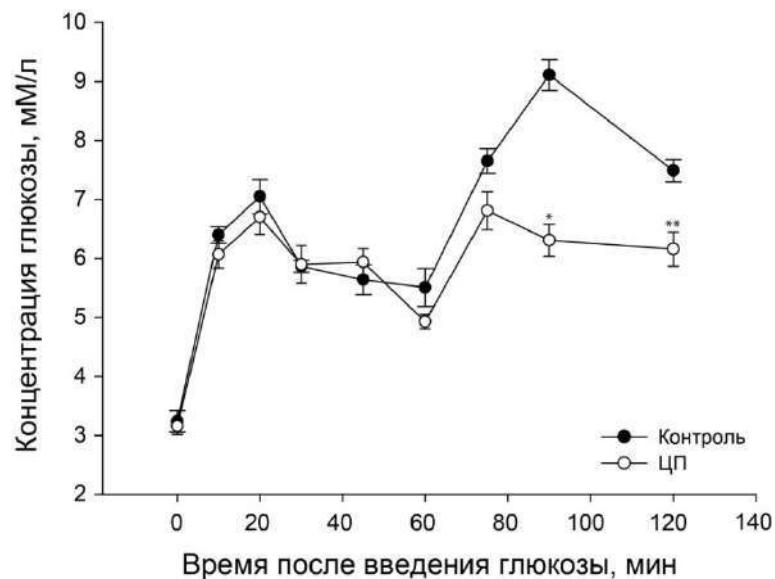


Рисунок 3.9 — Концентрация глюкозы в сыворотке крови крыс контрольной и опытной групп через различные интервалы времени после введения голодным животным глюкозы. Достоверно отличается от значения в контроле: \*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,05$ . Для каждой точки  $n=3$ .

Концентрация глюкозы в крови после приема пищи определяется, в основном, скоростями ее всасывания в кишечнике и последующей утилизации различными тканями. Например, головной мозг утилизирует 45–60 % глюкозы, эритроциты 5–10 %, почки 10–15 %, а скелетные мышцы 15–20 % (Dimitriadis et al., 2021). Однако концентрация глюкозы в крови зависит не только от ее утилизации, но и от продукции печенью и надпочечниками. Поэтому пониженная концентрация глюкозы в крови крыс

с ЦП в ходе рефиндинга глюкозой может быть обусловлена разными причинами. Она может быть связана с более медленным поступлением глюкозы из кишечника в кровь, с более высокой скоростью ее утилизации различными тканями (в первую очередь скелетными мышцами), а также с более низкой продукцией глюкозы — в основном, печенью и надпочечниками (Bezborodkina et al., 2014).

Принято считать, что интолерантность различных тканей к глюкозе является характерной чертой многих пациентов с ЦП (Muller et al., 1992; Riggio et al., 1997; Kruszynska, 1999; Schneider et al., 1999). В такой ситуации трудно ожидать высокой скорости абсорбции и утилизации глюкозы, поступившей с пищей. С другой стороны, при ЦП ухудшаются всасывание и транспорт сахаров и других веществ в кишечнике (Белобородова, 1978; Stratton et al., 2003) и меняется морфология этого органа (Onogi et al., 2000). Поэтому структурно-функциональные нарушения, наблюдающиеся в кишечнике при ЦП, также могут быть одной из причин более слабого, чем в норме, нарастания концентрации глюкозы в крови у крыс с СС1<sub>4</sub>-циррозом.

Введение глюкозы стимулировало синтез гликогена, как в печени крыс контрольной, так и опытной групп (рис. 3.10). Тем не менее, в течение абсорбтивного периода накопление гликогена в гепатоцитах цирротической печени происходило медленнее, чем в клетках нормальной печени (Bezborodkina et al., 2013б).

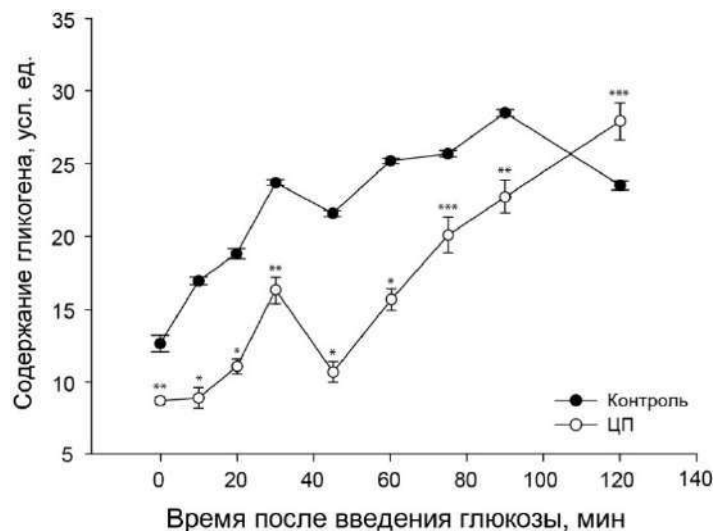


Рисунок 3.10 — Динамика накопления гликогена в гепатоцитах нормальной (контроль) и цирротической печени (ЦП) крыс через разные интервалы времени после введения глюкозы голодным животным. Примечания: 1) вертикальные отрезки — ошибка среднего; 2) средние значения при ЦП отличаются от значений нормы при уровне значимости \* —  $p < 0,001$ ; \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,05$ .



Причины более низкой скорости накопления гликогена и более низкого содержания гликогена в гепатоцитах цирротической печени в абсорбтивном периоде неясны. Они могут лежать как в метаболической плоскости (активность ферментов в печени, прямо или косвенно участвующих в его синтезе и деградации), так и быть связаны с количеством гепатоцитов в печени и с характеристиками этих клеток (плоидностью, размером, пролиферативной активностью и т.д.).

Безусловно, очень сильное влияние на содержание гликогена в гепатоцитах оказывает уровень активности ферментов, катализирующих равновесные и неравновесные реакции продукции глюкозы, гликолиза, глюконеогенеза, гликогеногенеза и гликогенолиза. Введение глюкозы вызывает в цирротической печени крыс более слабый, по сравнению с нормальным органом, подъем активности ГК — с 1,5 до 5,2 нмоль·мин<sup>-1</sup>·мг белка<sup>-1</sup> vs с 11,2 до ~ 20,0 нмоль·мин<sup>-1</sup>·мг белка<sup>-1</sup>, соответственно (рис. 3.11) (Bezborodkina et al., 2013a). В результате, отношение активностей ГК в печени крыс опытной и контрольной групп (ЦП/К) на протяжении абсорбтивного периода составило лишь ¼, что свидетельствует о крайне низкой фосфорилирующей активности ГК при циррозе (рис. 3.12).

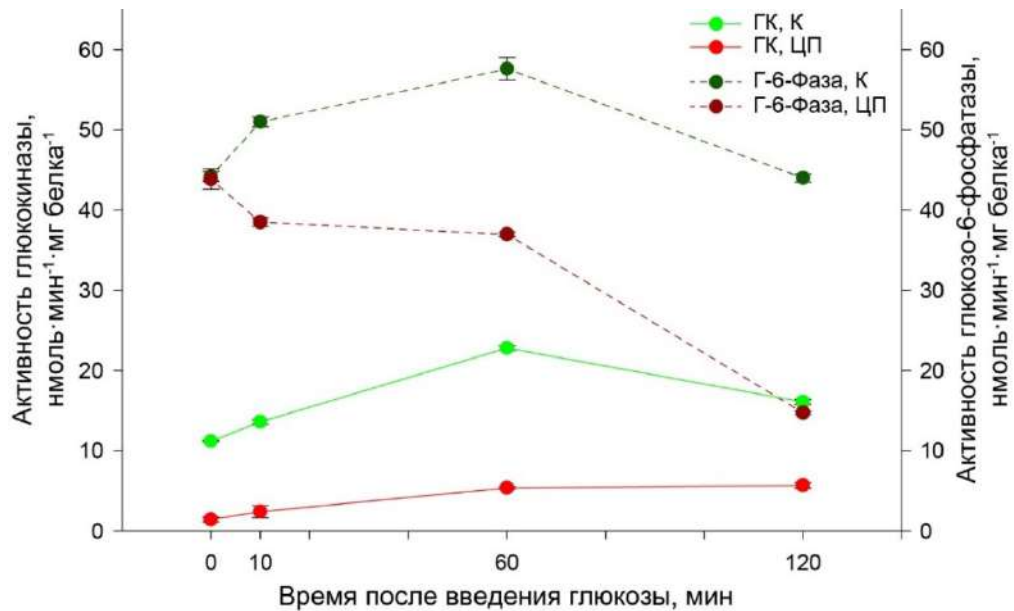


Рисунок 3.11 — Активность глюкокиназы (ГК) и глюкозо-6-фосфатазы (Г-6-Фаза) в печени крыс контрольной и опытной групп через различные интервалы времени после введения голодным животным глюкозы.

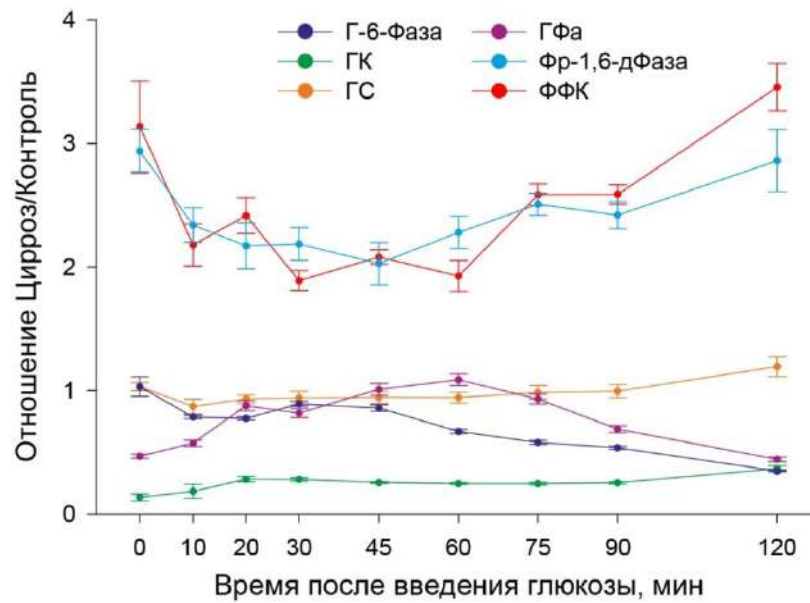


Рисунок 3.12 — Отношения активности ферментов метаболизма глюкозы и гликогена в нормальной и цирротической печени крыс в течение абсорбтивного периода, после введения глюкозы животным, голодавшим 48 ч.

Предполагают, что в условиях слабой активности ГК печень может использовать иные метаболические пути, которые способны частично или полностью компенсировать недостаточную фосфорилирующую активность ГК в ЦП. Действительно, установлено, что в цирротической печени человека возрастает активность других гексокиназ, способных фосфорилировать глюкозу (Lowes et al., 1998; Taketa et al., 1976, 1988). Кроме того, в некоторых случаях фосфорилирование глюкозы в печени происходит при участии Г-6-Фазы. Например, при экспериментальном диабете или длительном голодании, когда активность ГК находится на очень низком уровне, наблюдается интенсивное фосфорилирование глюкозы за счет трансферазной активности Г-6-Фазы (Nordlie, Arion, 1964; Alvares, Nordlie, 1977; Nordlie et al., 1979). В связи с этим, можно предположить, повышение активности гексокиназ с высоким сродством к глюкозе и трансформация гидролазной функции Г-6-Фазы в трансферазную представляют адаптивный ответ на крайне слабую фосфорилирующую способность ГК при циррозе.

В нормальной печени около 85 % Г-6-Ф, образованного при фосфорилировании глюкозы, примерно в равной степени используется для синтеза гликогена и в процессе гликолиза (O'Doherty et al., 1996). В цирротической печени, из-за низкой активности ГК, почти весь Г-6-Ф метаболизируется через гликолиз или пентозофосфатный путь (шунт).

Показано, что за 6 мес развития экспериментального цирроза происходит убыль паренхимы, равная пятикратной массе исходной печени (Peters, 1962; Саркисов и др.,

1975; Бродский, Урываева, 1981; Smejkalova et al., 1985; Macdonald et al., 1986). В интактной печени в течение того же периода времени происходит убыль паренхимы, соответствующая лишь исходной массе органа (Рябинина, Бенюш, 1973; Оттенсен и др., 1980). По нашим данным (табл. 3.1) в 1 г нормальной печени взрослых крыс содержится  $\sim 2,5 \times 10^8$  гепатоцитов (Bezborodkina et al., 2021б). Следовательно, убыль гепатоцитов в результате хронического воздействия на крыс  $\text{CCl}_4$  в течение 6 мес составит около  $10 \times 10^8$  клеток/г печени. Поэтому, чтобы поддержать многочисленные функции циррозной печени на должном уровне, примерно такое же количество гепатоцитов должно образоваться в результате компенсаторной репаративной регенерации. Восполнение столь значительного количества гепатоцитов в ходе развития ЦП требует гигантских объемов энергии и пластических материалов, источниками которых в организме являются, прежде всего, гликолиз и пентозофосфатный путь. Наши данные о высокой скорости гликолиза при ЦП у крыс (рис. 3.12) (Bezborodkina et al., 2013а) подтверждают результаты других авторов, полученные при исследовании печени пациентов с ЦП (Taketa et al., 1976, 1988; Nishikawa et al., 2014; Lee et al., 2018). Имеющиеся данные позволяют предположить, что регенераторные процессы в цирротической печени обеспечиваются энергией и необходимыми промежуточными продуктами за счет высокой скорости гликолиза и пентозофосфатного пути.

Интенсивные катаболические процессы, протекающие при ЦП в скелетных мышцах, печени и жировой ткани (Marchesini et al., 1981; Weber et al., 1992; Kalafateli et al., 2015; Gangitano et al., 2022), вызывают повышение в крови концентрации аминокислот, глицерина и лактата, образующихся при деструкции клеток и клеточных структур. Повышение концентрации этих продуктов катаболизма служит мощным стимулом для увеличения скорости глюконеогенеза в печени. Стоит отметить, что помимо трансформации не углеводных веществ в глюкозу, функция глюконеогенеза заключается в удалении лактата из клеток и тканей, функционирующих в условиях недостатка кислорода, тем самым предохраняя их от ацидоза.

Определение активности ключевых ферментов глюконеогенеза Г-6-Фазы и Фр-1,6-дФазы в печени крыс контрольной и опытной групп в абсорбтивном периоде привело к неожиданным и парадоксальным результатам. С одной стороны, мы нашли, что активность Фр-1,6-дФазы при ЦП увеличивается примерно в 2,4 раза ( $p < 0,001$ ) по сравнению с нормой (Bezborodkina et al., 2013а), подтверждая тем самым данные многих

авторов о том, что скорость глюконеогенеза при ЦП заметно возрастает (Newsholme, 1976; Owen et al., 1983; Krähenbühl, Reichen, 1993; Bugianesi et al., 1998; Petersen et al., 1999; Changanani et al., 2001). С другой стороны, в абсорбтивном периоде активность Г-6-Фазы в цирротической печени крыс, в среднем, оказалась примерно на треть ( $p < 0,01$ ) ниже, чем в печени крыс контрольной группы (рис. 3.11, рис. 3.12) (Bezborodkina et al., 2013a).

Существуют две точки зрения на активность Г-6-Фазы в печени в ходе абсорбтивного периода. Согласно одной из них продукция глюкозы в нормальной печени после поступления пищи в организм падает (Newgard et al., 1984; Minassian et al., 1999; van Dijk et al., 2001; Moore et al., 2012), а согласно другой — не только не снижается, но даже растет (Rossetti et al., 1993; Massillon et al., 1995; Rognstad, 1996; Rossetti, 1996).

По нашим данным (рис. 3.12), в нормальной печени в абсорбтивном периоде поддерживается как интенсивный глюконеогенез, так и высокая продукция глюкозы (Bezborodkina et al., 2013a). В подтверждение этому было найдено, что, по крайней мере, в течение 2 ч после введения глюкозы голодным крысам, несмотря на поглощение экзогенной глюкозы печенью и использование глюконеогенных субстратов для синтеза гликогена, наблюдается интенсивный глюконеогенез и продукция глюкозы (Niewoehner et al., 1984; Niewoehner, Nuttall, 1988). Возможно, противоречивость данных об активности Г-6-Фазы и уровне продукции глюкозы в абсорбтивном периоде обусловлена различиями во временных интервалах, изучаемых авторами. Например, вывод об ингибировании Г-6-Фазы в ходе рефидинга был сделан на основании анализа зависимости между активностью фермента и содержанием гликогена в печени, построенной всего лишь по трем точкам — 90, 180 и 360 мин после начала рефидинга (Minassian et al., 1999). Другими словами, Минасян с соавторами исследовали окончание абсорбтивного периода и начало постабсорбтивного периода, тогда как мы исследовали только абсорбтивный период (0–2 часа).

Причины столь низкой активности Г-6-Фазы у крыс с ЦП в течение всего абсорбтивного периода (рис. 3.11) (Bezborodkina et al., 2013a) нельзя объяснить лишь уменьшением на 9 % доли паренхимы печени (табл. 4.1) (Bezborodkina et al., 2021б). Одной из причин падения активности Г-6-Фазы называют нарушение мембран шЭПР после повреждающего действия продуктов ПОЛ (Benedetti et al., 1980; de Groot et al.,

1985; Ohyashiki et al., 1995). В этой связи, снижение активности СОД, каталазы и, соответственно, повышение концентрации продуктов ПОЛ в крови и цирротической печени (рис. 4.6) подтверждает, что одним из основных механизмов низкой активности Г-6-Фазы при ЦП может быть усиление процессов ПОЛ.

Изменения активностей ГК, ФФК, Фр-1,6-дФазы и Г-6-Фазы ведут к снижению или повышению концентрации Г-6-Ф в печени и тем самым косвенно влияют на уровни гликогена в клетках печени. Однако прямое действие на содержание гликогена в гепатоцитах оказывают ГС и ГФ, поскольку эти ферменты непосредственно участвуют в его синтезе и деградации, присоединяя или удаляя остатки глюкозы в молекулах гликогена.

Результаты, представленные на рисунке 3.13, демонстрируют быстрое увеличение активности ГС в печени контрольной и опытной групп крыс после введения глюкозы, подтверждая данные о стимуляции активности этого фермента после получения животными пищи (Niewoehner, Nuttall, 1988; Niewoehner et al., 1984; Ercan et al., 1994). Как следствие, отношение активностей ГС в печени контрольной и опытной групп крыс в течение абсорбтивного периода было близким к 1,0 (рис. 3.12). Тем не менее, у крыс опытной группы активность фермента в абсорбтивном периоде оказалось на 6,2 % ниже ( $p < 0,01$ ), чем в контрольной группе (Bezborodkina et al., 2014).

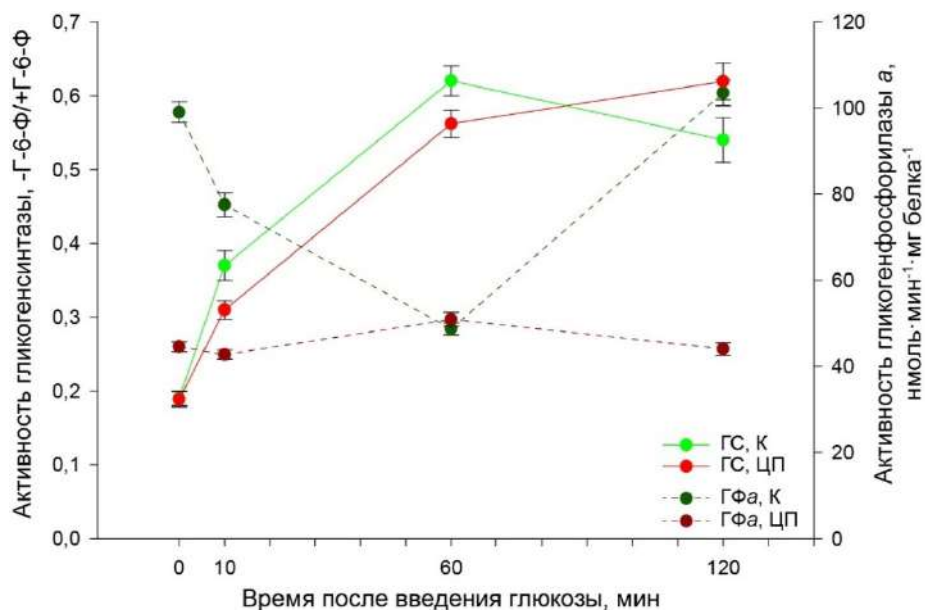


Рисунок 3.13 — Активность гликогенсинтазы (ГС) и гликогенфосфорилазы *a* (ГФа) в нормальной и цирротической (ЦП) печени крыс в абсорбтивном периоде через различные интервалы времени после введения голодным животным глюкозы.

В отличие от ГС, активность которой после введения глюкозы быстро увеличивалась и далее выходила на плато, активность ГФа в абсорбтивном периоде претерпевала более сложные изменения. У крыс контрольной группы введение глюкозы вызывало быстрое падение активности ГФа, но через 1 ч после начала рефидинга, активность фермента начинала возрастать и к концу абсорбтивного периода достигала первоначального уровня (рис. 3.13) (Bezborodkina et al., 2014).

Поскольку абсолютная активность ГФ намного выше, чем у ГС, первая играет ведущую роль в контроле метаболизма гликогена в печени (Roach, 2002; Ferrer et al., 2003). ГФа является сильным ингибитором фосфорилазы ГС и поэтому необходимым условием для инициации синтеза гликогена в печени считали снижение ее активности (Hers, 1990). Результаты, представленные на рисунке 3.13, свидетельствуют о том, что снижение активности ГФа в нормальной печени в начале абсорбтивного периода активирует ГС и приводит к быстрому синтезу гликогена в гепатоцитах (рис. 4.10) (Bezborodkina et al., 2014). Полученные данные демонстрируют реципрокное взаимодействие между ГС и ГФ, показанное ранее в других исследованиях (Minassian et al., 1999; Aiston et al., 2003). Однако такой характер взаимодействия ферментов сохраняется лишь в течение короткого интервала времени. Через 60 мин после начала рефидинга, когда содержание гликогена в гепатоцитах становится достаточно высоким (рис. 3.10), активность ГФ начинает возрастать, достигая к концу абсорбтивного периода первоначального «голодного» уровня (рис. 3.13) (Bezborodkina et al., 2014). В результате, во второй половине абсорбтивного периода ГС и ГФ становятся одновременно высоко активными (рис. 3.13), т.е. синтез и деградация гликогена в нормальной печени происходят одновременно. Таким образом, увеличение содержания гликогена может быть важным фактором, стимулирующим оборот гликогена в печени, который предотвращает его неконтролируемое накопление (Bezborodkina et al., 2014). Наличие оборота гликогена в печени подтверждается существованием прямой зависимости между скоростью гликогенолиза и концентрацией гликогена в печени (Magnusson et al., 1994).

В отличие от животных контрольной группы, инициация синтеза гликогена и его дальнейшее накопление в цирротической печени крыс в течение всего абсорбтивного периода происходят на фоне стабильно низкой активности ГФа (рис. 3.12, рис. 3.13) (Bezborodkina et al., 2014).

Как уже упоминалось выше, гликоген может синтезироваться прямым и непрямым путем. В последнем случае субстратом для ГС является Г-6-Ф, синтезированный из глюконеогенных  $C_3$ -предшественников (Newgard et al., 1983; Katz, McGarry, 1984; Kuwajima et al., 1986; Napoli et al., 1992). В нормальной печени вклад прямого и непрямого пути в синтез гликогена изменяется в зависимости от стадии пищевого цикла, количества и состава пищи, вида животных и ряда других факторов. Полагают, что при питании *ad libitum* соотношение прямого и непрямого пути составляет примерно 50/50 (Soares et al., 2009); но во время абсорбтивного периода вклад прямого пути может повышаться до 77 % (Magnusson et al., 1989).

Слабая фосфорилирующая активность ГК (гексокиназы IV) при ЦП (рис. 3.11, рис. 3.12) может быть компенсирована за счет активности других гексокиназ, прежде всего, I и II (Taketa et al., 1976, 1988; Lowes et al., 1998). Между тем, высокая активность этих изоэнзимов в печени еще не является гарантом увеличения активности ГС и интенсивного гликогеногенеза. Такой парадокс связан с присутствием в гепатоцитах двух пулов Г-6-Ф (Seoane et al., 1996; Gomis et al., 2002). Один из них образуется при участии ГК и в нормальной печени активирует печеночный тип ГС (GYS2), стимулируя синтез гликогена в гепатоцитах. Другой пул Г-6-Ф формируется за счет гексокиназной (**но не** глюкокиназной!) активности и стимулирует GYS1 (мышечный тип ГС), а не GYS2 (Meijer, 2002). Поэтому повышение фосфорилирования глюкозы в цирротической печени за счет возрастания активности гексокиназ не увеличивает активность печеночной GYS2 и, как следствие, не стимулирует синтез гликогена в гепатоцитах.

Анализ динамики ГК и ГС в абсорбтивном периоде показал, что коэффициенты корреляции между активностью этих ферментов в контрольной группе животных составляют 0,93 ( $p < 0,001$ ), а в опытной — 0,95 ( $p < 0,001$ ). Полученный результат позволяет предположить, что прямой путь синтеза гликогена (ГК→Г-6-Ф→ГС→гликоген) функционирует и при ЦП, но его вклад в накопление гликогена в гепатоцитах по сравнению с глюконеогенезом невелик. По нашим данным вклад прямого пути в синтез гликогена в цирротической печени крыс составляет около 25 %, а непрямого ~ 75 %.

Практически весь гликоген печени сосредоточен в клетках ее паренхимы. Поэтому характеристики гликогеногенеза в нормальной и цирротической печени во многом определяются количеством и свойствами гепатоцитов. Вместе с тем, влияние клеточных

и тканевых факторов на содержание гликогена и его динамику в гепатоцитах на разных стадиях пищевого цикла исследовано недостаточно. В частности, неясна роль размеров и пloidности клеток в процессе гликогенеза, неизвестно как влияют различные субпопуляции гепатоцитов на скорость накопления гликогена в печени при поступлении пищи в организм. Применение методов количественной цитохимии позволило нам детально исследовать влияние этих клеточных факторов на гликогенез в популяциях гепатоцитов нормальной и патологически измененной печени крыс и человека.

Анализ гистограмм, представленных на рисунках 3.14, *а* и 3.14, *б*, показал, что гликогенез в популяции гепатоцитов цирротической печени характеризуется значительной асинхронностью. В нормальной печени коэффициенты вариации распределения гепатоцитов по содержанию гликогена изменяются в пределах 20–30 %, в то время, как при ЦП они колеблются в пределах 40–55 %. Полученные данные свидетельствуют о том, что разные клетки в паренхиме печени синтезируют гликоген с разной скоростью, причем различия в способности клеток накапливать гликоген увеличиваются по мере увеличения продолжительности абсорбтивного периода.

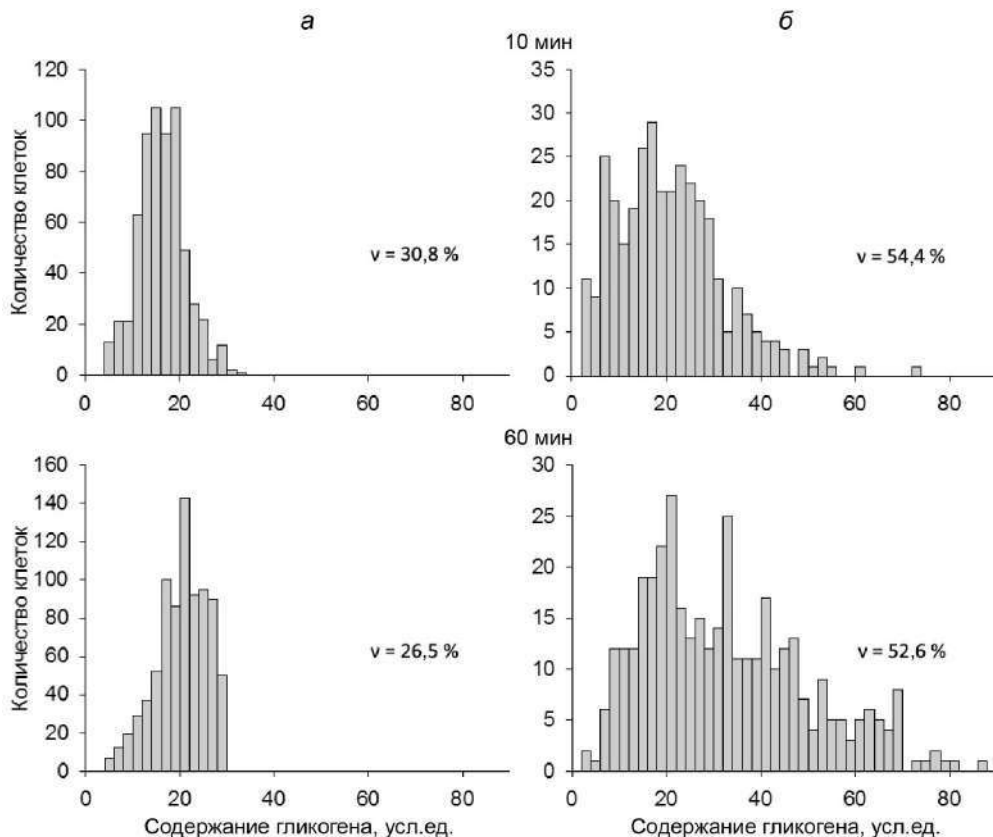


Рисунок 3.14 — Гистограммы распределения содержания гликогена в гепатоцитах в классе одноядерных 4с-клеток контрольной (*а*) и цирротической (*б*) печени крысы через 10 и 60 мин после введения глюкозы голодным животным.



Присутствие в печени млекопитающих полиплоидных клеток является характерной чертой паренхимы этого органа. У некоторых видов полиплоидия в печени может охватывать почти всю популяцию гепатоцитов, достигая при этом высоких уровней (Бродский, Урываева, 1981). Установлено, что количество полиплоидных клеток увеличивается при повреждении печени и различных заболеваниях этого органа (Kohn et al., 1991; Кудрявцев и др., 1993; Tarao et al., 1993, 1994; Melchiorri et al., 1994). Поэтому принципиальным являлся вопрос о влиянии уровней плоидности на содержание гликогена в гепатоцитах цирротической печени. Ранее было показано, что в постабсорбтивном периоде пищевого цикла содержание гликогена в гепатоцитах нормальной печени увеличивается пропорционально уровню плоидности клеток (Кудрявцев и др., 1979, 1980; Шалахметова и др., 1981; Майтесян, 1983). В данной работе мы исследовали зависимость между содержанием гликогена в гепатоцитах и уровнем их плоидности в абсорбтивном периоде, в ходе интенсивного гликогенеза, как в нормальной, так и цирротической печени.

Полученные данные подтвердили, что скорость накопления гликогена гепатоцитами цирротической печени ниже, чем клетками нормальной печени (табл. 3.6) (Безбородкина и др., 2009а; Bezborodkina et al., 2016). Содержание гликогена в клетках нормальной печени через 10 мин после введения глюкозы голодным крысам оказалось на 23 % больше, чем в клетках цирротической печени, а через 60 мин еще больше — на 69 % (табл. 3.6).

Таблица 3.6 — Содержание гликогена (усл. ед.) в одноядерных и двуядерных гепатоцитах различных классов плоидности в нормальной и цирротически измененной (ЦП) печени крысы после 48 ч голодания (0 мин), а также через 10 и 60 мин после введения глюкозы голодным животным ( $X \pm S_x$ ,  $n = 3$ ).

Время, мин	Классы плоидности, с					
	2с	2с×2	4с	4с×2	8с	8с×2
Норма						
0	4,7±0,3 (10)	9,9±0,2 (46)	9,6±0,1 (637)	19,3±0,3 (116)	18,2±0,4 (44)	—
10	8,8±0,5 <sup>3</sup> (12)	16,3±0,6 <sup>3</sup> (54)	17,2±0,1 <sup>3</sup> (740)	32,9±0,8 <sup>3</sup> (168)	34,3±0,9 <sup>3</sup> (64)	—
60	17,3±1,8 <sup>3</sup> (6)	33,2±0,8 <sup>3</sup> (50)	33,5±0,2 <sup>3</sup> (1078)	65,9±0,8 <sup>3</sup> (183)	63,8±1,7 <sup>3</sup> (39)	—

Продолжение таблицы 3.6.

Время, мин	Классы плоидности, с					
	2с	2с×2	4с	4с×2	8с	8с×2
ЦП						
0	3,7±0,8 (16)	7,2±0,8 (27)	7,6±0,2 (903)	14,9±0,6 (185)	14,4±0,6 (138)	27,1±10,8 (8)
10	6,8±2,2 (12)	13,4±3,9 (34)	13,2±0,7 <sup>3</sup> (599)	27,1±3,2 <sup>3</sup> (183)	26,4±3,1 <sup>3</sup> (86)	54,9±6,1 <sup>1</sup> (14)
60	10,4±1,0 <sup>3</sup> (43)	21,0±2,0 <sup>3</sup> (47)	22,3±0,8 <sup>3</sup> (593)	44,1±4,7 <sup>3</sup> (67)	41,5±3,1 <sup>3</sup> (93)	76,2±9,1 <sup>2</sup> (10)

Примечания: 1) результаты для каждой временной точки представляют собой взвешенное среднее из данных, полученных для 3 крыс; 2) в скобках — число измеренных клеток; 3) содержание гликогена в гепатоцитах отличается от соответствующего значения у голодных животных при уровне значимости <sup>1</sup> —  $p < 0,05$ , <sup>2</sup> —  $p < 0,01$ , <sup>3</sup> —  $p < 0,001$ .

Несмотря на то, что гепатоциты нормальной печени на разных этапах рефиндинга накапливают больше гликогена, чем при ЦП, содержание гликогена в одноядерных и двоядерных гепатоцитах различных классов плоидности, как в нормальной так и в цирротической печени соответствовало дозе генов, т.е. в расчете на геном оно было одинаковым (рис. 3.15) (Безбородкина и др., 2009а; Bezborodkina et al., 2016).

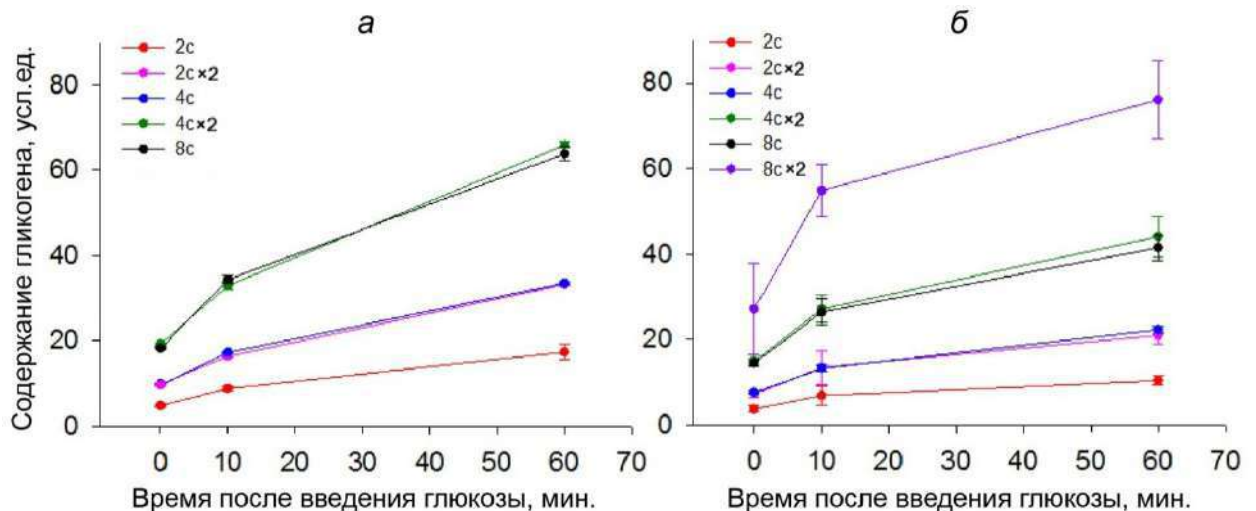


Рисунок 3.15 — Динамика содержания гликогена в гепатоцитах различных классов плоидности в контрольной (а) и цирротической печени (б) в ходе рефиндинга крыс глюкозой. Примечание: вертикальные отрезки — ошибка среднего.

Таким образом, заключение о пропорциональности содержания гликогена в гепатоцитах уровню плоидности клеток в ходе гликогенеза (рис. 3.16) (Bezborodkina et

al., 2016) полностью совпадает с выводом, который был сделан ранее при исследовании этой закономерности в относительно стабильном постабсорбтивном периоде пищевого цикла (Кудрявцев и др., 1979, 1980; Шалахметова и др., 1981; Майтесян, 1983). Следовательно, общие принципы регуляции транскрипции и трансляции в гепатоцитах цирротической печени не затрагиваются патологическим процессом в печени, хотя абсолютный уровень этих процессов в норме и при патологии может отличаться.

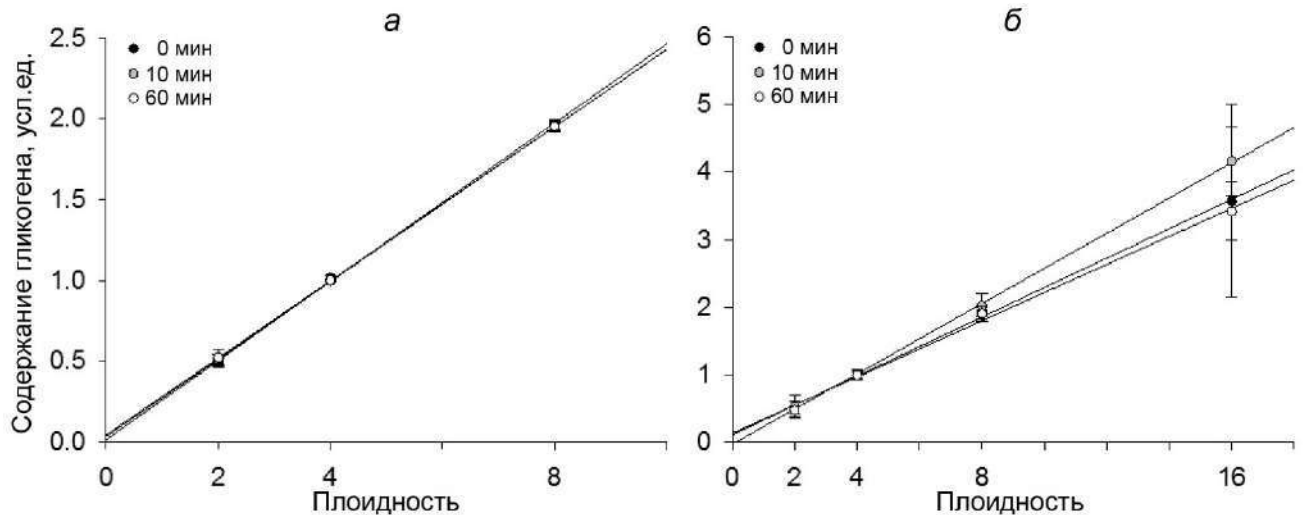


Рисунок 3.16 — Зависимость содержания гликогена в гепатоцитах контрольной (а) и цирротической (б) печени крысы от плоидности клеток при голодании (0 мин), а также через 10 и 60 мин после введения глюкозы голодным животным. Примечание: вертикальные отрезки — ошибка среднего.

Размер клеток — еще один фундаментальный параметр, который существенно влияет их строение и функцию (Jorgensen, Tyers, 2004). Подавляющее большинство работ, в которых изучалась взаимосвязь размера клеток с их функцией, посвящено влиянию на метаболизм ионозависимых флуктуаций клеточного объема. Показано, что увеличение или уменьшение объема клеток, обусловленное их гидратацией или обезвоживанием, оказывает сильное влияние на многочисленные метаболические пути, включая синтез и распад белков, липогенез, гликолиз и синтез мочевины (Waldegger, Lang, 1998). Однако быстрые осцилляции размера гепатоцитов, вызванные их набуханием или дегидратацией, по своей амплитуде не велики и не сопровождаются изменениями в клетках количества органоидов или других структур (Espelt et al., 2008). В отличие от колебаний объема клеток, вызванных гипер- и гипоосмотическими

условиями, интервал изменений статичных размеров гепатоцитов в печени млекопитающих несравнимо выше.

Интерферометрическое определение сухой массы (СМ) гепатоцитов<sup>\*)</sup> в нормальной (Bezborodkina et al., 2022) и цирротической печени показало, что в ходе абсорбтивного периода изменения этого параметра достигали 10 раз (Bezborodkina et al., 2016). Отчасти различия СМ клеток обусловлены различиями в степени их ploидности, однако, даже в пределах одного класса ploидности СМ гепатоцитов сильно отличалась. Например, у голодных крыс СМ одноядерных 4с-клеток варьировала от 400 до 798 пг (Bezborodkina et al., 2016). Причины такой вариабельности не совсем ясны. Известно, однако, что гепатоциты выполняют огромное количество тканеспецифических функций, ряд которых связан с синтезом и секрецией белков. Известно также, что в клетках существуют циркадный, окологасовой и другие ритмы синтеза белков и выведения их в плазму крови (Brodsky, 1992; Brodsky, 2014). При этом вариабельность клеток по содержанию белка, включению меченых аминокислот и выведению белка из гепатоцитов в максимуме и минимуме окологасового ритма могут достигать 2–4 раз (Новикова, Боровков, 1987). Исходя из этого, можно предположить, что изменения СМ гепатоцитов в наших экспериментах, в основном, связаны с колебаниями синтеза и выведения белков из клеток.

Полагают, что размеры клеток оказывают значительное влияние на метаболизм и содержание гликогена в гепатоцитах. Считается, что между размером гепатоцитов и содержанием в них гликогена существует определенная связь. Полагают, что содержание гликогена в клетках тем выше, чем больше они по размеру (Newsholme, Start, 1975). Результаты проверки этой гипотезы, представленные на рис. 3.17, *a*; 3.18, *a*; 3.19, *a*; 3.20, *a*; 3.21, *a* свидетельствуют о том, что в нормальной печени крысы и человека содержание гликогена в гепатоцитах действительно коррелирует с размером клеток (Безбородкина и др., 2009а; Bezborodkina et al., 2016). Подобная зависимость наблюдалась в каждом классе ploидности клеток.

Зависимость содержания гликогена от размера гепатоцитов хорошо прослеживается у крыс, как при голодании, так и в ходе интенсивного синтеза гликогена в печени. Особенно четко эта зависимость проявляется в классе одноядерных тетраploидных гепатоцитов (рис. 3.20, *a*). Полученные данные свидетельствуют о

---

<sup>\*)</sup> Сухая масса гепатоцитов примерно на 85% определяется содержанием в них белков (Бродский, 1966).

наличии в нормальной печени трех субпопуляций гепатоцитов, различающихся по содержанию гликогена (рис. 3.20, *а*). Возможно, что эти субпопуляции гепатоцитов отражают присутствие клеток портальной, промежуточной и центральной зон долики печени (Безбородкина и др., 2009а; Bezborodkina et al., 2016).

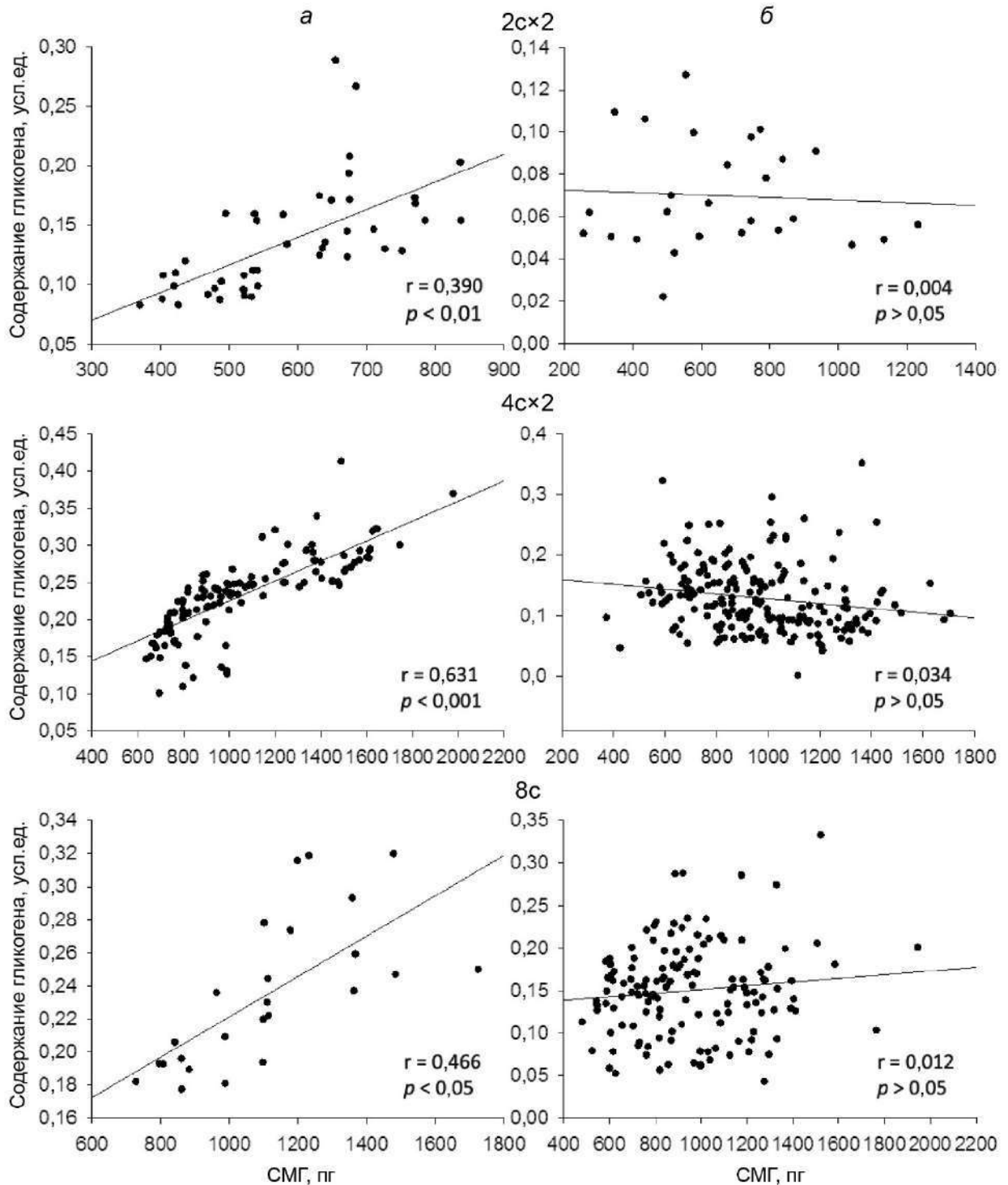


Рисунок 3.17 — Зависимость содержания гликогена от сухой массы гепатоцитов (СМГ) различных классов плоидности нормальной (*а*) и цирротической (*б*) печени у голодных крыс (0-я мин). Примечание: каждая точка на графике соответствует одной клетке.

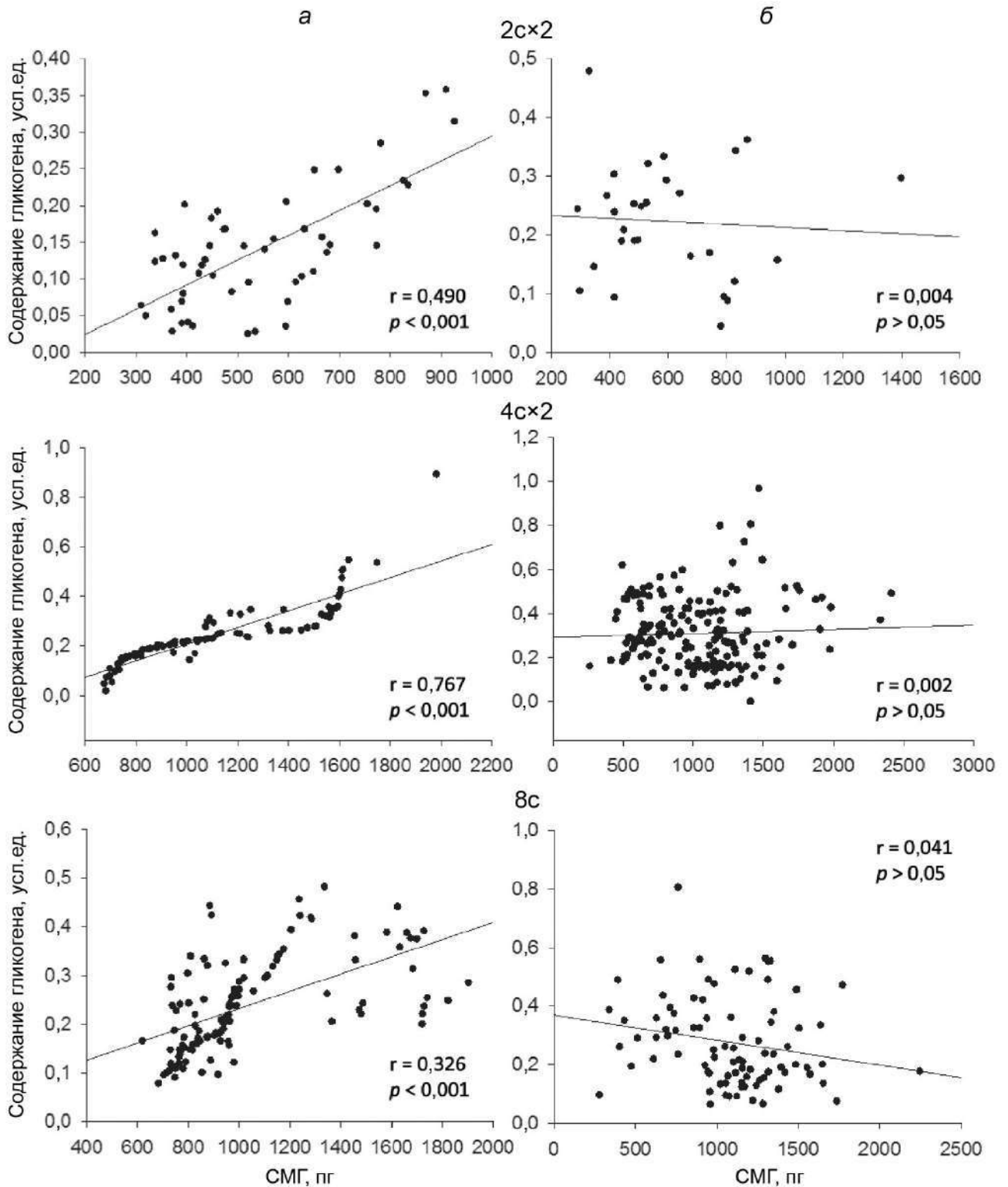


Рисунок 3.18 — Зависимость содержания гликогена от сухой массы гепатоцитов (СМГ) различных классов плоидности нормальной (а) и цирротической (б) печени через 10 мин после введения глюкозы голодным крысам. Примечание: каждая точка на графике соответствует одной клетке.

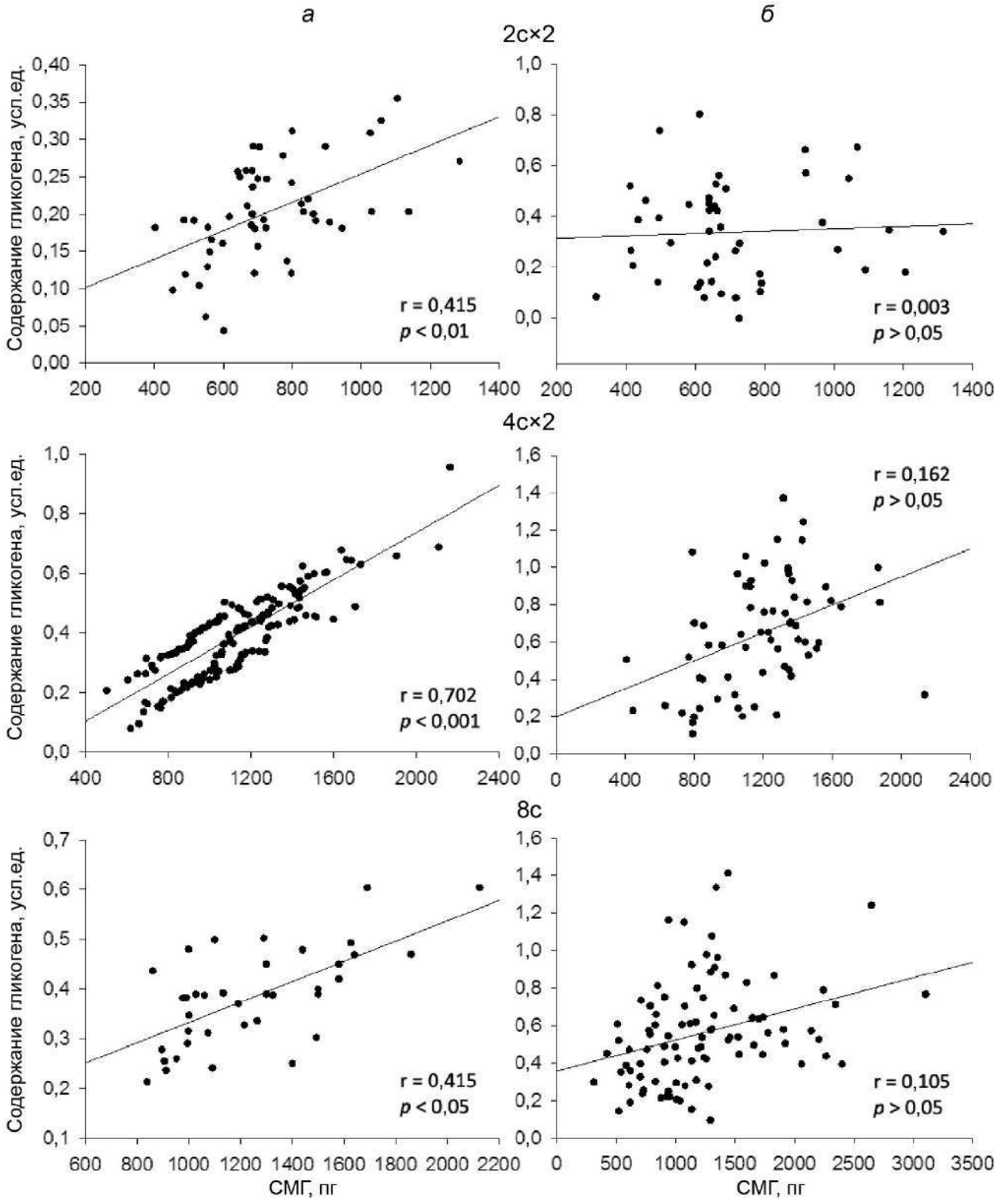


Рисунок 3.19 — Зависимость содержания гликогена от сухой массы гепатоцитов (СМГ) различных классов плоидности нормальной (а) и цирротической (б) печени через 60 мин после введения глюкозы голодным крысам. Примечание: каждая точка на графике соответствует одной клетке.

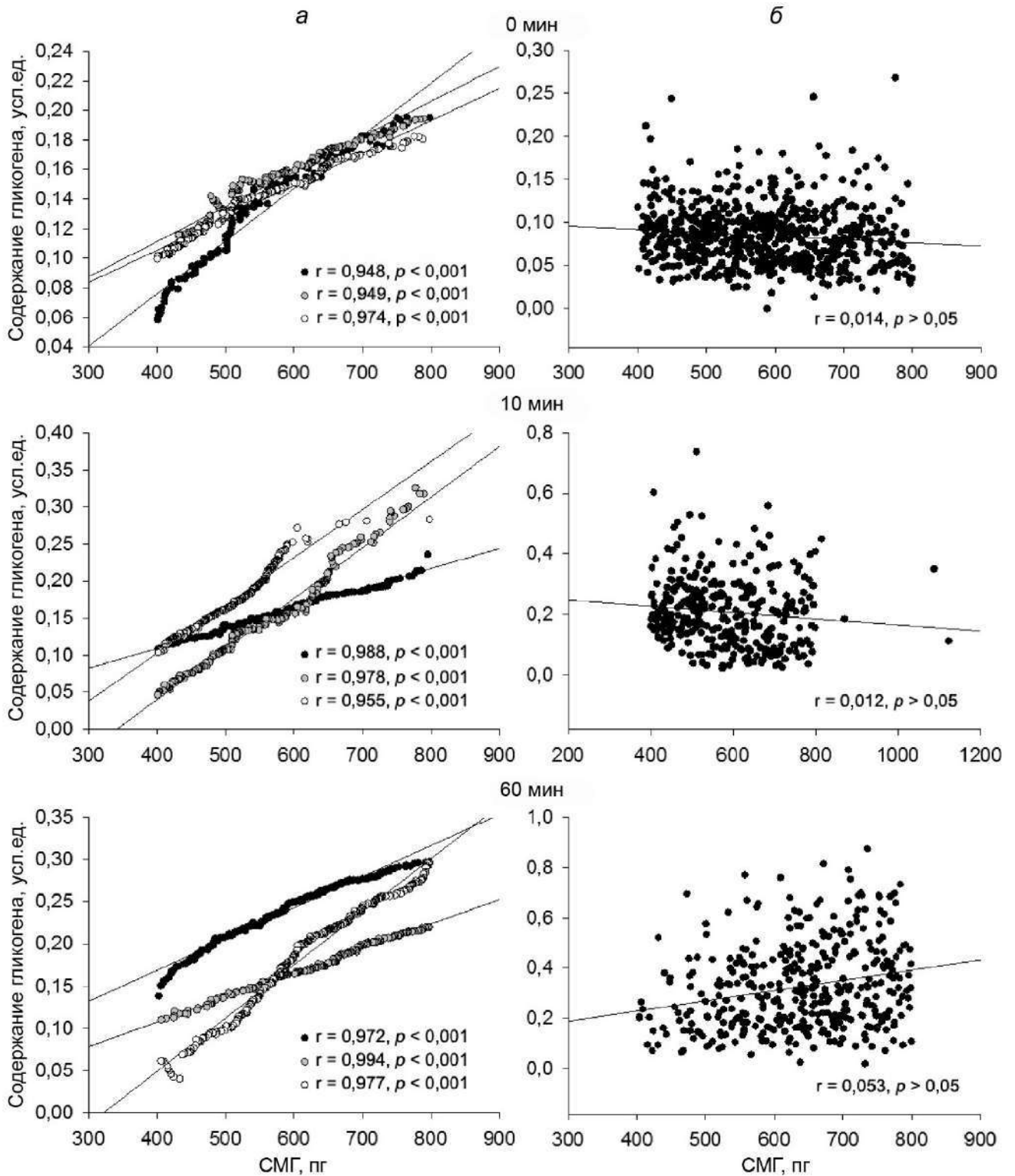


Рисунок 3.20 — Тетраплоидные гепатоциты контрольной (а) и цирротической (б) печени крысы на разных этапах рефиндинга. Взаимосвязь между содержанием гликогена и их сухой массой (СМГ). Примечания: 1) каждая точка на графике соответствует одной клетке; 2) черным, серым и белым цветом обозначены три субпопуляции клеток в контрольной печени крысы.



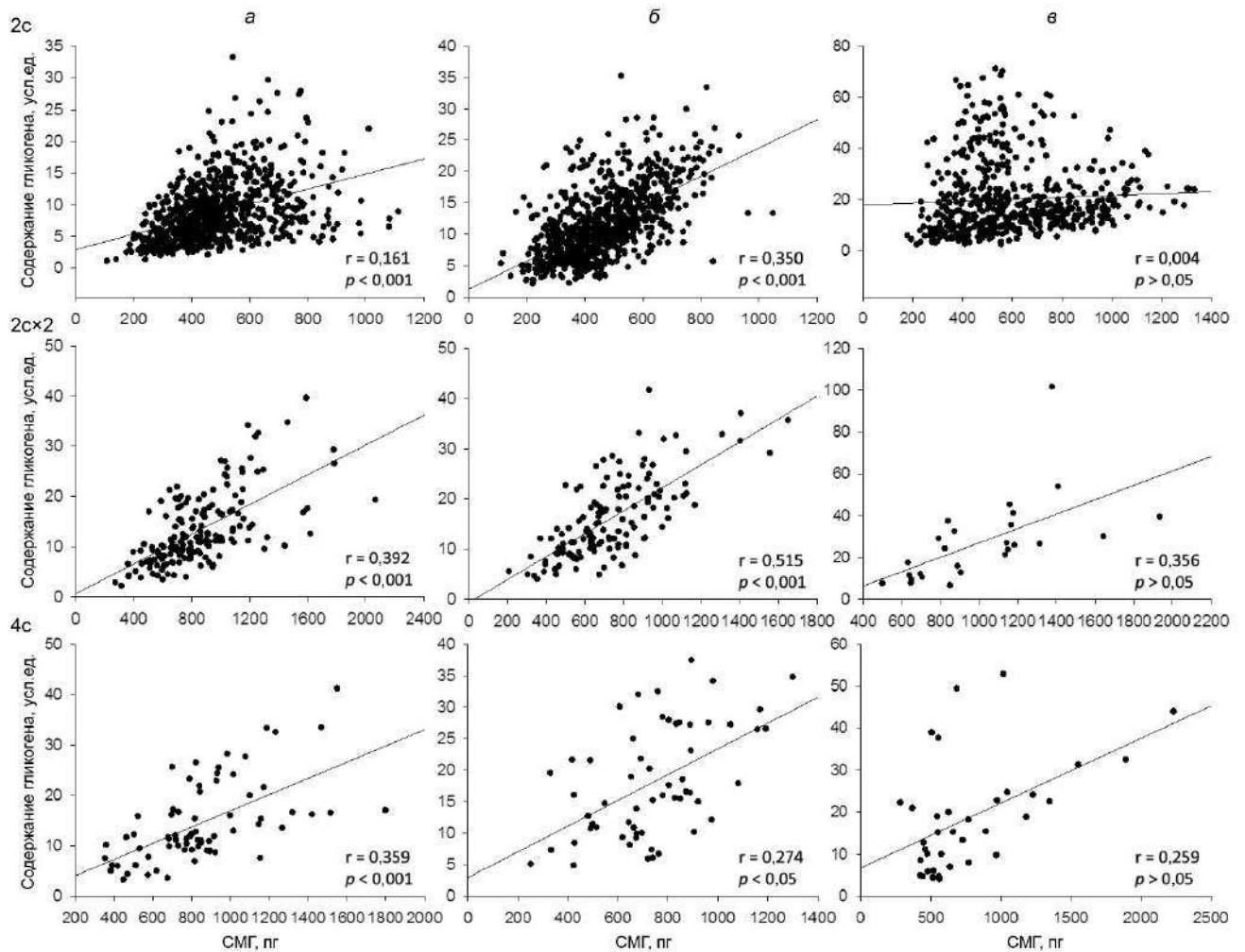


Рисунок 3.21 — Зависимость содержания гликогена от сухой массы гепатоцитов различных классов плоидности человека в контроле (а), при хроническом гепатите (б) и циррозе печени (в). Примечание: каждая точка на графике соответствует одной клетке.

В отличие от нормальной печени, в цирротической печени человека и крысы зависимость содержания гликогена в гепатоцитах от размера клеток отсутствует (рис. 3.17, б; 3.18, б; 3.19, б; 3.20, б; 3.21, в). Исходя из этого, можно предположить, что отсутствие зависимости между размером гепатоцитов и содержанием в них гликогена в цирротической печени связано, прежде всего, с нарушением долькового строения органа, которое приводит к резкому увеличению гетерогенности микроокружения гепатоцитов (Bezborodkina et al., 2016).

Таким образом, мы показали, что в абсорбтивном периоде пищевого цикла интенсивность накопления гликогена в цирротической печени ниже, чем в нормальной печени и сильно различается в разных клетках популяции гепатоцитов. Кроме того, установлено, что в нормальной печени существует прямая зависимость между размером

гепатоцитов и содержанием в них гликогена, тогда как при ЦП эта зависимость отсутствует.

### **3.2.3. Концентрация глюкозы в крови, содержание гликогена в гепатоцитах и активность ключевых ферментов его метаболизма в нормальной и патологически измененной печени в постабсорбтивном периоде человека, крыс и мышей после ночного голодания**

Подавляющее большинство данных о содержании и метаболизме гликогена в нормальной и патологически измененной печени получено для постабсорбтивного периода, продолжительность которого составляет 10–12 ч. Типичным постабсорбтивным периодом, например, у человека считается состояние организма после ночного голодания.

Анализу содержания гликогена в патологически измененной печени человека и крыс в постабсорбтивном периоде пищевого цикла посвящено несколько исследований. Тем не менее, имеющиеся данные не позволяют дать однозначный ответ на вопрос об уровне гликогена в поврежденном органе. В частности, при использовании модели экспериментального ЦП у крыс ( $\text{CCl}_4$  + фенobarбитал) было показано, что содержание гликогена в цирротической печени крыс в расчете на гепатоцит снижено примерно на 36% по сравнению с нормой (Krähenbühl et al., 1991). Поскольку активность ГС и ГФа при этом не изменялась, авторы пришли к выводу о том, что падение содержания гликогена в цирротической печени связано с «*intrinsic*» причинами. В другой работе, с использованием модели длительного холестаза у крыс, обнаружено, что содержание гликогена в расчете на миллилитр гепатоцитов снижено ~ на 61% (Krähenbühl et al., 1996). Падение запасов гликогена авторы объясняли уменьшением скорости его синтеза вследствие низкой активности ГС. Наконец, на модели тиоцетамидного ЦП было показано, что запасы гликогена в цирротической печени крыс составляют лишь половину от уровня характерного для контрольных животных (Giardina et al., 1994).

Имеющиеся сведения о содержании гликогена в цирротической печени человека также неоднозначны. Исследование биопсийного материала печени 28 больных алкогольным ЦП показало, что содержание гликогена составляет  $25,8 \pm 3,5$  мг/г сырой массы, в то время как у двух здоровых людей оно выше — 32,0 и 48,8 мг/г сырой массы

(Owen et al., 1981). Эти значения примерно соответствуют среднему значению содержания гликогена (43,7 мг/г) в печени 58 здоровых волонтеров после 12–16 ч ночного голодания (Nilsson, 1973). Пониженное содержание гликогена при ЦП объясняли увеличением доли фиброзной ткани, которая составляла в паренхиме печени исследованных больных ЦП  $41 \pm 3\%$  (Owen et al., 1981). Известно, что паренхима в нормальной печени человека занимает около 90 % ее объема (Snyder et al., 1975). Исходя из этих данных, можно заключить, что концентрация гликогена в паренхиме, свободной от фиброза, у больных ЦП составит на самом деле не  $25,8 \pm 3,5$  мг/г, как отмечено в работе Owen et al., 1981, а  $52,6 \pm 7,1$  мг/г. Это расчетное значение не отличается от величины концентрации гликогена в нормальной печени человека —  $43,7 \pm 1,8$  мг/г, указанной в статье Nilsson, 1973.

Для пациентов с алкогольным и биллиарным ЦП было найдено, что содержание гликогена в расчете на миллилитр гепатоцитов примерно на 50 % ниже, чем в норме (Krähenbühl et al., 2003). При этом уровни ГС и ГФ у пациентов в контрольной группе и группе с ЦП не различались, а падение содержания гликогена авторы объясняли уменьшением ~ в 7 раз активности ГК. Однако возможный механизм участия ГК в снижении уровней гликогена авторами представлен не был. Наконец, в работе с использованием  $^2\text{H}_2\text{O}$  метода и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии было обнаружено, что концентрация гликогена в печени у пациентов с циррозом на 34 % меньше, чем в контрольной группе. К сожалению, концентрацию гликогена авторы относили к общему объему цирротической печени, поэтому наличие пониженного уровня гликогена здесь не очевидно. Кроме того, авторы показали, что снижение содержания гликогена сопровождалось 3,5-кратным падением гликогенолиза в печени пациентов с циррозом (Petersen et al., 1999). Этот факт удивителен, поскольку столь сильное падение гликогенолиза, наоборот, должно было бы привести к увеличению содержания гликогена в печени.

В отличие от данных, приведенных выше, результаты определения концентрации гликогена в печени контрольных крыс и крыс с  $\text{CCl}_4$ -циррозом в постабсорбтивном периоде, полученные нами с помощью биохимического метода, показали, что в цирротической печени она увеличилась вдвое по сравнению с нормой —  $56,5 \pm 7,9$  vs  $28,3 \pm 6,5$  мг/г сырой массы печени ( $p < 0,05$ ), соответственно (Bezborodkina et al., 2022).

Одной из возможных причин отличия наших данных от результатов, полученных другими авторами, может быть разная методика определения объема паренхимы в цирротической печени, точность определения которого во многом определяет корректность оценки концентрации гликогена в печени при использовании биохимических методик. Поэтому для измерения содержания гликогена нами был использован цитофлуориметрический метод. В этом случае нет необходимости учитывать объем паренхимы в патологически измененной печени, т.к. содержание гликогена измеряется непосредственно в гепатоцитах.

Микроскопическое исследование гепатоцитов, окрашенных с помощью флуоресцентного варианта PAS-реакции, показало, что в норме гепатоциты характеризуются довольно тонкой структурой и четкими границами ядра и цитоплазмы (рис. 3.22, *а, в*). Хроническое отравление крыс  $\text{CCl}_4$  вызывает не только фиброзное перерождение паренхимы печени, но приводит также к значительным изменениям структуры самих гепатоцитов, которые увеличиваются в размерах, вакуолизируются и проявляют признаки дистрофии. Отличительной чертой клеточной популяции паренхимы при ЦП является полиморфизм составляющих ее гепатоцитов как по размеру, так и по структуре цитоплазмы. При этом могут встречаться отдельные клетки, характерные для нормальной печени (рис. 3.22, *б, г*) (Bezborodkina et al., 2013б; Bezborodkina et al., 2022).

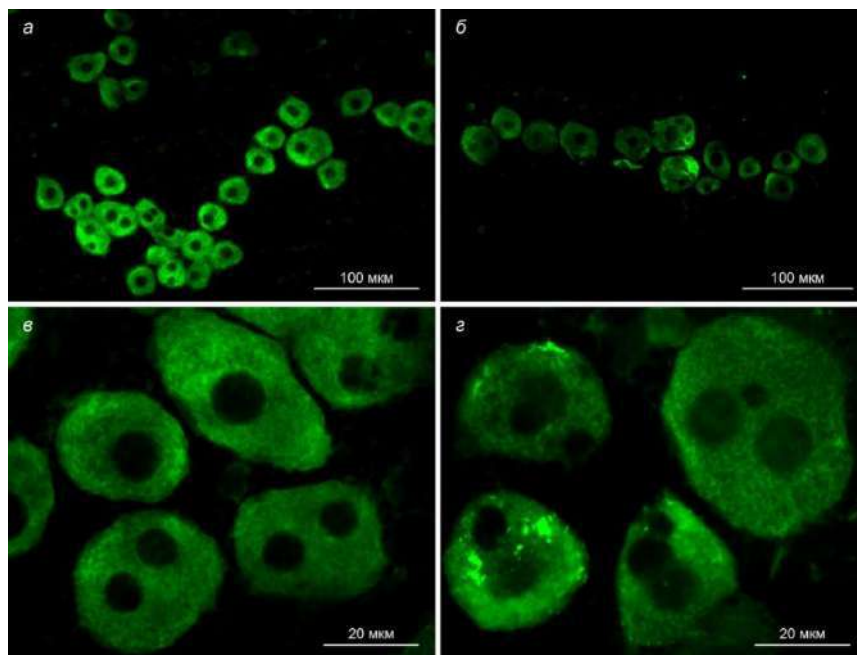


Рисунок 3.22 — Гепатоциты крыс контрольной (*а, в*) и опытной групп (*б, г*). Флуоресцентный вариант PAS-реакции.

Цитофлуориметрия гликогена в гепатоцитах крыс, показала, что после ночного голодания его содержание в цирротической печени значительно выше, чем в клетках нормального органа (рис. 3.23, а), подтвердив тем самым результаты биохимического анализа содержания гликогена, полученные нами (Bezborodkina et al., 2022).

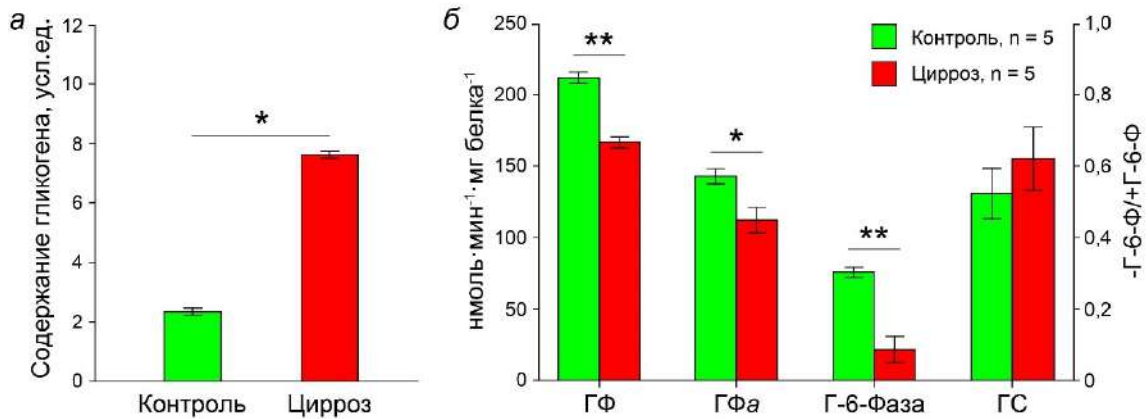


Рисунок 3.23 — Содержание гликогена в гепатоцитах (а) и активность ферментов его метаболизма (б) в норме и при циррозе печени у крыс. ГФ — общая гликогенфосфорилаза; ГФа — гликогенфосфорилаза *a*; Г-6-Фаза — глюкозо-6-фосфатаза; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ . Активность ферментов нормализовали по содержанию фиброзной ткани.

Исследование активности ключевых ферментов гликогенеза и гликогенолиза в печени крыс обнаружило, что уровни общей ГФ и ее активной формы при ЦП примерно на 20 % ниже, чем в нормальной печени (рис. 3.23, б) (Bezborodkina et al., 2022). Активность ГС в цирротической печени не отличалась от контрольных значений (рис. 3.23, б) (Bezborodkina et al., 2022). Полученные данные согласуются с результатами, полученными ранее (Кудрявцева и др., 1994) и предполагают, что причиной накопления гликогена в гепатоцитах может быть ослабление гликогенолиза вследствие снижения активности ГФа.

Анализ микроизображений гепатоцитов человека, окрашенных с помощью флуоресцентной PAS-реакции, показал, что по сравнению с нормой, клетки больных ХГ увеличиваются в размерах, становятся более полиморфными, в их цитоплазме появляются вакуоли, по-видимому, липидного происхождения (рис. 3.24, б, в). У больных ЦП происходит не только увеличение доли клеток с патологическими признаками, но и дальнейшее усиление этих изменений (рис. 3.24, г) (Bezborodkina et al., 2022).

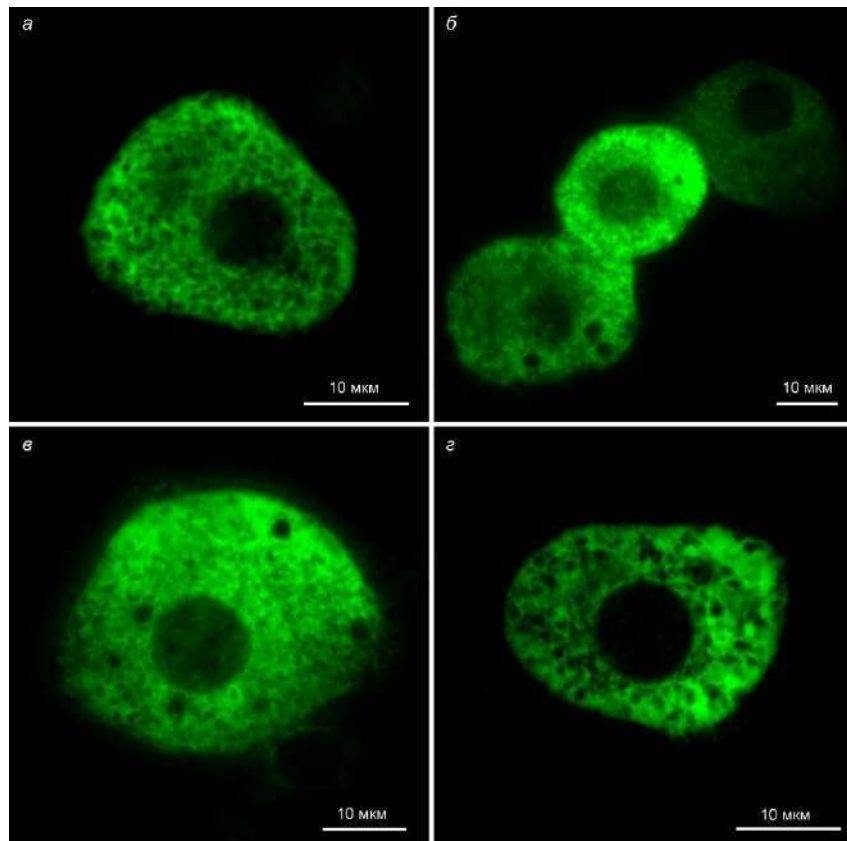


Рисунок 3.24 — Гепатоциты человека. *а* — норма; *б, в* — хронический гепатит; *г* — цирроз печени. Флуоресцентный вариант PAS-реакции.

Цитофлуориметрия гликогена в гепатоцитах нормальной и патологически измененной печени человека показала, что его содержание при ЦП, как и у крыс, значительно превышает норму (рис. 3.25, *а*) (Bezborodkina et al., 2022). Полученные данные свидетельствуют также о том, что хронический воспалительный процесс в печени человека сопровождается не только перестройкой дольковой структуры органа, изменениями состава и морфологии клеток паренхимы, но и постепенным накоплением гликогена в гепатоцитах по мере усиления тяжести поражения печени. В среднем, содержание гликогена в гепатоцитах больных ХГ, превышало норму на 88 %, а в клетках больных ЦП — на 160 % (рис. 3.25, *а*) (Bezborodkina et al., 2022). При этом накопление гликогена в гепатоцитах пациентов с ЦП сопровождалось более сильным, чем при ЦП у крыс, падением активностей, как общей гликогенфосфоорилазы, так и ее активной формы, ГФа — на 22 % и 46 % соответственно (рис. 3.25, *б*) (Bezborodkina et al., 2022). Этот результат подтверждает данные полученные ранее (Кудрявцева и др., 1992, 1994) и дает основание считать, что ослабление гликогенолиза вследствие низкой активности ГФа, как и в цирротической печени крыс, имеет первостепенное значение для увеличения содержания гликогена при ЦП у человека. Чтобы установить механизмы

гликогеноза гепатоцитов в цирротической печени важно выявить основные факторы, регулирующие активность ГС и ГФа и влияющие на уровень гликогена в печени.

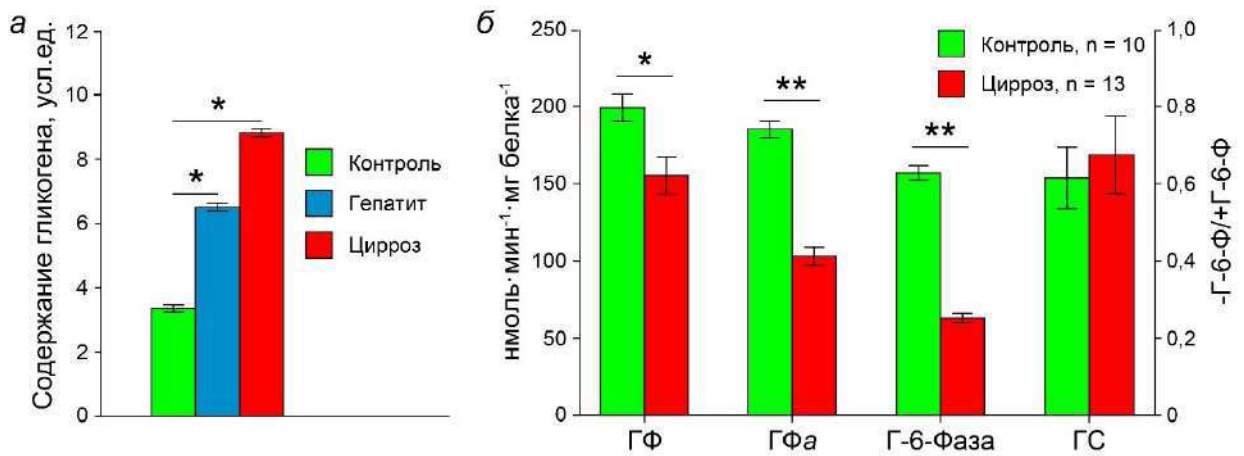


Рисунок 3.25 — Содержание гликогена в гепатоцитах (а) и активность ферментов его метаболизма (б) в норме, при хроническом гепатите и циррозе печени у человека. ГФ — общая гликогенфосфорилаза; ГФа — гликогенфосфорилаза *a*; Г-6-Фаза — глюкозо-6-фосфатаза; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ . Активность ферментов нормализовали по содержанию фиброзной ткани.

Помимо гормонального и энергетического статуса организма, процессов фосфорилирования–дефосфорилирования, изменения локализации в клетке (Bjorn et al., 2001; Ferrer et al., 2003; Jurczak et al., 2008; Roach et al., 2012) важную роль в регуляции этих ферментов играет концентрация Г-6-Ф в гепатоцитах. Г-6-Ф определяет степень фосфорилирования ГС, способствует лучшему взаимодействию с фосфатазой синтазы (von Wilamowitz-Moellendorff et al., 2013) и влияет на локализацию фермента в клетке (Fernandez-Novell et al., 1996). Повышение внутриклеточной концентрации Г-6-Ф увеличивает активность ГС и стимулирует синтез гликогена (Ciudad et al., 1986; Villar-Palasi, Guinovart, 1997).

При физиологических условиях активность ГФа обратно коррелирует с концентрацией Г-6-Ф в клетках. В отличие от ГС, повышение Г-6-Ф в гепатоцитах приводит к снижению активности ГФа и ингибированию гликогенолиза, независимо от того образуется ли этот метаболит путем фосфорилирования глюкозы с помощью ГК или в процессе глюконеогенеза (Aiston et al., 2003). Таким образом, Г-6-Ф в гепатоцитах является главной детерминантой не только скорости синтеза гликогена, но также скорости гликогенолиза. Концентрация Г-6-Ф в гепатоцитах сильно зависит от разнонаправленного действия ГК и Г-6-Фазы (Seoane et al., 1997). Поэтому можно



ожидать, что изменение активностей ГК и Г-6-Фазы приведет к сдвигу активностей ГС и ГФ и, как следствие, повлияет на содержание гликогена в клетках.

По нашим данным активность Г-6-Фазы в печени крыс с  $CCl_4$ -циррозом, находящихся в постабсорбтивном периоде, составляет 29 % от активности фермента в нормальной печени (рис. 3.23, б) (Bezborodkina et al., 2022). Согласно данным полученным ранее, активность этого фермента при экспериментальном ЦП у крыс может варьировать от 23 до 36 % от уровня нормы (Кудрявцева и др., 1994, 1996). Значительное снижение активности Г-6-Фазы было выявлено многими авторами и в печени пациентов с ЦП (Taketa et al., 1976; Owen et al., 1981; Pieniazek et al., 1985; Sotaniemi et al., 1985; Shimamura et al., 1987; Kruszynska, McIntyre, 1991). В частности, было показано, что в цирротической печени человека активность Г-6-Фазы после ночного голодания составляет менее 50 % от уровня нормы (Кудрявцева и др., 1992). Проведенное нами исследование биопсийного клинического материала, показало, что падение активности Г-6-Фазы зависит от тяжести поражения печени. У больных хроническим гепатитом активность Г-6-Фазы в постабсорбтивном периоде ниже нормы в 1,2 раза, а при ЦП — в 4,4 раза (рис. 3.25, б) (Bezborodkina et al., 2022).

Имеющиеся в настоящее время данные свидетельствуют о том, что в постабсорбтивном периоде активность ГК в цирротической печени человека также находится на очень низком уровне (Taketa et al., 1976; Sotaniemi et al., 1985; Lowes et al., 1998; Krähenbühl et al., 2003). Столь низкую активность ГК трудно объяснить лишь потерей паренхимы при ЦП у человека, поскольку ее объем уменьшается примерно наполовину, в то время как активность фермента снижается в несколько раз. Некоторые авторы к числу возможных причин снижения активности ГК при ЦП относят ухудшение синтеза белка ГК (Taketa et al., 1976; Sotaniemi et al., 1985). Однако вряд ли этот фактор является основным, т.к. скорость белкового синтеза в гепатоцитах цирротической печени, хотя и падает, но не в столь значительной степени, как активность этого фермента (Tessari, 2003; Katayama, 2020; Guldiken et al., 2021). Поэтому механизм значительного снижения активности ГК остается неясным. Тем не менее, крайне низкая активность ГК при ЦП предполагает, что в постабсорбтивном периоде скорость фосфорилирования глюкозы и скорость синтеза гликогена в гепатоцитах «прямым» путем (глюкоза→Г-6-Ф→гликоген) невелики.



Известно, что для продукции глюкозы гепатоциты могут использовать Г-6-Ф, который образуется в ходе гликогенолиза и глюконеогенеза. В нормальной печени после ночного голодания 70–80 % глюкозы образуется за счет гликогенолиза и лишь 20–30 % путем глюконеогенеза (Krusczynska, McIntyre, 1991; Krusczynska, 1999). При ЦП доля глюконеогенеза в продукцию глюкозы возрастает до 67–87 %, а относительный вклад гликогенолиза резко снижается (Owen et al., 1981; Bugianesi et al., 1998; Petersen et al., 1999; Perdigoto et al., 2003).

Некоторые авторы предполагали, что снижение вклада гликогенолиза в продукцию глюкозы при ЦП связано с уменьшением содержания гликогена в гепатоцитах (Owen et al., 1981; Schricker et al., 1996; Petersen et al., 1999). Однако, как справедливо заметили Bugianesi с соавторами, в отсутствие прямой оценки содержания гликогена в биопсиях цирротической печени делать подобный вывод нельзя (Bugianesi et al., 1998). В подтверждение этих слов, проведенный нами цитофлуориметрический анализ гепатоцитов, изолированных из цирротической печени крыс и человека, выявил в них высокое содержание гликогена (рис. 3.23, *a*, рис. 3.25, *a*). Высокое содержание гликогена в гепатоцитах при ЦП может быть обусловлено: во-первых, интенсивным глюконеогенезом, который повышает концентрацию Г-6-Ф в печени и, как следствие, приводит к ослаблению активности ключевого фермента деградации гликогена ГФ и, во-вторых, низкой активностью Г-6-Фазы. Важная роль Г-6-Фазы в регуляции уровня гликогена в печени подтверждается тем, что при наследственном гликогенозе I типа в отсутствии активности этого фермента, гепатоциты накапливают огромное количество гликогена (Beatty et al., 2002).

#### **3.2.4. Коморбидность цирроза печени и диабета. Влияние на содержание гликогена в гепатоцитах**

Характерной чертой многих болезней человека, в т.ч. и ЦП, является коморбидность. До 70 % пациентов с ЦП имеют клинически выраженный СД 2-го типа и гепатогенный диабет (Garcia-Compean et al., 2009; Kumar, 2018). Показано, что наличие диабета у пациентов с ЦП снижает продолжительность их жизни (Garcia-Compean et al., 2015; Kumar, 2018). Механизм развития диабета при ЦП связан с уменьшением массы паренхимы печени, структурной перестройкой органа и его

сосудистого русла. В этих условиях снижается экспрессия инсулиновых рецепторов, что, в свою очередь, приводит к гиперинсулинемии и резистентности к инсулину (Nishida, 2017).

В настоящее время накапливается всё больше данных о том, что ЦП и СД 2-го типа обладают рядом схожих черт. Серьезные различия между ЦП и СД 2-го типа наблюдаются лишь в метаболическом блоке, связанном с продукцией глюкозы печенью, и гистологической структуре органа (рис. 3.26). По сравнению с диабетом цирроз, по-видимому, характеризуется значительно бóльшим фиброзированием печени (Anthony et al., 1978; Owen et al., 1981; Doycheva et al., 2013; Zhou et al., 2014; Torbenson, Washington, 2020). Однако следует отметить, что гистологические исследования диабетической печени немногочисленны, сравнительный анализ морфологии печени при ЦП и СД не проводился, а данные о морфометрических показателях диабетической печени отсутствуют. Что касается различий метаболизма глюкозы в диабетической и цирротической печени, то они относятся, прежде всего, к продукции глюкозы и активности Г-6-Фазы. В отличие от ЦП, продукция глюкозы и активность Г-6-Фазы при СД намного превышают норму (Garfield, Cardell, 1979; Kolterman et al., 1981; Magnusson et al., 1992; DeFronzo et al., 1992; Clore et al., 2000; Westergaard, Madsen, 2001). По остальным параметрам СД и ЦП схожи (Alberti, 1981; Petrides, DeFronzo, 1989; Levinthal, Tavill, 1999; Jiang et al., 2020; Loria et al., 2013; Schofield et al., 2017) (рис. 3.26).



Рисунок 3.26 — Метаболические и морфологические показатели больных СД 2-го типа и циррозом печени (по сравнению с нормой).

Вопрос о содержании гликогена в печени больных диабетом давно привлекал внимание исследователей. Общий вывод работ, проведенных на материале печени пациентов с СД или депанкреатизированных животных, заключался в том, что диабет приводит к уменьшению содержания гликогена (Vallance-Owen, 1952) и скорости его синтеза (Hornbrook, 1970; Whitton, Hems, 1975; Golden et al., 1979) по сравнению с нормой. Снижение способности печени больных СД синтезировать гликоген объясняли дефектом активации ГС (Bishop, 1970; Tan, Nuttall, 1976; Bollen et al., 1983).

Тем не менее, вопрос о содержании гликогена в печени больных СД оставался открытым по двум причинам. Во-первых, в ряде работ было найдено, что печень многих больных без терапии инсулином и скончавшихся от диабетической комы, содержит нормальное или увеличенное количество гликогена (Geelmuuden, 1920; Warren, 1930; Popper, Wozasek, 1931). Во-вторых, информация о низком содержании гликогена в печени получена, в основном, на животных, у которых СД индуцировали в течение относительно короткого времени (short-term диабет). Между тем известно, что СД у человека развивается в течение многих месяцев и даже лет (long-term диабет). При использовании моделей СД, условие продолжительности воздействия на лабораторных животных обычно не соблюдается и фактор адаптации различных субстратных потоков к длительному патологическому состоянию, как правило, не учитывается. Поэтому предполагают, что низкий уровень гликогена в печени при диабете является скорее исключением, нежели правилом (Friedmann et al., 1963).

Роль гликогена печени в патогенезе СД остается неясной. Для выявления ранних преддиабетических изменений в содержании и структуре гликогена нами были использованы трансгенные гомозиготные мыши OE-NPY<sup>DBH</sup> с фенотипом позднего ожирения, гепатостеатоза и преддиабета (Ruohonen et al., 2008; Vähätalo et al. 2015). В качестве животных с диким фенотипом (WT) использовались мыши C57BL/6N. Для снижения уровня глюкозы в крови мыши подвергались обработке антигипергликемическим агентом метформином, который широко используется для лечения диабета.

Данные, представленные в таблице 3.7, свидетельствуют о том, что в постабсорбтивном периоде содержание гликогена в гепатоцитах мышей OE-NPY<sup>DBH</sup> и мышей WT одинаково (Ailanen et al., 2018). При этом структура гликогена в гепатоцитах OE-NPY<sup>DBH</sup> мышей резко отличается от структуры характерной для мышей дикого типа.

Обработка гомозиготных мышей OE-NPY<sup>DBH</sup> метформином приводит к почти двукратному снижению содержания гликогена в гепатоцитах, но в то же время нормализует соотношение его фракций. У WT-мышей метформин не влияет ни на содержание гликогена в гепатоцитах, ни на его фракционный состав (Ailanen et al., 2018). Причины различного действия метформина на содержание гликогена в гепатоцитах WT- и OE-NPY<sup>DBH</sup>-мышей, по-видимому, состоят в отличающихся характеристиках глюконеогенеза в печени этих линий мышей.

Известно, что СД приводит к усилению глюконеогенеза в печени по сравнению с нормой (Consoli et al., 1989; Giaccari, Rosetti, 1992; Torres et al., 2011; Jiang et al., 2020). Показано также, что скорость печеночного глюконеогенеза при действии метформина заметно падает (Alengrin et al., 1987; Heishi et al., 2006; Otto et al., 2003). Исходя из этих данных, можно предположить, что синтез и накопление гликогена в гепатоцитах OE-NPY<sup>DBH</sup> мышей, находящихся на стадии преддиабета, происходит преимущественно непрямым путем, через глюконеогенез (С<sub>3</sub>-предшественники→Г-6-Ф→гликоген), в то время как в печени мышей C57BL/6N для синтеза гликогена используется, главным образом, прямой путь (глюкоза→Г-6-Ф→гликоген) (Ailanen et al., 2018). Это предположение подтверждается также тем, что непрямой путь синтеза гликогена при диабете заметно усиливается (Giaccari, Rosetti, 1992; Bischof et al., 2002).

Таблица 3.7 — Содержание суммарного гликогена (СГ) и соотношение его легкодоступной и труднодоступной фракций (ЛД/ТД) в гепатоцитах мышей линии C57BL/6N с диким генотипом (WT) и трансгенных гомозиготных мышей OE-NPY<sup>DBH</sup> до и после действия метформина, усл.ед., (X±S<sub>x</sub>, n = 3).

Генотип	Обработка	СГ, усл.ед.	ЛД/ТД
WT	Без метформина	28,67±0,71	1,46±0,07
	Метформин	25,64±0,76	1,37±0,08
OE-NPY	Без метформина	30,74±0,71	0,64±0,03 <sup>1</sup>
	Метформин	16,58±0,49 <sup>1</sup>	1,61±0,09

<sup>1</sup> Достоверно отличается от остальных значений СГ или ЛД/ТД (<sup>1</sup>p < 0.05).

Цитофлуориметрия содержания гликогена в гепатоцитах больных СД 2-го типа после ночного голодания обнаружила, что оно увеличено в 2,7 раза по сравнению с

клетками пациентов контрольной группы (табл. 3.8). Данные, представленные в таблице 3.8, свидетельствуют о том, что содержание гликогена в гепатоцитах больных ЦП не отличается от такового в клетках пациентов с коморбидной формой заболевания — ЦП + СД 2.

Таблица 3.8 — Среднее содержание гликогена в гепатоцитах нормальной печени человека (контроль), больных сахарным диабетом 2 типа (СД 2), циррозом печени (ЦП) и пациентов с сочетанной формой этих двух заболеваний (ЦП+СД 2) (усл. ед.,  $X \pm S_x$ ).

	Контроль (n = 9)	СД 2 (n = 12)	ЦП (n = 4)	ЦП+СД 2 (n = 5)
Содержание гликогена	1,88±0,22	4,19±0,38 <sup>1</sup>	6,90±0,32 <sup>1a</sup>	6,12±0,79 <sup>1a</sup>

<sup>1</sup> Достоверно отличается от значения в контроле (<sup>1</sup>p < 0,001). <sup>a</sup> Достоверно отличается от значения в группе СД 2 (<sup>a</sup>p < 0,05).

Наши данные подтверждают результаты, полученные ранее на пациентах с СД (Vallance-Owen, 1952; Manderson et al., 1968) и на крысах с аллоксановым или стрептозотоциновым диабетом (Winternitz, Lattanzi, 1956; Van de Werve, Jeanrenaud, 1987; Ferrannini et al., 1990; Giaccari, Rosetti, 1992; de Oliveira et al., 2007; Bhanudas, Gopal, 2016). Содержание гликогена в гепатоцитах больных СД 2-го типа оказалось сравнимо с таковым у пациентов с ЦП (табл. 3.8). Небольшое превышение содержания гликогена в гепатоцитах цирротической печени, возможно, связано с небольшой, всего 4 человека, выборкой пациентов. Следует также отметить, что коморбидность цирроза и диабета не приводит ни к аддитивному, ни к потенцированному синергическим эффектам, поскольку содержание гликогена в гепатоцитах пациентов в группе ЦП+СД 2 практически не отличается от содержания гликогена в клетках печени у больных с только СД 2-го типа или только ЦП (табл. 3.8). Причиной этого, возможно, является то, что синтез гликогена при этих заболеваниях осуществляется с использованием одного и того же метаболического пути — глюконеогенеза, возможности которого ограничены.

Таким образом, содержание гликогена в гепатоцитах пациентов с сахарным диабетом 2-го типа в постабсорбтивном периоде увеличено по сравнению с нормой, но коморбидность СД с циррозом печени не усиливает гликогеноз.

### **3.3. Пространственная структура молекул гликогена в гепатоцитах крыс и человека в норме и при циррозе печени**

Как показано выше, содержание гликогена в клетках подвержено быстрым и масштабным изменениям в ответ на требования со стороны организма. При этом изменения содержания гликогена в клетках могут быть связаны не только с активностью ключевых ферментов его метаболизма и многочисленными факторами, регулирующими активность ферментов, но также с количеством молекул гликогена и их внутренней структурой. Установлено, что структура молекул гликогена в клетках нормальных и патологически измененных органов и тканей подвержена значительным перестройкам (Кудрявцева и др., 1988, 1992; Кудрявцева, 1987; Shearer et al., 2005; Kishnani, Chen, 2007; Wilson, 2010; Roach et al., 2012; Gilbert, Sullivan, 2014). Вместе с тем, механизмы формирования и деградации  $\beta$ -частиц гликогена, динамика их состава в норме и при патологии, роль структурных изменений частиц в регуляции гликогенеза и гликогенолиза во многом еще неясны. Одной из главных причин недостаточности этой информации является ограниченность возможностей современных методов изучения структуры молекул гликогена в клетках.

#### **3.3.1. Цитофлуориметрический метод исследования структуры гликогена в отдельных гепатоцитах**

В настоящее время ни один из известных методов не позволяет описать пространственную структуру столь огромной молекулы, как гликоген, с достаточной точностью и полнотой (Brust et al., 2020). Поэтому разработка метода, который позволил бы исследовать пространственную структуру молекул гликогена ( $\beta$ -частиц) в отдельных гепатоцитах, являлась настоятельной необходимостью. Следует, однако, отметить, что изучение структуры молекул гликогена, состоящих из совершенно одинаковых звеньев — остатков глюкозы, является непростой задачей.

Недостатки существующих методов изучения пространственной структуры гликогена следующие:

- применяются к гликогену, выделенному из тканей, что создает опасность нарушения его исходной структуры;

– обладают низкой чувствительностью. Минимальное количество ткани для определения содержания гликогена, не говоря уж об определении каких-либо параметров его молекул, составляет 10–100 мкг ( $10^{-6}$  г). Минимально определяемое количество гликогена в такой навеске составляет 3–50 мкг (Delaval et al., 1983). По нашим данным влажная масса одного гепатоцита нормальной печени крысы равна примерно 3,5 нг ( $10^{-9}$  г), а минимальное количество гликогена в одном гепатоците составляет 10–20 пг ( $10^{-12}$  г) (Bezborodkina et al., 2022). Следовательно, метод изучения структуры гликогена в одном гепатоците должен с высокой точностью определять ~ в 100000 раз меньшее содержание гликогена, чем существующие методы, в навеске ткани меньшей ~ в 3000 раз;

– не учитывают гетерогенность клеточного состава печени, которая значительно возрастает при ее патологии.

Разработка нашего метода для изучения структуры гликогена в отдельных клетках базировалась на:

– наиболее аргументированной в настоящее время гипотезе пространственной структуры молекулы, основанной на существовании про- и макрогликогена (ПГ, МГ), и их характеристиках: ПГ включает восемь внутренних ярусов молекулы, содержит ~ 5 % остатков глюкозы и ~ 10 % гликогенина, не экстрагируется из тканей 10%-й ТХУ; МГ включает четыре внешних яруса (с 9-го по 12-й) полностью сформированной молекулы<sup>\*)</sup>, содержит ~ 95 % всех остатков глюкозы, извлекается из тканей при обработке ТХУ; ПГ служит промежуточным звеном на пути формирования МГ (Lomako et al., 1993; Alonso et al., 1995; Melendez et al., 1997; Adamo, 1998).

– Periodic Acid-Schiff (PAS)-реакции, которая широко применяется для специфичного выявления гликогена в клетках (Lillie, 1965). Используя эту реакцию, можно количественно определять содержание гликогена в клетках (Кудрявцева и др., 1970; Gahrton et al., 1975). PAS-реакция состоит из двух основных этапов: мягкого окисления препаратов в растворе йодной кислоты и последующего их окрашивания в реактиве Шиффа. При окислении йодной кислотой или ее солями из 1,2-гликолевых групп в остатках глюкозы гликогена образуются альдегидные группы, которые затем

---

<sup>\*)</sup> Ряд авторов под макрогликогеном (МГ) подразумевают полную молекулу гликогена, которая включает 12 ярусов остатков глюкозы вместе с 8-ми ярусным прогликогеном (ПГ), содержащим 4–5% остатков глюкозы от их числа в полной молекуле гликогена. Мы выделяем две части молекулы – 8-ми ярусный ПГ и МГ — остатки глюкозы на 9–12 внешних ярусах молекулы.

выявляются с помощью реактивов типа Шиффа. Классический вариант реактива типа Шиффа — это раствор основного фуксина в сернистой кислоте, но могут использоваться и другие красители, в том числе флуоресцентные.

– FRET (Förster Resonance Energy Transfer) методе. Этот современный микроскопический анализ взаимодействий между биологическими макромолекулами обладает высокой чувствительностью к очень небольшим изменениям расстояния между флуорофорами. Фёрстеровский резонансный перенос энергии обычно происходит на расстояниях от 1 до 10 нм, что сравнимо с размерами большинства биологических макромолекул. FRET является безызлучательным процессом, при котором энергия флуоресцирующей молекулы донора (Don), находящейся в возбужденном состоянии, переносится на основное состояние другой флуоресцирующей молекулы — акцептора (Ac) путем диполь-дипольного взаимодействия (Piston, Kremers, 2007; Grecco, Verveer, 2011).

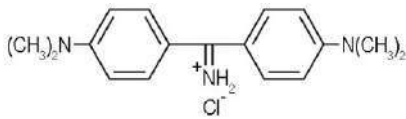
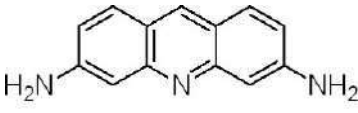
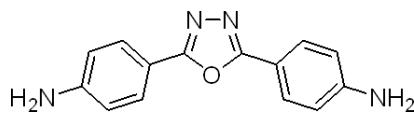
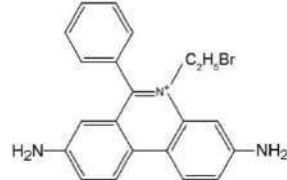
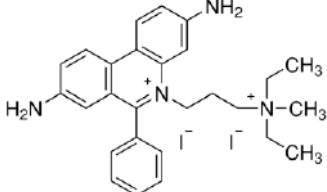
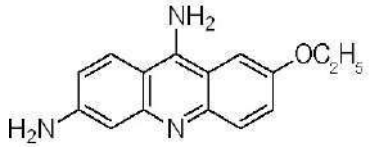
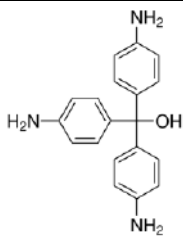
Разработка нового метода включала несколько этапов: 1) испытание различных флуоресцентных красителей в качестве заменителей основного фуксина в реактиве Шиффа; 2) выбор пары красителей, с помощью которых можно не только селективно выявлять гликоген в клетках в ходе PAS-реакции, но также использовать их в качестве Don и Ac при FRET анализе; 3) расчет фёрстеровского расстояния  $R_0$  для выбранной пары красителей; 4) исследование зависимости интенсивности окрашивания гликогена в гепатоцитах с помощью двух выбранных реактивов типа Шиффа разного цвета от времени окрашивания в реактиве; 5) определение оптимальных условий окрашивания препаратов для выявления и оценки содержания растворимой и нерастворимой в ТХУ фракций гликогена в отдельных клетках; 6) разработка методики расчета числа остатков глюкозы на внешних ярусах молекул гликогена.

Выбор красителей для цитофлуориметрических исследований в тех случаях, когда необходимо использовать два или более красителей одновременно, представляет непростую задачу. С одной стороны, важным условием применения метода для определения содержания растворимой и нерастворимой в ТХУ фракций гликогена в гепатоцитах является то, что спектры флуоресценции красителей, использующихся в реактивах типа Шиффа, должны, как можно меньше, перекрываться между собой. С другой стороны, применение метода FRET для анализа внутренней структуры молекул гликогена в клетках требует хотя бы частичного перекрывания спектров флуоресценции



испускания Don и поглощения Ac. Поэтому при выборе пары красителей мы учитывали не только специфичность связывания красителя с альдегидными группами гликогена, но также его спектральные характеристики. Список протестированных в работе красителей приведен в таблице 3.9 (Безбородкина и др., 2009б).

Таблица 3.9 — Характеристики флуоресцирующих красителей, использованных для приготовления реактивов типа Шиффа.

Краситель (источник информации)	Сокращенное название	Структурная формула	Концентрация, %	$\lambda$ возбуждения, нм	$\lambda_{\text{макс}}$ флуоресценции, нм
<b>Аурамин ОО</b> (Bosshard, 1964; Кудрявцев, Розанов, 1974)	Au		0,3	405, 436	526
<b>Акрифлавин</b> (Böhm, Sprenger, 1968)	Afl		0,001	546	605
<b>2,5-бис-[4-аминофенил-(Г')]-1,3,4-оксадиазол</b> (Yataghanas et al., 1969)	BAO		0,00001	365	440–450
<b>Бромистый этидий</b> (Кудрявцев и др., 1974)	EtBr		0,0004	546	595–610
<b>Йодистый пропидий</b> (Foglieni et al., 2001)	PI		0,0003	546	615–625
<b>Риванол</b> (Хачатуров, Смирнова, 1966)	Riv		0,01	380–480	520
<b>Парарозанилин</b> (Böhm, Sprenger, 1968; Fujita, 1973)	pRA		0,01–0,05	570	620

Примечание: реактивы типа Шиффа представляли собой водные растворы красителей соответствующей концентрации, в которые был добавлен хлористый тионил (0,2 мл на 100 мл раствора красителя).

Исследование препаратов, окрашенных реактивами типа Шиффа, показало, что все реактивы с высокой селективностью выявляют гликоген в гепатоцитах (рис. 3.27). Реакция на гликоген со всеми реактивами была отрицательной после предварительной обработки препаратов  $\alpha$ -амилазой и в том случае, когда препараты не подвергались окислению йодной кислотой перед помещением их в реактив Шиффа. Оказалось, однако, что риванол и особенно акрифлавин и обладают метахроматическими свойствами, т. е. при изменении концентрации исследуемого вещества спектр флуоресценции этих красителей также смещается. Кроме того, при цитофлуориметрии клеток, окрашенных акридиновыми красителями, присутствует довольно сильный эффект внутреннего фильтра. Обнаружено также, что при повышении концентрации акридиновых красителей и ВАО в реактиве типа Шиффа наблюдается слабое неспецифическое окрашивание клеток. Недостатком ВАО является также и то, что клетки, обработанные этим красителем, флуоресцируют в сине-зеленой области спектра, где, как известно, интенсивность собственной флуоресценции клеток особенно велика. Ряд недостатков отмечен и для других красителей. Аурамин 00 оказался недостаточно стойким к возбуждающему свету. Реактивы типа Шиффа на основе аурамина 00 и йодистого пропидия можно использовать только один раз из-за образования в них осадка. Парарозанилин может применяться лишь в очень небольших концентрациях из-за возможного нарушения пропорциональности между содержанием красителя и исследуемым веществом. Кроме того, при его использовании нужен строгий контроль интенсивности поглощения возбуждающего света, чтобы избежать ошибок при фотометрии (Безбородкина и др., 2009б).

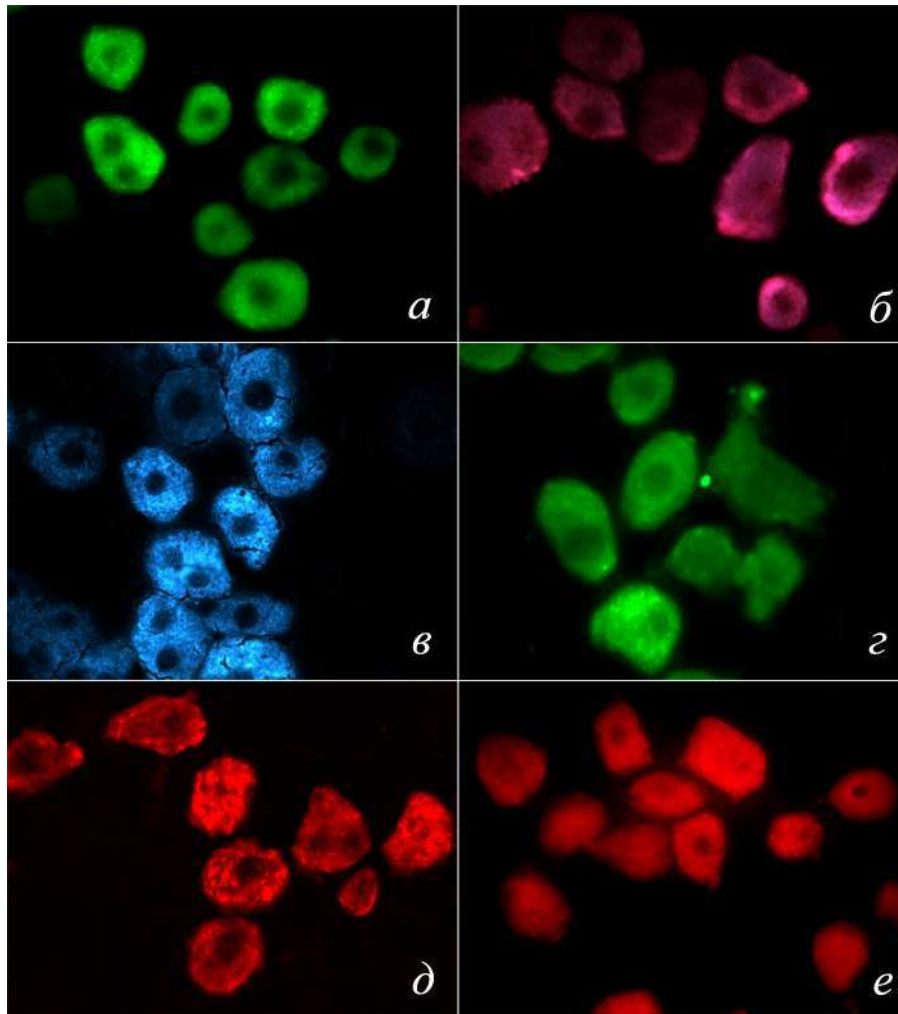


Рисунок 3.27 — Гепатоциты крысы, окрашенные с помощью PAS-реакции при использовании реактивов типа Шиффа: аурамина-SO<sub>2</sub> (а), основного фуксина-SO<sub>2</sub> (б), BAO-SO<sub>2</sub> (в), риванола-SO<sub>2</sub> (г), бромистого этидия-SO<sub>2</sub> (д) и акрифлавина-SO<sub>2</sub> (е). Axioskop (Carl Zeiss, Йена, Германия), об. 40х.

В итоге, для дальнейших исследований были выбраны красители аурамин 00 (Au) и бромистый этидий (EtBr). Во-первых, реактивы типа Шиффа Au-SO<sub>2</sub> и EtBr-SO<sub>2</sub>, при использовании их в PAS-реакции, позволяют специфично выявлять гликоген в гепатоцитах. Во-вторых, спектры флуоресценции гепатоцитов, окрашенных Au-SO<sub>2</sub> ( $\lambda_{\max} \sim 526$  нм) и EtBr-SO<sub>2</sub> ( $\lambda_{\max} \sim 610$  нм), слабо перекрываются (рис. 2.7) и не смещаются при изменении концентрации гликогена в клетках. В качестве «красного» красителя можно было бы использовать и парарозанилин, но, учитывая большой и успешный опыт применения EtBr в качестве флуоресцентного красителя, предпочтение было отдано последнему.

Поскольку альдегиды легко вступают во многие реакции присоединения, замещения и конденсации, необходимо было исследовать сохранность реактивности альдегидных групп в ходе длительного их окрашивания реактивом типа Шиффа Au-SO<sub>2</sub>.

Данные, представленные на рисунке 3.28, свидетельствуют о том, что в течение 3 ч нахождения препаратов в водном растворе SO<sub>2</sub>, концентрация которого была идентичной концентрации SO<sub>2</sub> в реактиве Шиффа, потери альдегидных групп не наблюдалось. С учетом этих данных была исследована зависимость интенсивности окрашивания препаратов от времени их обработки в реактиве типа Шиффа (Безбородкина и др., 2009б).

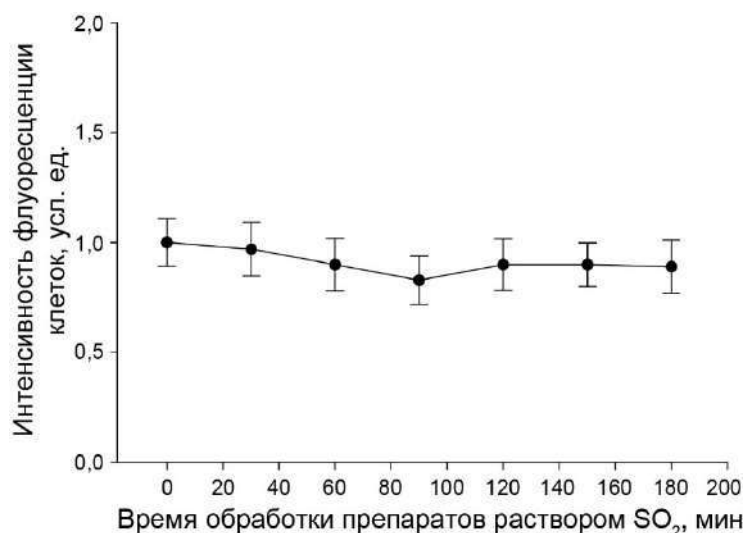


Рисунок 3.28 — Влияние различного времени выдерживания препаратов в растворе SO<sub>2</sub> на стабильность альдегидных групп гликогена в гепатоцитах. Примечание: вертикальные отрезки — ошибка среднего.

Для определения характера зависимости интенсивности PAS-реакции от продолжительности окрашивания клеток реактивами типа Шиффа Au-SO<sub>2</sub> и EtBr-SO<sub>2</sub>, гепатоциты, помещенные на покровных стеклах, окисляли в 0,8%-ном растворе KIO<sub>4</sub>. Затем стекла обрабатывали в течение различного времени при комнатной температуре либо в Au-SO<sub>2</sub> (0,3%-ный Au + 0,2 мл SOCl<sub>2</sub>/100 мл), либо в EtBr-SO<sub>2</sub> (0,0004%-ный раствор EtBr + 0,2 мл SOCl<sub>2</sub>/100 мл). После завершения окрашивания, все препараты одновременно вынимали из реактивов и обрабатывали по методике, описанной в разделе 2.3.2.1.

Результаты, представленные на рисунке 3.29, свидетельствуют о том, что зависимость интенсивности флуоресценции гепатоцитов от времени их окрашивания в

ходе PAS-реакции при использовании обоих реактивов имеет схожий двухступенчатый характер. В интервале 0–40 мин происходит быстрое связывание как Au-SO<sub>2</sub>, так и EtBr-SO<sub>2</sub>, а в интервале 40–70 мин связывание обоих красителей резко замедляется (или прекращается). Затем наблюдается новая волна интенсивного связывания красителей. После 90 мин график зависимости интенсивности флуоресценции клеток от времени окрашивания выходит на плато, свидетельствуя о завершении связывания красителей с альдегидными группами гликогена (Bezborodkina et al., 2011; Bezborodkina et al., 2021a).

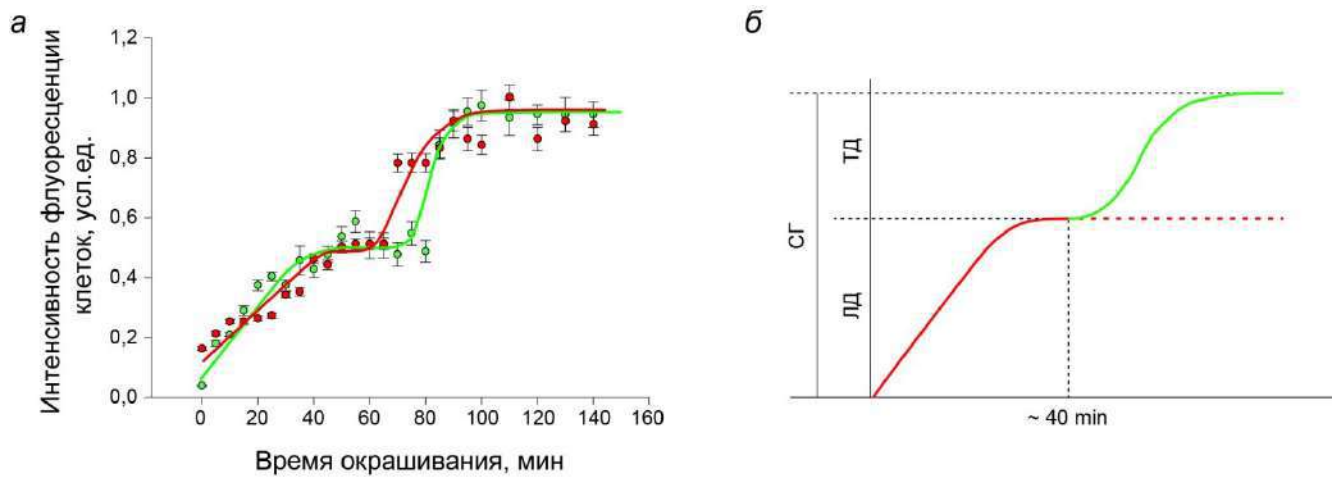


Рисунок 3.29 — Флуоресцентный вариант PAS реакции с реактивами типа Шиффа. *а* — зависимость интенсивности флуоресценции гепатоцитов от продолжительности их окрашивания EtBr-SO<sub>2</sub> (красная линия) и Au-SO<sub>2</sub> (зеленая линия); *б* — схема, показывающая последовательное окрашивание клеток EtBr-SO<sub>2</sub> (красная линия), а затем Au-SO<sub>2</sub> (зеленая линия). Примечание: при исследовании зависимостей, представленных на рисунке *а*, использовались клетки, полученные от разных крыс. ЛД — быстро окрашивающаяся фракция гликогена, легкодоступная для красителя. ТД — медленно окрашивающаяся фракция гликогена, труднодоступная для красителя. СГ — суммарный гликоген = ЛД + ТД.

Для выяснения природы быстро окрашивающейся (ЛД) и медленно окрашивающейся (ТД) фракций гликогена, препараты гепатоцитов на предметных стеклах, полученные от одной и той же крысы, перед окрашиванием Au-SO<sub>2</sub> или EtBr-SO<sub>2</sub> обрабатывали 10% ТХУ или 30% КОН (Bloom, Knowlton, 1953).

Результаты этого эксперимента, представленные в таблице 3.10, свидетельствуют о том, что гликоген в гепатоцитах полностью выявляется после 90 мин окисления препаратов в КЮ<sub>4</sub> и последующего окрашивания Au-SO<sub>2</sub> или EtBr-SO<sub>2</sub>. Фракция гликогена, быстро выявляемая в течение 40 мин после начала окрашивания в реактиве Шиффа, соответствует фракции, которая извлекается с помощью ТХУ («легкодоступная» фракция), а фракция гликогена, которая выявляется медленно (в

интервале от 40 до 90 мин) соответствует «труднодоступной» фракции, полностью извлекаемой лишь при обработке препаратов горячей КОН. Полученные данные (табл. 3.10) свидетельствуют о том, что в гепатоцитах крысы, печень которой использовалась в эксперименте, доля фракции чувствительной к обработке 10%-й ТХУ, составляет ~ 72 %, а доля фракции не чувствительной к обработке ТХУ ~ 28 % (Bezborodkina et al., 2011; Bezborodkina et al., 2021a).

Таблица 3.10 — Влияние различных обработок на интенсивность флуоресценции гепатоцитов, окрашенных PAS-реакцией с использованием реактивов типа Шиффа Au-SO<sub>2</sub> или EtBr-SO<sub>2</sub>.

Тип обработки	Интенсивность флуоресценции (усл.ед.)
KIO <sub>4</sub> → Au-SO <sub>2</sub> (90 мин)	224±12
KIO <sub>4</sub> → EtBr-SO <sub>2</sub> (90 мин)	198±15
KIO <sub>4</sub> → Au-SO <sub>2</sub> (40 мин)	159±8
KIO <sub>4</sub> → EtBr-SO <sub>2</sub> (40 мин)	147±11
10% ТХУ → KIO <sub>4</sub> → Au-SO <sub>2</sub> (90 мин)	66±5
10% ТХУ → KIO <sub>4</sub> → EtBr-SO <sub>2</sub> (90 мин)	54±4
30% КОН → KIO <sub>4</sub> → Au-SO <sub>2</sub> (90 мин)	5,9±0,4
30% КОН → KIO <sub>4</sub> → EtBr-SO <sub>2</sub> (90 мин)	5,3±0,3
H <sub>2</sub> O → Au-SO <sub>2</sub> (90 мин)	9,7±0,5
H <sub>2</sub> O → EtBr-SO <sub>2</sub> (90 мин)	8,4±0,5
α-амилаза → KIO <sub>4</sub> → Au-SO <sub>2</sub> (90 мин)	6,4±0,4
α-амилаза → KIO <sub>4</sub> → EtBr-SO <sub>2</sub> (90 мин)	4,8±0,2
Собственная флуоресценция клеток в «зеленой» области спектра (λ <sub>max</sub> = 530 nm)	7,0±0,4
Собственная флуоресценция клеток в «красной» области спектра (λ <sub>max</sub> = 610 nm)	5,1±0,3

Примечание: продолжительность предварительного окисления препаратов перйодатом калия (KIO<sub>4</sub>) во всех случаях составляла 90 мин. Интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных в ходе PAS-реакции Au-SO<sub>2</sub> или EtBr-SO<sub>2</sub>, нормировали по тетраплоидным гепатоцитам крыс, которые окрашивали этими же реактивами на ДНК по Фельгену (Розанов, Кудрявцев, 1967). Одноядерные тетраплоидные гепатоциты являются удобным объектом для нормирования, поскольку они содержат постоянное количество ДНК и составляют ~ 80 % популяции клеток паренхимы печени взрослых крыс (Кудрявцев и др., 1979).

Таким образом, проведенное исследование показало, что: 1) обработка препаратов Au-SO<sub>2</sub> или EtBr-SO<sub>2</sub> в течение 90 мин выявляет весь гликоген в гепатоцитах (224±12 и 198±15 усл. ед. соответственно); 2) окрашивание препаратов Au-SO<sub>2</sub> или EtBr-SO<sub>2</sub> в течение 40 мин выявляет фракцию гликогена, которая извлекается с помощью обработки препаратов 10%-й ТХУ (159±8 и 147±11 усл.ед. соответственно), т.е.

фракцию гликогена не связанную с белками — макрогликоген (МГ); 3) последующее окрашивание препаратов Au-SO<sub>2</sub> или EtBr-SO<sub>2</sub> в интервале 40–90 мин выявляет фракцию гликогена, которая полностью извлекается из клеток только после обработки КОН (66±5 и 54±4 соответственно), т.е. фракцию гликогена связанную с белками — прогликоген (ПГ) (Bezborodkina et al., 2021a).

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

Как показано выше, PAS-окрашивание клеток в течение 0–40 мин позволяет выявить МГ, а в интервале 40–90 мин — ПГ. Для того, чтобы в одной и той же клетке



выявить и отдельно определить содержание этих фракций гликогена мы использовали реактивы Шиффа с красителями, флуоресцирующими разным цветом.

В качестве примера на рисунке 3.30 показаны гепатоциты, в которых фракция гликогена свободная от белков (МГ) окрашена EtBr-SO<sub>2</sub>, а фракция, связанная с белками (ПГ) окрашена Au-SO<sub>2</sub>. Для отдельного измерения содержания этих фракций гликогена в индивидуальных клетках использовали метод цитофлуориметрии. Гепатоциты, окрашенные EtBr-SO<sub>2</sub>, флуоресцируют в «красной» области спектра при возбуждении зелёным светом ( $\lambda_{\text{max}} = 546$  нм), а окрашенные Au-SO<sub>2</sub> — в «зеленой» области спектра при возбуждении синим светом ( $\lambda_{\text{max}} = 436$  нм). Общее содержание гликогена (ОГ) в клетках определяли, как сумму МГ + ПГ.

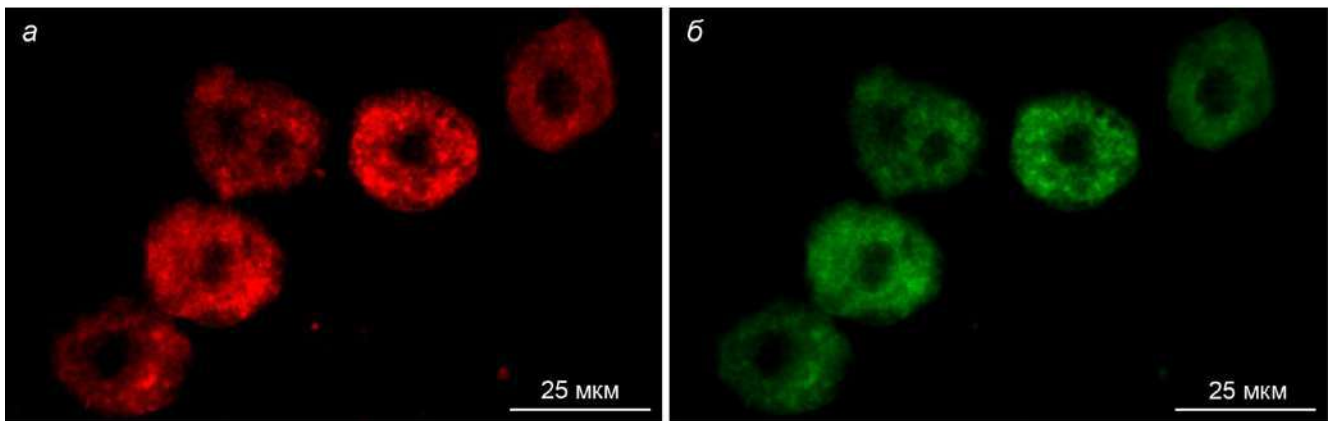


Рисунок 3.30 — Гепатоциты окрашенные в течение 40 мин EtBr-SO<sub>2</sub>,  $\lambda_{\text{возб}} = 546$  нм (а). Те же клетки, окрашенные затем Au-SO<sub>2</sub>,  $\lambda_{\text{возб}} = 436$  нм (б).

### 3.3.2. Структура молекул гликогена в гепатоцитах крыс и человека в нормальной и цирротической печени на разных стадиях пищевого цикла

Возможность выявлять ПГ и МГ в одной и той же клетке с помощью красителей, обладающих разными спектральными характеристиками, позволила исследовать изменения их содержания в гепатоцитах крысы в ходе гликогенеза. Результаты, представленные на рисунке 3.31, а, свидетельствуют о том, что содержание МГ в клетках контрольных крыс на всех сроках после введения глюкозы (кроме 120-й мин) превышало содержание МГ в клетках крыс с ЦП. Можно отметить, что на разных стадиях рефиндинга доля МГ в некоторых гепатоцитах контрольных крыс и у крыс с ЦП, могла достигать 90 % (Chestnova et al., 2015).



Содержание ПГ в гепатоцитах крыс контрольной группы возросло на 12,7 % ( $p < 0,01$ ) в течение 20 мин после введения глюкозы голодным животным и затем не изменялось. В отличие от контроля, содержание ПГ при ЦП слабо изменялось в первые 60 мин гликогенеза, однако в конце эксперимента превысило исходный уровень в 2,3 раза ( $p < 0,001$ ) (рис. 3.31, б).

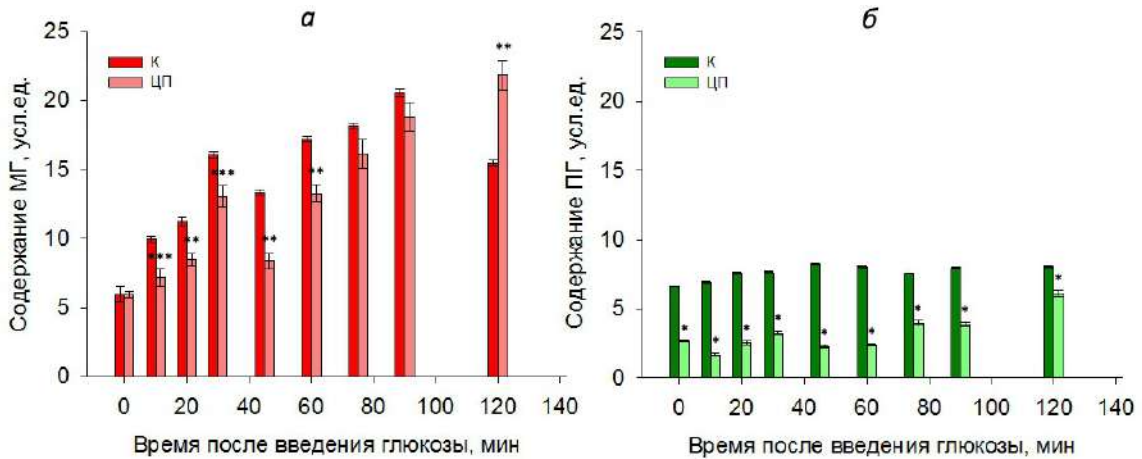


Рисунок 3.31 — Содержание макрогликогена (МГ) (а) и прогликогена (ПГ) (б) в гепатоцитах контрольной (К) и цирротической (ЦП) печени крысы через разные интервалы времени после введения глюкозы голодным животным. Примечания: 1) вертикальные отрезки — ошибка среднего; 2) средние значения при ЦП достоверно отличаются от значений нормы (\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,05$ ).

Анализ показал, что накопление гликогена в печени и колебания его уровней в клетках контрольных и опытных крыс на разных этапах гликогенеза связаны, главным образом, с изменениями содержания МГ (рис. 3.32).

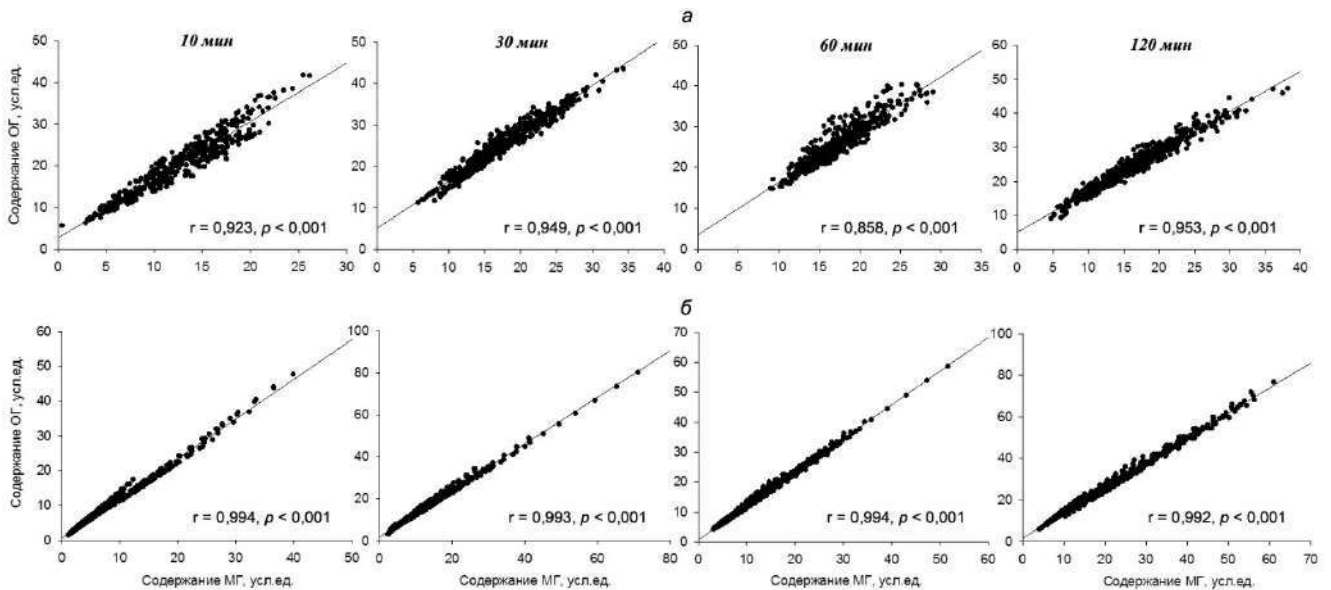


Рисунок 3.32 — Зависимость содержания общего гликогена (ОГ) от содержания макрогликогена (МГ) в гепатоцитах нормальной (а) и цирротической (б) печени крысы на разных этапах гликогенеза (10, 30, 60 и 120-я мин). Примечание: каждая точка на графиках соответствует одной клетке.

После 48-часового голодания и на протяжении 120 мин гликогенеза доля ПГ в гепатоцитах нормальной печени была выше, чем в гепатоцитах крыс с ЦП. Доля ПГ в гепатоцитах нормальной и цирротической печени несколько снижалась в течение гликогенеза, в то время как доля МГ увеличивалась (Chestnova et al., 2015) (рис. 3.33, а, б).

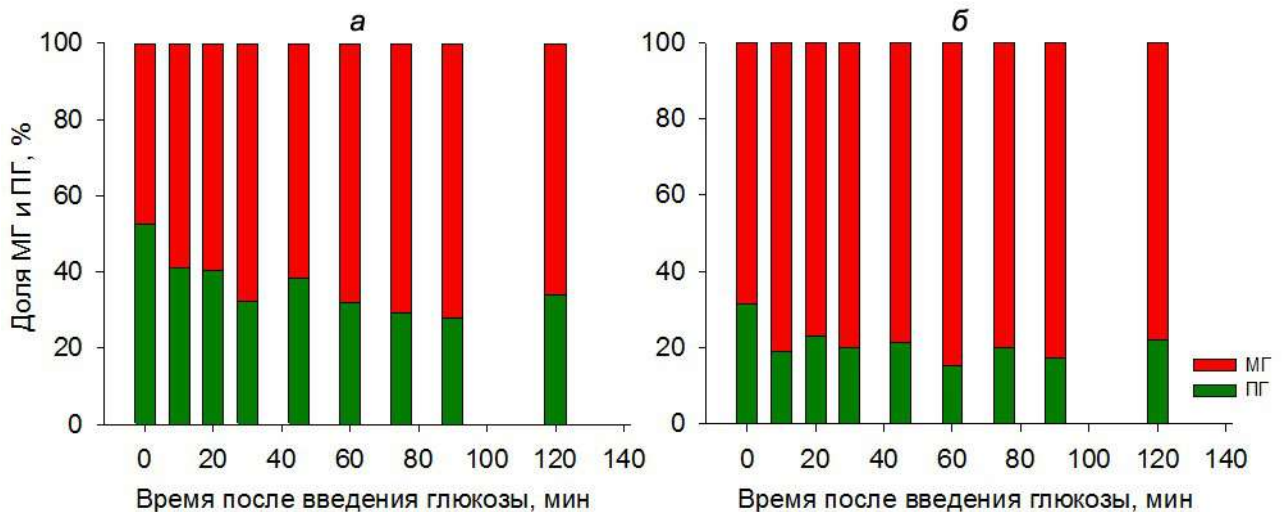


Рисунок 3.33 — Доля (%) макрогликогена (МГ) и прогликогена (ПГ) в гепатоцитах нормальной (а) и цирротической (б) печени крысы через разные интервалы времени после введения глюкозы голодным животным.

В постабсорбтивном периоде (12–16 ч после последнего приема пищи) соотношение МГ и ПГ в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крыс отличалось от ранних этапов гликогенеза. В этом периоде пищевого цикла в гепатоцитах нормальной печени доля МГ значительно преобладала над ПГ, а при ЦП относительное содержание МГ лишь немного превышало таковое ПГ (рис. 3.34). Сравнение структуры молекул гликогена в гепатоцитах нормальной печени крыс и человека в постабсорбтивном периоде показало, что она очень схожа. Относительное содержание МГ составляет 83–85 %. По мере развития патологического процесса в печени доля МГ снижается, соответственно увеличивается доля ПГ (рис. 3.34) (Bezborodkina et al., 20216).

Эти данные подтверждают результаты ранних исследований, полученные при изучении структуры гликогена в гепатоцитах нормальной и патологически измененной печени крысы и человека (Кудрявцева, 1987; Кудрявцева и др., 1988, 1992).

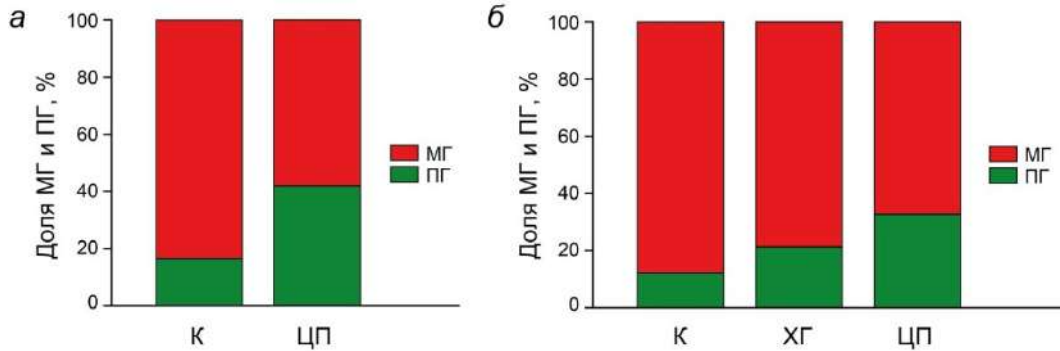


Рисунок 3.34 — Доля МГ и ПГ (%) в молекулах гликогена в гепатоцитах крыс (а) и человека (б) в постабсорбтивном периоде. В норме (К), при хроническом гепатите (ХГ) и циррозе печени (ЦП).

Таким образом, МГ составляет наибольший объем гликогена в гепатоцитах и играет ведущую роль в изменениях его содержания. Кроме того, наши данные свидетельствуют о том, что, в отличие от скелетных мышц, гликогенез в гепатоцитах крысы после введения глюкозы голодным животным происходит, преимущественно, путем заполнения внешних ярусов уже имеющихся в клетках частиц гликогена, а не за счет образования новых.

Анализ содержания ПГ и МГ в одной и той же клетке дал возможность исследовать их динамику при различных физиологических и патологических условиях, но что еще важнее, позволил определить число ярусов в молекулах гликогена отдельного гепатоцита и количество остатков глюкозы на каждом из ярусов.

Исходя из гипотезы о том, что **полная** молекула гликогена состоит из 8 внутренних (ПГ) и 4 внешних (МГ) ярусов остатков глюкозы (Lomako et al., 1993; Alonso et al., 1995; Melendez et al., 1997), а общее число остатков глюкозы в ПГ равно 3315 (Roach et al., 2012), можно получить информацию об абсолютном и относительном числе остатков глюкозы на внешних ярусах молекулы гликогена.

Степень заполнения внешних ярусов молекулы гликогена ( $F_n$ ) остатками глюкозы в зависимости от экспериментально определяемого отношения МГ/ПГ ( $k$ ) рассчитывали по формуле:

$$F_9 = k \times P / t_9, \text{ при } k \leq 1 \quad (13)$$

$$F_{10} = (k \times P - t_9) / t_{10}, \text{ при } 1 < k \leq 3 \quad (14)$$

$$F_{11} = (k \times P - t_9 - t_{10}) / t_{11}, \text{ при } 3 < k \leq 7 \quad (15)$$

$$F_{12} = (k \times P - t_9 - t_{10} - t_{11}) / t_{12}, \text{ при } 7 < k \leq 15 \quad (16)$$

где:  $P$  — суммарное число остатков на первых 8 ярусах (прогликоген),  $t_n$  — максимально возможное число остатков на ярусе  $n$ .

Расчеты показали, что гликоген в гепатоцитах нормальной печени голодных крыс состоит из гранул, содержащих ПГ, т.е. 1–8-й ярусы и заполненный на 90 % 9-й ярус (рис. 3.35, *a*), а в цирротической — из частиц, содержащих 1–9-й ярусов и заполненного ~ на 60 % 10-го яруса (рис. 3.35, *б*). Анализ динамики пространственной структуры молекул гликогена в ходе рефидинга крыс глюкозой показал, что в норме максимальное заполнение внешних ярусов молекул гликогена на стадии рефидинга ограничивается 10-м ярусом, а при ЦП — 11-м (рис. 3.35). Клеток, у которых бы весь гликоген состоял из 12-ярусных частиц обнаружено не было.

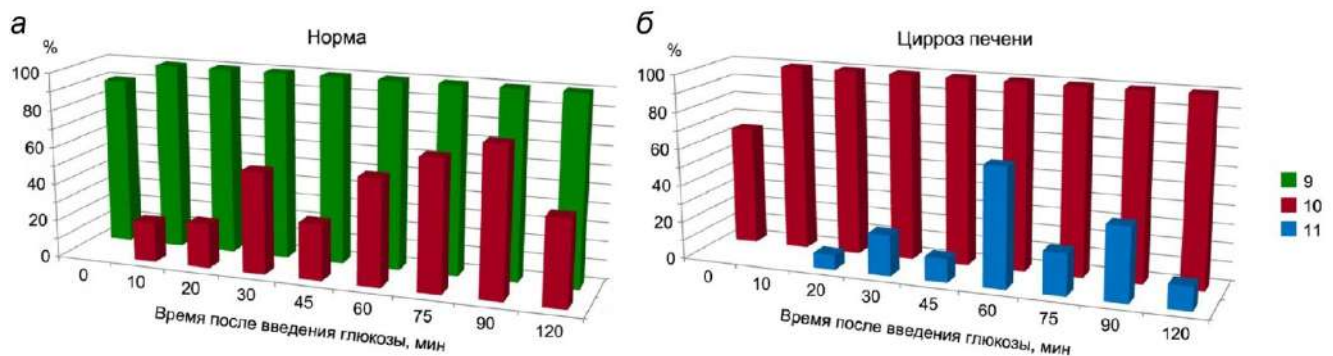


Рисунок 3.35 — Доля глюкозных остатков на внешних ярусах молекулы гликогена в нормальной (*a*) и цирротической (*б*) печени крысы, %.

В течение всего абсорбтивного периода количество остатков глюкозы на внешних ярусах молекул гликогена в гепатоцитах крыс с ЦП превышало таковое в гепатоцитах нормальной печени (рис. 3.36).

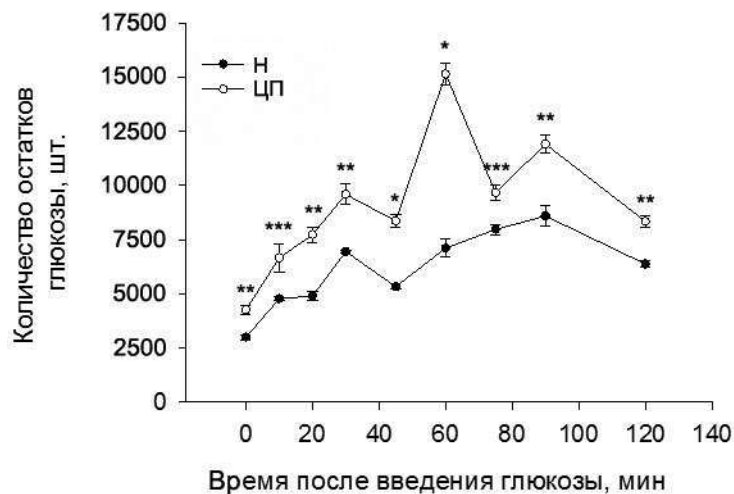


Рисунок 3.36 — Изменение числа остатков глюкозы на внешних ярусах молекул гликогена в гепатоцитах нормальной (Н) и цирротической печени (ЦП) крысы. Примечания: 1) вертикальные отрезки — ошибка среднего; 2) средние значения при ЦП отличаются от значений нормы при уровне значимости \* —  $p < 0,001$ ; \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,05$ .

Несмотря на увеличение содержания гликогена в гепатоцитах контрольных крыс в течение 30 мин рефиндинга почти вдвое, отношение МГ/ПГ оставалось примерно на одном уровне (рис. 4.37). То есть на первых этапах гликогенеза накопление гликогена в клетках происходит преимущественно за счет увеличения числа молекул и только позднее (45, 60 и 90-я мин рефиндинга) — путем заполнения их внешних ярусов. В отличие от нормы, при ЦП накопление гликогена путем заполнения внешних ярусов его молекул выражено на всех этапах рефиндинга (рис. 3.38).

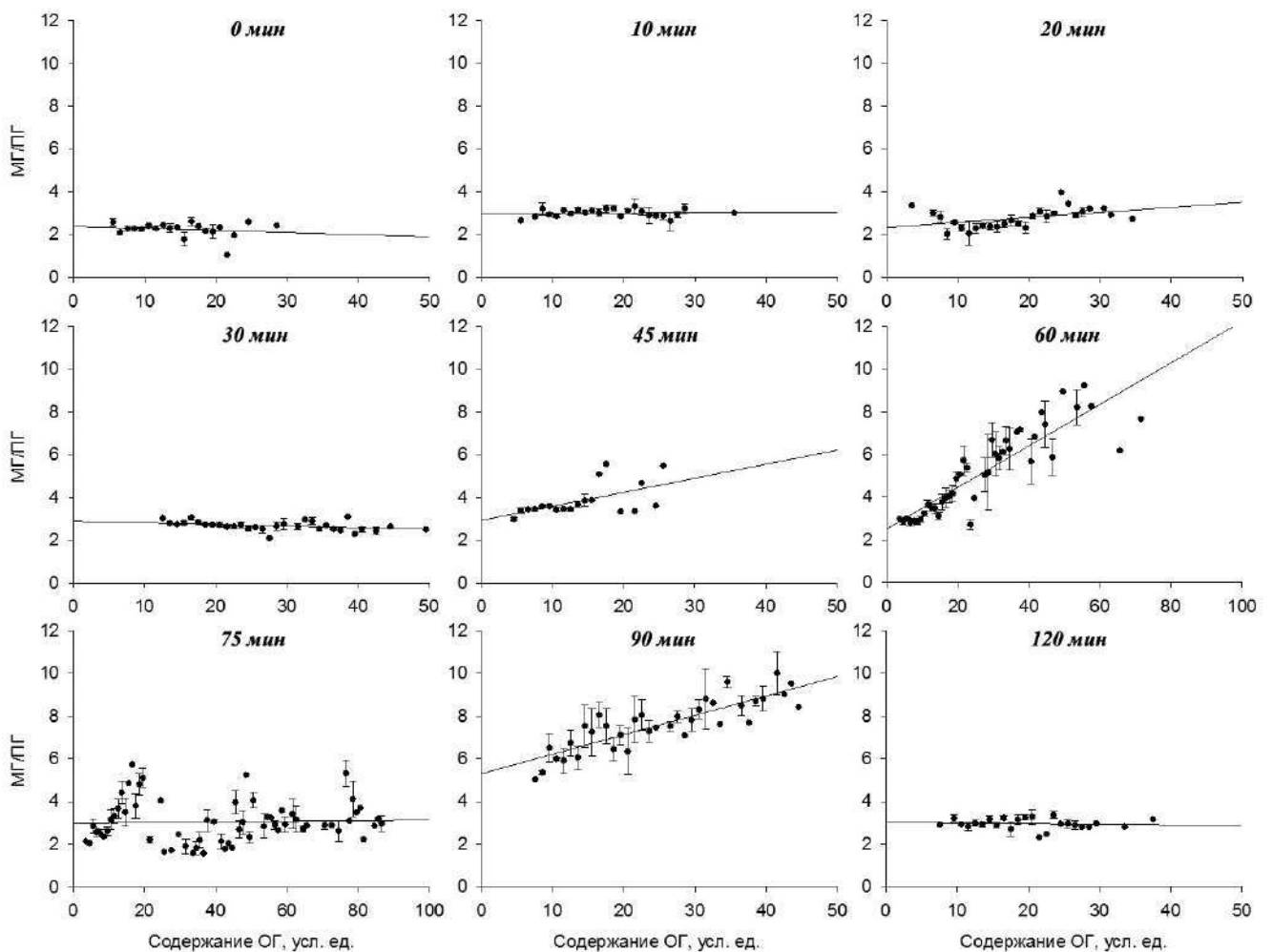


Рисунок 3.37 — Зависимость содержания общего гликогена (ОГ) от степени заполнения (усл. ед.) внешних ярусов молекул гликогена (МГ/ПГ) в гепатоцитах нормальной печени крысы на разных этапах гликогенеза. Примечание: вертикальные отрезки — ошибка среднего.

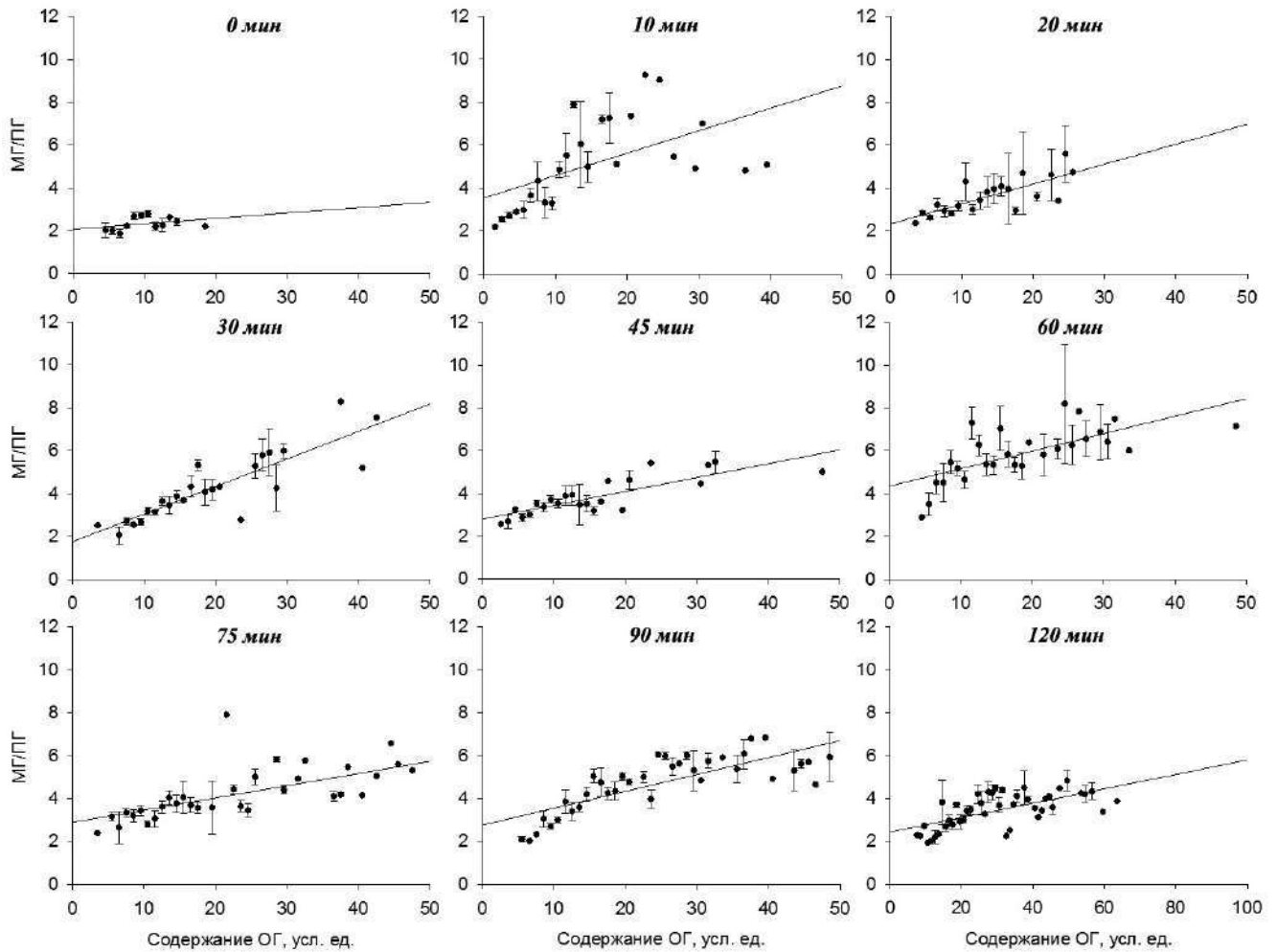


Рисунок 3.38 — Зависимость содержания общего гликогена (ОГ) от степени заполнения (усл. ед.) внешних ярусов молекул гликогена (МГ/ПГ) в гепатоцитах цирротической печени крысы на разных этапах гликогенеза. Примечание: вертикальные отрезки — ошибка среднего.

В постабсорбтивном периоде молекулы гликогена в гепатоцитах нормальной печени крыс и человека содержат, в среднем, 18810 и 24034 остатков глюкозы соответственно. У крыс молекулы гликогена, помимо ПГ, состоят из полностью заполненных остатками глюкозы 9-го и 10-го ярусов, а также заполненного примерно на 40 % 11-го яруса. В гепатоцитах нормальной печени человека молекулы гликогена включают полные 9-й и 10-й ярусы и заполненный ~ на 80 % 11-й ярус, свидетельствуя о том, что они, в среднем, немного крупнее, чем у крыс (рис. 3.39).

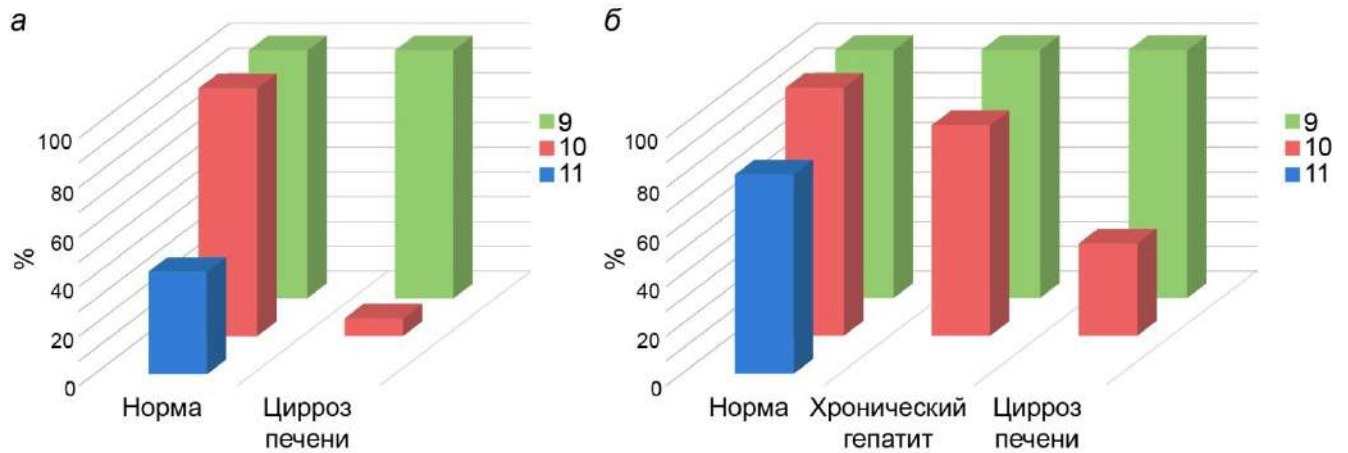


Рисунок 3.39 — Доля глюкозных остатков на внешних ярусах молекул гликогена в печени крысы (а) и человека (б) в постабсорбтивном периоде, %.

В гепатоцитах цирротической печени молекулы у обоих видов мельче, чем в нормальной. Структура гликогена в гепатоцитах пациентов с ХГ занимает промежуточное положение (рис. 3.39, б).

Несмотря на более низкую, по сравнению с нормой, степень заполнения внешних ярусов гликогена при ЦП у человека, содержание гликогена в гепатоцитах на 160 % ( $p < 0,01$ ) выше нормы (рис. 3.25, а). Исходя из этого можно заключить, что по мере развития патологического процесса число  $\beta$ -частиц в гепатоцитах увеличивается. Расчеты показали, что, если принять среднее количество частиц в гепатоцитах нормальной печени за 1,0, то при ХГ оно составит примерно 3,0, а при ЦП ~ 6,0.

Информация об изменениях ярусной структуры гранул гликогена, базируется, главным образом, на данных о размерах частиц гликогена в скелетных мышцах человека, полученных с помощью методов электронной микроскопии (ЭМ). ЭМ анализ  $\beta$ -частиц гликогена показал, что их диаметр варьирует от 10 до 44 нм и, в среднем, составляет 25 нм, что примерно соответствует диаметру 7–8-ярусной частицы гликогена (Marchand et al., 2002; Shearer, Graham, 2004; Graham et al., 2010). Гранулы с диаметром более 44 нм обнаружены не были, что согласуется с теоретическими представлениями о структуре молекул гликогена (Goldsmith et al., 1982). При ЭМ-исследовании культивируемых мышечных трубочек было показано, что размер  $\beta$ -частиц в ходе гликогенеза увеличивается незначительно, с 24,9 до 28,1 нм (ярусы 7→9-й) (Elsner et al., 2002). Авторы заключили, что отложение гликогена в клетках связано с образованием новых 7–8-ярусных  $\beta$ -частиц, а не с формированием дополнительных ярусов на уже



имеющихся частицах. В процессе гликогенолиза средний диаметр частиц уменьшался до 24,4 нм и наблюдалась их деструкция (Elsner et al., 2002).

При восстановлении скелетных мышц человека после продолжительной умеренной нагрузки средний диаметр частиц гликогена удваивается, при этом лишь немногие имеют диаметр, соответствующий МГ. В начале периода восстановления (0–4 ч) содержание гликогена в мышцах возрастало преимущественно за счет увеличения числа частиц, а в последующие 44 ч путем увеличения их объема (Marchand et al., 2007). Исследования размеров молекул гликогена в печени мышей с помощью эксклюзионной хроматографии показали, что в течение пищевого цикла  $\alpha$ -частицы распадаются на стабильные молекулы гликогена с радиусом  $\sim 12$  нм (Sullivan et al., 2014).

Таким образом, все имеющиеся в настоящее время данные о пространственной структуре молекул гликогена в клетках крайне немногочисленны и основаны либо на изучении динамики ПГ и МГ с помощью цитохимических методик, либо на измерении размера молекул с помощью ЭМ или эксклюзионной хроматографии. Поскольку содержание гликогена в клетках при различных физиологических и патологических условиях связано, главным образом, с изменением МГ было интересно получить более подробную информацию о его пространственных характеристиках. Для этого мы разработали метод, позволяющий определять в отдельных гепатоцитах число ярусов в молекулах гликогена и количество глюкозных остатков на каждом из них.

### **3.3.3. Анализ структуры молекул гликогена в гепатоцитах крыс и человека с помощью метода FRET**

Одним из подходов для получения информации о пространственной структуре МГ в клетках, может быть применение метода FRET (Förster Resonance Energy Transfer). Метод позволяет определять расстояние между молекулами-флуорофорами (донором и акцептором), участвующими в передаче энергии.

Фёрстеровское расстояние ( $R_0$ ) для пары красителей, использованных в данной работе — Au-SO<sub>2</sub> (донор, Don) и EtBr-SO<sub>2</sub> (акцептор, Ac), составляет по нашим данным 3,2 нм (Bezborodkina et al., 2011). Согласно расчетам, среднее расстояние между ярусами молекулы гликогена, общий радиус которой равен  $\sim 21$  нм, составляет  $\sim 1,9$  нм (рис. 3.40) (Goldsmith et al., 1982; Shearer, Graham, 2004; Roach et al., 2012).



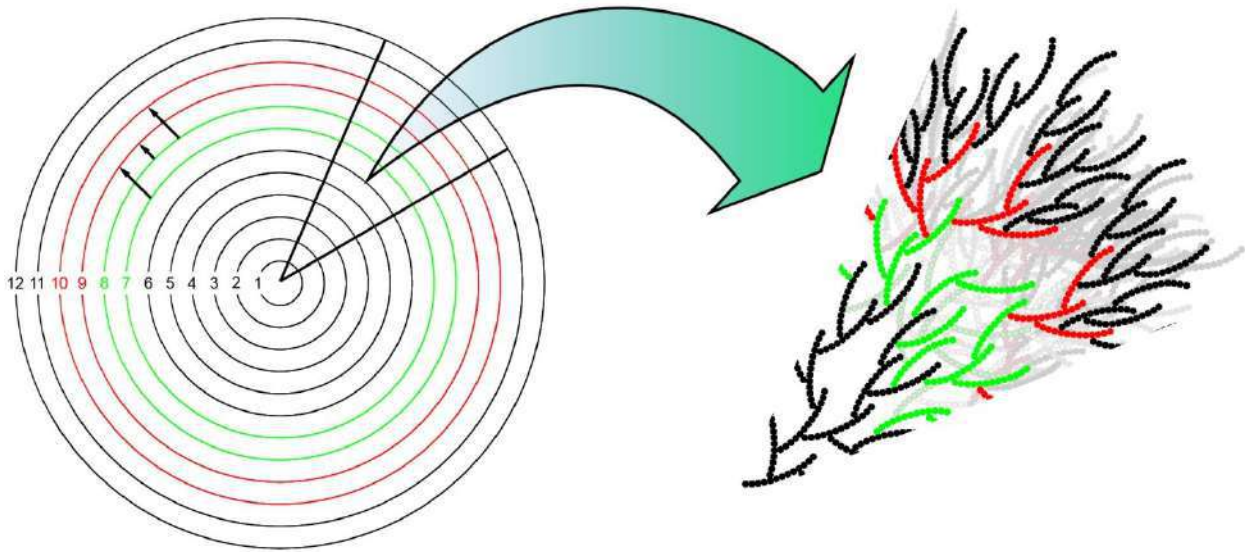


Рисунок 3.40 — Схематическое изображение молекулы гликогена. Цветом отмечены ярусы, между которыми возможна резонансная передача энергии (FRET). Расстояние между ярусами в сферической  $\beta$ -частице гликогена с радиусом 21 нм, составляет  $\sim 1,9$  нм.

Как было установлено (см. Раздел 3.3.1), PAS-окрашивание клеток в течение 40 мин  $\text{EtBr-SO}_2$  выявляет МГ, т.е. остатки глюкозы на внешних (с 9-го по 12-й) ярусах молекул гликогена. Последующее окрашивание клеток  $\text{Au-SO}_2$  выявляет ПГ — остатки глюкозы, расположенные на внутренних (с 1-го по 8-й) ярусах молекул гликогена. В фёрстеровском взаимодействии могут участвовать только молекулы Au, связанные с остатками глюкозы на 7-ом и 8-ом ярусах ПГ. Au на остатках глюкозы, расположенных на этих ярусах, передает энергию на EtBr, связанный с остатками глюкозы на 9-м и 10-м ярусах МГ, которые принимают энергию излучения (Bezborodkina et al., 2011; Bezborodkina et al., 2018).

Остатки глюкозы, окрашенные  $\text{Au-SO}_2$  и расположенные ниже 7-го яруса, а также остатки глюкозы, окрашенные  $\text{EtBr-SO}_2$  и расположенные выше 10-го яруса в молекуле гликогена, не могут участвовать в фёрстеровском взаимодействии из-за превышения  $R_0$  между донором и акцептором. Таким образом, эффективность FRET ( $E_{\text{FRET}}$ ) сильно зависит от степени заполнения ярусов 9-го и 10-го в молекуле гликогена. Если ярусы 9-й и 10-й не заполнены или почти не заполнены, то энергия излучения Au не может передаваться на EtBr. Поэтому наличие в клетках большого количества  $\beta$ -частиц, состоящих только из ПГ (т.е. глюкозных остатков на 1-м – 8-м ярусах), будет снижать уровень  $E_{\text{FRET}}$ . С другой стороны, даже полное заполнение 11-го и 12-го ярусов не приведет к повышению  $E_{\text{FRET}}$ , так как расстояние между 8-м и 11-м ярусами ( $\sim 5,7$  нм)

будет значительно превышать  $R_0$  и энергия излучения от донора к акцептору передаваться не может (Bezborodkina et al., 2011; Bezborodkina et al., 2018).

Измерение  $E_{\text{FRET}}$  в индивидуальных гепатоцитах крыс нормальной и цирротической печени через различные интервалы времени после введения голодным крысам глюкозы показало, что в норме этот показатель, в среднем,  $\sim 3,3$  раза выше, чем при ЦП (рис. 3.41).



Рисунок 3.41 — Эффективность FRET ( $E_{\text{FRET}}$ ) в гепатоцитах нормальной (Н) и цирротической печени (ЦП) крысы на разных этапах гликогенеза. Примечания: 1) вертикальные отрезки — ошибка среднего; 2) средние значения при ЦП отличаются от значений нормы при уровне значимости \* —  $p < 0,001$ ; \*\* —  $p < 0,01$ .

В начале рефиндинга (0–30-я мин)  $E_{\text{FRET}}$  в гепатоцитах нормальной печени увеличивалась более чем вдвое, после чего оставалась примерно на одном уровне. В гепатоцитах цирротической печени, наоборот,  $E_{\text{FRET}}$  относительно стабильна до 75-й мин, а затем падает примерно в 2 раза. Поскольку в клетках нормальной печени 9-й и, особенно, 10-й ярусы в молекулах гликогена оставались не полностью заполненными (рис. 3.35, а), то по мере их заполнения можно было ожидать увеличения  $E_{\text{FRET}}$ . Это предположение подтверждается результатами, представленными на рисунке 3.42 и рисунке 3.43, из которых следует, что в клетках нормальной печени, в отличие от клеток цирротической печени,  $E_{\text{FRET}}$  на многих этапах гликогенеза сильно зависит от увеличения количества остатков глюкозы в молекулах гликогена (Bezborodkina et al., 2011).

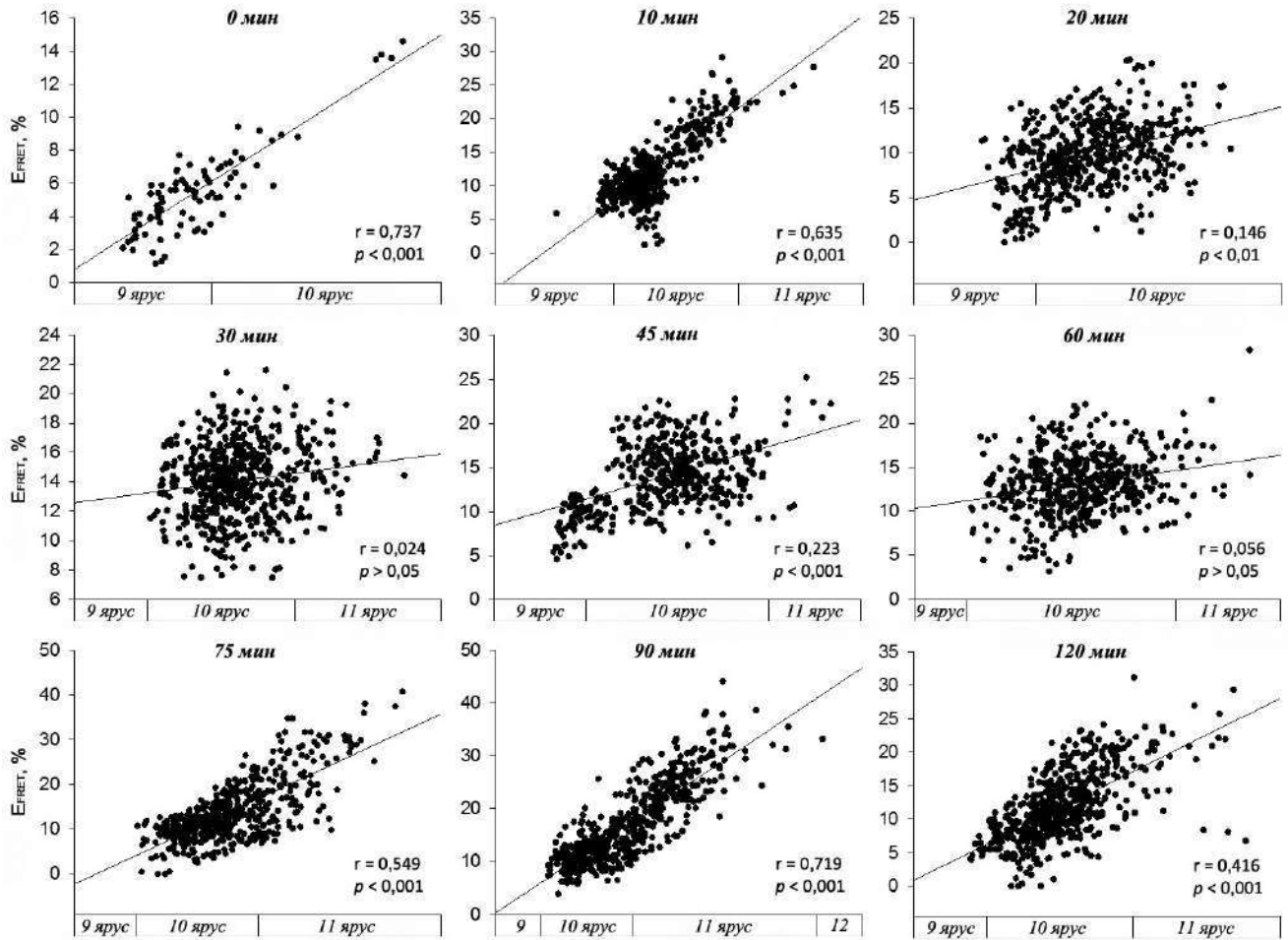


Рисунок 3.42 — Зависимость эффективности FRET ( $E_{\text{FRET}}$ ) от степени заполнения внешних ярусов (9–12-го) молекул гликогена в гепатоцитах нормальной печени крысы на разных этапах гликогенеза. Примечание: каждая точка на графиках соответствует одной клетке.

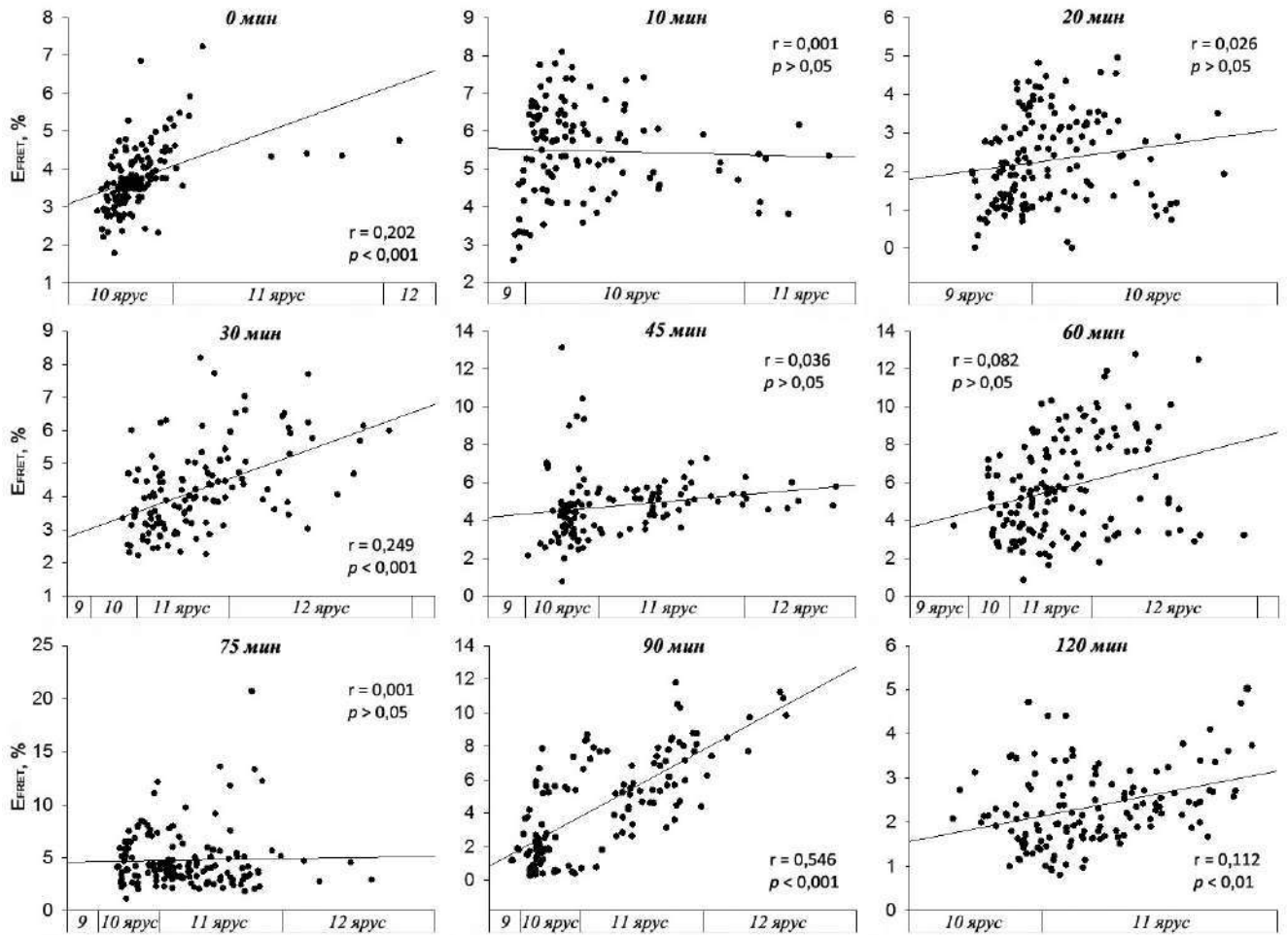


Рисунок 3.43 — Зависимость эффективности FRET ( $E_{FRET}$ ) от степени заполнения внешних ярусов (9–12-го) молекул гликогена в гепатоцитах цирротической печени крысы на разных этапах гликогенеза. Примечание: каждая точка на графиках соответствует одной клетке.

Важным достоинством метода FRET является его высокая чувствительность к небольшим изменениям расстояния между молекулами Don и Ac ( $r$ ). При увеличении  $r$  выше  $R_0$  для данной пары красителей  $E_{FRET}$  будет резко снижаться. Расстояние между Don и Ac в ходе рефиндинга крыс в гепатоцитах нормальной печени составило, в среднем,  $4,401 \pm 0,004$  нм, а в клетках цирротической —  $5,447 \pm 0,009$  нм (рис. 3.44). Поэтому в норме  $E_{FRET}$  и оказалась выше, чем при ЦП (рис. 3.41).

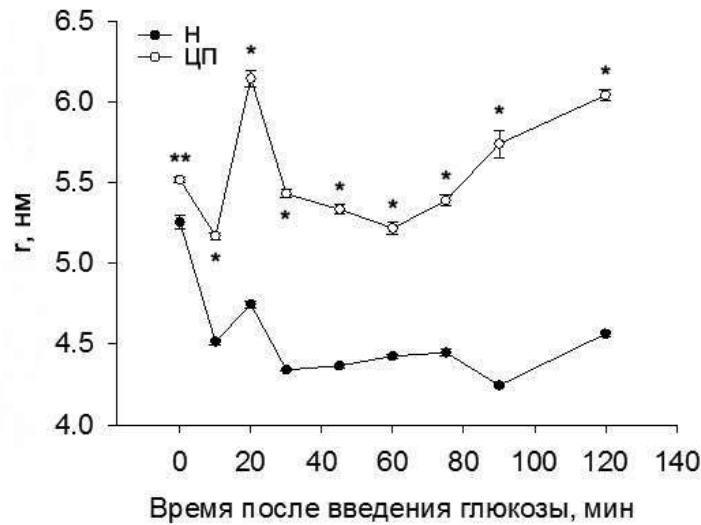


Рисунок 3.44 — Расстояние между Don и Ac ( $r$ ) в молекулах гликогена в гепатоцитах нормальной (Н) и цирротической печени (ЦП) крысы на разных этапах гликогенеза. Примечания: 1) вертикальные отрезки — ошибка среднего; 2) средние значения при ЦП отличаются от значений нормы при уровне значимости \* —  $p < 0,001$ ; \*\* —  $p < 0,01$ .

Определение расстояния между Don и Ac в течение гликогенеза показало, что по мере заполнения внешних ярусов гликогена остатками глюкозы величина  $r$  уменьшается. В гепатоцитах нормальной печени  $r$  уменьшается на  $1,08 \pm 0,18$  нм в ходе рефиндинга крыс глюкозой, а в гепатоцитах крыс с ЦП — на  $0,64 \pm 0,21$  нм ( $p < 0,05$ ). Наиболее резкое уменьшение  $r$  в норме обнаружено на 0, 75, 90 и 120-й мин после введения глюкозы голодным животным ( $\Delta r = 1,48$ ; 1,4; 1,7 и 1,59 нм соответственно) (рис. 3.45), а при ЦП — лишь на одном сроке (90-я мин), на котором  $\Delta r$  составило 2,23 нм (рис. 3.46).

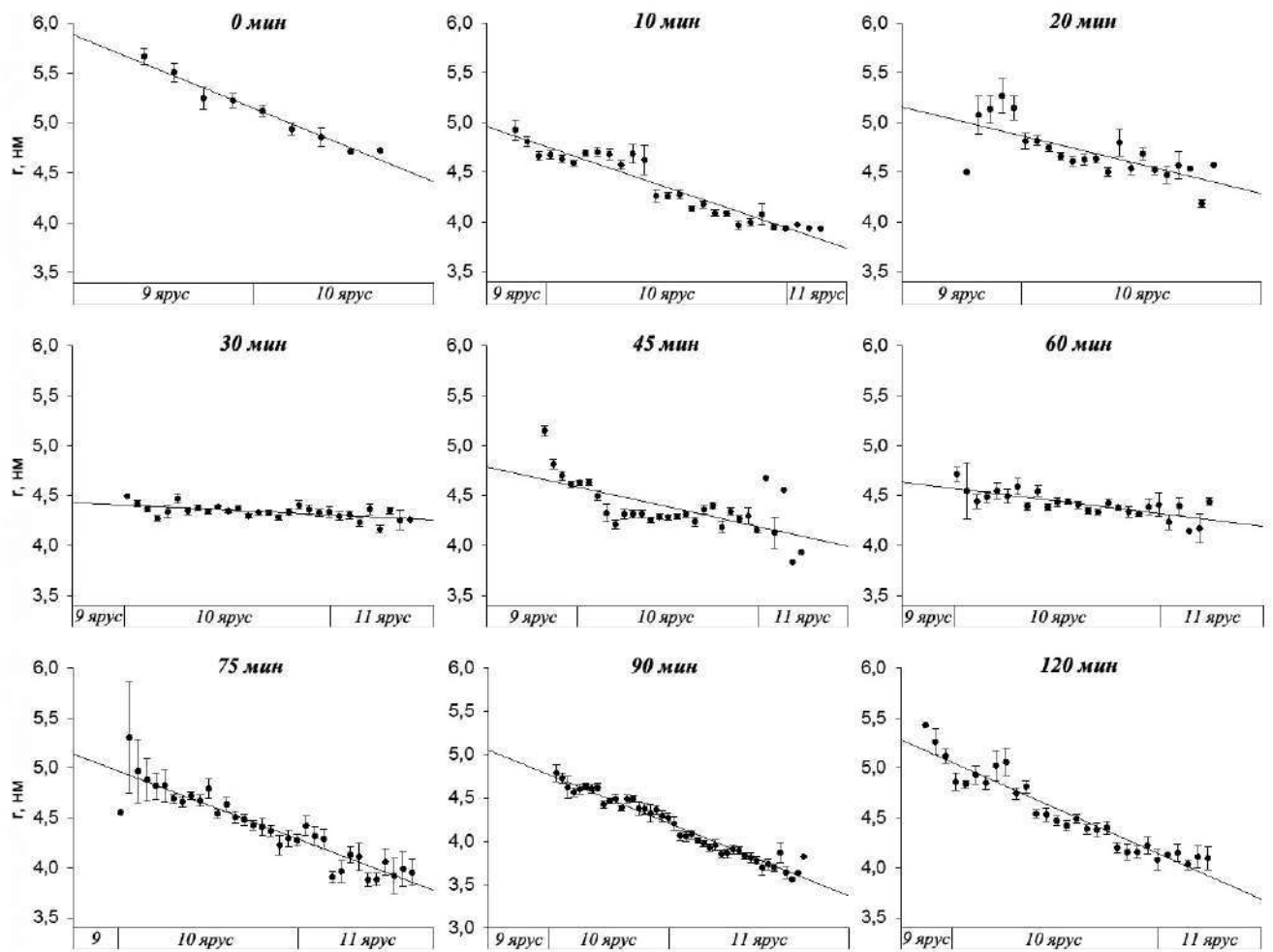


Рисунок 3.45 — Зависимость расстояния между D и A ( $r$ ) от степени заполнения внешних ярусов (9–11-го) молекул гликогена в гепатоцитах нормальной печени крысы на разных этапах гликогенеза. Примечание: вертикальные отрезки — ошибка среднего.

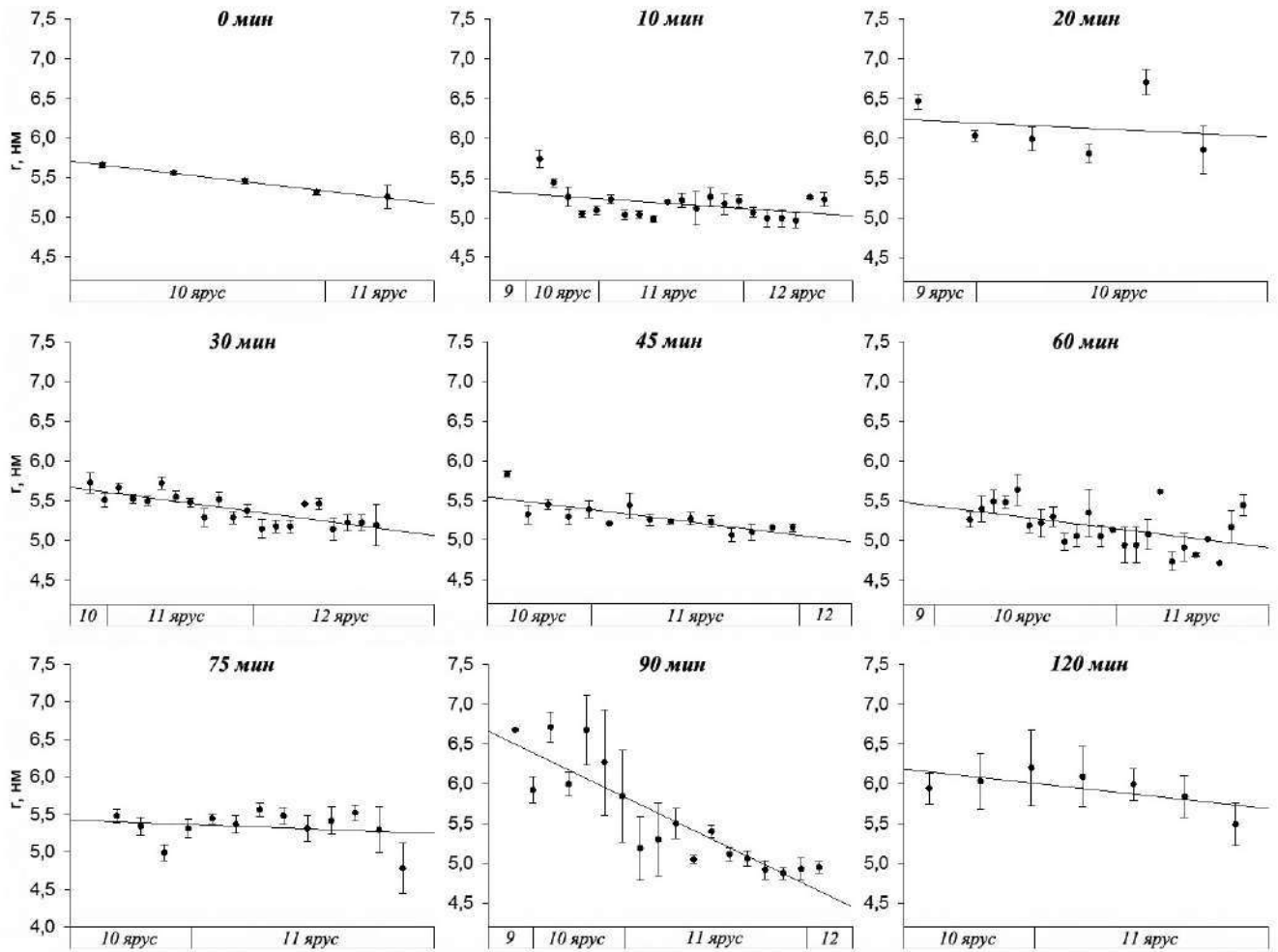


Рисунок 3.46 — Зависимость расстояния между DDP и Ac ( $r$ ) от степени заполнения внешних ярусов (9–12-го) молекул гликогена в гепатоцитах цирротической печени крысы на разных этапах гликогенеза. Примечание: вертикальные отрезки — ошибка среднего.

Таким образом, увеличение  $E_{\text{FRET}}$  в клетках нормальной печени крысы на начальных стадиях (0–30 мин) гликогенеза (рис. 3.41) по сравнению с клетками цирротической печени обусловлено, по-видимому, меньшим расстоянием между остатками глюкозы, находящихся на 7, 8 и 9, 10-м ярусах (рис. 3.44, 3.45) и увеличением числа остатков глюкозы на 10-м ярусе (рис. 3.35).

Ранее, при изучении локализации синтеза гликогена в гепатоцитах, изолированных из печени голодных крыс, было показано, что стимуляция синтеза гликогена глюкозой вызывает перемещение ГС на периферию клеток. При этом количество фермента, сконцентрированного вблизи плазматической мембраны, увеличивалось со временем (Garcia-Rocha et al., 2001). Кроме того, используя инкубацию изолированных гепатоцитов с  $^{14}\text{C}$ -глюкозой было установлено, что синтез гликогена всегда начинается вблизи плазматической мембраны клеток. Однако затем, по



мере усиления гликогенеза, синтезированный гликоген постепенно перемещается к центру клеток, а его место замещается новыми синтезированными молекулами (Fernandez-Novell et al., 2002).

Используя процедуру АВ (Acceptor Bleaching) можно получить сведения не только о структуре частиц гликогена, но и морфологически выразить передачу энергии от донора к акцептору в виде изображений областей клеток, на которых представлено распределение сигнала FRET в цитоплазме гепатоцитов. На серии изображений гепатоцитов (рис. 3.47) можно видеть, что уровень  $E_{\text{FRET}}$ , отмеченный по мере усиления сигнала разным цветом, достаточно четко отражает локализацию частиц гликогена с различной степенью заполнения внешних ярусов.

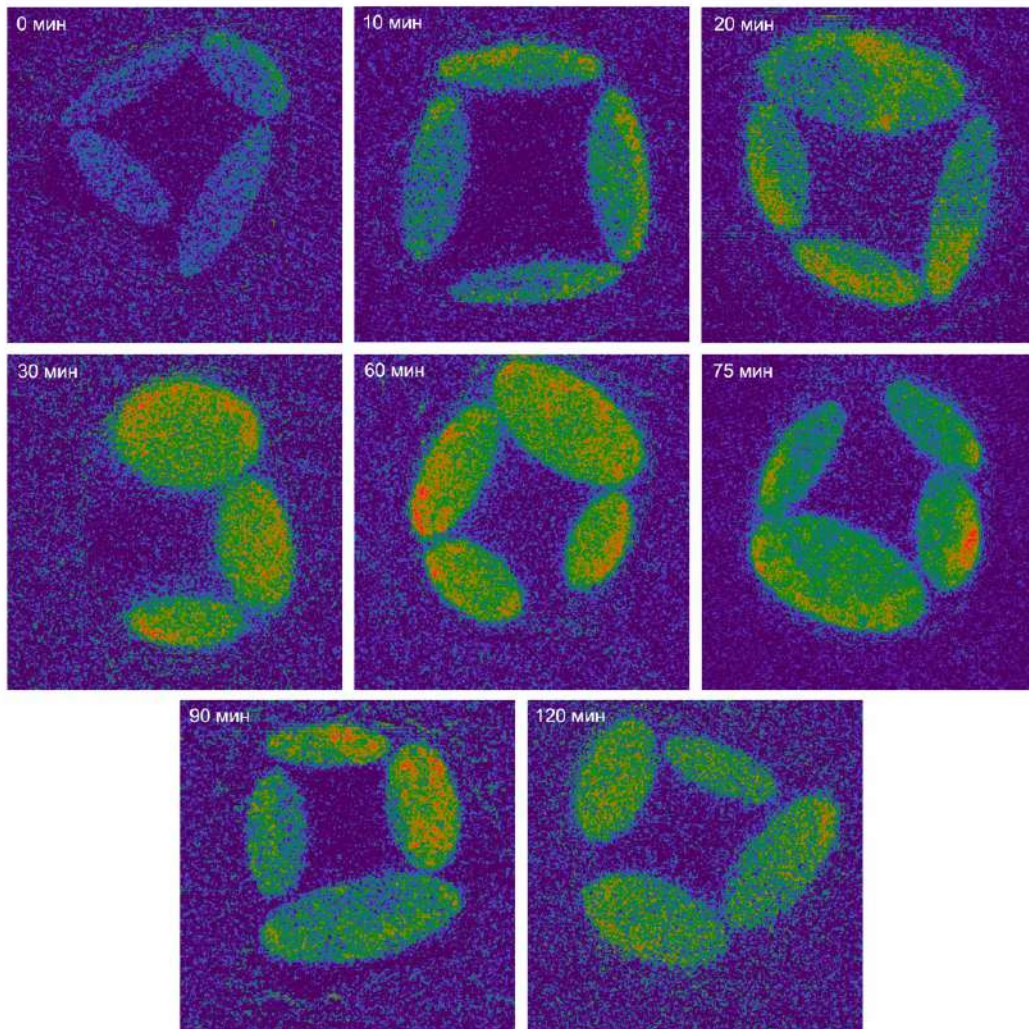


Рисунок 3.47 — Распределение сигнала FRET в цитоплазме гепатоцитов крысы на различных этапах гликогенеза. Примечание: по мере увеличения эффективности FRET ( $E_{\text{FRET}}$ ) цвет локусов, в которых происходит передача энергии от донора к акцептору, изменяется следующим образом: синий→зеленый→оранжевый→красный.



В гепатоцитах голодных крыс передача энергии от донора к акцептору слабая. Это проявляется в том, что почти вся клетка окрашена в синий цвет. Зеленый цвет, означающий более высокий уровень сигнала FRET, заметен лишь на периферии гепатоцитов. Уже через 10 мин после введения глюкозы на периферии клетки появляются оранжевые точки, в которых сигнал FRET выше, чем в зеленых. По мере развития гликогенолиза на периферии клеток появляются красные точки, отражающие наиболее высокий сигнал FRET, которые затем распределяются по всей цитоплазме. К концу эксперимента (120-я мин), когда распад гликогена начинает преобладать над его синтезом, количество красных точек уменьшалось, а в некоторых клетках они исчезали.

Измерение  $E_{\text{FRET}}$  в гепатоцитах человека в постпрандиальном периоде показало, что в клетках нормальной печени она составила 3 %. По мере развития тяжести поражения печени этот показатель увеличился при ХГ в 1,3 раза ( $p < 0,001$ ), а при ЦП — в 3 раза ( $p < 0,001$ ) по сравнению с нормой (рис. 3.48).

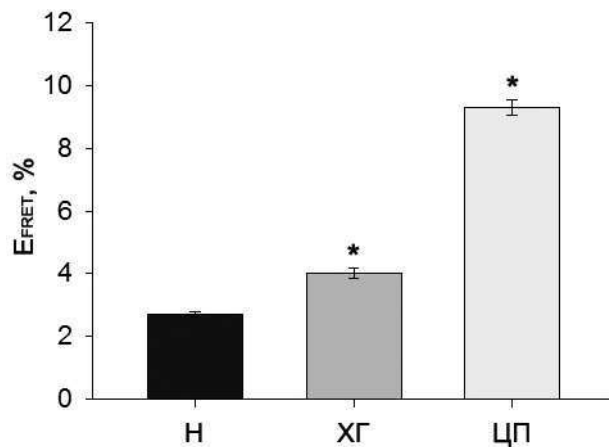


Рисунок 3.48 — Эффективность FRET ( $E_{\text{FRET}}$ ) в гепатоцитах человека в норме (Н), при хроническом гепатите (ХГ) и циррозе печени (ЦП). Примечания: 1) вертикальные отрезки — ошибка среднего; 2) средние значения при ХГ и ЦП отличаются от значения нормы при уровне значимости \* —  $p < 0,001$ .

Анализ распределения сигнала FRET в цитоплазме гепатоцитов человека (рис. 3.49) показал, что передача энергии от донора к акцептору осуществляется с достаточно высокой эффективностью, поскольку подавляющее большинство зон в цитоплазме гепатоцитов окрашено в «зеленый» цвет. В синий цвет окрашены лишь области наиболее близкие к ядру. При ХГ все области, в которых происходит передача энергии помимо зеленых локусов, содержат большое количество оранжевых точек. В цитоплазме гепатоцитов цирротической печени наблюдаются немногочисленные

области зеленого цвета, но значительно большее пространство в ней занимают области, окрашенные в оранжевый и даже красно-малиновый цвет.

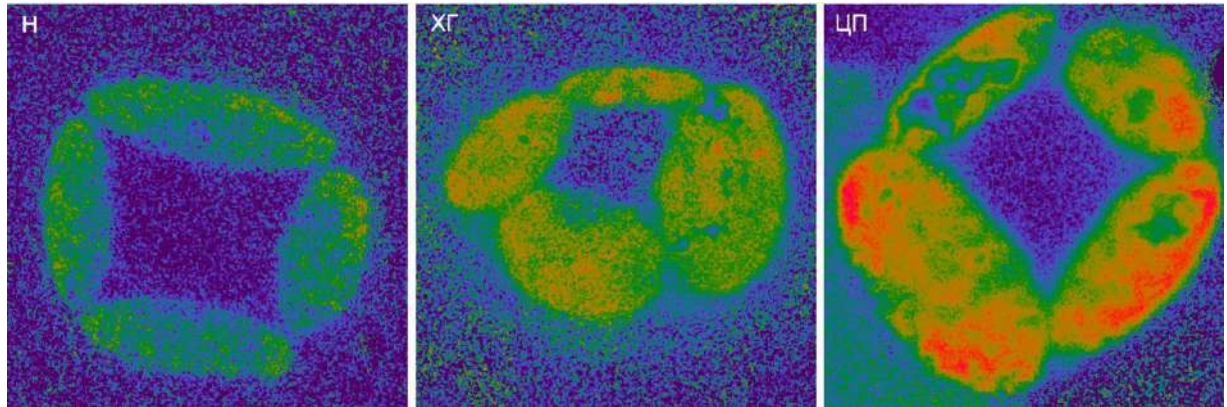


Рисунок 3.49 — Распределение сигнала FRET в цитоплазме гепатоцитов человека в постабсорбтивном периоде. Примечание: по мере того, как эффективность FRET ( $E_{\text{FRET}}$ ) растет, цвет локусов, в которых происходит передача энергии от донора к акцептору, изменяется следующим образом: синий→зеленый→оранжевый→красный.

Определение расстояния между Don и Ac ( $r$ ) в частицах гликогена позволило установить, что в гепатоцитах нормальной печени человека оно составляет, в среднем,  $6,14 \pm 0,05$  нм, при ХГ —  $5,69 \pm 0,04$  нм, а при ЦП —  $4,88 \pm 0,02$  нм ( $p < 0,001$ ) (рис. 3.50).

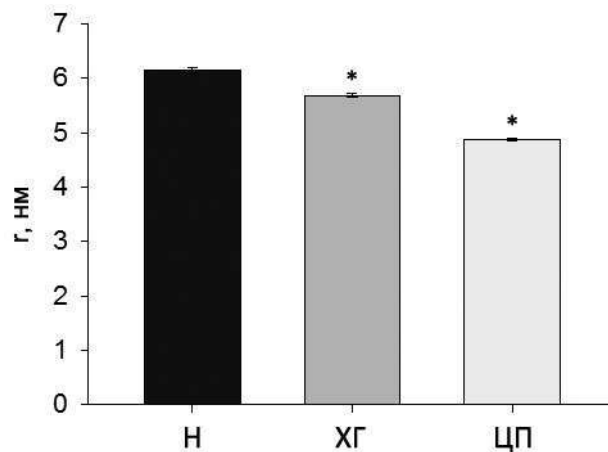


Рисунок 3.50 — Расстояние между Don и Ac ( $r$ ) в молекулах гликогена в гепатоцитах человека в норме (Н), при хроническом гепатите (ХГ) и циррозе печени (ЦП). Примечания: 1) вертикальные отрезки — ошибка среднего; 2) средние значения при ХГ и ЦП отличаются от значения нормы при уровне значимости \* —  $p < 0,001$ .

Анализ распределения клеток по  $r$  в популяции гепатоцитов показал, что доля клеток с молекулами гликогена, в которых расстояние между Don и Ac ( $r$ ) не превышает фёрстеровского взаимодействия, увеличивается по мере усиления тяжести заболевания.

При ЦП доля таких клеток увеличивается по сравнению с нормой примерно в 50 раз (рис. 3.51).

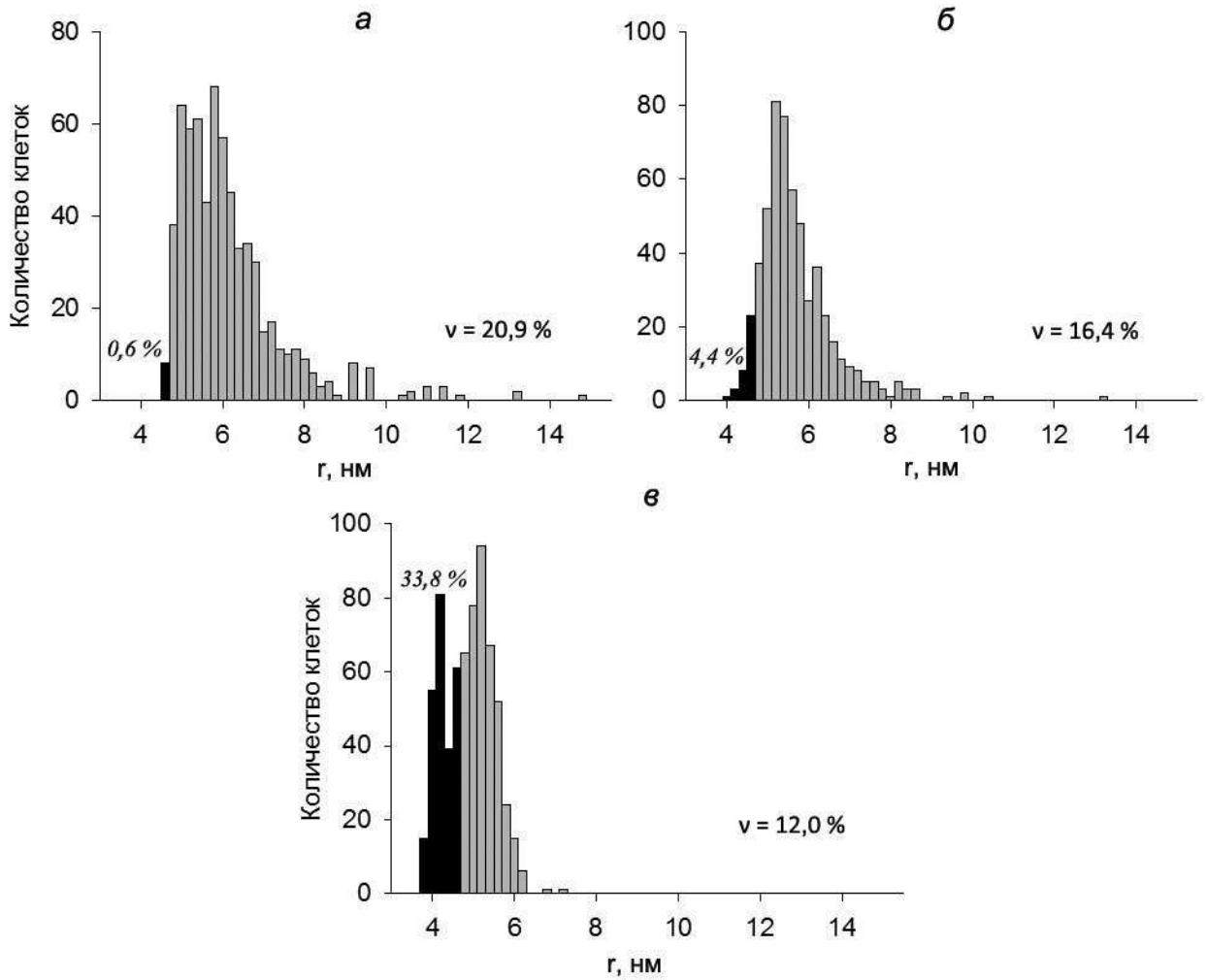


Рисунок 3.51 — Гистограммы распределения клеток в популяции гепатоцитов человека по расстоянию между Don и Ac ( $r$ ) в молекулах гликогена в норме (а), при хроническом гепатите (б) и циррозе печени (в). Примечание: черным цветом обозначена доля клеток с частицами гликогена, в которых расстояние между Don и Ac ( $r$ ) не превышает фёрстеровского взаимодействия.  $v$  — коэффициент корреляции.

Ранее установлено (рис. 3.39), что молекулы гликогена в гепатоцитах нормальной печени человека включают полные 9-й и 10-й ярусы и заполненный ~ на 80% 11-й ярус остатков глюкозы. При ЦП внешние ярусы молекул гликогена состоят практически только из одного 9-го яруса. Как показано на рисунке 4.40 передача энергии в молекулах гликогена, окрашенных аурамино- $\text{SO}_2$  и бромистым этидием- $\text{SO}_2$ , может происходить только с 7 и 8 ярусов (Don) на 9 и 10 ярусы (Ac). Седьмой и восьмой ярусы молекул гликогена вместе содержат 2496 остатков глюкозы. Девятый и десятый ярусы в молекулах гликогена в гепатоцитах нормальной печени в сумме содержат 9984 остатков

глюкозы (Roach et al., 2012). Поскольку оба внешних яруса (9-й + 5 % 10-го) молекул гликогена в гепатоцитах цирротической печени содержат только 3661 остаток глюкозы можно предположить, что передача энергии от Don к Ac при ЦП будет происходить с меньшей эффективностью. Поэтому главными причинами гораздо более высокой, чем в норме, эффективности FRET в гепатоцитах при ЦП, по-видимому, являются: меньшее расстояние между Don и Ac в молекулах гликогена при ЦП и значительно большее относительное число гепатоцитов, в молекулах которых расстояние между Don и Ac ( $r$ ) находится в интервале фёрстеровского взаимодействия.

Полная 12-ти ярусная молекула гликогена, как уже говорилось, состоит из 2-х частей (фракций): внутренней (прогликогена) — первые восемь ярусов остатков глюкозы и внешней — (макрогликогена), включающей четыре внешних яруса остатков глюкозы (рис. 1.18, раздел 1.7). В синтезе и деградации гликогена принимает участие только макрогликоген. Остатки глюкозы, расположенные на четырех внешних яруса молекулы используются в качестве потенциальных источников энергии для различных процессов в клетках. Остальные 4–5 % остатков глюкозы в прогликогеновой части молекулы гликогена служат в качестве «платформы» при дальнейшем формировании полной молекулы. Остатки глюкозы прогликогена могут использоваться для получения энергии лишь в исключительных случаях (Melendez et al., 1998).

Считается, что после заполнения наружного 12-го яруса, рост молекул гликогена прекращается. Механизм, останавливающий биосинтез молекул гликогена по достижении ими полного размера, пока неизвестен. Единственной гипотезой, объясняющей этот феномен, является гипотеза Мэдсена и Кори (Madsen, Cori, 1958). Она предполагает, что размер молекул гликогена контролируется структурой самих молекул.

Мэдсен и Кори предположили, что, поскольку степень и принцип ветвления в молекулах гликогена на всех уровнях их организации остается постоянной, а число цепей остатков глюкозы увеличивается по мере роста молекул, плотность размещения остатков на ярусах будет повышаться по мере приближения к поверхности молекул. Соответственно, на внешних ярусах остатки глюкозы окажутся более тесно прижатыми друг к другу, чем на внутренних ярусах, расположенных дальше от поверхности. Важную роль в механизме контроля размера молекул гликогена, играет размер ферментов, участвующих в его синтезе. Авторы полагали, что, когда плотность

расположения остатков глюкозы на поверхности молекул гликогена становится слишком высокой, места для работы гликогенсинтазы оказывается недостаточно и рост молекул прекращается.

Результаты определения расстояния между Don и Ac на разных ярусах молекул гликогена в гепатоцитах человека свидетельствуют о том, что оно уменьшается при увеличении числа ярусов в молекулах (рис. 3.52). По мере заполнения ярусов молекул гликогена в гепатоцитах человека  $r$ , в среднем, уменьшается в норме на 2,94 нм, при ХГ — на 2,03 нм, а при ЦП — на 0,55 нм (рис. 3.52). При ЦП расстояние между Don и Ac. в среднем, значительно меньше, чем в клетках нормальной печени.

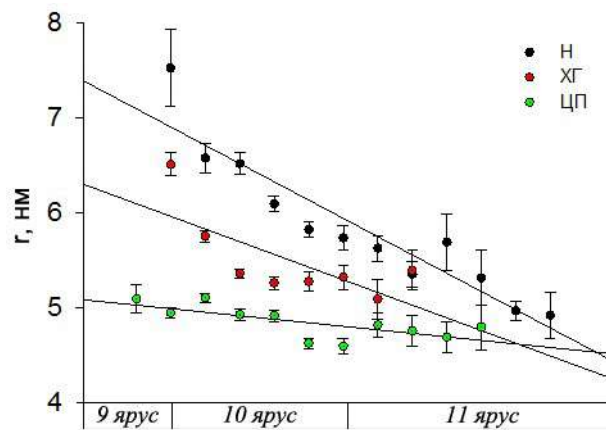


Рисунок 3.52 — Зависимость расстояния между Don и Ac ( $r$ ) от степени заполнения внешних ярусов (9–11-го) молекул гликогена в гепатоцитах человека: в норме (Н), при хроническом гепатите (ХГ) и циррозе печени (ЦП). Примечание: вертикальные отрезки — ошибка среднего.

Данные, представленные на рисунке 3.52, свидетельствуют о том, что в гепатоцитах нормальной печени по мере роста молекул гликогена расстояние между Don и Ac ( $r$ ) уменьшается. Эти данные говорят о том, что при увеличении размера молекул гликогена остатки глюкозы становятся всё более плотно прижатыми друг к другу. В отличие от молекул гликогена в гепатоцитах нормальной печени, молекулы гликогена при ЦП, по-видимому, обладают более плотной структурой на всех этапах их формирования. Как следствие, полученные нами данные подтверждают гипотезу Мэдсена и Кори (Madsen, Cori, 1958) о том, что размер молекул гликогена регулируется своей собственной структурой.

Однако возникает другой вопрос: происходит ли остановка роста молекул гликогена только по достижении 12-го яруса или рост молекул может прекращаться

гораздо раньше? Для ответа на этот вопрос нужно обратиться к имеющимся данным о размерах молекул гликогена, полученных с помощью электронной микроскопии (Wanson, Drochmans, 1968; Elsner et al., 2002; Marchand et al., 2002; 2007; Graham et al., 2010; Obel et al., 2012; Brewer et al., 2019).

ЭМ исследования размера частиц гликогена, проведенные, в основном, на скелетных мышцах, показали, что диаметр молекул может варьировать в широких пределах. Предельный диаметр молекул гликогена составлял 42–44 нм (Marchand et al., 2002), что соответствует теоретическим представлениям (Goldsmith et al., 1982; Melendez-Hevia et al., 1993; Melendez et al., 1997). Однако следует подчеркнуть, что частицы с диаметром 42–44 нм, который соответствовал 12-ти ярусной частице (молекуле) гликогена встречались крайне редко. По данным многих авторов средний диаметр молекул гликогена составляет ~ 25 нм, что соответствует молекулам гликогена с остатками глюкозы на 7–8 ярусах (Shearer, Graham, 2004). Кроме того, результаты, представленные на рисунке 3.46 и рисунке 3.47, позволяют сделать вывод о том, что уменьшение расстояния между остатками глюкозы по мере увеличения их числа в молекулах гликогена наблюдается даже на самых ранних стадиях гликогенеза в гепатоцитах. Эти данные дают основание предполагать, что помимо стерических, связанных с концентрацией остатков глюкозы на поверхности молекул и размером ферментов, участвующих в синтезе-деградации гликогена, по-видимому, существуют иные механизмы ограничения роста молекул гликогена и их числа в клетках.

Таким образом, помощью разработанного цитофлуориметрического метода, позволяющего исследовать пространственную структуру молекул гликогена в гепатоцитах установлено, что в абсорбтивном периоде число остатков глюкозы в  $\beta$ -частицах при ЦП выше, чем в нормальной печени. При ЦП остатки глюкозы в  $\beta$ -частицах упакованы в более плотные структуры, нежели в нормальной печени. Показано также, что синтез гликогена в гепатоцитах после введения глюкозы голодным крысам начинается на периферии клеток и постепенно перемещается к их центральной части, подтверждая данные, полученные ранее на изолированных гепатоцитах с использованием  $^{14}\text{C}$ -глюкозы (Garcia-Rocha et al., 2001; Fernandez-Novell et al., 2002).

### **3.4. Морфофункциональное состояние цирротически измененной печени крыс и человека при использовании различных методов лечения**

Цирроз печени (ЦП) — это диффузный процесс, характеризующийся фиброзом и трансформацией нормальной структуры печени с образованием узлов. ЦП представляет собой финальную стадию большинства хронических диффузных заболеваний печени (Ивашкин и др., 2021).

ЦП — широко распространенное заболевание печени, сопровождающееся высокой смертностью и большими экономическими потерями для государства. Причины его возникновения могут быть разными, но суть одна — развитие фиброза и постепенная прогрессия болезни, ведущая к перестройке архитектоники печени и сдвигам метаболизма не только в органе-мишени, но и во всем организме.

В течение многих лет в различных странах прилагались огромные усилия не только найти способы облегчить страдания пациентов, но, что ещё более важно, устранить те структурные и метаболические нарушения в печени, которые явились следствием длительного развития цирроза. Как правило, лечебные мероприятия были направлены на устранение частных проявлений ЦП (снижение гипертензии, устранение асцита, улучшение микроциркуляции и т.д.) и не приводили к его полному излечению (Naumov, 1997; Соринсон, 1998). Возможно поэтому большинство гепатологов продолжает считать, что ЦП представляет необратимую патологию, рано или поздно приводящую к летальному исходу (Friedman, Bansal, 2006; Gieling et al., 2008, Bravo et al., 2012). Терапевтических методов радикального излечения ЦП в настоящее время не существует и лечение направлено в основном на облегчение симптомов (Cui et al., 2021; Kronborg et al., 2021).

Общепринято, что единственный радикальный способ устранения цирроза — это трансплантация печени (van der Helm et al., 2019). Между тем, она до сих пор остается очень труднодоступной операцией для большинства пациентов нуждающихся в ней из-за отсутствия подходящих доноров, высокой стоимости и многих других факторов (Jadlowiec et al., 2016). Несмотря на это, число успешных трансплантаций печени неуклонно растет. Например, в Европе в 2010 г оно составило ~ 6000 (Zarrinpar, Busuttill, 2013), в России в 2018 г — 3,4 на 1 млн населения, в Московской области за этот же год — 30 (Мойсюк и др., 2018; Готье, Хомяков, 2019). Наряду с увеличением числа

трансплантаций печени увеличивается и продолжительность жизни пациентов. Согласно статистическим данным, после такого хирургического вмешательства в течение одного года выживают более 90 % пациентов; спустя 5 лет выживаемость составляет 70 %, а после 20 лет — 53 %. Вместе с увеличением продолжительности жизни пациентов, перенесших трансплантацию печени, растет и качество их жизни (Onghena et al., 2016). Тем не менее, несмотря на все эти достижения, количество больных с ЦП, трансплантация печени которым необходима для выживания, не уменьшается, а время ожидания такой операции остается большим. В Московской области, например, оно составляет 5,5 мес (Мойсюк и др., 2018).

Острая нехватка донорской печени для трансплантации пациентам с терминальной стадией цирроза стимулировала поиск новых подходов к лечению этой болезни. Среди них можно выделить генную и клеточную терапию. Показано, например, что перенос гена IGF-I (инсулин-подобный фактор роста I) в цирротическую печень запускает процесс, повышающий экспрессию цитопротекторных и антифиброгенных молекул, и снижающий при этом экспрессию профиброгенных факторов (Sobrevals et al., 2010). Считается также, что трансплантация клеток, способных при определенных условиях дифференцироваться в гепатоциты и холангиоциты, в принципе, может компенсировать утраченные в ходе патологического процесса функциональные клетки печени (Burra et al., 2004; Alison et al., 2007; Conigliaro et al., 2010). К числу таких клеток в настоящее время относят эмбриональные стволовые клетки, внепеченочные стволовые клетки (мезенхимные клетки костного мозга или другой локализации, особенно из жировой ткани), а также внутripеченочные прогениторные клетки (Galvao et al., 2006; Aquino et al., 2010; Darwiche, Petersen, 2010; Katoonizadeh et al., 2014; Yovchev et al., 2014). Теоретически, трансплантация клеток и генная инженерия могут принести большую пользу для терапии ЦП. Однако предстоит предпринять еще немало усилий, чтобы эти методы могли использоваться в клинической практике в качестве рутинных операций (Laurson et al., 2005; Muraca et al., 2006; Lysy et al., 2008; Piscaglia et al., 2010; Tirmitz-Parker et al., 2013).

Поэтому, параллельно с разработкой новых методов клеточной терапии, проводятся исследования, цель которых состоит в усилении способности самой патологически измененной печени восстанавливаться до исходного нормального уровня. Необходимость таких исследований заключается в том, чтобы избежать



трансплантации органа и предотвратить смертность из-за иммунной несовместимости. Поэтому выявление клеточных популяций способных участвовать в регенерации печени, установление клеточных механизмов восстановления массы и функции поврежденного органа являются важными задачами на пути повышения ее эндогенных регенераторных потенциалов.

Репаративная регенерация патологически измененной печени, которая может происходить, как путем увеличения объема функционирующей паренхимы, так и путем резорбции избыточного коллагена, направлена на нормализацию стромально-паренхиматозных взаимоотношений. Недостаточность регенерации может способствовать хронизации патологического процесса в печени и усилению его тяжести (LaBrecque, 1994). Известно, что нормальный и репаративный рост любого органа может осуществляться за счет увеличения числа клеток (пролиферации), увеличения числа геномов в клетках (полиплоидизации) и за счет увеличения массы цитоплазмы клеток, не связанной с их полиплоидизацией (собственно гипертрофии) (Goss, 1966).

В настоящее время общепринято, что полиплоидизация паренхимы печени осуществляется путем чередования ацитокинетических и полиплоидизирующих реституционных митозов по схеме:  $2c \rightarrow 2c \times 2 \rightarrow 4c \rightarrow 4c \times 2 \rightarrow 8c$  и т.д. Детали этого процесса могут различаться у разных видов млекопитающих (Nadal, Zaidela, 1966; Brodsky, Uryvaeva, 1985; Kudryavtsev et al., 1993; Duncan et al., 2010; Donne et al., 2020), но его отправной точкой является пул одноядерных диплоидных гепатоцитов. Считается, что именно диплоидные ( $2c$ ) гепатоциты во многом определяют регенераторный потенциал печени (Сакута, Кудрявцев, 1996, 2005; Patterson, Swift, 2019).

В таблицах 3.3 и 3.4 (раздела 3.1.4) приведены наши данные об относительном количестве гепатоцитов различных классов ploидности в нормальной и цирротической печени крыс и человека. Они позволяют заключить, что несмотря на значительное различие в уровнях полиплоидизации паренхимы нормальной печени крыс и человека, динамика популяции гепатоцитов у крыс и человека в ходе развития ЦП схожа. Сходство проявляется, прежде всего, в увеличении среднего уровня ploидности гепатоцитов при ЦП по сравнению с нормой. Кроме того, из результатов, представленных в таблицах 3.3 и 3.4, следует, что популяция диплоидных гепатоцитов, доля которых увеличивается при ЦП у крыс и составляет значительную часть

популяции клеток паренхимы печени у человека, играет значительную роль в восстановлении поврежденной паренхимы печени. Этот тезис подтверждается результатами других авторов. Во-первых, было показано, что доля 2с-гепатоцитов при ЦП постепенно увеличивается после прекращения отравления крыс  $CCl_4$  крыс (Сакута, Кудрявцев, 1996). Во-вторых, установлено, что диплоидные гепатоциты вступают в митотический цикл значительно активнее, чем полиплоидные (Урываева, Маршак, 1969; Watanabe, 1970; Watanabe et al., 1984; Gerlyng et al., 1993; Gorla et al., 2001).

Известно, что наряду с пролиферацией и полиплоидизацией существенную роль в нормальном и репаративном росте различных органов играет гипертрофия клеток (Goss, 1966; Бродский, Урываева, 1981). Обычно клеточную гипертрофию связывают с увеличением числа геномов в клетке (полиплоидией), что неизбежно приводит к увеличению ее размера. Значительно реже изучают гипертрофию, не связанную с увеличением плоидности клетки или предмитотическими синтезами. Между тем определение этого показателя может иметь важное значение при исследовании механизмов нормального и репаративного роста органа. Степень гипертрофии клеток в этом случае связывают с размерами их цитоплазмы, поскольку изменение размеров ядер практически не влияет на общий размер клеток. Точная оценка гипертрофии клетки, не связанной с ее плоидностью, может быть достигнута путем параллельного определения уровня плоидности клетки и объективных показателей ее размера. Таким показателем может быть сухая масса (СМ) клетки, более 80 % которой составляют белки (Гизе, 1959; Бродский, 1966). Измерение СМ гепатоцитов показало, что перед началом отравления крыс  $CCl_4$  СМ клеток равнялась  $812 \pm 17$  пг. Через 6 мес после начала эксперимента значения СМ гепатоцитов у крыс контрольной группы (не подвергавшихся воздействию  $CCl_4$ ) составили  $943 \pm 21$  пг, а у крыс с ЦП —  $1184 \pm 56$  пг. СМ гепатоцитов в нормальной печени взрослого человека составляла в среднем  $546,0 \pm 29,6$  пг, а у пациентов с ЦП —  $675,4 \pm 41,3$  пг. Увеличение массы гепатоцитов в ходе развития ЦП, которое по сравнению с нормой составило 25,6 % ( $p < 0,001$ ) у крыс и 23,7 % ( $p < 0,05$ ) у человека, говорит о том, что гипертрофия клеток играет заметную роль в репаративном росте печени (Bezborodkina et al., 2021б).

Данные об изменении массы паренхимы печени в ходе развития ЦП, сухой массе гепатоцитов и их плоидности в нормальной и цирротической печени крыс и человека дают возможность количественно оценить вклад процессов пролиферации ( $Q_1$ ),

полиплоидизации ( $Q_2$ ) и гипертрофии ( $Q_3$ ) клеток в нормальный и репаративный рост печени.

Развитие  $CCl_4$ -индуцированного цирроза у крыс связано с увеличением на 19 % ( $p < 0,05$ ) массы печени (Bezborodkina et al., 2021б). В отличие от крыс, масса печени человека при ЦП уменьшается (Patel et al., 2019; Simon et al, 2020; Hagen et al., 2022), сопровождаясь значительным снижением доли паренхимы. Если в нормальной печени человека доля паренхимы равна  $90,6 \pm 0,9$  %, то при ЦП она составляет лишь  $54,0 \pm 2,5$  % (табл. 3.2) (Bezborodkina et al., 2021б), свидетельствуя о преобладании гибели гепатоцитов над их восполнением.

Представленные в таблице 3.11 данные свидетельствуют о том, что у крыс заметную роль в увеличении массы органа при развитии ЦП играет гипертрофия клеток (около 18 %). Однако основной вклад в репаративный рост печени вносят клеточные процессы, связанные с синтезом ДНК и сопровождающиеся увеличением числа клеток в органе. На долю пролиферации, связанной с обычными митотическими делениями клеток, приходится 66 %, а на долю полиплоидизации 16 %. Схожие данные были получены ранее при исследовании клеточных механизмов нормального и репаративного роста печени у крыс (Сакута, Кудрявцев, 1996). Несколько меньший вклад пролиферации (57 %) и увеличенный вклад полиплоидизации (30 %) при формировании ЦП, найденные авторами, по-видимому, связаны с возрастными отличиями животных, использованных в эксперименте.

Таблица 3.11 — Относительный вклад (%) пролиферации ( $Q_1$ ), полиплоидизации ( $Q_2$ ) и гипертрофии ( $Q_3$ ) гепатоцитов в изменение массы печени крыс и человека в ходе развития цирроза печени (ЦП).

	$Q_1$	$Q_2$	$Q_3$
Крыса	66	16	18
Человек	111,2	-7,3	-3,9

Примечание: при расчетах вклада(ов) пролиферации, полиплоидии и гипертрофии клеток предполагали, что отношение массы паренхимы печени цирротической печени к массе паренхимы нормальной печени ( $M$ ) с учетом обновления клеток в ходе развития ЦП составляет у крыс 4,0, а у человека 0,37.

Определение вклада(ов) пролиферации, полиплоидии и гипертрофии гепатоцитов в репаративный рост печени у человека показало, что репаративный рост печени

человека в ходе развития цирроза осуществляется исключительно за счет митотических делений мелких диплоидных гепатоцитов (табл. 3.11).

Хотя многие исследователи считают, что цирроз печени необратим, целый ряд авторов придерживаются противоположной точки зрения (Саркисов, Рубецкой, 1965; Powell et al., 1970; Солопаев, 1985; Dufour et al, 1997; Kaplan et al., 1997; Lau et al., 1999; Benyon, Iredale, 2000; Wanless, 2001; Kweon et al., 2001; Hammel et al., 2001). Ключевыми вопросами в работах, посвященных проблеме обратного развития ЦП, являются степень возврата патологических изменений в печени к нормальному состоянию после применения соответствующих лечебных мероприятий и уровень повреждающего действия самой терапии на печень больных ЦП.

Понимание механизмов, вовлекаемых в процесс фиброзирования печени, является основополагающей задачей, от решения которой зависит разработка подходов к терапии ЦП. Фиброз и цирроз являются динамичными процессами, способными с течением времени как прогрессировать, так и подвергаться регрессии в зависимости от того будет ли перманентно присутствовать причина, лежащая в основе этого заболевания (Arthur, 2002). Поэтому первостепенную важность при решении проблемы возврата структуры и функции цирротической печени к исходной, нормальной, приобретает устранение причины, вызвавшей ЦП. Наши результаты, свидетельствуют о том, что прекращение отравления крыс  $CCl_4$  уже через 1 мес приводит к заметному улучшению структуры печени, которое выражается, главным образом, в уменьшении доли соединительной ткани. Однако спустя даже 6 мес<sup>\*)</sup> после окончания повреждающего воздействия полного восстановления дольковой структуры органа не происходит (рис. 3.53) (Kudryavtseva et al., 1998, 1999, 2001a; Кудрявцева и др., 2000).

В экспериментах на крысах мы протестировали ряд способов лечения, которые, в принципе, могли бы повысить степень и скорость восстановления структуры и функции печени, нарушенных в ходе развития ЦП. Условно можно выделить несколько направлений исследований, нацеленных на поиск способов реверсии цирротических изменений в печени *при условии устранения повреждающего агента*: усиление пролиферативного потенциала гепатоцитов, уменьшение массы соединительной ткани, снижение нагрузки на печень и повышение функционального

---

<sup>\*)</sup> Считается, что возраст крыс 11–13 мес примерно соответствует возрасту 30 лет у человека, а возраст 24–27 мес примерно соответствует возрасту человека 60–70 лет (Weisfeld, 1998). Следовательно, возрастной интервал 6 мес у крыс примерно соответствует интервалу 12–15 лет у человека.

состояния некоторых систем организма, оказывающих прямое влияние на уровень регенераторного процесса.

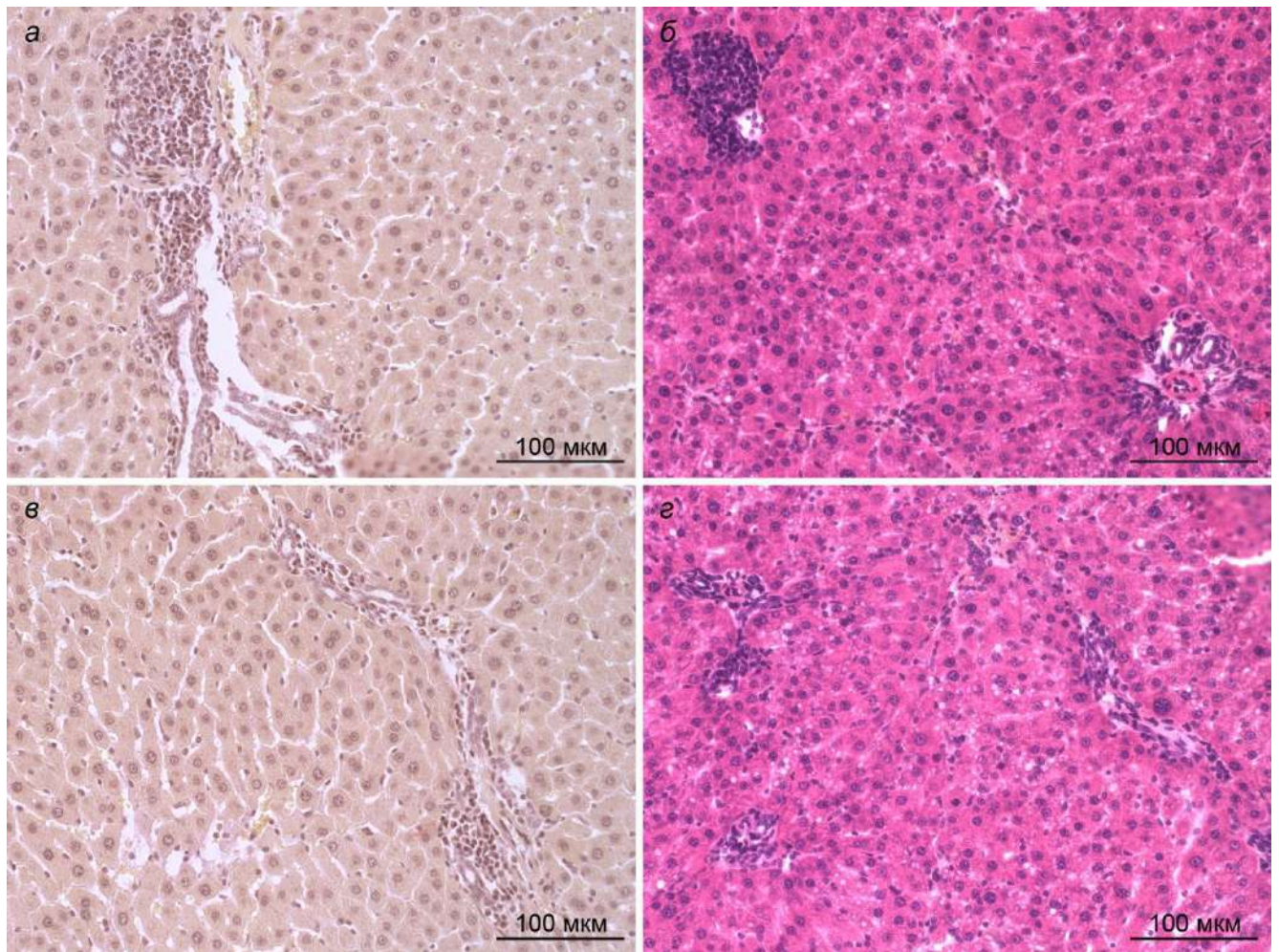


Рисунок 3.53 — Срезы печени крыс: *а, б* — при циррозе печени; *в, з* — через 6 мес после прекращения воздействия  $\text{CCl}_4$ ; *а, в* — окраска по Ван-Гизону, *б, з* — окраска гематоксилин-эозином.

В качестве агентов и процедур потенциально способных усилить регенерацию цирротически измененного органа и нормализовать его структуру и функцию была использована частичная резекция печени (Nakamura et al., 1984; Imai et al., 1990; Castells et al., 1994), высокоуглеводная диета (Stowell et al., 1951; Bernelli-Zazzera, Gaja, 1964; Jennische, 1983; Hinson, 1983; Frederiks, 1985; Kabadi et al., 1985), хорионический гонадотропин человека (Солопаева, 1969; Солопаева, Солопаев, 1991) и дипептид лизин-глутамин (Киселева и др., 1999).

Хотя для повышения регенерационной способности цирротической печени крыс использовались агенты различной природы, их действие приводило к однотипным



результатам. Суммарный итог наших экспериментальных исследований (Kudryavtseva et al., 1998, 1999, 2001a; Кудрявцева и др., 2000) состоит в следующем:

- 1) Дольковая структура органа не восстанавливается даже спустя 6 мес после завершения воздействия на животных  $CCl_4$ , несмотря на определенную нормализацию гистологической структуры печени — уменьшение доли соединительной ткани, исчезновение очагов воспаления, уменьшение количества клеток Купфера (рис. 3.54).

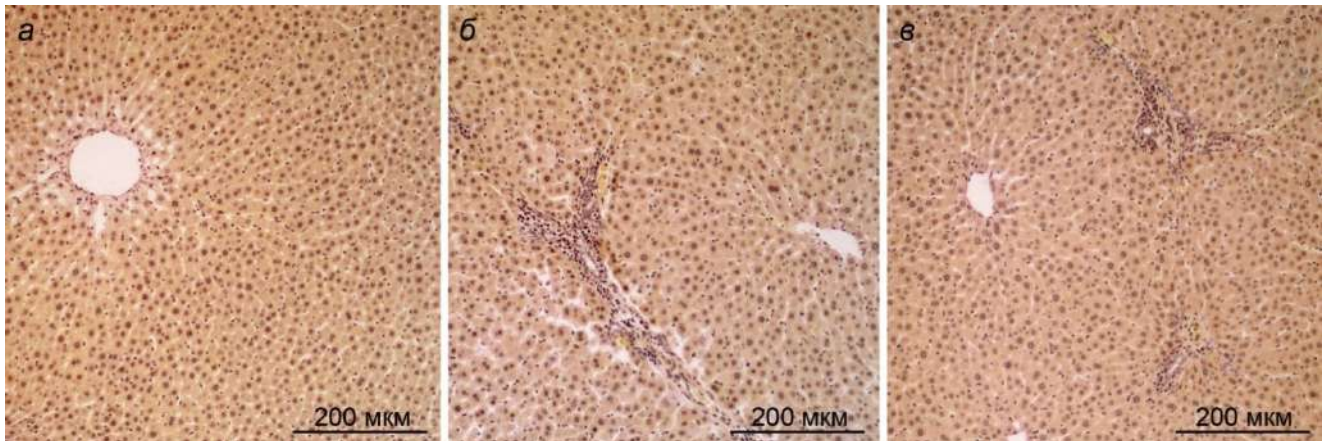


Рисунок 3.54 — Срезы печени крыс: *а* — норма; *б* — цирроз печени; *в* — через 6 мес после частичной гепатэктомии. Окраска по Ван-Гизону.

- 2) Функциональные показатели печени после прекращения воздействия на животных  $CCl_4$  восстанавливаются быстрее и полнее, чем ее гистологическая структура и, прежде всего, заключаются в существенном снижении содержания гликогена в гепатоцитах, повышении активности Г-6-Фазы и повышении активности ГФа. Вместе с тем, в отличие от ГФа, содержание гликогена и активность Г-6-Фазы, не достигали значений нормы даже спустя продолжительное время после прекращения токсического воздействия.
- 3) Между снижением содержания гликогена в гепатоцитах и активностью Г-6-Фазы в печени крыс выявлена обратная зависимость ( $r = -0,84$ ,  $p < 0,001$ ), (рис. 3.55).

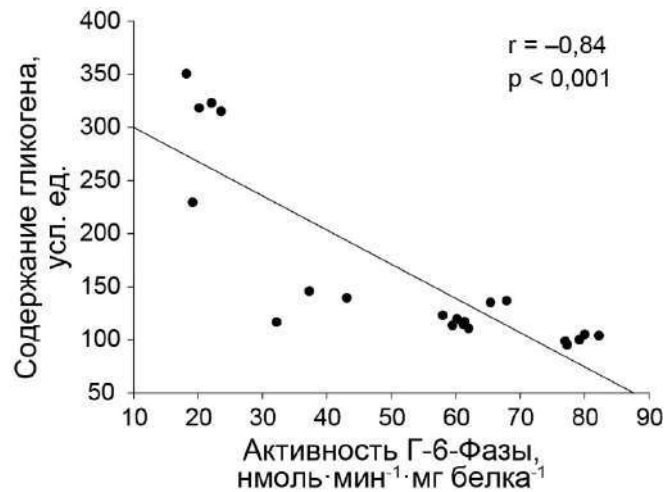


Рисунок 3.55 — Зависимость содержания гликогена в гепатоцитах от активности глюкозо-6-фосфатазы (Г-6-Фазы) в печени крыс.

Таким образом, проведенное исследование с применением различных методов терапии ЦП у крыс установило, что, несмотря на определенное улучшение архитектоники органа, полного восстановления его исходного долькового строения не происходит даже по истечении длительного времени наблюдения. Анализ полученных данных показал, что ведущим фактором улучшения морфологии цирротически измененной печени является прекращение патогенного воздействия. Методы лечения ЦП у крыс, использованные в данной работе, оказывали лишь слабое влияние на ход восстановления пораженного органа (Kudryavtseva et al., 1998, 1999, 2001a; Кудрявцева и др., 2000).

Масштабные исследования с использованием экспериментальных моделей ЦП (Iimuro et al., 2003; Parsons et al., 2004; Siller-Lopez et al., 2004; Roderfeld et al., 2006; Atta et al., 2014) и клинические данные, полученные на пациентах с ЦП (Wanless et al., 2000; Poynard et al., 2002; Dienstag et al., 2003) показали, что исключение этиологического источника хронического повреждения печени приводит к уменьшению уровня противовоспалительных и фиброгенных цитокинов, снижению продукции внеклеточного матрикса и апоптозу звездчатых клеток (Iredale et al., 1998; Iredale, 2007; Krizhanovsky et al., 2008; Wright et al., 2001). Кроме того, во многих работах продемонстрировано значительное уменьшение объема фиброзной ткани после воздействия на ЦП различными агентами (Lewis et al., 1983; Weinbren et al., 1985; Dufour et al., 1997; Sobesky et al., 1999; Guerret, 1999; Poynard et al., 2002; Liu et al., 2013; Sun et al., 2020). Тем не менее, несмотря на все эти положительные результаты, большинство

исследователей в настоящее время считают, что обратному развитию может подвергаться только фиброз, но не зрелый цирроз (Desmet, Roskams, 2004; Malekzadeh et al., 2004; Bravo et al., 2012). Полная обратимость цирротических изменений в печени допускается лишь в редких случаях или считается спорным результатом (Benyon, Iredale, 2000; Di Vinicius et al., 2005; Ramachandran, Iredale, 2009; Metwally et al., 2017). Поэтому утверждать, что использование различных методов лечения ЦП приведет к обратному развитию структурных изменений в печени до уровня характерного для нормальной архитектуры печени, пока нельзя. Наши данные, полученные при изучении CCl<sub>4</sub>-цирроза печени у крыс в течение длительного восстановительного периода после прекращения отравления животных гепатотропным ядом, также подтверждают этот тезис (Kudryavtseva et al., 1998, 1999, 2001a; Кудрявцева и др., 2000).

Фиброзирование органа и глубокая перестройка сосудистого русла печени при циррозе приводят к гипоксии и ухудшению снабжения клеток ее паренхимы необходимыми субстратами. Помимо этого, развитие ЦП сопровождается постоянно протекающими процессами воспаления, гибели и пролиферации различных типов клеток, а также нейтрализации повреждающих агентов, которые требуют значительных затрат энергии. Поэтому, в принципе, прекращение повреждающего воздействия на печень, которое ведет к существенному снижению интенсивности всех этих процессов, должно повлечь за собой высвобождение значительного количества энергии, которая может быть перенаправлена на восстановление структуры и многочисленных функций поврежденной печени. Однако данные об уровне гипоксии в печени и энергетическом статусе органа после прекращения повреждающего воздействия и терапии ЦП в настоящее время отсутствуют.

Одним из фармакологических агентов, используемых при лечении ЦП, является 2-этилтиобензимидазола гидробромид (бемитил, БМ). Показано, что он ускоряет репаративную регенерацию печени, улучшает функцию патологически измененного органа, проявляет иммуномодулирующий и антиоксидантный эффекты (Плотников и др., 1989; Смирнов, 1993; Смирнов, 1994; Гайворонская, 2000). Установлено также, что БМ обладает антимуtagenными свойствами (Дурнев, Середенин, 1995; Зиновьева и др., 1995; Середенин и др., 1986) и оказывает благоприятное действие на углеводный обмен цирротически измененной печени крыс. Полагают, что основной механизм влияния БМ



на углеводный обмен в печени опосредован усилением процессов транскрипции и трансляции (Оковитый, 1995).

Наиболее распространенной экспериментальной моделью для получения ЦП является хроническое воздействие на животных гепатотропным ядом, в качестве которого особенно часто используется четыреххлористый углерод ( $CCl_4$ ). Полагают, что ЦП, развивающийся у животных, сходен с ЦП у человека (Zimmerman, 1978; Закусов, 1985; Саркисов, 1987; Kohno et al., 1991; Скобелева, 1994). Вместе с тем, оценка доли соединительной ткани, определение активности ферментов и содержания гликогена показала, что патологический процесс в печени человека приводит к значительно более глубоким структурным и функциональным перестройкам, чем в печени животных (Owen et al., 1981, 1983; Кудрявцева и др., 1992). В связи с этим очевидно, что данные, полученные при изучении патогенеза и обратимости ЦП у животных, требуют существенной коррекции, при использовании их для человека. Поэтому в данной работе проведено сравнительное исследование влияния БМ на реабилитацию патологически измененной печени у крыс и человека (Кудрявцева и др., 2002а, 2002б; Kudryavtseva et al., 2003; Кудрявцева и др., 2004; Оковитый и др., 2006). При этом эффекты БМ на печень больных хроническим вирусным гепатитом изучали, как на стадии до развития ЦП, так и на стадии цирроза (Кудрявцева и др., 2002а).

Исследование эффектов БМ на метаболизм гликогена в цирротической печени крыс показало, что применение этого препарата вызывает значительное снижение содержания гликогена в гепатоцитах и повышение активности Г-6-Фазы в печени животных (табл. 3.12). Однако подобно другим использованным в нашей работе агентам, БМ не приводит к полной нормализации этих показателей. Уровни гликогена в гепатоцитах после терапии БМ остаются на 23 % выше ( $p < 0,001$ ), а активность Г-6-Фазы — на такую же величину ниже ( $p < 0,02$ ), чем в контроле (Кудрявцева и др., 2002б; Kudryavtseva et al., 2003). Снижение уровней гликогена в печени крыс после терапии БМ, несомненно, указывает на благоприятное влияние этого препарата на патологически измененный орган (Кудрявцева и др., 2002б; Кудрявцева и др., 2004). Необходимо, однако, еще раз подчеркнуть, что результаты, полученные при изучении обратимости ЦП у животных, можно использовать для человека лишь с большой осторожностью.

Таблица 3.12 — Содержание суммарного гликогена и его фракций в гепатоцитах (усл.ед.), активность глюкозо-6-фосфатазы (Г-6-Фазы) (нмоль/ мин/мг белка) в печени крыс в норме, при циррозе (ЦП) и на фоне лечения цирроза 2-этилтиобензимидазола гидробромидом (ЦП+БМ), усл. ед. ( $X \pm S_x$ ,  $n = 5$ ).

Вариант опыта	Суммарный гликоген	ЛД-фракция гликогена	ТД-фракция гликогена	Активность Г-6-Фазы
Контроль	2,39±0,06	1,93±0,05	0,38±0,03	0,77±0,03
ЦП	7,73±0,07 <sup>1</sup>	4,53±0,07 <sup>1</sup>	3,05±0,02 <sup>1</sup>	0,20±0,08 <sup>1</sup>
ЦП + БМ	2,94±0,05 <sup>1</sup>	1,99±0,06	0,62±0,02 <sup>1</sup>	0,59±0,05 <sup>2</sup>

<sup>1,2</sup> Достоверно отличается от значения в контроле (<sup>1</sup> $p < 0,001$ , <sup>2</sup> $p < 0,02$ ).

Полученные данные свидетельствуют о том, что базовая терапия больных ХВГ и ЦП фактически не влияла на содержание гликогена в клетках. В то же время лечение БМ приводило к снижению его содержания в гепатоцитах, которое было особенно заметным у больных ХВГ, чем у больных с ЦП (табл. 3.13) (Кудрявцева и др., 2002а). Следует также отметить, что терапия больных ЦП с использованием БМ вызывала лишь 9%-ое падение уровней гликогена в гепатоцитах ( $p < 0,01$ ), в то время как в гепатоцитах крыс БМ снижал содержание гликогена на 77 % (табл. 3.12). Содержание гликогена в гепатоцитах после окончания лечения пациентов с ЦП препаратом оставалось выше уровня нормы примерно в 2,38 раза ( $p < 0,001$ ) (табл. 3.13). При схожей схеме использования БМ для лечения ЦП у крыс содержание гликогена в гепатоцитах после лечения продолжало превышать уровень нормы лишь в 1,23 раза ( $p < 0,001$ ) (табл. 3.12) (Кудрявцева и др., 2002б; Kudryavtseva et al., 2003). Слабое влияние БМ на печень пациентов, возможно, связано с персистенцией вируса и/или более глубокой структурной перестройкой паренхимы у человека по сравнению с крысами (Кудрявцева и др., 2002а; Vezborodkina et al., 2021б).

Таблица 3.13 — Содержание суммарного гликогена и его фракций в гепатоцитах пациентов различных групп, усл. ед. ( $X \pm S_x$ ).

Показатель	Группы пациентов						
	I (n = 10)	II (n = 12)	III (n = 3)	IV (n = 9)	V (n = 13)	VI (n = 4)	VII (n = 9)
Суммарный гликоген	3,4±0,1	6,5±0,1	6,0±0,3	5,6±0,1	8,9±0,2	9,4±0,4	8,1±0,2
ЛД-фракция	2,9±0,1	5,2±0,1	4,4 ±0,1	4,3±0,1	6,0±0,1	6,7±0,1	6,5±0,1
ТД-фракция	0,4±0,1	1,4±0,1	1,6±0,3	1,0±0,1	2,9±0,2	3,1±0,5	1,5±0,2

Примечание: I группа — контроль, II — ХВГ без терапии, III — ХВГ после базовой терапии, IV — ХВГ после терапии 2-этилтиобензимидазола гидробромидом, V — ЦП без терапии, VI — ЦП после базовой терапии, VII — ЦП после терапии 2-этилтиобензимидазола гидробромидом. Все значения в группах пациентов II–VII достоверно отличаются от соответствующих значений в группе I при  $p < 0,001$ .

Несмотря на все усилия, направленные на то, чтобы состав исследуемых групп пациентов был однородным по ряду показателей, достичь этого и тем самым исключить проблемы, связанные с гетерогенностью клеточных популяций в паренхиме печени человека, оказалось невозможно. Поэтому для снижения влияния разнородности состава пациентов в группах на содержание гликогена в гепатоцитах использовали серийные биопсии печени, полученные от одного и того же пациента через разные интервалы времени после терапии бемитилом (таблицы 3.14, 3.15) (Кудрявцева и др., 2002а).

Таблица 3.14 — Содержание суммарного гликогена (СГ) и его фракций в гепатоцитах, полученных из серийных биоптатов печени больных ХВГ до (I биопсия) и после (II биопсия) терапии 2-этилтиобензимидазола гидробромидом, усл. ед. ( $X \pm S_x$ ).

Пациенты №№	Содержание гликогена					
	I биопсия			II биопсия		
	СГ	ЛД-фракция	ТД-фракция	СГ	ЛД-фракция	ТД-фракция
1	9,3±0,8	6,1±0,3	3,2±0,9	6,1±0,2	5,0±0,2	1,1±0,3
2	6,4±0,4	5,1±0,3	1,3±0,5	5,2±0,1	4,3±0,2	0,9±0,2
3	4,5±0,3	3,5±0,2	1,0±0,4	4,0±0,3	3,1±0,1	0,9±0,3
4	6,6±0,8	4,6±0,3	2,0±0,6	4,9±0,5	4,1±0,2	0,8±0,3
5	9,0±0,9	6,8±0,2	2,2±0,9	8,1±0,6	6,6±0,3	1,6±0,6
6	6,7±0,3	4,8±0,5	1,9±0,6	5,1±0,4	4,1±0,3	1,0±0,5
7	8,1±0,4	6,3±0,5	1,9±0,6	7,1±0,4	5,9±0,4	1,2±0,6
8	9,0±0,8	6,8±0,3	2,3±0,9	7,0±0,4	5,9±0,3	1,1±0,5
9	7,6±0,8	5,0±0,2	2,6±0,8	6,2±0,2	5,3±0,2	0,9±0,3

Таблица 3.15 — Содержание суммарного гликогена (СГ) и его ЛД- и ТД-фракций в гепатоцитах, полученных из серийных биоптатов печени больных ЦП до (I биопсия) и после (II биопсия) терапии 2-этилтиобензимидазола гидробромидом, усл. ед. ( $X \pm S_x$ ).

Пациенты №№	Содержание гликогена					
	I биопсия			II биопсия		
	СГ	ЛД-фракция	ТД-фракция	СГ	ЛД-фракция	ТД-фракция
1	8,5±0,4	5,8±0,4	2,7±0,6	7,8±0,3	6,5±0,2	1,3±0,4
2	10,2±1,0	6,7±0,3	3,5±1,0	8,5±0,9	6,7±0,3	1,8±0,9
3	8,3±1,0	5,3±0,3	3,0±1,0	8,0±0,7	6,4±0,5	1,6±0,9
4	9,5±0,9	6,6±0,3	2,9±0,9	8,5±0,4	6,7±0,5	1,8±0,6
5	7,7±0,6	5,8±0,2	1,9±0,6	7,2±0,6	6,2±0,4	1,0±0,7
6	8,7±0,4	6,2±0,4	2,5±0,6	8,0±0,9	6,4±0,4	1,6±0,9
7	9,0±0,8	5,3±0,3	3,7±0,8	8,2±0,7	6,6±0,2	1,6±0,7
8	9,4±1,0	6,8±0,3	2,6±1,0	8,1±0,6	6,9±0,3	1,2±0,7
9	9,8±1,0	5,5±0,2	4,4±1,0	8,5±0,6	6,2±0,3	2,3±0,7

Ранее на материале более 160 биопсий печени больных ХГ, было установлено, что содержание гликогена в гепатоцитах пациентов, не зависит от этиологии заболевания и увеличивается по мере усиления поражения печени. У больных с тяжелой степенью поражения печени содержание гликогена в клетках могло превышать норму более чем в 4 раза (Кудрявцева, 1987). Исследование, проведенное нами, показало (табл. 3.13, 3.14, 3.15), что терапия БМ, в отличие от базовой терапии, ведет к снижению содержания гликогена и у больных ХВГ, и у пациентов с ЦП (Кудрявцева и др., 2002а). При этом у пациентов с ЦП наблюдается обратная корреляция ( $r = -0,87$ ;  $p < 0,01$ ) между степенью снижения содержания гликогена в гепатоцитах и его первоначальным уровнем в клетках (рис. 3.56). Этот результат означает, что действие БМ на содержание гликогена в клетках тем значительнее, чем меньше тяжесть поражения печени (Кудрявцева и др., 2002а).

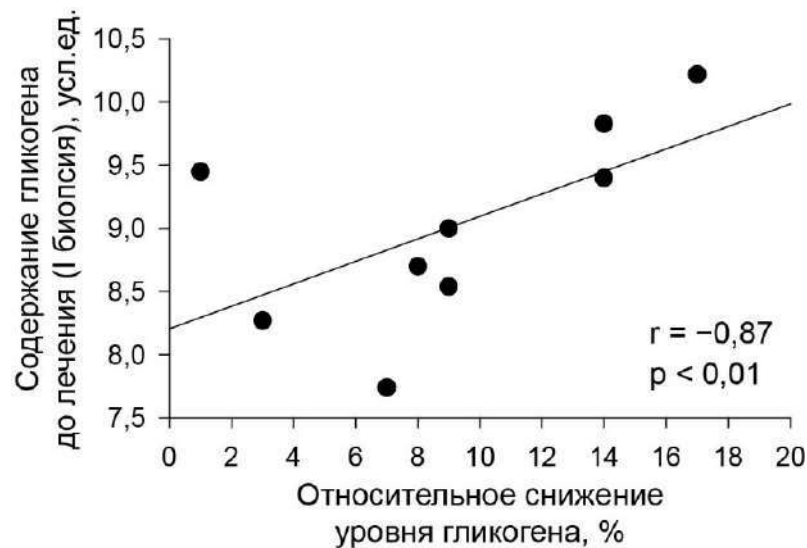


Рисунок 3.56 — Зависимость между степенью снижения содержания гликогена в гепатоцитах и первоначальным его уровнем в клетках пациентов с ЦП после терапии БМ. По результатам серийных биопсий.

Анализ зависимости относительного падения уровней гликогена в гепатоцитах от длительности интервала между 1-й и 2-й биопсиями обнаружил, что она существует только для больных ХВГ (рис. 3.57). Подобный результат предполагает, что в случае ХВГ, при котором патологические изменения в печени выражены в меньшей степени, чем при ЦП, терапия БМ приводит к прогрессирующему и длительному улучшению метаболизма гликогена в печени (Кудрявцева и др., 2002а).

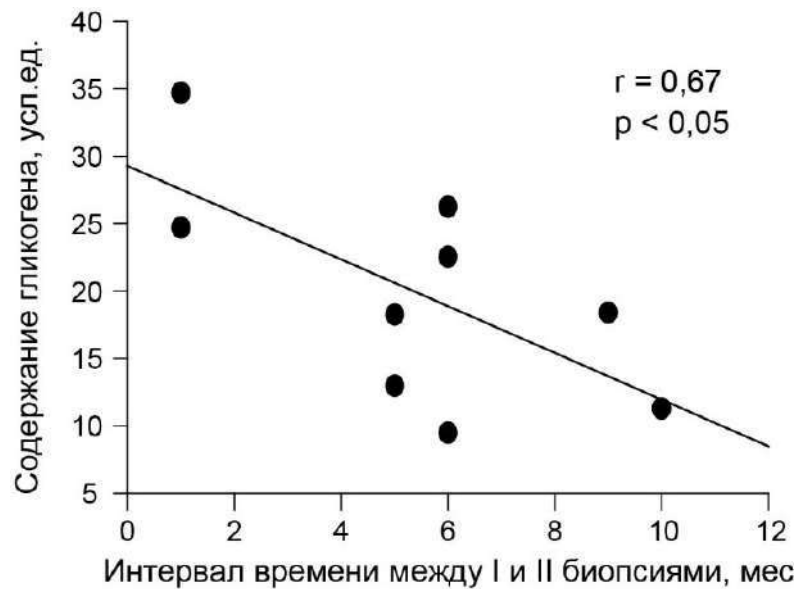


Рисунок 3.57 — Зависимость снижения содержания гликогена в гепатоцитах печени пациентов с ХВГ от продолжительности интервала времени между I и II биопсиями после терапии БМ.

Исследование зависимости содержания гликогена в гепатоцитах пациентов с ХВГ от активности Г-6-Фазы в печени (рис. 3.58) показало, что, как и у крыс с ЦП (Кудрявцева и др., 2002б), активность этого фермента в значительной степени определяет уровень гликогена в клетках. Увеличение активности Г-6-Фазы приводит к снижению его содержания в гепатоцитах (Кудрявцева и др., 2002а).

Исходя из вышесказанного, можно заключить, что гликогеноз гепатоцитов при ЦП у крыс и человека после прекращения повреждающего воздействия на печень в значительной мере обратим. Дополнительное применение методов терапии после удаления патогенного воздействия оказывает лишь небольшой положительный эффект. Установлено также, что степень снижения уровней гликогена в гепатоцитах цирротической печени после терапии обратно пропорциональна содержанию гликогена в клетках до лечения и повышению активности Г-6-Фазы (Kudryavtseva et al., 1998, 1999, 2001а, 2003; Кудрявцева и др., 2000; 2002а, 2002б, 2004).

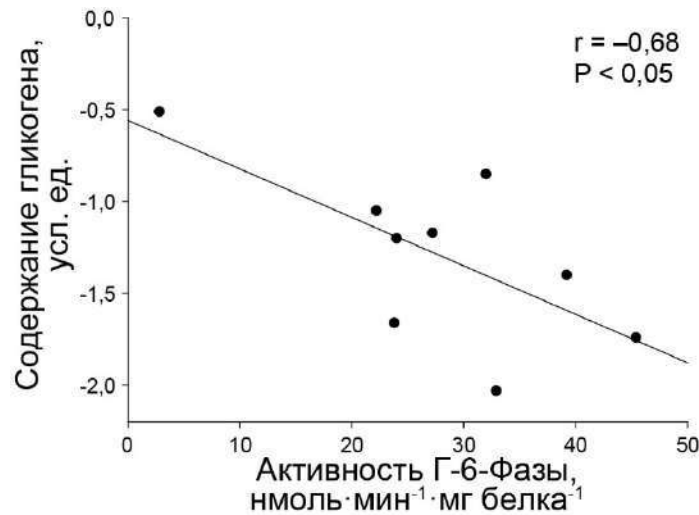


Рисунок 3.58 — Зависимость снижения содержания гликогена в гепатоцитах пациентов с ХВГ от повышения активности глюкозо-6-фосфатазы (Г-6-Фазы) в печени после терапии БМ. По результатам серийных биопсий.

Содержание гликогена в гепатоцитах, помимо физиологических требований со стороны организма и факторов метаболического характера (концентрации глюкозы в крови, уровня инсулина и глюкагона, активности ферментов и др.), может зависеть от числа молекул гликогена и их пространственной структуры. Теоретически, число остатков глюкозы на 4-х внешних ярусах молекул гликогена (~50000) может превышать число остатков, содержащихся в 8-ми внутренних ярусах (3315), в 15–16 раз (Roach et al., 2012). Даже если учесть, что прямому, без участия деветвящего энзима, действию ГФа подвергается лишь 34,6%  $\alpha$ -1,4-гликозидных связей в гликогене (Shearer, Graham, 2004), колебания содержания гликогена в клетках, только из-за изменений пространственной структуры его молекул, могут достигать примерно 5 раз. Можно предположить, что вариабельность содержания гликогена в гепатоцитах, связанная с разным числом его молекул в клетках, по-видимому, также значительна.

Данные, приведенные на рисунке 3.59, демонстрируют, что у крыс контрольной группы общее число остатков глюкозы в одной молекуле ( $\beta$ -частице) гликогена составляет, в среднем,  $18810 \pm 734$ , а при ЦП оно значительно меньше —  $7107 \pm 390$ .

Полученные данные о числе остатков глюкозы в молекулах гликогена означают, что в норме пространственная структура молекул гликогена у крыс включает полностью заполненные остатками глюкозы десять ярусов и заполненный на 41% 11-й ярус, а при ЦП — полностью заполненные девять ярусов и всего на 3,3% — 10-й ярус (рис. 3.59). На основании данных о зависимости диаметра молекул гликогена от числа остатков

глюкозы в них (Shearer, Graham, 2004; Roach et al., 2012) можно выяснить, что средний диаметр молекул гликогена в гепатоцитах нормальной печени крыс составляет 36 нм, а при ЦП ~ 31 нм. Различные способы реабилитации ЦП приводят к определенной реверсии структуры молекул гликогена, нарушенной в результате длительного развития патологического процесса, но полностью не восстанавливают ее (рис. 3.59).

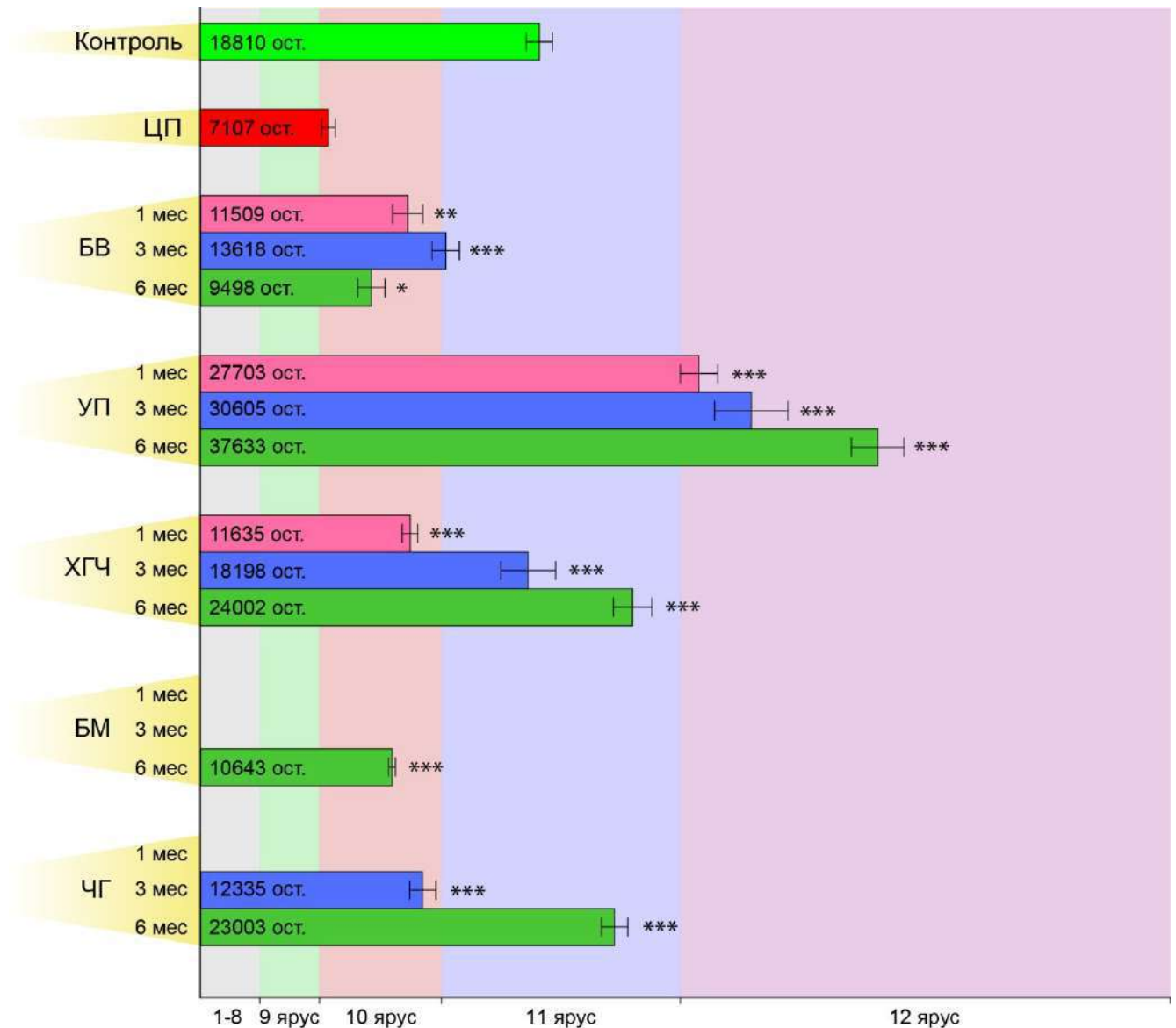


Рисунок 3.59 — Количество остатков глюкозы в молекулах гликогена гепатоцитов нормальной и цирротической печени крыс через разные интервалы времени после прекращения отравления животных  $\text{CCl}_4$  и применения различных методов терапии цирроза печени (ЦП). БВ — без какого-либо воздействия; УП — высокоуглеводная диета; ХГЧ — хорионический гонадотропин человека; БМ — 2-этилтиобензимидазола гидробромид; ЧГ — частичная гепатэктомия.

Исключение повреждающего агента и применение дополнительной терапии приводит к однотипному изменению пространственной структуры гликогена, которое

выражается в увеличении числа остатков глюкозы в его молекулах. Наибольший прирост числа остатков глюкозы в молекулах гликогена, как можно было предполагать, наблюдался в группе крыс, которые получали пищу с высоким содержанием углеводов (рис. 3.59). Уже через 1 мес после начала получения высокоуглеводной пищи количество остатков глюкозы в гепатоцитах крыс этой группы превышало уровень нормы на 47 % ( $p < 0,001$ ), а через 6 мес увеличивалось почти вдвое. Остальные методы терапии ЦП у крыс оказывали меньший эффект, который, однако, усиливался при увеличении ее продолжительности (рис. 3.59).

Результаты определения относительного количества молекул гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротически измененной печени крыс представлены на рисунке 3.60.

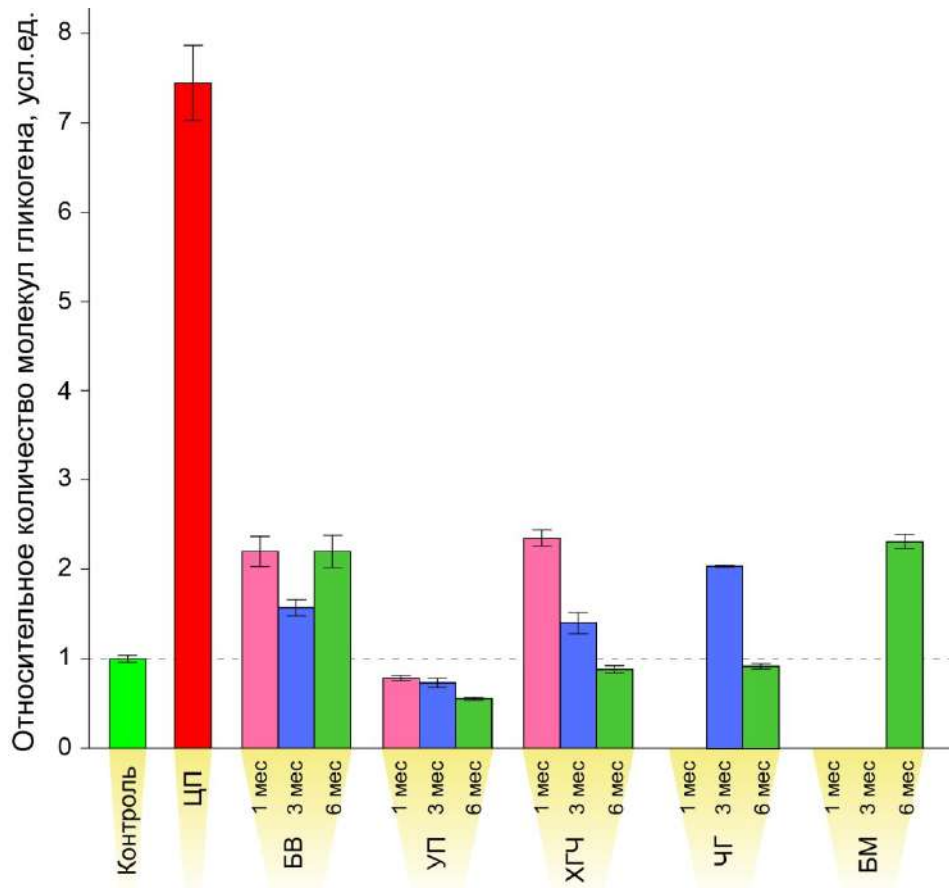


Рисунок 3.60 — Относительное количество молекул гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крыс через разные интервалы времени после прекращения отравления животных  $\text{CCl}_4$  и применения различных методов терапии цирроза печени (ЦП). БВ — без какого-либо воздействия; УП — питание пищей с высоким содержанием углеводов; ХГЧ — хорионический гонадотропин человека; ЧГ — частичная гепатэктомия; БМ — 2-этилпиобензимидазола гидробромид.



Полученные данные, позволяют сделать вывод о том, что развитие ЦП у крыс сопровождается 2–3-х кратным уменьшением числа остатков глюкозы в молекулах гликогена и гораздо бóльшим (в 7–9 раз) увеличением числа его молекул (рис. 3.59 и рис. 3.60). Различные методы терапии ЦП приводят не только к увеличению числа остатков в молекулах гликогена и, соответственно, к увеличению размера самих молекул, но и к уменьшению количества молекул гликогена, сопровождаясь при этом падением его уровней в гепатоцитах. Относительный вклад количества молекул гликогена и числа остатков глюкозы в них в снижение содержания гликогена в клетках отличается при использовании разных методов лечения ЦП (рис. 3.59 и рис. 3.60). Тем не менее, можно заключить, что вклад снижения количества молекул гликогена в уменьшение его содержания в гепатоцитах при реабилитации ЦП наиболее весом.

В нормальной печени человека молекулы гликогена несколько крупнее, чем у крыс и содержат, в среднем,  $24034 \pm 707$  остатков глюкозы. Развитие ЦП у человека связано с уменьшением  $\sim$  в 2,6 раза ( $p < 0,01$ ) числа остатков глюкозы в молекулах гликогена и увеличением в 8–10 раз числа молекул гликогена (рис. 3.61). Стоит отметить, что пространственная структура  $\beta$ -частиц гликогена в гепатоцитах цирротической печени человека практически идентична таковой у крыс: молекулы также состоят из 9-ти полных ярусов и частично заполненного остатками глюкозы 10-го яруса (рис. 3.59, рис. 3.61).

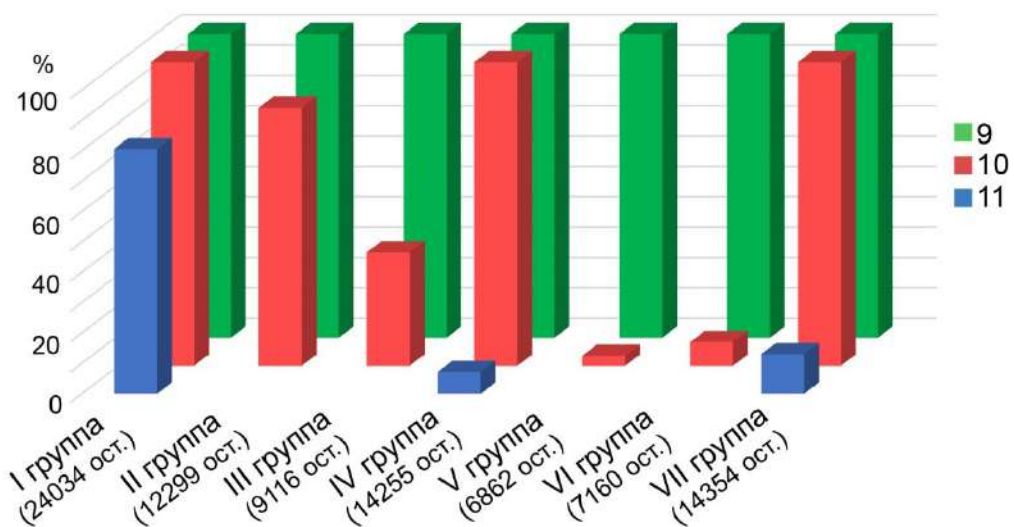


Рисунок 3.61 — Общее количество остатков глюкозы и их распределение на внешних ярусах молекул гликогена в гепатоцитах пациентов I–VII групп. Примечание: I группа — контроль, II — ХВГ без терапии, III — ХВГ после базовой терапии, IV — ХВГ после терапии 2-этилтиобензимидазола гидробромидом, V — ЦП без терапии, VI — ЦП после базовой терапии, VII — ЦП после терапии 2-этилтиобензимидазола гидробромидом.

Терапия пациентов с ЦП бемитилом (рис. 3.61, VII группа) приводила к 2–х кратному увеличению среднего числа остатков глюкозы в молекулах гликогена и примерно такому же уменьшению количества молекул гликогена в гепатоцитах. Схожие данные были получены при определении и количества остатков глюкозы в молекулах гликогена в гепатоцитах пациентов с ХВГ при лечении их БМ (рис. 3.61, IV группа).

Причины уменьшения размера молекул гликогена и увеличения их числа в гепатоцитах при ЦП не ясны. Известно, однако, что процесс деградации гликогена в первую очередь затрагивает относительно более мелкие  $\beta$ -частицы и в меньшей степени крупные  $\alpha$ -частицы (Sullivan et al., 2014). Подобный вывод подтверждается, кроме того, тем, что ГФ более активна в гликогене с меньшим молекулярным весом (Stetten, Stetten, 1958). Данные по включению меченой глюкозы в гликоген также указывают на то, что скорость метаболизма его более крупных молекул ниже, чем мелких (Geddes et al., 1977). Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что площадь поверхности молекул гликогена, которая увеличивается с уменьшением их размера, может играть важную роль в контроле его деградации. Исходя из сказанного, можно предположить, что уменьшение размера молекул гликогена при ЦП представляет адаптивную реакцию, позволяющую увеличить скорость метаболизма гликогена.

ЦП обычно заканчивается развитием печеночной недостаточности и/или приводит к образованию гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) или злокачественных опухолей в других органах (Kalaitzakis et al., 2011; Ganne-Carrié, Nahon, 2019). Риск развития ГЦК у больных с ЦП в 26-60 раз выше, чем в общей популяции (Sorensen et al., 1998; Kalaitzakis et al., 2011). Поэтому многие исследователи, главным образом, на основании данных морфологического анализа считают ЦП предканцерогенным состоянием (Anthony, 1978; Roncalli et al., 2011; Hytiroglu et al., 2012; Niu et al., 2017). ГЦК — один из наиболее смертоносных раков человека. Хроническая инфекция вирусами гепатита В или С, продукты питания, содержащие афлатоксины, продуцируемые микромицетами, нарушения обмена веществ, диабет и чрезмерное употребление алкоголя являются основными стимулами хронического воспаления печени, которое приводит к фиброзу (и) или циррозу, и в конечном счете к развитию ГЦК у человека (рис. 3.62).

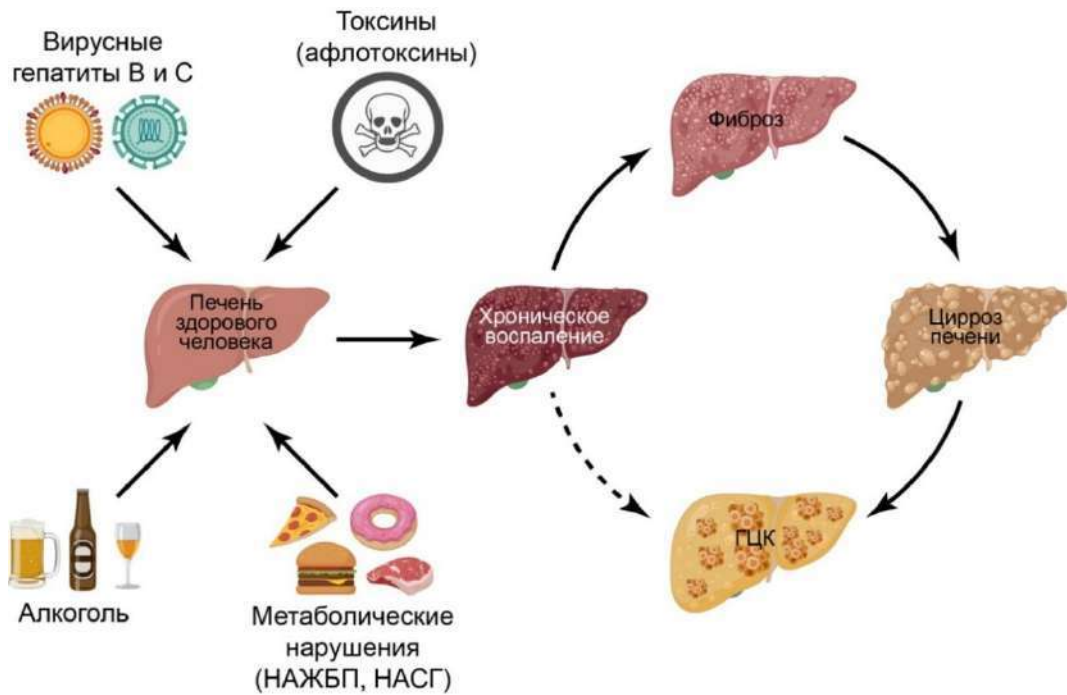


Рисунок 3.62 — Факторы риска для развития ГЦК у человека. HCV — вирус гепатита С, HBV — вирус гепатита В; неалкогольная жировая болезнь печени, NAFLD, неалкогольный стеатогепатит, NASH (Jilkova et al., 2019).

ГЦК — опухоль с очень высоким уровнем метаболизма, потребляющая гораздо больше кислорода, чем окружающая ее нормальная ткань (Guo et al., 2020). Поэтому, несмотря на сильную васкуляризацию, скорость диффузии  $O_2$  в опухоли часто оказывается недостаточной, что приводит к формированию гипоксического микроокружения клеток. Показано, что средний уровень оксигенации в ГЦК составляет ~0,8 % (McKeown, 2014; Chen, Lou, 2017), тогда как в окружающей нормальной ткани он колеблется в пределах 4,0–7,3 % (Leary et al., 2002; Brooks et al., 2004). Фактор гипоксии играет ключевую роль в неоангиогенезе, прогрессии, инвазии и метастазировании опухоли (Hockel, Vaupel, 2001; Liu et al., 2017; Lin et al., 2018; Al Tameemi et al., 2019; Guo et al., 2020; Zhang et al., 2020; Emami Nejad et al., 2021; Cramer, Vaupel, 2022).

Естественно предположить, что гепатоканцерогенез, развивающийся в условиях гипоксии, приведет к глубокой перестройке углеводного обмена в ГЦК и окружающих опухоль клетках печени, которая будет сопровождаться заметными изменениями содержания гликогена и активности ферментов его метаболизма. Однако данные о содержании гликогена в опухолевых клетках противоречивы. С одной стороны, было показано, что содержание гликогена в злокачественных клетках печени, для которых

накопление гликогена в норме является одной из основных дифференцированных функций, находится на низком уровне или даже отсутствует (Su, Bannasch, 2003; Takegoshi et al., 2016; Berndt et al., 2021). Полагают, что уменьшение запасов гликогена в этом случае связано с процессом трансформации пренеопластических гепатоцитов в опухолевые клетки. Злокачественная трансформация гепатоцитов в ходе длительного гепатоканцерогенеза ведет к фундаментальному изменению углеводного метаболизма, следствием которого является постепенное уменьшение первоначально высокого содержания гликогена в клетках (Bannasch et al., 1984; Bannasch, 2010; Harjes, 2022). Показано, что у мышей с ГЦК, полученной действием нитрозамина, существует обратная корреляция между размером опухоли и содержанием в ней гликогена, т.е. опухоли меньшего размера имеют значительно бóльшие запасы гликогена, в то время как опухоли большего размера содержат меньше гликогена. Аналогичным образом, в срезах опухоли печени человека окрашивание гликогена очень часто наблюдали в небольших узелках, но редко обнаруживали в более крупных опухолях. Несмотря на высокую вариабельность между индивидуумами, в большинстве случаев содержание гликогена было увеличено на стадии I (ранняя стадия), но резко снижено на более поздних стадиях развития ГЦК человека (стадия II, стадия III и стадия IV) по сравнению с соседними нормальными тканями. Кроме того, обнаружено, что расположение очагов клеток, содержащих гликоген, коррелирует с группами альфа-фетопротейин-позитивных клеток в этих срезах печени (Liu et al., 2021). Полученные данные позволяют предположить, что гликоген, как энергетический резерв глюкозы, расходуется на пролиферацию и рост злокачественных клеток в ходе прогрессии ГЦК.

Считается, что высокие уровни гликогена являются ключевым событием для инициации онкогенетических процессов в ходе злокачественной трансформации клеток в печени (Cui et al., 2021; Liu et al., 2021; Davidson et al., 2022). Накопление гликогена в раковых клетках способствует их выживанию в гипоксической среде со скудным поступлением питательных веществ и дает возможность поддерживать высокую пролиферативную активность, усиливать инвазию и миграцию (Favaro et al., 2012; Zois, Harris, 2016; Althemus et al., 2019; Curtis et al., 2019). Показано, что ингибирование метаболизма гликогена вызывает гибель раковых клеток, в то время как увеличение накопления гликогена ускоряет онкогенез (Dukhande et al., 2018; Barot et al., 2019; Liu et al., 2021).

Таким образом, содержание гликогена в клетках печени может служить маркером ранней диагностики и прогноза ГЦК. Поэтому разработка лечебных мероприятий, направленных на снижение уровней гликогена в опухолевых клетках, может представлять стратегическую основу для терапии ГЦК. Вместе с тем, использование данных о содержании гликогена в опухолевой печени для прогноза течения и исхода ГЦК требует более детальной отработки метода количественного определения гликогена в опухолевых клетках и тщательного изучения его метаболизма.

В настоящее время почти все исследования содержания гликогена в ГЦК основано на визуальной оценке интенсивности окрашивания срезов ткани или клеток с помощью PAS-реакции. При этом во многих работах с использованием PAS-реакции авторы применяли очень короткое время окисления препаратов в йодной кислоте (5–10 мин), а продолжительность окрашивания в реактиве Шиффа составляла всего 10–15 мин (Jiang et al., 2010; Favaro et al., 2012; Chen et al., 2019; Curtis et al., 2019; Chen et al., 2020; Tang et al., 2021; Liu et al., 2021). Между тем, давно известно, что для полного выявления гликогена в клетках необходимо использовать более длительное окисление препаратов в йодной кислоте, а продолжительность их окрашивания в реактиве Шиффа должна составлять ~ 90 мин (Кудрявцева и др., 1972; Gahrton et al., 1975). Это связано с тем, что быстрое PAS-окрашивание препаратов, используемое многими авторами, позволяет определять лишь небольшую часть гликогена в клетках (см. раздел 3.3) и не дает возможности исследовать его структуру в ткани.

Одним из ключевых факторов, способствующих усилению гликолиза в опухолевых и не опухолевых клетках печени, является низкая активность Г-6-Фазы. Снижение активности этого фермента ослабляет продукцию эндогенной глюкозы и приводит к накоплению в клетках Г-6-Ф (Sun et al., 2009). Избыток глюкозо-6-фосфата усиливает гликолиз, увеличивает синтез жирных кислот, мочевой кислоты и лактата, а также, вследствие накопления гликогена и липидов, вызывает гепатомегалию и в конечном счете приводит к развитию опухоли (Gjorgjieva et al., 2016; Cho et al., 2018). Особенно четко это проявляется при гликогенозе 1-го типа (болезнь фон Гирке). При этой наследственной болезни, связанной с дефицитом Г-6-Фазы, гепатоциты накапливают огромное количество гликогена (Beaty et al., 2002).

Показано, что активность Г-6-Фазы в ГЦК человека составляет ~ 47 % от уровня контроля (Taketa et al., 1976). Однако еще более низкая активность Г6Фазы по

сравнению с нормой была найдена в ГЦК сурков. Используя естественную модель ГЦК, развивающуюся в ходе онтогенеза у североамериканских лесных сурков *Marmota monax*, было установлено, что активность Г-6-Фазы в самой опухоли составляет 17 %, а в нормальной ткани печени, окружающей ГЦК, — 59,4 % по сравнению с активностью фермента в печени здоровых животных (Kuang et al., 2006).

Считается, что четыреххлористый углерод ( $CCl_4$ ), который использовался в нашей работе для получения ЦП у крыс, не является генотоксическим агентом (Lee et al., 2013). Поэтому, чтобы вызвать ГЦК у животных  $CCl_4$  обычно используют в комбинации с каким-либо генотоксическим агентом, чаще всего с ДЭН, диэтилнитрозамином (Santos et al., 2017; Jilkova et al., 2019). Однако, несмотря на то что  $CCl_4$  не является генотоксическим агентом, свободные радикалы  $CCl_3^*$  и  $Cl^*$ , образующиеся при его микросомальном окислении (Britton, Vascon, 1994), приводят к разрушению клеточных структур, которое сопровождается воспалением, фиброзом и усилением пролиферации клеток в печени. При длительном воздействии  $CCl_4$  на печень все эти процессы значительно увеличивают риск генетических ошибок и могут привести к формированию ГЦК. Показано, что внутрижелудочное введение  $CCl_4$  крысам в течение 30-ти недель вызывало образование ГЦК у 30–40% животных (Frezza et al., 1994). Фуджи с соавторами наблюдали множество хорошо сформированных ГЦК на поверхности печени после 15–17 нед воздействия на мышей  $CCl_4$  (Fujii et al., 2008). Повторные инъекции  $CCl_4$  мышам в течение двух лет приводили к формированию 50% НСС (Zhao et al., 2015), но 100%-ое развитие опухоли наблюдали у мышей после одновременного введения ДЭН и  $CCl_4$  (Uehara et al., 2014).

Полученные в нашей работе данные свидетельствуют о том, что, несмотря на отсутствие генотоксичности  $CCl_4$ , продолжительное хроническое воздействие этого агента вызывает изменения структуры и метаболизма печени очень схожие с теми, которые наблюдаются в ходе развития ГЦК:

- 1) Узелковая пролиферация и атипизм гепатоцитов.
- 2) Усиление ПОЛ и продукции АФК.
- 3) Истощение антиоксидантных систем.
- 4) Концентрация внутренних мембран митохондрий значительно ниже, чем в норме.
- 5) Интенсивный гликолиз.

- 6) Крайне низкая активность глюкокиназы.
- 7) Низкая активность глюкозо-6-фосфатазы.
- 8) Низкая активность гликогенфосфорилазы.
- 9) Высокие уровни гликогена в гепатоцитах.

Таким образом, можно заключить, что результаты настоящей работы подтверждают вывод многих авторов о том, что ЦП является предканцерогенным состоянием и что главной предпосылкой для формирования первичного рака печени (ГЦК) является наличие цирроза. Выявленные изменения в структуре и метаболизме гепатоцитов при ЦП являются необходимым условием для старта развития и прогрессии ГЦК. Не хватает только «нажатия на спусковой крючок», т.е. изменений в генетическом аппарате клеток.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ежегодная гибель от болезней печени составляет около 4 % от всех смертей в мире (Devarbhavi et al., 2023). Цирроз (ЦП), наряду с гепатоцеллюлярной карциномой (ГЦК), представляет конечную необратимую стадию хронических прогрессирующих заболеваний печени. Алкоголь и гепатотропные вирусы являются не только главными, но и наиболее древними этиологическими факторами ЦП. Виноделие и вместе с ним неумеренное потребление алкоголя появилось 8–10 тысяч лет тому назад, еще в эпоху неолита (Leibowitz, 1967; Nikolova et al., 2018; Hirst, 2019). Столь же давним оказалось и присутствие в костных фрагментах и мумиях человека гепатотропного вируса В (Simmonds, 2001; Souza et al., 2014; Locarnini et al., 2021; Trovao, 2022). В последнее время всё более значительную роль в формировании ЦП начинают играть медикаментозные поражения печени (Leise et al., 2014; Wang et al., 2021) и ее неалкогольная жировая болезнь, затрагивающая четверть взрослого населения планеты (Farrell et al., 2006; Zhai et al., 2021b; Nouredin, Harison, 2023). Хотя печень не является основным органом-мишенью для вируса COVID-19, популяционный анализ показал, что смертность от ЦП во время пандемии выросла. Предполагают, однако, что этот рост обусловлен повышением потребления алкоголя (Ye et al., 2022; Huang et al., 2023).

ЦП — это не только сильные страдания самих больных, но также огромные экономические затраты на их лечение и содержание. Прогноз для пациентов с ЦП зависит от целого ряда факторов, включая этиологию, тяжесть, тип и выраженность осложнений, наличие сопутствующих заболеваний. Средняя продолжительность жизни пациентов с компенсированным ЦП составляет 9–12 лет, тогда как при декомпенсированном ЦП не превышает 3-х лет (Zipprich et al., 2012). Возраст большинства больных ЦП находится в интервале от 40 до 60 лет (Sajja et al., 2014), но в течение последних десятилетий ЦП «молодеет», поражая наиболее активную, полезную и продуктивную часть населения различных стран.

Цирроз очень трудно поддается терапии. В настоящее время существует лишь два пути лечения ЦП, каждый из которых имеет свои достоинства и недостатки. Один из них — замена пораженной циррозом печени донорской. Трансплантация печени или ее части является второй по распространенности операцией замены органов, а средняя выживаемость пациентов через 1 год и 5 лет после операции составляет 82–85 % и 68–



70 % соответственно, достигая у отдельных пациентов 20-ти и более лет (Roberts et al., 2004; Onghena et al., 2016; Shavelle et al., 2021). Несмотря на огромные успехи в области трансплантологии, ее нынешние темпы удовлетворяют менее 10 % мировых потребностей в пересадке печени. Подобная ситуация связана, главным образом, с нехваткой подходящих доноров и финансовыми трудностями. Еще одной проблемой является длительность ожидания трансплантации, что нередко приводит к прогрессированию заболевания, формированию злокачественных новообразований и возникновению других процессов, опасных для жизни больных ЦП. Другой путь лечения ЦП заключается в выявлении поврежденных звеньев структуры и метаболизма цирротической печени, установлении механизмов этих повреждений, а также в определении методов устранения дефектов, возникших в ходе развития патологического процесса. Пока этот путь не столь радикальный и быстрый, но он представляется более фундаментальным и масштабным, нежели трансплантация печени.

Печень млекопитающих выполняет огромный объем жизненно важных функций. Поддержание на стабильно высоком уровне функциональной активности патологически измененной печени требует большого притока энергии, что в условиях гипоксии и глубокой структурной перестройки представляет серьезную проблему. Энергетический обмен в гепатоцитах при ЦП отличается резистентностью к инсулину и преимущественным окислением жиров вместо глюкозы и белков, характерными для длительного голодания. В итоге перестройка окислительного метаболизма и гипоксия приводят к падению функциональной активности митохондрий гепатоцитов, где образуется большая часть АТФ, почти вдвое. Этот факт согласуется с наличием обратной корреляции между тяжестью поражения печени и уровнем затрат энергии в организме больных ЦП (Schneeweiss et al., 1990). С другой стороны, запасы гликогена, важного источника энергии для гепатоцитов, увеличиваются при усилении тяжести заболевания и могут достигать уровней, превышающих норму в несколько раз.

Синтез гликогена в гепатоцитах цирротической печени осуществляется, главным образом, непрямым путем, за счет глюконеогенеза, а его инициация и дальнейшее накопление в клетках происходят на фоне стабильно низкой активности гликогенфосфорилазы *a* (ГФа). Гликоген начинает синтезироваться на периферии гепатоцитов, а в процессе гликогенеза его вновь синтезированные молекулы перемещаются к центру клеток, замещаясь новыми. Как в норме, так и при ЦП, в

течение всего гликогенеза содержание гликогена в гепатоцитах коррелирует с уровнем плоидности клеток. В то же время, если в нормальной печени содержание гликогена в гепатоцитах связано с размером (массой) клеток, то при ЦП подобная зависимость отсутствует. Развитие ЦП сопровождается увеличением (в 7–9 раз) в гепатоцитах числа молекул гликогена и 2–3-кратным уменьшением в них остатков глюкозы. При этом число молекул гликогена в гепатоцитах увеличивается по мере усиления тяжести заболевания, а упаковка остатков глюкозы становится более плотной.

Практически все многочисленные функции печени выполняются гепатоцитами, поэтому их количество и метаболическая активность чрезвычайно важны для нормального функционирования органа. В ходе развития ЦП повреждающий агент вызывает непрерывную гибель гепатоцитов и образование их *de novo*. Хотя скорости гликолиза и пентозофосфатного пути, промежуточные продукты которых необходимы для высокой пролиферативной активности гепатоцитов, значительно возрастают при ЦП, этого оказывается недостаточно, чтобы снизить гибель клеток. Общее количество образовавшихся в ходе развития ЦП новых клеток превышает их исходное число у крыс примерно в 4–5 раз, а у человека ~ в 1,5 раза. Тем не менее, несмотря на высокий оборот, гибель гепатоцитов в ходе развития ЦП значительно превышает их восполнение. В цирротической печени человека возмещение утраченных клеток происходит за счет пролиферации мелких диплоидных гепатоцитов, тогда как у крыс, помимо пролиферации гепатоцитов, заметный вклад в репаративный рост печени вносят их полиплоидизация и гипертрофия. В отличие от печени человека, где убыль гепатоцитов при развитии ЦП означает значительную потерю паренхимы, масса паренхимы у крыс вследствие увеличения плоидности и гипертрофии клеток цирротической печени практически не изменяется.

Полученные данные позволяют заключить, что при формировании цирроза одним из ключевых событий является ослабление глюкостатической функции печени. Усиление глюконеогенеза и гликолиза при ЦП сопровождается снижением продукции глюкозы печенью, значительным гликогенозом гепатоцитов и существенным изменением структуры молекул гликогена.

## ВЫВОДЫ

1. В процессе гликогенеза сухая масса гепатоцитов и содержание в них гликогена, как в нормальной, так и в цирротической печени крыс, изменяются пропорционально дозе генов.
2. В нормальной печени человека и крыс содержание гликогена в гепатоцитах соразмерно с массой клетки, тогда как в цирротической печени подобная зависимость отсутствует.
3. Разработан оригинальный микрофлуориметрический метод, позволяющий оценить структуру  $\beta$ -частиц (молекул) гликогена в отдельных гепатоцитах.
4. В гепатоцитах нормальной печени крыс накопление гликогена на ранних стадиях гликогенеза связано с синтезом новых  $\beta$ -частиц, а на поздних — с добавлением глюкозных остатков к уже имеющимся частицам. При циррозе изменение содержания гликогена в гепатоцитах в течение гликогенеза обусловлено заполнением внешних ярусов  $\beta$ -частиц.
5. Увеличение содержания гликогена в гепатоцитах человека в ходе развития цирроза печени связано, главным образом, с образованием  $\beta$ -частиц *de novo*.
6. В гепатоцитах крыс, по мере развития цирроза, расстояние между цепями глюкозных остатков в  $\beta$ -частицах гликогена увеличивается, а в гепатоцитах человека — уменьшается.
7. Расстояние между внешними ярусами  $\beta$ -частиц по мере их заполнения остатками глюкозы уменьшается, что подтверждает гипотезу о саморегулируемости размера частиц.
8. В постабсорбтивном периоде пищевого цикла содержание гликогена в гепатоцитах пациентов с сахарным диабетом 2-го типа увеличено по сравнению с нормой. Коморбидность сахарного диабета с циррозом печени не усиливает гликогеноз.
9. В отличие от крыс, у которых при формировании цирроза заметную роль играют процессы полиплоидизации и гипертрофии гепатоцитов, репаративная регенерация печени человека в ходе развития цирроза осуществляется исключительно за счет митотических делений мелких диплоидных гепатоцитов.

10. Ведущим фактором реабилитации глюкостатической функции цирротической печени является исключение патогенного воздействия. Терапия цирроза не приводит к восстановлению исходной архитектоники, дольковой структуры печени.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- АДФ — аденозидифосфат  
АлАТ — аланинаминотрансфераза  
АМФ — аденозинмонофосфат  
АсАТ — аспартатаминотрансфераза  
АТФ — аденозинтрифосфат  
АФК — активные формы кислорода  
БМ — бемитил (2-этилтиобензимидазола гидробромид)  
ВФ — ветвящий фермент  
Г-1-Ф — глюкозо-1-фосфат  
Г-6-Ф — глюкозо-6-фосфат  
Г-6-Фаза — глюкозо-6-фосфатаза  
ГБ — гликогеновая болезнь  
ГДФ — гуаниндифосфат  
ГК — глюкокиназа  
Гн — гликогенин  
ГС — гликогенсинтаза  
ГТФ — гуанитрифосфат  
ГФ — гликогенфосфорилаза  
ГФа — активная форма гликогенфосфорилазы  
ГЦК — гепатоцеллюлярная карцинома  
ДВФ — деветвящий фермент  
ДК — диеновые конъюгаты  
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота  
ДЭН — диэтилнитрозамин  
КВММ — концентрация внутренних мембран митохондрий  
ЛД-фракция — легкодоступная фракция гликогена  
ЛПОНП — липопротеины очень низкой плотности  
МГ — макрогликоген  
МДА — малоновый диальдегид  
мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота

Н — норма  
НАЖБП — неалкогольная жировая болезнь печени  
ОБ — общий билирубин  
ОПМ — объемная плотность митохондрий  
ПГ — прогликоген  
ПОЛ — перекисное окисление липидов  
СГ — суммарный гликоген  
СД — сахарный диабет  
СМ — сухая масса  
СОД — супероксиддисмутаза  
ТД-фракция — труднодоступная фракция гликогена  
ТХУ — трихлоруксусная кислота  
УДФ — уридиндифосфат  
УДФ-глюкоза — уридиндифосфат глюкоза  
УП — углеводное питание  
УТФ — уридинтрифосфат  
Фн — неорганический фосфор  
ФФК — фосфруктокиназа  
Фр-1,6-дФ — фруктозо-1,6-дифосфатаза  
ХВГ — хронический вирусный гепатит  
ХГ — хронический гепатит  
ХГЧ — хорионический гонадотропин человека  
цАМФ — циклический аденозинмонофосфат  
ЦЗ — центральная зона дольки печени  
ЦП — цирроз печени  
ЧГ — частичная гепатэктомия  
шЭПР — шероховатый эндоплазматический ретикулум  
ЩФ — щелочная фосфатаза  
ЭМ — электронная микроскопия  
ЯМР — ядерный магнитный резонанс  
АВ — acceptor bleaching  
Ас — акцептор

Don — донор

FRET — Förster resonance energy transfer

GKRP — регуляторный белок глюкокиназы

PAS — Periodic Acid-Schiff

WT — дикий фенотип

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Анацкая, О.В. Межвидовая вариабельность уровня ploидности гепатоцитов и кардиомиоцитов млекопитающих и птиц и ее причины: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.25 / Ольга Владимировна Анацкая. — Санкт-Петербург, 1999. — 28 с.
2. Арефьева, А.М. Плоидность и гипертрофия мышечных клеток при инфаркте и пороках сердца человека / А.М. Арефьева, В.Я. Бродский, Д.С. Саркисов, Н.В. Панова, И.Г. Гвазова // Цитология. — 1993. — Вып. 35. — С. 55.
3. Аршавский, И.А. Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития / И.А. Аршавский. — М.: Наука, 1982. — 270 с.
4. Байдюк, Е.В. Характеристика клеточных популяций сердца и печени при хронической сердечной недостаточности: дис. ... канд. биол. наук: 03.03.04 / Екатерина Викторовна Байдюк. — Санкт-Петербург, 2013. — 145 с.
5. Безбородкина, Н.Н. Морфометрия митохондриального аппарата гепатоцитов нормальной и цирротически измененной печени / Н.Н. Безбородкина, С.В. Оковитый, М.В. Кудрявцева, О.В. Кирик, И.В. Зарубина, Б.Н. Кудрявцев // Цитология. — 2008. — Т. 50, вып. 3. — С. 228–236.
6. Безбородкина, Н.Н. 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 // Цитология. — 2009а. — Т. 51(5). — С. 417–427.
7. Безбородкина, Н.Н. Применение реактивов типа Шиффа с различными спектральными характеристиками для определения легкодоступной и труднодоступной фракций гликогена в отдельных гепатоцитах / Н.Н. Безбородкина, Е.И. Киршина, Е.В. Мушинская, Б.Н. Кудрявцев // Цитология. — 2009б. — Т. 51(12). — С. 1025–1035.
8. Белобородова, Е.И. Всасывательная функция кишечника при циррозах печени / Е.И. Белобородова // Клин. мед. — 1978. — Вып. 56. — С. 61–65.
9. Бенеке, Г. Применение интерференционной микроскопии для исследования биологических объектов. Введение в количественную цитохимию / Г. Бенеке. — М.: Мир, 1969. — С. 70–92.
10. Бобылева, Н.А. Изучение особенностей восстановительных процессов в печени после многократных резекций органа / Н.А. Бобылева, Е.А. Ладыгина // Сб. науч.



трудов под ред. Б.П. Солопаева «Проблема регенерации патологически измененных органов и обратимости патологических изменений». — Горький: [б. и.], 1975. — Вып. 66. — С. 141–146.

11. Богданова, М.С. Оценка относительного вклада процессов пролиферации, полиплоидизации и гипертрофии клеток в увеличении массы печени на разных стадиях постнатального развития крыс / М.С. Богданова, М.В. Кудрявцева, И.М. Кузнецова, Т.М. Шалахметова, Е.Э. Завадская, Г.А. Сакута, Б.Н. Кудрявцев // Цитология. — 1990. — Т. 32(7). — С. 695–703.

12. Бреслер, В.М. Нормальная и патологическая цитология паренхимы печени / В.М. Бреслер, Н.А. Черногрядская, Е.М. Пильщик. — Л.: Наука, 1969. — 272 с.

13. Бродский, В.Я. Трофика клетки / В.Я. Бродский. — М.: Наука, 1966. — 355 с.

14. Бродский, В.Я. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка / В.Я. Бродский, И.В. Урываева. — М.: Наука, 1981. — 259 с.

15. Верин, В.К. Дивергентная дифференцировка гепатоцитов и холангиоцитов в эмбриональном и репаративном гистогенезе печени: дис. ... докт. мед. наук: 03.00.11 / В.К. Верин. — Ленинград, 1984. — 280 с.

16. Высоцкая, Р.А. Значение аденилатциклазной системы печени в развитии ее хронических поражений / Р.А. Высоцкая, А.С. Логинов, Г.Г. Варванина, А.Ю. Пиленицын // Бюл. Эксп. Биол. Мед. — 1998. — Т. 125. — С. 450–453.

17. Гайворонская, В.В. Влияние бемитила, этомерзола и яктона на процессы регенерации печени после частичной гепатэктомии / В.В. Гайворонская, С.В. Оковитый, Е.Б. Шустов, А.В. Смирнов // Эксперим. клинич. фармакол. — 2000. — Т. 63(5). С. 34–36.

18. Гизе, А. Физиология клетки / А. Гизе. — М.: Изд. иностр. лит., 1959. — 455 с.

19. Готье, С.В. Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2018 году. XI сообщение регистра Российского трансплантологического общества / С.В. Готье, С.М. Хомяков // Вестник трансплантологии и искусственных органов. — 2019. — Том 21(3). — С. 7–32.

20. Давыдовский, И.В. Общая патология человека / И.В. Давыдовский. — М.: Медгиз, 1969. — 611 с.

21. Делоне, Г.В. Анализ постнатального роста печени мыши на основе учета числа гепатоцитов, их массы и пloidности / Г.В. Делоне, И.В. Урываева, В.Ф. Корецкий, В.Я. Бродский // Онтогенез. — 1987. — Т. 18. — С. 304–307.
22. Дубинина, Е.Е. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека / Е.Е. Дубинина, Л.А. Сальникова, Л.Ф. Ефимова // Лаб. Дело. — 1983. — Т. 10. — С. 30–33.
23. Дурнев, А.Д. Проблема гепатической безопасности фармакологических средств / А.Д. Дурнев, С.Б. Середенин // В кн.: Фундаментальные исследования как основа создания лекарственных средств: Тез. докл. 1 съезда Рос. науч. о-ва фармакологов. — М.: [б. и.], 1995. — С. 152.
24. Завадская, Е.Э. Сухой вес изолированных гепатоцитов человека в норме и при хроническом гепатите / Е.Э. Завадская, М.В. Кудрявцева, Б.Н. Кудрявцев, С.А. Смирнова, А.Д. Скорина // Цитология. — 1983. — Вып. 25. — С. 447–451.
25. Завадская, Е.Э. Цитологические механизмы репаративного роста печени в условиях ее хронического повреждения и частичной гепатэктомии: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.17 / Елена Эдуардовна Завадская. — Ленинград, 1989. — 22 с.
26. Завадская, Е.Э. Изменение сухого веса гепатоцитов при хронической интоксикации крыс СС14 / Е.Э. Завадская, М.В. Кудрявцева, Б.Н. Кудрявцев // Цитология. — 1989. — Т. 31. — С. 419–425.
27. Заварзин, А.А. Синтез ДНК и кинетика клеточных популяций в онтогенезе млекопитающих / А.А. Заварзин. — Л.: Наука. — 1967. — 195 с.
28. Закусов, В.В. Проблема моделирования в фармакологии / В.В. Закусов // Бюл. эксперим. Биол. мед. — 1985. — Т. 6. — С. 757–760.
29. Зиновьева, В.Н. Применение бактериальных тест-систем для оценки мутагенных и антимутагенных свойств производных бензимидазола / В.Н. Зиновьева, С.А. Никитин, О.В. Островский // В кн.: Фундаментальные исследования как основа создания лекарственных средств: Тез. докл. 1 съезда Рос. науч. о-ва фармакологов. — М.: [б. и.], 1995. — С. 170.
30. Ивантер, Э.В. Адаптивные особенности мелких млекопитающих / Э.В. Ивантер, Т.В. Ивантер, И.Л. Туманов. — Л.: Наука. — 1985. — 318 с.
31. Ивашкин, В.Т. Клинические рекомендации Российского общества по изучению печени и Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и

лечению фиброза и цирроза печени и их осложнений / В.Т. Ивашкин, М.В. Маевская, М.С. Жаркова, С.Б. Жигалова, Е.А. Киценко, Г.В. Манукьян, [и др.] // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. — 2021. — Т. 31(6). — С. 56–102.

32. Ищенко, И.Ю. Морфофункциональные изменения в тканевом микрорайоне печени и региональных лимфотических узлах у крыс Вистар с моделью хронического токсического гепатита, созданного комбинированным действием четыреххлористого углерода и этанола / И.Ю. Ищенко, С.В. Мичурина // Бюл. СО РАМН. — 2005. — Т. 155(1). — С. 62–65.

33. Карташова, О.Я. Экспериментальная патология печени / О.Я. Карташова. — Рига: Зинатне, 1985. — 148 с.

34. Колпащикова, И.Ф. Особенности морфологических изменений печени крыс и кроликов в процессе возникновения и обратного развития экспериментального цирроза / И.Ф. Колпащикова, В.А. Алымов // Сб. науч. трудов под ред. Б.П. Солопаева «Проблема регенерации патологически измененных органов и обратимости патологических изменений». Горький: [б. и.], 1970. — Вып. 32. — С. 108–110.

35. Комаров, С.А. Кинетика индекса меченых <sup>3</sup>H-тимидином ядер в развивающихся мышечных волокнах личинок тутового шелкопряда / С.А. Комаров // Цитология. — 1987. — Т. 29. — С. 845–848.

36. Кудрявцев, Б.Н. Цитофлуориметрия ДНК с этидиум бромидом-SO<sub>2</sub> / Б.Н. Кудрявцев, М.В. Кудрявцева, М.Д. Фадеева // Цитология. — 1974. — Т. 16(1). — С. 107–112.

37. Кудрявцев, Б.Н. Цитофлуориметрия. Общие принципы / Б.Н. Кудрявцев, Ю.М. Розанов // В кн.: Т.А. Детлаф (ред.). Методы биологии развития. — М.: Наука, 1974. — С. 497–500.

38. Кудрявцев, Б.Н. Цитотометрическое исследование содержания гликогена в гепатоцитах различной ploидности у взрослых крыс / Б.Н. Кудрявцев, М.В. Кудрявцева, Т.М. Шалахметова, Е.Э. Завадская, В.А. Иоффе, И.Я. Барский, Г.В. Папаян // Цитология. — 1979. — Вып. 21. — С. 218–221.

39. Кудрявцев, Б.Н. Метод определения в одной и той же клетке содержания гликогена, ДНК, <sup>3</sup>H-тимидиновой метки и сухого веса / Б.Н. Кудрявцев, М.В.

Кудрявцева, Е.Э. Завадская, Т.М. Шалахметова, С.А. Комаров, Н.И. Комарова // Цитология. — 1980. — Вып. 21. — С. 79–84.

40. Кудрявцев, Б.Н. Полиплоидия в печени человека в норме и при заболевании гепатитом / Б.Н. Кудрявцев, М.В. Кудрявцева, Е.Э. Завадская, С.А. Смирнова, А.Д. Скорина // Цитология. — 1982. — Т. 24. — С. 436–444.

41. Кудрявцев, Б.Н. Кинетика клеточной популяции паренхимы печени человека в течение постнатального развития, в период стабилизации роста и при старении / Б.Н. Кудрявцев, М.В. Кудрявцева, Г.А. Сакута, Г.И. Штейн // Цитология. — 1991. — Вып. 33. — С. 95–107.

42. Кудрявцев, Б.Н. Исследование полиплоидизации гепатоцитов при некоторых хронических заболеваниях печени у человека / Б.Н. Кудрявцев, М.В. Кудрявцева, Г.А. Сакута, А.Д. Скорина, Г.И. Штейн // Цитология. — 1993. — Т. 35. — С. 70–83.

43. Кудрявцева, М.В. Определение количества гликогена в клетках печени крыс с использованием флуоресцентного красителя аурамина 00 / М.В. Кудрявцева, Б.Н. Кудрявцев, Ю.М. Розанов // Цитология. — 1970. — Т. 12. — С. 1060–1067.

44. Кудрявцева, М.В. Влияние продолжительности окисления периодатом на интенсивность и специфичность PAS-реакции с обычным реактивом Шиффа и реагентом типа Шиффа - аурамино SO<sub>2</sub> / М.В. Кудрявцева, Б.Н. Кудрявцев, Ю.М. Розанов // Цитология. — 1972. — Т. 14. — С. 1357–1362.

45. Кудрявцева, М.В. О двух фракциях гликогена в клетках печени крыс (цитофлуориметрическое исследование) / М.В. Кудрявцева, Б.Н. Кудрявцев, Ю.М. Розанов // Цитология. — 1974. — Т. 16. — С. 851–858.

46. Кудрявцева, М.В. Цитофлуориметрическое исследование содержания гликогена и его фракций в клетках печени крыс в течение 1-й не дели постнатального онтогенеза / М.В. Кудрявцева, Т.М. Шалахметова // Цитология. — 1979. — Т. 21. — С. 566–571.

47. Кудрявцева, М.В. Метод получения изолированных клеток печени из материала прижизненных пункционных биопсий / М.В. Кудрявцева, Е.Э. Завадская, А.Д. Скорина, С.А. Смирнова, Б.Н. Кудрявцев // Лаб. дело. — 1983. — Т. 9. — С. 21–22.

48. Кудрявцева, М.В. Гликогеноз клеток печени при хроническом гепатите у человека и его диагностическое значение / М.В. Кудрявцева // Успехи гепатологии. — 1987. — Т. 13. — С. 201–211.

49. Кудрявцева, М.В. Цитофлуориметрическое исследование фракций гликогена в клетках печени больных хроническим вирусным и хроническим алкогольным гепатитами / М.В. Кудрявцева, А.Д. Скорина, Б.Н. Кудрявцев // Цитология. — 1988. — Т. 30. — С. 705–709.
50. Кудрявцева, М.В. Цитофлуориметрическое исследование содержания гликогена и его фракций в гепатоцитах больных циррозом печени различной этиологии / М.В. Кудрявцева, А.В. Емельянов, Г.А. Сакута, А.Д. Скорина, Л.А. Слепцова, Б.Н. Кудрявцев // Цитология. — 1992. — Т. 34. — С. 100–107.
51. Кудрявцева, М.В. Цитофлуориметрическое исследование содержания гликогена и активности некоторых ферментов его метаболизма в гепатоцитах человека и животных при циррозе печени и в условиях реабилитации / М.В. Кудрявцева, Г.А. Сакута, А.В. Емельянов, А.Д. Скорина, Б.Н. Кудрявцев // Цитология. — 1994. — Т. 36. — С. 200–210.
52. Кудрявцева, М.В. Гликогенообразовательная функция гепатоцитов в условиях регенерации циррозной печени крыс после частичной гепатэктомии / М.В. Кудрявцева, А.В. Емельянов, Г.А. Сакута, Б.Н. Кудрявцев // Цитология. — 1996. — Т. 38. — С. 934–948.
53. Кудрявцева, М.В. Влияние препарата “Вилон” на гликогенообразовательную функцию гепатоцитов при экспериментальном циррозе печени у крыс / М.В. Кудрявцева, Н.Н. Безбородкина, Е.Н. Сек, И.Я. Шапиро, А.Ю. Барановская, Б.Н. Кудрявцев // Цитология. — 2000. — Т. 42, вып. 8. — С. 757–763.
54. Кудрявцева, М.В. Особенности влияния бемитила на метаболизм гликогена в гепатоцитах патологически измененной печени человека / М.В. Кудрявцева, Н.Н. Безбородкина, С.В. Оковитый, О.В. Иванова, Б.Н. Кудрявцев // Цитология. — 2002а. — Т. 44(7) — С. 668–675.
55. Кудрявцева, М.В. Исследование влияния бемитила на углеводный обмен цирротически измененной печени крыс / М.В. Кудрявцева, Н.Н. Безбородкина, С.В. Оковитый, Б.Н. Кудрявцев // Цитология. — 2002б. — Т. 44. — С. 166–174.
56. Кудрявцева, М.В. Влияние гепатопротектора 2-этилтиобензимидазола гидробромида (Бемитила) на содержание гликогена в гепатоцитах цирротически измененной печени, находящихся в различных условиях микроокружения / М.В.

Кудрявцева, Н.Н. Безбородкина, С.В. Оковитый, Б.Н. Кудрявцев // Цитология. — 2004. — Т. 46(8). — С. 735–739.

57. Лиознер, Л.Д. Регенерация органов у млекопитающих / Л.Д. Лиознер. — М.: Медгиз, 1960. — 392 с.

58. Майтесян, Е.С. Сравнительный анализ функциональной активности гепатоцитов различных классов ploидности: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Ерванд Санасарович Майтесян. — Ленинград, 1983. — 22 с.

59. Мойсюк, Я.Г. Трансплантация печени в Московской области: региональный проект и реализация / Я.Г. Мойсюк, Ю.О. Малиновская, Л.В. Бельских, П.О. Богомолов, А.И. Лобаков, А.А. Аммосов, [и др.] // Альманах клинической медицины. — 2018. — Том. 46(6). — С. 572–583.

60. Моносзон, И.А. Изучение репаративной регенерации и обратимости патологического состояния цирротически измененной печени крыс при разной степени развития цирроза после различных объемов резекции печени: автореф. дис. ... канд. биол. наук / И.А. Моносзон. — Горький, 1968. — 24 с.

61. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера. Биоэнергетика и метаболизм / Д. Нельсон, М. Кокс. — М.: Бином, 2012. — Т. 2. — 640 с.

62. Новикова, Т.Е. Изменение содержания альбумина в гепатоцитах *in vitro* / Т.Е. Новикова, А.Ю. Боровков // Цитология. — 1987. — Вып. 29. — С. 236–239.

63. Оковитый, С.В. Протеинсинтетические и иммунные механизмы защитно-репаративных эффектов гепатотропных средств: дис. ... канд. мед. наук / Сергей Владимирович Оковитый. — Санкт-Петербург, 1995. — 195 стр.

64. Оковитый, С.В. Исследование гепатопротекторного эффекта бемитила на модели длительного токсического поражения печени / С.В. Оковитый, Н.Н. Безбородкина, И.В. Зарубина, О.П. Миронова, Б.Н. Кудрявцев, С.Н. Шуленин // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2006. — Т. 69(2). — С. 52–54.

65. Оковитый, С.В. Новый плеiotропный эффект симвастатина при экспериментальном стеатогепатите у крыс / С.В. Оковитый, А.В. Аркадьева, Н.Н. Безбородкина, Г.А. Сакута, М.Ю. Ярославцев, С.Н. Шуленин, Б.Н. Кудрявцев // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2007. — Т. 70(3). — С. 43–45.

66. Оковитый, С.В. Гепатопротекторы / С.В. Оковитый, Н.Н. Безбородкина, С.Г. Улейчик, С.Н. Шуленин. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 112 с.

67. Оковитый, С.В. Гепатопротекторы: руководство для врачей. 2-е изд., перераб. и доп. / С.В. Оковитый, В.А. Приходько, Н.Н. Безбородкина, Б.Н. Кудрявцев. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2022. — 240 с.

68. Олевская, Е.Р. Коморбидность больных циррозом печени: влияние на течение и исходы / Е.Р. Олевская, А.И. Долгушина, А.Н. Тарасов, А.О. Хихлова // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. — 2018. — Вып. 157(9). — С. 57–63.

69. Оттенсен, Б.В. О возрастной зависимости средней продолжительности митотического цикла и времени удвоения числа гепатоцитов в онтогенезе и при регенерации печени / Б.В. Оттенсен, В.А. Конышев, Н.Н. Пятницкий // Онтогенез. — 1980. — Т. 11. — С. 257–271.

70. Плотников, М.Б. Антигипоксические и антиокислительные свойства бемитила / М.Б. Плотников, А.С. Саратиков, Т.Н. Плотникова, В.А. Хазанов, О.П. Панина, Е.А. Кобзева, [и др.] // Бюл. эксперим. биол. мед. — 1989. — Т. 107(5). — С. 583–585.

71. Подымова, С.Д. Болезни печени. Руководство для врачей / С.Д. Подымова. — М.: Медицина, 1999. — 704 с.

72. Розанов, Ю.М. Метод флуоресцентной цитофотометрии для количественного определения ДНК / Ю.М. Розанов, Б.Н. Кудрявцев // Цитология. — 1967. — Т. 9(3). — С. 361–368.

73. Розенфельд, Е.Л. Врожденные нарушения обмена гликогена / Е.Л. Розенфельд, И.А. Попова. — М.: Медицина, 1989. — 240 с.

74. Романова, Л.А. Определение гидроперекисей липидов с помощью тиоцианата аммония / Л.А. Романова, И.Д. Стальная // В кн.: В.Н. Орехович (ред.). Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1977. — С. 64–66.

75. Рябина, З.А. Полиплоидия и гипертрофия клеток в процессах роста и восстановления / З.А. Рябина, В.А. Бенюш. — М.: Медицина, 1973. — 207 с.

76. Сакута, Г.А. Клеточные механизмы регенерации циррозной печени крыс. I. Соотношение процессов пролиферации, полиплоидизации и гипертрофии клеток после прекращения хронического воздействия  $CCl_4$  / Г.А. Сакута, Б.Н. Кудрявцев // Цитология. — 1996. — Т. 38. — С. 1158–1171.

77. Сакута, Г.А. Клеточные механизмы регенерации цирротически измененной печени крыс. II. Влияние частичной гепатэктомии на пролиферацию, полиплоидизацию и гипертрофию гепатоцитов / Г.А. Сакута, Б.Н. Кудрявцев // Цитология. — 2005. — Т. 47. — С. 379–387.
78. Саркисов, Д.С. Пути восстановления цирротически измененной печени / Д.С. Саркисов, Л.Г. Рубецкой. — М.: Медицина, 1965. — 138 с.
79. Саркисов, Д.С. Регенерация и ее клиническое значение / Д.С. Саркисов. — М.: Медицина, 1970. — 284 с.
80. Саркисов, Д.С. Несколько замечаний по поводу статьи Л.Д.Лиознера "О регенерации патологически измененных органов" / Д.С. Саркисов // Арх. патол. — 1974. — Т. 36. — С.70–72.
81. Саркисов, Д.С. О влиянии ритма действия повреждающего агента на характер репаративной регенерации печени / Д.С. Саркисов, А.А. Пальцын, И.В. Попова, А.К. Бадикова, Б.В. Втюрина // Арх. патол. — 1975. — Т. 37. — С. 80–87.
82. Саркисов, Д.С. Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций / Д.С. Саркисов. — М.: Медицина, 1987. — 446 с.
83. Саркисов, Д.С. Общая патология человека / Д.С. Саркисов, М.А. Пальцев, Н.Н. Хитров. — М.: Медицина, 1995. — 270 с.
84. Середенин, С.Б. Изучение мутагенных и антимутагенных свойств бемитила / С.Б. Середенин, Ю.Г. Бобков, А.Д. Дурнев, О.Ю. Дубовская // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1986. — Т. 102(7). — С. 76–79.
85. Скобелева, Т.В. Метаболизм основного вещества соединительной ткани на различных стадиях развития экспериментального цирроза печени / Т.В. Скобелева // Вопр. мед. химии. — 1994. — Т. 40. — С. 17–20.
86. Скулачев, В.П. Кислород в живой клетке: добро и зло / В.П. Скулачев // Рос. журн. гастр. гепатол. колопрот. — 1999. — Вып. 1. — С. 12–18.
87. Смирнов, А.В. Бемитил: механизм действия и связанные с ним эффекты / А.В. Смирнов // Физиологически активные вещества. Межвед. сб. науч. тр. — 1993. — Вып. 25. — С. 5–9.
88. Смирнов, А.В. Особенности актопротекторов как самостоятельного фармакологического класса / А.В. Смирнов // Антигипоксанты и актопротекторы: итоги и перспективы. Материалы конф. — 1994. — Вып. 3. — С. 164–166.



89. Солопаев, Б.П. Исследование обратимости острых и хронических изменений органов / Б.П. Солопаев. — М.: Медицина, 1963. — 238 с.
90. Солопаев, Б.П. Регенерация нормальной и патологически измененной печени / Б.П. Солопаев. — Горький: Волго-Вятское книжн. изд-во, 1980. — 240 с.
91. Солопаев, Б.П. Сравнительное изучение регенерации нормальных и патологически измененных органов / Б.П. Солопаев // Сравнительные аспекты изучения регенерации и клеточной пролиферации, Ч.2. — Горький, 1985. — С. 279–281.
92. Солопаева, И.М. Морфофункциональное исследование стимуляции регенерации цирротически измененной печени / И.М. Солопаева, Р.С. Риман, А.К. Чистякова, Л.С. Палигина, В.А. Ляляев, А.А. Косых, Г.В. Ануфриева // Сб. науч. трудов под ред. Б.П. Солопаева «Проблема регенерации патологически измененных органов и обратимости патологических изменений». — Горький: [б. и.], 1967. — С.331–345.
93. Солопаева, И.М. Стимуляция регенерации нормальной и патологически измененной печени: дис. ... докт. мед. наук. / И.М. Солопаева. — Горький, 1969. — 229 с.
94. Солопаева, И.М. Стимуляция регенерации патологически измененной печени и хорионический гонадотропин: Монография / И.М. Солопаева, Б. П. Солопаев. — Н. Новгород: ННГУ, 1991. — 123 с.
95. Соринсон, С.Н. Вирусные гепатиты / С.Н. Соринсон. — СПб.: Теза, 1998. — 325 с.
96. Тепперман, Дж. Физиология обмена веществ и эндокринной системы / Дж. Тепперман, Х. Тепперман. — М.: Мир, 1989. — 656 с.
97. Урываева, И.В. Анализ пролиферации диплоидных и полиплоидных клеток в регенерирующей печени мыши / И.В. Урываева, Т.Л. Маршак // Цитология. — 1969. — Вып. 11. — С. 1252–1258.
98. Фактор, В.М. Полиплоидизация гепатоцитов мышей при многократных воздействиях  $CCl_4$  / В.М. Фактор, И.В. Урываева // Бюл. exper. биол. — 1980. — Вып. 11. — С. 614–616.
99. Хачатуров, Е.Н. Применение риванола- $SO_2$  для цитофлуориметрии ДНК / Е.Н. Хачатуров, Е.А. Смирнова // Изв. Акад. Наук СССР. — 1966. — Т. 6. — С. 900–905.

100. Шалахметова Т.М. Содержание белка в гепатоцитах разной степени плоидности у крыс в постнатальный период развития / Т.М. Шалахметова, М.В. Кудрявцева, Б.Н. Кудрявцев // Цитология. — 1981. — Т. 23. — С. 674–680.
101. Шерлок, Ш. Заболевания печени и желчных путей / Ш. Шерлок, Дж. Дули. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2002. — 859 с.
102. Шмидт-Ниельсен, К. Размеры животных: почему они так важны? / К. Шмидт-Ниельсен. — М.: Мир, 1987. — 259 с.
103. Adamo, K.B. Comparison of traditional measurement with macroglycogen and proglycogen analysis of muscle glycogen / K.B. Adamo, T.E. Graham // J. Appl. Physiol. — 1998. — Vol. 84. — P. 908–913.
104. Adamo, K.B. Dietary carbohydrate and postexercise synthesis of proglycogen and macroglycogen in human skeletal muscle / K.B. Adamo, M.A. Tarnopolsky, T.E. Graham // Am. J. Physiol. — 1998. — Vol. 275(2). — P. E229–E234.
105. Agius, L. Hexokinase and glucokinase binding in permeabilized guinea-pig hepatocytes / L. Agius // Biochem. J. — 1994. — Vol. 303. — P. 841–846.
106. Ailanen, L. The metabolic syndrome in mice overexpressing neuropeptide Y in noradrenergic neurons / L. Ailanen, S.T. Ruohonen, L.H. Vahatalo, K. Tuomainen, K. Eerola, H. Salomäki-Muftari, [et al.] // J. Endocrinol. — 2017. — Vol. 234(1). — P. 57–72.
107. Ailanen, L. Metformin normalizes the structural changes in glycogen preceding prediabetes in mice overexpressing neuropeptide Y in noradrenergic neurons / L. Ailanen, N.N. Bezborodkina, L. Virtanen, S.T. Ruohonen, A.V. Malova, S.V. Okovity, [et al.] // Pharmacol. Res. Perspect. — 2018. — Vol. 6(2). — Article: e00389.
108. Aiston, S. Hepatic glycogen synthesis is highly sensitive to phosphorylase activity: evidence from metabolic control analysis / S. Aiston, L. Hampson, A.M. Gomez-Foix, J.J. Guinovart, L. Agius // J. Biol. Chem. — 2001. — Vol. 276. — P. 23856–23866.
109. Aiston, S. Glucose 6-Phosphate regulates hepatic glycogenolysis through inactivation of phosphorylase / S. Aiston, B. Andersen, L. Agius // Diabetes. — 2003. — Vol. 52. — P. 1333–1339.
110. Akatsuka, A. Comparison of the liver glycogen synthase from normal and streptozotocin-induced diabetic rats / A. Akatsuka, T.J. Singh, K.P. Huang // Arch. Biochem. Biophys. — 1983. — Vol. 220. — P. 426–434.

111. Al Tameemi, W. Hypoxia-modified cancer cell metabolism / W. Al Tameemi, T.P. Dale, R.M.K. Al-Jumaily, N.R. Forsyth // *Front Cell Dev. Biol.* — 2019. — Vol. 7. — 4.

112. Alberti, K.G. Disturbances of metabolic homeostasis in liver disease / K.G. Alberti, D.G. Johnston, M. Piniewska-Hulas, J. Whittaker // *Acta. Med. Port.* — 1981. — Vol. 2. — P. 35–47.

113. Alengrin, F. Inhibitory effects of metformin on insulin and glucagon action in rat hepatocytes involve post-receptor alterations / F. Alengrin, G. Grossi, B. Canivet, J. Dolais-Kitabgi // *Diabete Metab.* — 1987. — Vol. 13(6). — P. 591–597.

114. Alison, M.R. Application of liver stem cells for cell therapy / M.R. Alison, C. Choong, S. Lim // *Semin. Cell Dev. Biol.* — 2007. — Vol. 18(6). — P. 819–826.

115. Alonso, M.D. A new look at the biogenesis of glycogen / M.D. Alonso, J. Lomako, W.M. Lomako, W.J. Whelan // *FASEB J.* — 1995. — Vol. 9. — P. 1126–1137.

116. Alvares, F.L. Quantitative correlation of glucose uptake and phosphorylation with the activities of glucose-phosphorylating enzymes in perfused livers of fasted and fed rats / F.L. Alvares, R.C. Nordlie // *J. Biol. Chem.* — 1977. — Vol. 252(23). — P. 8404–8414.

117. Anthony, P.P. The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization / P.P. Anthony, K.S. Ishak, N.C. Nayak, H.E. Poulsen, P.J. Scheuer, L.H. Sobin // *J. Clin. Pathol.* — 1978. — Vol. 31. — P. 395–414.

118. Apisarnthanarak, P. Correlation between the severity of hepatitis B cirrhosis and CT volumetry-based hepatic segmental anatomic changes / P. Apisarnthanarak, D. Wongsawaeng, K. Muangsomboon // *J. Med. Assoc. Thai.* — 2014. — Vol. 97(8). — P. 856–862.

119. Aquino, J.B. Mesenchymal stem cells as therapeutic tools and gene carriers in liver fibrosis and hepatocellular carcinoma / J.B. Aquino, M.F. Bolontrade, M.G. García, O.L. Podhajcer, G. Mazzolini // *Gene. Ther.* — 2010. — Vol. 17(6). — P. 692–708.

120. Arden, G.B. Spare the rod and spoil the eye / G.B. Arden, R.L. Sidman, W. Arap, R.O. Schlingemann // *Review Br. J. Ophthalmol.* — 2005. — Vol. 89(6). — P. 764–769.

121. Arias, I.M. The liver: biology and pathobiology / I.M. Arias, H.J. Alte, J.L. Boyer, D.E. Cohen, D.A. Shafritz, S.S. Thorgeirsson, A.W. Wolkoff. — 6th ed. — New York, NY: John Wiley & Sons, 2020. — 1144 p.

122. Arkinstall, M.J. Regulation of fuel metabolism by preexercise muscle glycogen content and exercise intensity / M.J. Arkinstall, C.R. Bruce, S.A. Clark, C.A. Rickards, L.M. Burke, J.A. Hawley // *J. Appl. Physiol.* — 2004. — Vol. 97. — P. 2275–2283.
123. Arosio, B. Changes in expression of the albumin, fibronectin and type \* procollagen genes in CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis: effect of pyridoxol L,2-pyrrolidon-5 carboxylate / B. Arosio, D. Santambrogio, N. Gagliano, G. Annoni // *Pharmacol. Toxicol.* — 1993. — Vol. 73. — P. 301–304.
124. Arthur, M.J.P. Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C / M.J.P. Arthur // *Gastroenterology.* — 2002. — Vol. 122(5). — P. 1525–1528.
125. Aschenbach, J.R. Gluconeogenesis in dairy cows: the secret of making sweet milk from sour dough / J.R. Aschenbach, N.B. Kristensen, S.S. Donkin, H.M. Hammon, G.B. Penner // *IUBMB Life.* — 2010. — Vol. 62. — P. 869–877.
126. Asrani, S.K. Role of magnetic resonance elastography in compensated and decompensated liver disease / S.K. Asrani, J.A. Talwalkar, P.S. Kamath, V.H. Shah, G. Saracino, L. Jennings, [et al.] // *J. Hepatol.* — 2014. — Vol. 60(5). — P. 934–939.
127. Atta, H. Mutant MMP-9 and HGF gene transfer enhance resolution of CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in rats: role of ASH1 and EZH2 methyltransferases repression / H. Atta, M. El-Rehany, O. Hammam, H. Abdel-Ghany, M. Ramzy, M. Roderfeld, [et al.] // *PLoS One.* — 2014. — Vol. 9(11). — e112384.
128. Baidyuk, E.V. Morphology and function of cultured hepatocytes isolated from rats with experimental toxic hepatitis / E.V. Baidyuk, A.P. Shiryayeva, N.N. Bezborodkina, G.A. Sakuta // *Cell and Tissue Biology.* — 2009. — Vol. 3(6). — P. 565–572.
129. Ball, S. The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the establishment of plastid endosymbiosis / S. Ball, C. Colleoni, U. Cenci, J.N. Raj, C. Tirtiaux // *J. Exp. Botany.* — 2011. — Vol. 62. — P. 1775–1801.
130. Bannasch, P. Hepatocellular glycogenosis and related pattern of enzymatic changes during hepatocarcinogenesis / P. Bannasch, H.J. Hacker, F. Klimek, D. Mayer // *Adv. Enzyme Regul.* — 1984. — Vol. 22. — P. 97–121.
131. Bannasch, P. Hepatocellular glycogenosis and hepatic neoplasms / P. Bannasch // *Toxicol. Pathol.* — 2010. — Vol. 38(6). — P. 1000–1002.

132. Barot, S. Inhibition of glycogen catabolism induces intrinsic apoptosis and augments multikinase inhibitors in hepatocellular carcinoma cells / S. Barot, E.M. Abo-Ali, D.L. Zhou, C. Palaguachi, V.V. Dukhande // *Exp. Cell Res.* — 2019. — Vol. 381(2). — P. 288–300.

133. Battram, D.S. Caffeine ingestion does not impede the resynthesis of proglycogen and macroglycogen after prolonged exercise and carbohydrate supplementation in humans / D.S. Battram, J. Shearer, D. Robinson, T.E. Graham // *J. Appl. Physiol.* — 2004. — Vol. 96. — P. 943–950.

134. Beaty, R.M. Delivery of glucose-6-phosphatase in a canine model for glycogen storage disease, type Ia, with adeno-associated virus (AAV) vectors / R.M. Beaty, M. Jackson, D. Peterson, A. Bird, T. Brown, D.K. Benjamin Jr., [et al.] // *Gene Ther.* — 2002. — Vol. 15. — P. 1015–1022.

135. Beinert, H. New insights, ideas and unanswered questions concerning iron-sulfur clusters in mitochondria / H. Beinert, S.P. Albracht // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1982. — Vol. 683(3–4). — P. 245–277.

136. Belloni, A.S. A morphometric study of the effects of short-term starvation on rat hepatocytes / A.S. Belloni, P. Rebuffat, G. Gottardo, V. Meneghelli, A. Coi, G. Mazzocchi, G.G. Nussdorfer // *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* — 1988. — Vol. 20. — P. 751–757.

137. Bender, D.A. Gluconeogenesis & the Control of Blood Glucose / D.A. Bender, P.A. Mayes // In: V.W. Rodwell, D.A. Bender, K.M. Botham, P.J. Kennelly, P.A. Weil. *Harper's Illustrated Biochemistry*, 30th Edition. — N.Y.: McGraw-Hill, 2015. — Ch.19. — P. 185–195.

138. Benedetti, A. Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids / A. Benedetti, M. Comporti, H. Esterbauer // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1980. — Vol. 620. — P. 281–296.

139. Bennett, M.D. Hepatic intranuclear glycogen inclusions in western barred bandicoots (*Perameles bougainville*) / M.D. Bennett, L. Woolford, P.K. Nicholls, K.S. Warren, A.J. O'Hara // *J. Vet. Diagn. Invest.* — 2008. — Vol. 20. — P. 376–379.

140. Benyon, R.C. Is liver fibrosis reversible? / R.C. Benyon, J.P. Iredale // *Gut.* — 2000. — Vol. 46. — P. 443–446.

141. Bernard, C. Nouvelles recherches expérimentales sur les phénomènes glycogéniques du foie / C. Bernard // *Mém. Soc. Biol.*, 2e série. — 1857. — T. 4. — P. 1–7.

142. Berndt, N. Metabolic heterogeneity of human hepatocellular carcinoma: implications for personalized pharmacological treatment / N. Berndt, J. Eckstein, N. Heucke, T. Wuensch, R. Gajowski, M. Stockmann, [et al.] // *FEBS J.* — 2021. — Vol. 288(7). — P. 2332–2346.

143. Bernelli-Zazzera, A. Some aspects of glycogen metabolism following reversible or irreversible liver ischemia / A. Bernelli-Zazzera, G. Gaja // *Exp. Mol. Pathol.* — 1964. — Vol. 3. — P. 351–368.

144. Berteloot, A. Rapid kinetics of liver microsomal glucose-6-phosphatase / A. Berteloot, H. Vidal, G. Van de Werve // *J. Biol. Chem.* — 1991. — Vol. 266. — P. 5497–5507.

145. Bezborodkina, N.N. Analysis of structure of glycogen in rat hepatocytes using cytochemical and FRET methods / N.N. Bezborodkina, G.I. Shtein, E.V. Sivova, A.Yu. Chestnova, B.N. Kudryavtsev // *Cell and Tissue Biology.* — 2011. — Vol. 5(5). — P. 417–427.

146. Bezborodkina N.N. Glycogen metabolism during chronic liver diseases / N.N. Bezborodkina, A.Yu. Chestnova, B.N. Kudryavtsev // In: P.L. Weiss, B.D. Faulkner (Eds). *Glycogen: Structure, Functions in the Body and Role in Disease.* — New York: NOVA Publishers, 2013a. — P. 47–79.

147. Bezborodkina, N.N. Hepatocytes of cirrhotic rat liver accumulate glycogen more slowly than normal ones / N.N. Bezborodkina, S.V. Okovity, A.Yu. Chestnova, B.N. Kudryavtsev // *Hepatol. Int.* — 2013b. — Vol. 7. — P. 1084–1090.

148. Bezborodkina, N.N. Activity of glycogen synthase and glycogen phosphorylase in normal and cirrhotic rat liver during glycogen synthesis from glucose or fructose / N.N. Bezborodkina, A.Yu. Chestnova, S.V. Okovity, B.N. Kudryavtsev // *Exp. Toxicol. Pathol.* — 2014. — Vol. 66. — P. 147–154.

149. Bezborodkina, N.N. Glycogen content in hepatocytes is related with their size in normal rat liver but not in cirrhotic one / N.N. Bezborodkina, A.Yu. Chestnova, M.L. Vorobev, B.N. Kudryavtsev // *Cytometry Part A.* — 2016. — Vol. 89(4). — P. 357–364.

150. Bezborodkina, N.N. Spatial structure of glycogen molecules in cells / N.N. Bezborodkina, A.Y. Chestnova, M.L. Vorobev, B.N. Kudryavtsev // *Biochemistry (Moscow).* — 2018. — Vol. 83(5). — P. 467–482.

151. Bezborodkina, N.N. Cytochemical analysis of spatial structure of glycogen molecules in rat hepatocytes / N.N. Bezborodkina, A.V. Stepanov, M.L. Vorobev, A.Yu. Chestnova, G.I. Stein, B.N. Kudryavtsev // *Journal of Molecular Structure*. — 2021a. — Vol. 1228. — Article 129770.

152. Bezborodkina N.N. Postprandial glycogen content is increased in the hepatocytes of human and rat cirrhotic liver / N.N. Bezborodkina, S.V. Okovity, B.N. Kudryavtsev // *Cells*. — 2021b. — Vol. 10(5). — Article 976.

153. Bezborodkina, N.N. Dynamics of the glycogen  $\beta$ -particle number in rat hepatocytes during glucose refeeding / N.N. Bezborodkina, A.V. Stepanov, M.L. Vorobev, G.I. Stein, S.V. Okovityi, B.N. Kudryavtsev // *Int. J. Mol. Sci.* — 2022. — Vol. 23. — 9263.

154. Bhanudas K.S. Estimation of liver glycogen in normal control, diabetic control and *Tinospora cordifolia* extract treated albino rats / K.S. Bhanudas, P.K. Gopal // *Global Journal of Science Frontier Research*. — 2016. — Vol. XVI(II). — P. 17–20.

155. Biorn, A.C. The amino-terminal tail of glycogen phosphorylase is a switch for controlling phosphorylase conformation, activation, and response to ligands / A.C. Biorn, D.J. Graves // *Biochemistry*. — 2001. — Vol. 40. — P. 5181–5189.

156. Bioulac-Sage, P. Liver and biliary-tract histology / P. Bioulac-Sage, B. Le Bail, C. Balabaud // In: J. Bircher, J.-P. Benhamou, N. McIntyre, M. Rizzetto, J. Rodes (Eds.). *Oxford textbook of clinical hepatology* (2 volumes). Oxford, UK: Oxford University Press, 1999. — Vol.1. — P. 13–23.

157. Bischof, M.G. Hepatic glycogen metabolism in type 1 diabetes after long-term near normoglycemia / M.G. Bischof, E. Bernroider, M. Krssak, M. Krebs, H. Stingl, P. Nowotny, [et al.] // *Diabetes*. — 2002. — Vol. 51. — P. 49–54.

158. Bishop, J.S. Inability of insulin to activate liver glycogen transferase D phosphatase in the diabetic pancreatectomized dog / J.S. Bishop // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1970. — Vol. 208. — P. 208–218.

159. Bloom, W.L. Glycogen fractions of liver and muscle / W.L. Bloom, G.T. Lewis, M.Z. Schumpert, T.M. Shen, // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 188. — P. 631–636.

160. Bloom, W.L. Muscle glycogen fractions during stimulation / W.L. Bloom, G.C. Knowlton // *Am. J. Physiol.* — 1953. — Vol. 73(3). — P. 545–546.

161. Bois-Joyeux, B. Age-dependent glycolysis and gluconeogenesis enzyme activities in starved-refeed rats / B. Bois-Joyeux, M. Chanez, J. Peret // *Diabete Metab.* — 1990. — Vol. 16. — P. 504–512.

162. Bollen, M. Effects of glucose on phosphorylase and glycogen synthase in hepatocytes from diabetic rats / M. Bollen, L. Hue, W. Stalmans // *Biochem. J.* — 1983. — Vol. 210. — P. 783–787.

163. Bosshard, U. Fluorescence microscopic measurement of the dna content of the cell nucleus / U. Bosshard // *Z. Wiss. Mikrosk.* — 1964. — Vol. 65. — P. 391–408.

164. Böhm, N. Fluorescence cytophotometry: a valuable method for the quantitative determination of nuclear Feulgen-DNA / N. Böhm, E. Sprenger // *Histochemie.* — 1968. — Vol. 16(2). — P. 100–118.

165. Bradford, M.M. A rapid and simple method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Anal. Biochem.* — 1976. — Vol. 72. — P. 248–254.

166. Bravo, E. Evaluation of the spontaneous reversibility of carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in rabbits / E. Bravo, E. D'Amore, F. Ciaffoni, C.L. Mammola // *Laboratory Animals.* — 2012. — Vol. 46. — P. 122–128.

167. Brewer, K.M. Brain glycogen structure and its associated proteins: past, present and future / K.M. Brewer, M.S. Gentry // In: M. DiNuzzo, A. Schousboe (Eds). *Brain Glycogen Metabolism. Advances in Neurobiology, volume 23.* — Cham, Switzerland: Springer, 2019. — P. 17–81.

168. Britton, R.S. Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis / R.S. Britton, B.R. Bacon // *Hepatogastroenterology.* — 1994. — Vol. 41(4). — P. 343–348.

169. Brocklehurst, K.J. Stimulation of hepatocyte glucose metabolism by novel small molecule glucokinase activators / K.J. Brocklehurst, V.A. Payne, R.A. Davies, D. Carroll, H.L. Vertigan, H.J. Wightman, [et al.] // *Diabetes.* — 2004. — Vol. 53. — P. 535–541.

170. Brodsky, V.Y. Cell polyploidy: its relation to tissue growth and function / V.Y. Brodsky, I.V. Uryvaeva // *Intern. Rev. Cytol.* — 1977. — Vol. 50. — P. 275–332.

171. Brodsky, V.Y. Genome multiplication in growth and development / V.Y. Brodsky, I.V. Uryvaeva. — Cambridge Univ. Press, 1985. — 312 p.



172. Brodsky, V.Y. Ultradian rhythms in life processes: an inquiry into fundamental principles of chronobiology and psychobiology / V.Y. Brodsky. — London-New York: Springer-Verlag, 1992. — 419 p.
173. Brodsky, V.Y. Circahoralian (ultradian) metabolic rhythms / V.Y. Brodsky // *Biochemistry (Moscow)*. — 2014. — Vol. 79. — P. 483–495.
174. Bröjer, J. Synthesis of proglycogen and macroglycogen in skeletal muscle of standardbred trotters after intermittent exercise / J. Bröjer, S. Holm, R. Jonasson, U. Hedenström, B. Essén-Gustavsson // *Equine. Vet. J. Suppl.* — 2006. — Vol. 36. — P. 335–339.
175. Brooks, A.J. Liver tissue partial pressure of oxygen and carbon dioxide during partial hepatectomy / A.J. Brooks, J. Eastwood, I.J. Beckingham, K.J. Girling // *Br. J. Anaesth.* — 2004. — Vol. 92(5). — P. 735–737.
176. Brust, H. Starch and glycogen analyses: methods and techniques / H. Brust, S. Orzechowski, J. Fettke // *Biomolecules*. — 2020. — Vol. 10(7). — Article 1020.
177. Bugianesi, E. Quantification of gluconeogenesis in cirrhosis: response to glucagon / E. Bugianesi, S. Kalhan, E. Burkett, G. Marchesini, A. McCullough // *Gastroenterology*. — 1998. — Vol. 115. — P. 1530–1540.
178. Burchell, B. Reconstitution of purified Wistar rat liver bilirubin UDP-glucuronyltransferase into Gunn-rat liver microsomes / B. Burchell // *Biochem. J.* — 1982. — Vol. 201. — P. 653–656.
179. Burchell, A. The glucose-6-phosphatase system in human development / A. Burchell, R. Hume // *Histol. Histopathol.* — 1995. — Vol. 10. — P. 979–993.
180. Burra, P. Strategies for liver support: from stem cells to xenotransplantation / P. Burra, D. Samuel, J. Wendon, A. Pietrangelo, S. Gupta // *J. Hepatol.* — 2004. — Vol. 41(6). — P. 1050–1059.
181. Buzhor, E. Cell-based therapy approaches: the hope for incurable diseases / E. Buzhor, L. Leshansky, J. Blumenthal, H. Barash, D. Warshawsky, Y. Mazor, R. Shtrichman // *Regen. Med.* — 2014. — Vol. 9(5). — P. 649–672.
182. Calder, P.C. Heterogeneity of glycogen synthesis upon refeeding following starvation / P.C. Calder, R. Geddes // *Int. J. Biochem.* — 1992. — Vol. 24. — P. 71–77.

183. Callea, F. Cirrhosis of the liver. A regenerative process / F. Callea, M. Brisigotti, G. Fabbretti, R. Sciot, P. Van Eyken, M. Favret // *Digestive Diseases and Sciences*. — 1991. — Vol. 36. — P. 1287–1293.
184. Camp, J.G. Multilineage communication regulates human liver bud development from pluripotency / J.G. Camp, K. Sekine, T. Gerber, H. Loeffler-Wirth, H. Binder, M. Gac, [et al.] // *Nature*. — 2017. — Vol. 546(7659). — P. 533–538.
185. Canturk, N.Z. The protective effect of vitamin E on gastric mucosal injury in rats with cirrhosis of the liver / N.Z. Canturk, Z. Canturk, N.Z. Utkan, C. Yenisey, G. Ozbilim, T. Gelen, Y. Yalman // *Chin. Med. J. (Engl)*. — 1999. — Vol. 112. — P. 56–60.
186. Caro, J.F. Liver glucokinase: decreased activity in patients with type II diabetes / J.F. Caro, S. Triester, V.K. Patel, E.B. Tapscott, N.L. Frazier, G.L. Dohm // *Horm. Metab. Res.* — 1995. — Vol. 27. — P. 19–22.
187. Castells, A. Impact of shunt surgery for variceal bleeding in the natural history of ascites in cirrhosis: a retrospective study / A. Castells, J. Salo, J.C. Quer, A. Ginès, J. Boix, P. Ginès, [et al.] // *Hepatology*. — 1994. — Vol. 20. — P. 584–591.
188. Caudwell, F.B. Purification and subunit structure of glycogen-branching enzyme from rabbit skeletal muscle / F.B. Caudwell, P. Cohen // *Eur. J. Biochem.* — 1980. — Vol. 109. — P. 391–394.
189. Chaikuad, A. Conformational plasticity of glycogenin and its maltosaccharide substrate during glycogen biogenesis / A. Chaikuad, D. Sean Froese, G. Berridge, F. von Delft, U. Oppermann, W.W. Yue // *PNAS*. — 2011. — Vol. 108(52). — P. 21028–21033.
190. Chandramouli, C. Myocardial glycogen dynamics: new perspectives on disease mechanisms / C. Chandramouli, U. Varma, E.M. Stevens, R.-P. Xiao, D.I. Stapleton, K.M. Mellor, L.M.D. Delbridge // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* — 2015. — Vol. 42. — P. 415–425.
191. Changani, K.K. Evidence for altered hepatic gluconeogenesis in patients with cirrhosis using in vivo 31-phosphorus magnetic resonance spectroscopy / K.K. Changani, R. Jalan, I.J. Cox, M. Ala-Korpela, K. Bhakoo, S.D. Taylor-Robinson, J.D. Bell // *Gut*. — 2001. — Vol. 49. — P. 557–564.
192. Chapa-Dubocq, X. Simple kinetic model of mitochondrial swelling in cardiac cells / X. Chapa-Dubocq, V. Makarov, S. Javadov // *J. Cell Physiol.* — 2018. — Vol. 233(7). — P. 5310–5321.

193. Charni-Natan, M. Liver and steroid hormones — can a touch of p53 make a difference? / M. Charni-Natan, R. Aloni-Grinstein, E. Osher, V. Rotter // *Front. Endocrinol.* — 2019. — Vol. 10. — Article 374.

194. Chen, C. Hypoxia inducible factors in hepatocellular carcinoma / C. Chen, T. Lou // *Oncotarget.* — 2017. — Vol. 8(28). — P. 46691–46703.

195. Chen, M.F. The regeneration of cirrhotic liver after partial hepatectomy: a study using the rat carbon tetrachloride-induced cirrhotic model / M.F. Chen, T.L. Hwang // *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China B.* — 1994. — Vol. 18(2). — P. 71–75.

196. Chen, Sh.-L. A GYS2/p53 negative feedback loop restricts tumor growth in HBV-related hepatocellular carcinoma / Sh.-L. Chen, Ch.-Zh. Zhang, L.L. Liu, S.-X. Lu, Y.-H. Pan, C.-H. Wang, [et al.] // *Cancer Res.* — 2019. — Vol. 79(3). — P. 534–545.

197. Chen, Sh.-L. GYS1 induces glycogen accumulation and promotes tumor progression via the NF- $\kappa$ B pathway in Clear Cell Renal Carcinoma / Sh.-L. Chen, Q.-Sh. Huang, Yu.-H. Huang, X. Yang, M.-M. Yang, Y.-F. He, [et al.] // *Theranostics.* — 2020. — Vol. 10(20). — P. 9186–9199.

198. Chestnova, A.Yu. Dynamics of proglycogen and macroglycogen in hepatocytes of normal and cirrhotic rat liver at various stages of glycogenesis / A.Yu. Chestnova, N.N. Bezborodkina, N.M. Matyukhina, B.N. Kudryavtsev // *Cell and Tissue Biology.* — 2015. — Vol. 9(2). — P. 133–140.

199. Chiang, J. Liver physiology: metabolism and detoxification / J. Chiang // In: L.M. McManus, R.N. Mitchell (Eds). *Pathobiology of human disease.* — San Diego: Elsevier, 2014. — P. 1770–1782.

200. Chistiakov, D.A. Liver regenerative medicine: Advances and challenges / D.A. Chistiakov // *Cell Tiss. Organs.* — 2012. — Vol. 196(4). — P. 291–312.

201. Cho, H.G. Frequent basal cell cancer development is a clinical marker for inherited cancer susceptibility / H.G. Cho, K.Y. Kuo, S. Li, I. Bailey, S. Aasi, A.L.S. Chang, [et al.] // *JCI Insight.* — 2018. — Vol. 3(15). — e122744.

202. Ciudad, C. J. Glucose 6-phosphate plays a central role in the activation of glycogen synthase by glucose in hepatocytes / C.J. Ciudad, A. Carabaza, J.J. Guinovart // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1986. — Vol. 141. — P. 1195–1200.

203. Cleary, P.A. The effect of intensive glycemic treatment on coronary artery calcification in type 1 diabetic participants of the Diabetes Control and Complications

Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study / P.A. Cleary, T.J. Orchard, S. Genuth, N.D. Wong, R. Detrano, J.-Y.C. Backlund, [et al.] // *Diabetes*. — 2006. — Vol. 55. — P. 3556–3565.

204. Clore, J.N. Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes / J.N. Clore, J. Stillman, H. Sugeran // *Diabetes*. — 2000. — Vol. 49. — P. 969–974.

205. Coerver, K.A. Developmental expression of hexokinase 1 and 3 in rats / K.A. Coerver, S.M. Gray, J.E. Barnes, D.L. Armstrong, E.R. McCabe // *Histochem. Cell. Biol.* — 1998. — Vol. 109. — P. 75–86.

206. Conigliaro, A. Hepatic progenitors for liver disease: current position / A. Conigliaro, D.A. Brenner, T. Kisseleva // *Stem Cells Cloning*. — 2010. — Vol. 3. — P. 39–47.

207. Consoli, A. Predominant role of gluconeogenesis in increased hepatic glucose production in NIDDM / A. Consoli, N. Nurjhan, F. Capani, J. Gerich // *Diabetes*, — 1989. — Vol. 38. — P. 550–557.

208. Cornish-Bowden, A. Hexokinase and 'glucokinase' in liver metabolism / A. Cornish-Bowden, M.L. Cardenas // *Trends Biochem. Sci.* — 1991. — Vol. 16(8). — P. 281–282.

209. Cramer, T. Severe hypoxia is a typical characteristic of human hepatocellular carcinoma: Scientific fact or fallacy? / T. Cramer, P. Vaupel // *J. Hepatol.* — 2022. — Vol. 76(4). — P. 975–980.

210. Croset, M. Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ / M. Croset, F. Rajas, C. Zitoun, J.M. Hurot, S. Montano, G. Mithieux // *Diabetes*. — 2001. — Vol. 50. — P. 740–746.

211. Cui, M. The effect of comfort nursing on liver function and nursing satisfaction of patients with liver cirrhosis / M. Cui, M. Sun, L. Bu // *Am. J. Transl. Res.* — 2021. — Vol. 13(6). — P. 6973–6979.

212. Curtino, J.A. From the seminal discovery of proteoglycogen and glycogenin to emerging knowledge and research on glycogen biology / J.A. Curtino, M.A. Aon // *Biochemical Journal*. — 2019. — Vol. 476. — P. 3109–3124.

213. Curtis, M. Fibroblasts mobilize tumor cell glycogen to promote proliferation and metastasis / M. Curtis, H.A. Kenny, B. Ashcroft, A. Mukherjee, A. Johnson, Y. Zhang, [et al.] // *Cell Metab.* — 2019. — Vol. 29(1). — P. 141–155.e9.

214. Darwiche, H. Biology of the adult hepatic progenitor cell: "ghosts in the machine" / H. Darwiche, B.E. Petersen // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* — 2010. — Vol. 97. — P. 229–249.
215. Das, A. Flippase-mediated phospholipid asymmetry promotes fast Cdc42 recycling in dynamic maintenance of cell polarity / A. Das, B.D. Slaughter, J.R. Unruh, W.D. Bradford, R. Alexander, B. Rubinstein, R. Li // *Nat. Cell Biol.* — 2012. — Vol. 14. — P. 304–310.
216. Datsko, V.A. Experimental cirrhosis: liver morphology and function / V.A. Datsko, L.Ya. Fedoniuk, Ya.I. Ivankiv, K.I. Kurylo, A.S. Volska, S.L. Malanchuk, O.M. Oleshchuk // *Wiad. Lek.* — 2020. — Vol. 73(5). — P. 947–952.
217. David, H. Quantitative ultrastructural data of animal and human cells / H. David. — Leipzig, GDR: VEB Georg Thieme, 1977. — 495 p.
218. Davidson, C.D. Inhibition of glycogen metabolism induces reactive oxygen species-dependent cytotoxicity in anaplastic thyroid cancer in female mice / C.D. Davidson, J.A. Tomczak, E. Amiel, F.E. Carr // *Endocrinology.* — 2022. — Vol. 163(12). — bqac169.
219. De Duve, C. Specificite de la glucose-6-phosphatase / C. De Duve, H. Beaufays // *Bull. Soc. Chem. Biol.* — 1951. — Vol. 33. — P. 421.
220. de Groot, H. Loss of latent activity of liver microsomal membrane enzymes evoked by lipid peroxidation. Studies of nucleoside diphosphatase, glucose-6-phosphatase, and UDP glucuronyltransferase / H. de Groot, T. Noll, T. Toll // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1985. — Vol. 815. — P. 91–96.
221. de Oliveira, D.S. Glycogen Levels and Energy Status of the Liver of Fasting Rats with Diabetes Types 1 and 2 / D.S. de Oliveira, C.A. Bersani-Amado, M.C. Martini, F. Suzuki-Kemmelmeier, A. Bracht // *Brazilian Archives of Biology and Technology.* — 2007. — Vol. 50(5). — P. 785–791.
222. DeFronzo, R.A. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview / R.A. DeFronzo, R.C. Bonadonna, E. Ferrannini // *Diabetes Care.* — 1992. — Vol. 15(3). — P. 318–368.
223. Degenhardt, T.P. Chemical modification of proteins by methylglyoxal / T.P. Degenhardt, S.R. Thorpe, J.W. Baynes // *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand).* — 1998. — Vol. 44. — P. 1139–1145.

224. Degli Esposti, D. Mitochondrial roles and cytoprotection in chronic liver injury / D. Degli Esposti, J. Hamelin, N. Bosselut, R. Saffroy, M. Sebagh, A. Pommier, [et al.] // *Biochem. Res. Int.* — 2012. — Vol. 2012. — Article ID 387626.
225. Delaval, E. Renal glycogen content and hormonal control of enzymes involved in renal glycogen metabolism / E. Delaval, E. Moreau, S. Andriamanantsara, J.P. Geloso // *Pediatr. Res.* — 1983. — Vol. 17(9). — P. 766–769.
226. Deng, B. Molecular Structure of Human-Liver Glycogen / B. Deng, M.A. Sullivan, C. Chen, J. Li, P.O. Powell, Z. Hu, R.G. Gilbert // *PLoS ONE.* — 2016. — Vol. 11(3). — P. e0150540.
227. Desmet, V.J. Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth / V.J. Desmet, T. Roskams // *Journal of Hepatology.* — 2004. — Vol. 40. — P. 860–867.
228. Devarbhavi, H. Global burden of liver disease: 2023 update / H. Devarbhavi, S.K. Asrani, J.P. Arab, Y.A. Nartey, E. Pose, P.S. Kamath // *J. Hepatol.* — 2023. — Vol. 79. — P. 516–537.
229. Devos, P. A molecular order in the synthesis and degradation of glycogen in the liver / P. Devos, H.G. Hers // *Eur. J. Biochem.* — 1979. — Vol. 99. — P. 161–167.
230. Devos, P. Glycogen in rat adipose tissue: sequential synthesis and random degradation / P. Devos, H.G. Hers // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1980. — Vol. 95. — P. 1031–1036.
231. Devos, P. The alpha particulate liver glycogen. A morphometric approach to the kinetics of its synthesis and degradation / P. Devos, P. Baudhuin, F. Van Hoof, H.G. Hers // *Biochem. J.* — 1983. — Vol. 209. — P. 159–165.
232. Di Vinicius, I. Morphological signs of cirrhosis regression Experimental observations on carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis of rats / I. Di Vinicius, A.P. Baptista, A.A. Barbosa Jr., Z.A. Andrade // *Pathology – Research and Practice.* — 2005. — Vol. 201. — P. 449–456.
233. Dienstag, J.L. Histological outcome during long-term lamivudine therapy / J.L. Dienstag, R.D. Goldin, E.J. Heathcote, H.W.L Hann, M. Woessner, S.L. Stephenson, [et al.] // *Gastroenterology.* — 2003. — Vol. 124(1). — P. 105–117.
234. Dimitriadis, G.D. Regulation of postabsorptive and postprandial glucose metabolism by insulin-dependent and insulin-independent mechanisms: an integrative

approach / G.D. Dimitriadis, E. Maratou, A. Kountouri, M. Board, V. Lambadiari // *Nutrients*. — 2021. — Vol. 13. — P. 159–192.

235. DiNuzzo, M. Kinetic analysis of glycogen turnover: relevance to human brain <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy / M. DiNuzzo // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2013. — Vol. 33. — P. 1540–1548.

236. Doljanski, F. The growth of the liver with special reference to mammals / F. Doljanski // *Intern. Rev. Cytol.* — 1960. — Vol. 10. — P. 217–241.

237. Donne, R. Polyploidy in liver development, homeostasis and disease / R. Donne, M. Saroul-Ainama, P. Cordier, S. Celton-Morizur, C. Desdouets // *HAL*. — 2020. — Vol. 17(7). — P. 391–405.

238. Dowling, D. The molecular mechanisms of offspring effects from obese pregnancy / D. Dowling, F.M. McAuliffe // *Obes. Facts*. — 2013. — Vol. 6. — P. 134–145.

239. Doycheva, I. Prognostic implication of liver histology in patients with nonalcoholic fatty liver disease in diabetes / I. Doycheva, N. Patel, M. Peterson, R. Loomba // *J. Diabetes Complications*. — 2013. — Vol. 27(3). — P. 293–300.

240. Duan B.W. Liver transplantation in acute-on-chronic liver failure patients with high model for end stage liver disease (MELD) scores: A single center experience of 100 consecutive cases / B.W. Duan, S.C. Lu, M.L. Wang, J.-N. Liu, P. Chi, W. Lai, [et al.] // *J. Surgical Res.* — 2013. — Vol. 183(2). — P. 936–943.

241. DuBois, R. Early changes in gene expression during liver regeneration: What do they mean? / R. DuBois // *Hepatology*. — 1990. — Vol. 11. — P. 1079–1082.

242. Dufour, J.F. Reversibility of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis / J.F. Dufour, R. DeLellis, M.M. Kaplan. // *Ann. Intern. Med.* — 1997. — Vol. 127. — P. 981–985.

243. Dukhande, V.V. Inhibition of Glycogen metabolism as a potential strategy for anticancer therapy / V.V. Dukhande, S. Barot, S. Husein, Ch. Palaguachi // *FASEB J.* — 2018. — Vol. 31(1). — Suppl. 942.10.

244. Duncan, A.W. The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation / A.W. Duncan, M.H. Taylor, R.D. Hickey, A.E. Hanlon Newell, M.L. Lenzi, S.B. Olson, [et al.] // *Nature*. — 2010. — Vol. 467. — P. 707–710.

245. Ehsani-Zonouz, A. Interaction of hexokinase with the outer mitochondrial membrane and a hydrophobic matrix / A. Ehsani-Zonouz, A. Golestani, M. Nemat-Gorgani // *Mol. Cell. Biochem.* — 2001. — Vol. 223. — P. 81–87.

246. Elsner, P. Partly ordered synthesis and degradation of glycogen in cultured rat myotubes / P. Elsner, B. Quistorff, G.H. Hansen, N. Grunnet // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277. — P. 4831–4838.

247. Emami Nejad, A. The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment / A. Emami Nejad, S. Najafgholian, A. Rostami, A. Sistani, S. Shojaeifar, M. Esparvarinha, [et al.] // *Cancer Cell Int.* — 2021. — Vol. 21(1). — Article number: 62.

248. Ercan, N. Liver glycogen synthase, phosphorylase, and the glycogen concentration in rats given a glucose load orally: a 24-hour study / N. Ercan, M.C. Gannon, F.Q. Nuttall // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1994. — Vol. 315. — P. 35–40.

249. Espelt, M.V. Volumetric response of vertebrate hepatocytes challenged by osmotic gradients: A theoretical approach / M.V. Espelt, K. Alleva, G. Amodeo, G. Krumschnabel, R.C. Rossi, P.J. Schwarzbaum // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* — 2008. — Vol. 150. P. 103–111.

250. Fang, Y. Hepatocyte proliferation as an indicator of outcome in acute alcoholic hepatitis / Y. Fang, C. Bird, K. Nakamura, G.L. Davis, J.Y. Lau // *Lancet.* — 1994. — Vol. 343. — P. 820–823.

251. Farrell, G.C. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis / G.C. Farrell, C.Z. Larter // *Hepatology.* — 2006. — Vol. 43(51). — P. S99–S112.

252. Favaro, E. Glucose utilization via glycogen phosphorylase sustains proliferation and prevents premature senescence in cancer cells / E. Favaro, K. Bensaad, M.G. Chong, D.A. Tennant, D.J.P. Ferguson, C. Snell, [et al.] // *Cell Metab.* — 2012. — Vol. 16(6). — P. 751–764.

253. Fernandez-Checa, J.C. Mitochondrial glutathione depletion in alcoholic liver disease / J.C. Fernandez-Checa, T. Hirano, H. Tsukamoto, N. Kaplovitz // *Alcohol.* — 1993. — Vol. 10. — P. 469–475.

254. Fernandez-Novell, J.M. Translocation and aggregation of hepatic glycogen synthase during the fasted-to-refed transition in rats / J.M. Fernandez-Novell, A. Roca, D. Bellido, S. Vilaro, J.J. Guinovart // *Eur. J. Biochem.* — 1996. — Vol. 238(2). — P. 570–575.

255. Fernandez-Novell, J.M. Zonal distribution of glycogen synthesis in isolated rat hepatocytes / J.M. Fernandez-Novell, C. Lopez-Iglesias, J.C. Ferrer, J.J. Guinovart // *FEBS Lett.* — 2002. — Vol. 531. — P. 222–228.



256. Ferrannini, E. Influence of long-term diabetes on liver glycogen metabolism in the rat / E. Ferrannini, A. Lanfranchi, F. Rohner-Jeanrenaud, G. Manfredini, G. Van de Werve // *Metabolism*. — 1990. — Vol. 39(10). — P. 1082–1088.

257. Ferrer, J.C. Control of glycogen deposition / J.C. Ferrer, C. Favre, R.R. Gomis, J.M. Fernández-Novell, M. García-Rocha, N. de la Iglesia, [et al.] // *FEBS Lett.* — 2003. — Vol. 546. — P. 127–132.

258. Fessenden, J.D. Forster resonance energy transfer measurements of ryanodine receptor type 1 structure using a novel site-specific labeling method / J.D. Fessenden // *PLoS One*. — 2009. — Vol. 4. — Article: e7338.

259. Foglieni, C. Fluorescent dyes for cell viability: an application on prefixed conditions / C. Foglieni, C. Meoni, A.M. Davalli // *Histochem. Cell Biol.* — 2001. — Vol. 115(3). — P. 223–229.

260. Forbes, S.J. Liver regeneration — mechanisms and models to clinical application / S.J. Forbes, P.N. Newsome // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* — 2016. — Vol. 13(8). — P. 473–485.

261. Fox, I.J. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation / I.J. Fox, J.R. Chowdhury, S.S. Kaufman, T.C. Goertzen, N.R. Chowdhury, P.I. Warkentin, [et al.] // *N. Engl. J. Med.* — 1998. — Vol. 338(20). — P. 1422–1426.

262. Francavilla, A. Cyclic AMP metabolism and adenylate cyclase concentration in patients with advanced hepatic cirrhosis / A. Francavilla, A.F. Jones, T.E. Starzl // *Gastroenterology*. — 1978. — Vol. 75. — P. 1026–1032.

263. Frederiks, W.M. Influence of nutritional state on ischemic damage in rat liver / W.M. Frederiks, G.M. Fronik, F. Mar, J. James // *Liver*. — 1985. — Vol. 5. — P. 342–347.

264. Friedman, S.L. Reversal of hepatic fibrosis – fact or fantasy? / S.L. Friedman, M.B. Bansal // *Hepatology*. — 2006. — Vol. 43. — S82–88.

265. Friedmann, B. Liver glycogen synthesis in intact alloxan diabetic rats / B. Friedmann, E.H. Goodman, Jr., S. Weinhouse // *J. Biol. Chem.* — 1963. — Vol. 238(9). — P. 2899–2905.

266. Friedmann, B. Effects of glucose feeding, cortisol, and insulin on liver glycogen synthesis in the rat / B. Friedmann, E.H. Jr Goodman, S. Weinhouse // *Endocrinology*. — 1970. — Vol. 81. — P. 486–496.

267. Frontera, W.R. Skeletal muscle: a brief review of structure and function / W.R. Frontera, J. Ochala // *Calcif. Tissue Int.* — 2015. — Vol. 96(3). — P. 183–195.
268. Fujita, S. DNA cytofluorometry on large and small cell nuclei stained with pararosaniline Feulgen / S. Fujita // *Histochemie.* — 1973. — Vol. 36(3). — P. 193–199.
269. Fukuda, T. Autophagy and lysosomes in Pompe disease / T. Fukuda, A. Roberts, M. Ahearn, K. Zaal, E. Ralston, P.H. Plotz, N. Raben // *Autophagy.* — 2006. — Vol. 2. — P. 318–320.
270. Fukumura, A. Correlation between adenosine triphosphate content and apoptosis in liver of rats treated with alcohol / A. Fukumura, M. Tsutsumi, M. Tsusciscima, S. Takase // *Alcohol Clin. Exp. Res.* — 2003. — Vol. 27. — P. 12S–15S.
271. Gadella, T.W. GFP-based FRET microscopy in living plant cells / T.W. Gadella, G.N.M. Van der Krogt // *Trends Plant. Sci.* — 1999. — Vol. 7. — P. 287–291.
272. Gahrton, G. Determination of the glycogen content in single neutrophil leukocytes using a micromodel of leukocyte glycogen / G. Gahrton, I. Olsson, A. Dahlqvist // *J. Histochem. Cytochem.* — 1975. — Vol. 23(1). — P. 59–64.
273. Galvao, F. Hepatocyte transplantation: State of the art / F. Galvao, D. de Andrade Jr, D. de Andrade, B.C. Martins, A.G. Marson, C.V. Bernard, [et al.] // *Hepatol. Res.* — 2006. — Vol. 36(4). — P. 237–247.
274. Ganesh, S. Regional and developmental expression of Epm2a gene and its evolutionary conservation / S. Ganesh, K.L. Agarwala, K. Amano, T. Suzuki, A.V. Delgado-Escueta, K. Yamakawa // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2001. — Vol. 283. — P. 1046–1053.
275. Gangitano, E. Protein catabolism and the dysregulation of energy intake-related hormones may play a major role in the worsening of malnutrition in hospitalized cirrhotic patients / E. Gangitano, L. Gnessi, M. Merli // *Livers.* — 2022. — Vol. 2. — P. 158–170.
276. Ganne-Carrié, N. Hepatocellular carcinoma in the setting of alcohol-related liver disease / N. Ganne-Carrié, P. Nahon // *J. Hepatol.* — 2019. — Vol. 70. — P. 284–293.
277. Gannon, M.C. Quantitation of the glucose area response to a meal / M.C. Gannon, F.Q. Nuttall // *Diabetes Care* — 1990. — Vol. 13. — P. 1095–1096.
278. Garcia-Compean, D. Liver cirrhosis and diabetes: risk factors, pathophysiology, clinical implications and management / D. Garcia-Compean, J.O. Jaquez-Quintana, J.A.

Gonzalez-Gonzalez, H. Maldonado-Garza // *World J. Gastroenterol.* — 2009. — Vol. 15. — P. 280–288.

279. Garcia-Compean, D. The treatment of diabetes mellitus of patients with chronic liver disease / D. García-Compeán, J.A. González-González, F.J. Lavallo-González, E.I. González-Moreno, H.J. Maldonado-Garza, J.Z. Villarreal-Pérez // *Ann. Hepatol.* — 2015. — Vol. 14(6). — P. 780–788.

280. Garcia-Rocha, M. Intracellular distribution of glycogen synthase and glycogen in primary cultured rat hepatocytes / M. Garcia-Rocha, A. Roca, N. de la Iglesia, O. Baba, J.M. Fernández-Novell, J.C. Ferrer, J.J. Guinovart // *Biochem J.* — 2001. — Vol. 357. — P. 17–24.

281. Garfield, S.A. Hepatic glucose-6-phosphatase activities and correlated ultrastructural alterations in hepatocytes of diabetic rats / S.A. Garfield, R.R. Cardell, Jr // *Diabetes.* — 1979. — Vol. 28. — P. 664–679.

282. Garyaly, P. Protein degradation and quality control in cells from laforin and malin knock-out mice / P. Garyaly, D.M. Segvich, A.A. DePaoli-Roach, P.J. Roach // *J. Biol. Chem.* — 2014. — Vol. 289. — P. 20606–20614.

283. Gaub, J. Cytophotometry of liver cells from ethanol-fed rats: ethanol causes increased polyploidization and protein accumulation / J. Gaub, L. Fanerholdt, S. Keiding, J. Kondrup, P. Petersen, G.L. Wantzin // *Eur. J. Clin. Invest.* — 1981. — Vol. 11. — P. 235–237.

284. Geddes, R. The influence of lysosomes on glycogen metabolism / R. Geddes, G.C. Stratton // *Biochem. J.* — 1977. — Vol. 163. — P. 193–200.

285. Geddes, R. The molecular size and shape of liver glycogen / R. Geddes, J.D. Harvey, P.R. Wills // *Biochem. J.* — 1977. — Vol. 163. — P. 201–209.

286. Geddes, R. Glycogen: a structural viewpoint / R. Geddes // *The polysaccharides.* N.Y. — 1985. — Vol. 3. — P. 283–336.

287. Geddes, R. Glycogen: a metabolic viewpoint / R. Geddes // *Biosci. Rep.* — 1986. — Vol. 6. — P. 415–428.

288. Gerlyng, P. Binucleation and polyploidization patterns in developmental and regenerative rat liver growth / P. Gerlyng, A. Abyholm, T. Grotmol, B. Erikstein, H.S. Huitfeldt, T. Stokke, P.O. Seglen // *Cell Prolif.* — 1993. — Vol. 26. — P. 557–565.

289. Gessler, K. V-amylose at atomic resolution: X-ray structure of a cycloamylose with 26 glucose residues (cyclomaltohexacosose) / K. Gessler, I. Uson, T. Takaha, N.

Krauss, S.M. Smith, S. Okada, [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1999. — Vol. 96. — P. 4246–4251.

290. Giaccari, A. Predominant role of gluconeogenesis in the hepatic glycogen repletion of diabetic rats / A. Giaccari, L. Rosetti // *J. Clin. Invest.* — 1992. — Vol. 89. — P. 36–45.

291. Giardina, M.G. Kinetic analysis of glycogen synthase and PDC in cirrhotic rat liver and skeletal muscle / M.G.Giardina, M. Matarazzo, L. Sacca // *Am. J. Physiol.* — 1994. — Vol. 267. — P. E900–E906.

292. Gieling, R.G. Fibrosis and cirrhosis reversibility – molecular mechanisms / R.G. Gieling, A.D. Burt, D.A. Mann // *Clin. Liver. Dis.* — 2008. — Vol. 12. — P. 915–937.

293. Gilbert, R.G. The molecular size distribution of glycogen and its relevance to diabetes / R.G. Gilbert, M.A. Sullivan // *Aust. J. Chem.* — 2014. — Vol. 67. — P. 538–543.

294. Gilgenkrantz, H. Understanding Liver Regeneration: From Mechanisms to Regenerative Medicine / H. Gilgenkrantz, A. Collin de l'Hortet // *Am. J. Pathol.* — 2018. — Vol. 188(6). — P. 1316–1327.

295. Gjorgjieva, M. Progressive development of renal cysts in glycogen storage disease type I / M. Gjorgjieva, M. Raffin, A. Duchamp, A. Perry, A. Stefanutti, M. Brevet, [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* — 2016. — Vol. 25(17). — P. 3784–3797.

296. Glouert, A. Araldite as embedding for electron microscopy / A. Glouert, R. Glouert // *J. Biophys. Biochem. Cytol.* — 1958. — Vol. 4. — P. 191–194.

297. Golden, S. Glycogen synthesis by hepatocytes from diabetic rats / S. Golden, P.A. Wals, F. Okajima, J. Katz // *Biochem. J.* — 1979. — Vol. 182. — P. 727–734.

298. Goldsmith, E. Structure of maltoheptaose by difference Fourier methods and a model for glycogen / E. Goldsmith, S. Sprang, R. Fletterick // *J. Mol. Biol.* — 1982. — Vol. 156. — P. 411–427.

299. Gomis, R.R. Liver glycogen synthase but not the muscle isoform differentiates between glucose 6-phosphate produced by glucokinase or hexokinase / R.R. Gomis, E. Cid, M. García-Rocha, J.C. Ferrer, J.J. Guinovart // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277(26). — P. 23246–23252.

300. Gorla, G.R. Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells / G.R. Gorla, H. Malhi, S. Gupta // *Journal of Cell Science*. — 2001. — Vol. 114(16). — P. 2943–2951.

301. Goss, R. Hypertrophy versus hyperplasia / R. Goss // *Science*. — 1966. — Vol. 153. — P. 1615–1620.

302. Graham, T.E. Pro- and macroglycogenolysis: relationship with exercise intensity and duration / T.E. Graham, K.B. Adamo, J. Shearer, I. Marchand, B. Saltin // *J. Appl. Physiol.* — 2001. — Vol. 90. — P. 873–879.

303. Graham, T.E. The regulation of muscle glycogen: the granule and its proteins / T.E. Graham, Z. Yuan, A.K. Hill, R.J. Wilson // *Acta Physiol.* — 2010. — Vol. 199. — P. 489–498.

304. Granlund, A. The influence of the PRKAG3 mutation on glycogen, enzyme activities and fibre types in different skeletal muscles of exercise trained pigs / A. Granlund, M. Jensen-Waern, B. Essen-Gustavsson // *Acta Vet. Scand.* — 2011. — Vol. 53. — P. 20.

305. Grecco, H.E. FRET in cell biology: still shining in the age of super-resolution? / H.E. Grecco, P.J. Verveer // *Chemphyschem.* — 2011. — Vol. 12. — P. 484–490.

306. Green, A.R. The glycogenic action of protein targeting to glucogen in hepatocytes involves multiple mechanisms including phosphorylase inactivation and glycogen synthase translocation / A.R. Green, S. Aiston, C.C. Greenberg, S. Freeman, S.M. Poucher, M.J. Brady, L. Agius // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Vol. 279. — P. 46474–46482.

307. Grimsby, J. Characterization of glucokinase regulatory protein-deficient mice / J. Grimsby, J.W. Coffey, M.T. Dvorozniak, J. Magram, G. Li, F.M. Matschinsky, [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2000. — Vol. 275. — P. 7825–7831.

308. Gruppuso, P.A. Induction of hepatic glycogenesis in the fetal rat / P.A. Gruppuso, D.L. Brautigan // *Am. J. Physiol.* — 1989. — Vol. 256. — P. E49–E54.

309. Guerret, S. Long-term administration of interferon-alpha in non-responder patients with chronic hepatitis C: follow-up of liver fibrosis over 5 years / S. Guerret, A. Desmoulière, P. Chossegros // *J. Viral. Hepat.* — 1999. — Vol. 6(2). — P. 125–133.

310. Guldiken, N. Serum transferrin as a biomarker of hepatocyte nuclear factor 4 alpha activity and hepatocyte function in liver diseases / N. Guldiken, J. Argemi, B. Gurbuz, S.R. Atkinson, M. Oliverius, P. Fila, [et al.] // *BMC Medicine*. — 2021. — Vol. 19. — Article number: 39.

311. Gunja-Smith, Z. A revision of the Meyer—Bernfeld model of glycogen and amylopectin / Z. Gunja-Smith, J.J. Marshall, C. Mercier, E.E. Smith, W.J. Whelan // *FEBS Lett.* — 1970. — Vol. 12. — P. 101–104.

312. Guo, L. The prognostic value of inflammation factors in hepatocellular carcinoma patients with hepatic artery interventional treatments: a retrospective study / L. Guo, H. Ren, L. Pu, X. Zhu, Y. Liu, X. Ma // *Cancer Manag. Res.* — 2020. — Vol. 12. — P. 7173–7188.
313. Hagen, F. Correlation between liver volume and liver weight in a cohort with chronic liver disease: a semiautomated CT-volumetry study / F. Hagen, A. Mair, H. Bösmüller, M. Horger // *Quant. Imaging Med. Surg.* — 2022. — Vol. 12(1). — P. 376–383.
314. Hallgren, N.K. Cell volume affects glycogen phosphorylase activity in fish hepatocytes / N.K. Hallgren, E.R. Busby, T.P. Mommsen // *J. Comp. Physiol. B.* — 2003. — Vol. 173. — P. 591–599.
315. Hammel, P. Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct / P. Hammel, A. Couvelard, D. O’Toole, A. Ratouis, A. Sauvanet, J.F. Flejou, [et al.] // *N. Engl. J. Med.* — 2001. — Vol. 344. — P. 418–423.
316. Hannoun, Z. The potential of induced pluripotent stem cell derived hepatocytes / Z. Hannoun, C. Steichen, N. Dianat, A. Weber, A. Dubart-Kupperschmitt // *J. Hepatol.* — 2016. — Vol. 65(1). — P. 182–189.
317. Harjes, U. Glycogen condensates drive tumorigenesis by trapping Hippo kinases / U. Harjes // *Nat. Rev. Cancer.* — 2022. — Vol. 22(1). — 1.
318. Harvey, P.J. <sup>31</sup>P and <sup>1</sup>H NMR spectroscopic studies of liver extracts of carbon tetrachloride-treated rats / P.J. Harvey, G.E. Gready, K.M. Hickey, D.G. Le Couteur, A.J. McLean // *NMR Biomed.* — 1999. — Vol. 12. — P. 395–401.
319. Hata, K. The structure of shellfish glycogen. III. A proposed model of glycogen particle / K. Hata, M. Hata, M. Hata, K. Matsuda // *J. Jpn. Soc. Starch. Sci.* — 1984. — Vol. 31(3). — P. 146–155.
320. Heishi, M. Global gene expression analysis in liver of obese diabetic db/db mice treated with metformin / M. Heishi, J. Ichihara, R. Teramoto, Y. Itakura, K. Hayashi, H. Ishikawa, [et al.] // *Diabetologia.* — 2006. — Vol. 49. — P. 1647–1655.
321. Henrissat, B. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families, modules, and implications for genomics / B. Henrissat, G. J. Davies // *Plant. Physiol.* — 2000. — Vol. 124. — P. 1515–1519.

322. Hers, H.-G. The metabolism of glycogen in the liver of foetal and newborn rats. In *Metabolic adaptation to extrauterine life / H.-G. Hers.* — Brussels-Luxembourg: ECSC, EEC, EAEC, 1981. — P. 3–7.

323. Hers, H.-G. Mechanisms of blood glucose homeostasis / H.-G. Hers // *J. Inherit. Metab. Dis.* — 1990. — Vol. 13. — P. 395–410.

324. Heydari, Z. Tissue engineering in liver regenerative medicine: insights into novel translational technologies / Z. Heydari, M. Najimi, H. Mirzaei, A. Shpichka, M. Ruoss, Z. Farzaneh, [et al.] // *Cells.* — 2020. — Vol. 9(2). — 304.

325. Hickman, I.J. Impact of diabetes on the severity of liver disease / I.J. Hickman, G.A. Macdonald // *Am. J. Med.* — 2007. — Vol. 120(10). — P. 829–834.

326. Higgins, G.M. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal / G.M. Higgins, R.M. Anderson // *Arch.Pathol.* — 1931. — Vol. 12. — P. 186–202.

327. Hinson, J.F. Acetaminopheninduced hepatic glycogen depletion and hyperglycemia in mice / J.F. Hinson, J.B. Mays, A.M. Cameron // *Biochemical Pharmacology.* — 1983. — Vol. 32. — P. 1979–1988.

328. Hirschhorn, R. Glycogen storage disease type II: acid  $\alpha$ -glucosidase (acid maltase) deficiency. / R. Hirschhorn, A.J. Reuser // In: C.R. Scriver, W.S. Sly, B. Childs, A.L. Beaudet, D. Valle, K.W. Kinzler, B. Vogelstein (Eds.). *The metabolic and molecular basis of inherited disease.* — N.Y.: McGraw-Hill, 2000. — P. 3389–3420.

329. Hirst, K.K. *The Origins and History of Winemaking / K.K. Hirst // ThoughtCo.* — 2023. Available at: <https://www.thoughtco.com/wine-origins-archaeology-and-history-173240> (accessed 28.07.2023).

330. Hockel, M. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects / M. Hockel, P. Vaupel // *J. Natl. Cancer Inst.* — 2001. — Vol. 93(4). — P. 266–276.

331. Holstein, A. Clinical implication of hepatogenous diabetes in liver cirrhosis / A. Holstein, S. Hinze, E. Thiessen, A. Plaschke, E.-H. Egberts // *J. Gastroenterol. Hepatol.* — 2002. — Vol. 17. — P. 677–681.

332. Hornbrook, K.R. Synthesis of liver glycogen in starved alloxan diabetic rats / K.R. Hornbrook // *Diabetes.* — 1970. — Vol. 19. — P. 916–923.

333. Huang, D.Q. Global epidemiology of cirrhosis — aetiology, trends and predictions / D.Q. Huang, N.A. Terrault, F. Tacke, L.L. Gluud, M. Arrese, E. Bugianesi, R. Loomba // *Nature Reviews Gastroenterol. Hepatol.* — 2023. — Vol. 20. — P. 388–398.

334. Huang, Y.T. Oxidative-stress-related changes in the livers of bile-duct-ligated rats / Y.T. Huang, I.S. Hsu, C.J. Chen, C.-T. Liu, Y.-H. Wei // *J. Biomed. Sci.* — 2003. — Vol. 10. — P. 170–178.

335. Huebschmann, A.G. Diabetes and advanced glycoxidation end products / A.G. Huebschmann, J.G. Regensteiner, H. Vlassara, J.E. Reusch // *Diabetes Care.* — 2006. — Vol. 29. — P. 1420–1432.

336. Hundal, R.S. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes / R.S. Hundal, M. Krssak, S. Dufour, D. Laurent, V. Lebon, V. Chandramouli, [et al.] // *Diabetes.* — 2000. — Vol. 49. — P. 2063–2069.

337. Hytiroglu, P. Beyond “Cirrhosis”: A proposal from international liver pathology subgroup / P. Hytiroglu, D.C. Snover, V. Alves, C. Balabaud, P.S. Bhathal, P. Bioulac-Sage, [et al.] // *Am. J. Clin. Pathol.* — 2012. — Vol. 137. — P. 5–9.

338. Hyypä, S. Post-exercise muscle glycogen repletion in horses: Doctoral dissertation / S. Hyypä — Helsinki: MTT Agrifood Research Finland, 2007. — 82 p.

339. IDF Diabetes Atlas 2021, 10th edition. — Available at: [https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/?dlmodal=active&dlsrc=https%3A%2F%2Fdiabetesatlas.org%2Fidfawp%2Fresource-files%2F2021%2F07%2FIDF\\_Atlas\\_10th\\_Edition\\_2021.pdf](https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/?dlmodal=active&dlsrc=https%3A%2F%2Fdiabetesatlas.org%2Fidfawp%2Fresource-files%2F2021%2F07%2FIDF_Atlas_10th_Edition_2021.pdf) (accessed 28.07.2023).

340. Iimuro, Y. Delivery of matrix metalloproteinase-1 attenuates established liver fibrosis in the rat / Y. Iimuro, T. Nishio, T. Morimoto, T. Nitta, B. Stefanovic, S.K. Choi, [et al.] // *Gastroenterology.* — 2003. — Vol. 124(2). — P. 445–458.

341. Imai, T. Clinicopathological studies and operative results of hepatocellular carcinoma with liver cirrhosis comparing HB associated cirrhosis to alcoholic and post-transfusion cirrhosis / T. Imai, M. Carrillo, H. Vokoi, T. Noguchi, Y. Kawarada, R. Mizumoto // *Gastroenterol. Jap.* — 1990. — Vol. 25. — P.50–54.

342. Iredale, J.P. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors / J.P. Iredale, R.C. Benyon, J. Pickering, M. McCullen, M. Northrop, S. Pawley, [et al.] // *J. Clin. Invest.* — 1998. — Vol. 102(3). — P. 538–549.



343. Iredale, J.P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ / J.P. Iredale // *J. Clin. Invest.* — 2007. — Vol. 117(3). — P. 539–548.
344. Iynedjian, P.B. Mammalian glucokinase and its gene / P.B. Iynedjian // *Biochem. J.* — 1993. — Vol. 293. — P. 1–13.
345. Iype, P.T. Some aspects of chemical and cellular composition of adult rat liver / P.T. Iype, P.M. Bhargova, A.D. Tasker // *Exp. Cell Res.* — 1965. — Vol. 40. — P. 233–251.
346. Jadlowiec, C.C. Liver transplantation: Current status and challenges / C.C. Jadlowiec, T. Taner // *World J. Gastroenterol.* — 2016. — Vol. 22(18). — P. 4438–4445.
347. James, A.P. Proglycogen and macroglycogen: artifacts of glycogen extraction? / A.P. James, P.D. Barnes, T.N. Palmer, P.A. Fournier // *Metabolism.* — 2008. — Vol. 57. — P. 535–543.
348. James, J. Growth patterns of rat hepatocytes during postnatal development / J. James, J. Tas, K.S. Bosch // *Europ. J. Cell Biol.* — 1979. — Vol. 19. — P. 222–226.
349. James, J. Naphthol-yellow-S-protein content of individual rat hepatocytes as related to food intake and short-term starvation / J. James, K.S. Bosch, G.M. Fronik, J.M. Houtkooper // *Cell Tissue Res.* — 1986. — Vol. 243. — P. 165–169.
350. Javadov, S. Different approaches to modeling analysis of mitochondrial swelling / S. Javadov, X. Chapa-Dubocq, V. Makarov // *Mitochondrion.* — 2018. — Vol. 38. — P. 58–70.
351. Jefferies, M. Update on global epidemiology of viral hepatitis and preventive strategies / M. Jefferies, B. Rauff, H. Rashid, T. Lam, S. Rafiq // *World J. Clin. Cases.* — 2018. — Vol. 6(13). — P. 589–599.
352. Jennische, E. Effects of ischemia on the hepatic cell membrane potential in the rat. Differences between fed and fasted animals / E. Jennische // *Acta. Physiol. Scand.* — 1983. — Vol. 118(1). — P. 69–73.
353. Jensen, J. The role of skeletal muscle glycogen breakdown for regulation of insulin sensitivity by exercise / J. Jensen, P.I. Rustad, A.J. Kolnes, Y.-C. Lai // *Front Physiol.* — 2011. — Vol. 2. — Article 112.
354. Jensen, T.E. Regulation of glucose and glycogen metabolism during and after exercise / T.E. Jensen, E.A. Richter // *J. Physiol.* — 2012. — Vol. 590(5). — P. 1069–1076.

355. Jepsen, P. Comorbidity and survival of Danish cirrhosis patients: a nationwide population-based cohort study / P. Jepsen, H. Vilstrup, P.K. Andersen, T.L. Lash, H.T. Sorensen // *Hepatology*. — 2008. — Vol. 48(1). — P. 214–220.

356. Jiang, S. Starch binding domain-containing protein 1/genethonin 1 is a novel participant in glycogen metabolism / S. Jiang, B. Heller, V.S. Tagliabracci, L. Zhai, J.M. Irimia, A.A. DePaoli-Roach, [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2010. — Vol. 285. — P. 34960–34971.

357. Jiang, S. Starch-binding domain-containing protein 1 (Stbd1) and glycogen metabolism: identification of the Atg8 family interacting motif (AIM) in Stbd1 required for interaction with GABARA-PL1 / S. Jiang, C.D. Wells, P.J. Roach // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2011. — Vol. 413. — P. 420–425.

358. Jiang, S. Diabetic-induced alterations in hepatic glucose and lipid metabolism: The role of type 1 and type 2 diabetes mellitus / S. Jiang, J.L. Young, K. Wang, Y. Qian, L. Cai // *Mol. Med. Rep.* — 2020. — Vol. 22(2). — P. 603–611.

359. Jilkova, Z.M. Animal models of hepatocellular carcinoma: the role of immune system and tumor microenvironment / Z.M. Jilkova, K. Kurma, T. Decaens // *Cancers (Basel)*. — 2019. — Vol. 11(10). — 1487.

360. Johansson, U. Splanchnic and peripheral glucose metabolism in cirrhosis / U. Johansson, J. Wahren, L.S. Eriksson // *J. Hepatol.* — 1994. — Vol. 20. — P. 760–767.

361. Johnson, L.V. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123 / L.V. Johnson, M.L. Walsh, C.L. Bo // *Cell Biol.* — 1980. — Vol. 77. — P. 990–994.

362. Jorgensen, P. How cells coordinate growth and division / P. Jorgensen, M. Tyers // *Curr. Biol.* — 2004. — Vol. 14. — P. R1014–R1027.

363. Ju, C. Hypoxia-inducible factors as molecular targets for liver diseases / C. Ju, S.P. Colgan, H.K. Eltzschig // *J. Mol. Med.* — 2016. — Vol. 94. — P. 613–627.

364. Jungermann, K. Metabolic zonation of liver parenchyma: significance for the regulation of glycogen metabolism, gluconeogenesis and glycolysis / K. Jungermann // *Diabetes Metab. Rev.* — 1987. — Vol. 3. — P. 269–293.

365. Jungermann, K. Functional specialization of hepatocytes / K. Jungermann, J. Katz // *Physiol. Rev.* — 1989. — Vol. 69. — P. 718–745.

366. Jungermann, K. Role of intralobular compartmentation in hepatic metabolism / K. Jungermann // *Diabetes Metab.* — 1992. — Vol. 18. — P. 81–86.

367. Jungermann, K. Role of oxygen in the zonation of carbohydrate metabolism and gene expression in liver / K. Jungermann, T. Kietzmann // *Kidney Int.* — 1997. — Vol. 51. — P. 402–412.
368. Jurczak, M.J. The role protein translocation in the regulation metabolism / M.J. Jurczak, A.M. Danos, V.R. Rehrmann, M.J. Brady // *J. Cell Biochem.* — 2008. — Vol. 104. — P. 435–443.
369. Kaasik, A. Regulation of mitochondrial matrix volume / A. Kaasik, D. Safiulina, A. Zharkovsky, V. Veksler // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* — 2007. — Vol. 292(1). — P. C157–163.
370. Kabadi, U.M. Elevated plasma ammonia level in hepatic cirrhosis: role of glucagon / U.M. Kabadi, A.B. Eisenstein, J. Konda // *Gastroenterology.* — 1985. — Vol. 88(3). — P. 750–756.
371. Kalafateli, M. Impact of muscle wasting on survival in patients with liver cirrhosis / M. Kalafateli, C. Konstantakis, K. Thomopoulos, C. Triantos // *World J. Gastroenterol.* — 2015. — Vol. 21(24). — P. 7357–7361.
372. Kalaitzakis, E. Increased risk for malignant neoplasms among patients with cirrhosis / E. Kalaitzakis, S.A. Gunnarsdottir, A. Josefsson, E. Björnsson // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* — 2011. — Vol. 9. — P. 168–174.
373. Kalhan, S.C. Gluconeogenesis in the fetus and neonate / S.C. Kalhan, P. Parimi // *Semin. Perinatol.* — 2000. — Vol. 24. — P. 94–106.
374. Kalhan, S.C. Metabolism of glucose and methods of investigation in the fetus and newborn / S.C. Kalhan // In: R.A. Polin, S.H. Abman, D.H. Rowitch, W.E. Benitz, W.W. Fox (Eds.). *Fetal and Neonatal Physiology*, Fifth edition. — Philadelphia, PA: Elsevier, 2017. — Vol. 1. — P. 390–403.
375. Kaplan, M.M. Sustained biochemical and histologic remission of primary biliary cirrhosis in response to medical treatment / M.M. Kaplan, R.A. DeLellis, H.J. Wolfe // *Ann Intern. Med.* — 1997. — Vol. 126. — P. 682–688.
376. Katoonizadeh, A. Hepatic progenitor cells in liver regeneration: current advances and clinical perspectives / A. Katoonizadeh, H. Poustchi, R. Malekzadeh // *Liver Int.* — 2014. — Vol. 34(10). — P. 1464–1472.
377. Katayama, K. Zinc and protein metabolism in chronic liver diseases / K. Katayama // *Nutr. Res.* — 2020. — Vol. 74. — P. 1–9.

378. Katz, J. The glucose paradox: is glucose a substrate for liver metabolism? / J. Katz, J. McGarry // *Clin. Invest.* — 1984. — Vol. 74. — P. 1901–1909.
379. Kele P.G. Early hepatic regeneration index and completeness of regeneration at 6 months after partial hepatectomy / P.G. Kele, M. de Boer, E.J. van der Jagt, T. Lisman, R.J. Porte // *Br. J. Surg.* — 2012. — Vol. 99(8). — P. 1113–1119.
380. Keller, U. Evidence for an augmented glucagon dependence of hepatic glucose production in cirrhosis of the liver / U. Keller, G.E. Sonnenberg, D. Burckhardt, A. Perruchoud // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 1982. — Vol. 54. — P. 961–968.
381. Kholodenko, I. Mesenchymal-epithelial transition in culture of stromal progenitor cells isolated from the liver of a patient with alcoholic cirrhosis / I. Kholodenko, R. Kholodenko, G. Manukyan, V. Burunova, K. Yarygin // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* — 2016. — Vol. 162. — P. 115–119.
382. Kietzmann, T. Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited / T. Kietzmann // *Redox. Biol.* — 2017. — Vol. 11. — P. 622–630.
383. Kietzmann, T. Liver zonation in health and disease: hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors as concert masters / T. Kietzmann // *Int. J. Mol. Sci.* — 2019. — Vol. 20. — 2347.
384. Kishnani, P.S. Important role of abnormal glycogen structure in the development of liver cirrhosis and progression to hepatocellular carcinoma in patients with glycogen storage disease type III / P.S. Kishnani, Y.T. Chen // *J. Hepatol.* — 2007. — Vol. 47. — P. 300–301.
385. Kits Van Heijningen, A.J. Free and fixed glycogen in rat muscle / A.J. Kits Van Heijningen, A. Kemp // *Biochem. J.* — 1955. — Vol. 59. — P. 487–491.
386. Knox, W.E. Enzyme pattern in fetal, adult and neoplastic rat tissues. 2nd ed. / W.E. Knox. — Basel: S. Karger, 1976. — 324 P.
387. Kohno, H. Changes in transglutaminase activity in carbon tetrachloride-damaged rat liver / H. Kohno, K. Kashimura, S. Katon, I. Ohkubo // *Experientia.* — 1991. — Vol. 72. — P. 70–75.
388. Koike, Y. Studies on DNA content of hepatocytes in cirrhosis and hepatoma by means of microspectrophotometry and radioautography / Y. Koike, Y. Suzuki, A. Nagata, S. Furuta, T. Nagata // *Histochemistry.* — 1982. — Vol. 73. — P. 549–562.
389. Kolterman, O.G. Receptor and postreceptor defects contribute to the insulin resistance in noninsulin-dependent diabetes mellitus / O.G. Kolterman, R.S. Gray, J. Griffin, P.

Burstein, J. Insel, J.A. Scarlett, J.M. Olefsky // *J. Clin. Invest.* — 1981. — Vol. 68(4). — P. 957–969.

390. Krähenbühl, L. Progressive decrease in tissue glycogen content in rats with long-term cholestasis / L. Krähenbühl, C. Talos, J. Reichen, S. Krähenbühl // *Hepatology.* — 1996. — Vol. 24. — P. 902–907.

391. Krähenbühl, L. Relationship between hepatic mitochondrial function in vivo and in vitro in rats with carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis / L. Krähenbühl, M. Ledermann, C. Lang, S. Krähenbühl // *J. Hepatol.* — 2000. — Vol. 33. — P. 216–223.

392. Krähenbühl, L. Reduced hepatic glycogen stores in patients with liver cirrhosis / L. Krähenbühl, C. Lang, S. Ludes, C. Seiler, M. Schäfer, A. Zimmermann, S. Krähenbühl // *Liver Int.* — 2003. — Vol. 23. — P. 101–109.

393. Krähenbühl, S. Decreased hepatic glycogen content and accelerated response to starvation in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis / S. Krähenbühl, F.L. Weber, E.P. Brass // *Hepatology.* — 1991. — Vol. 14. — P. 1189–1195.

394. Krähenbühl, S. Adaptation of mitochondrial metabolism in liver cirrhosis: Different strategies to maintain a vital function / S. Krähenbühl, J. Reichen // *Scand. J. Gastroenterol.* — 1992. — Vol. 27(Suppl. 193). — P. 90–96.

395. Krähenbühl, S. Decreased hepatic glucose production in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis / S. Krähenbühl, J. Reichen // *J. Hepatol.* — 1993. — Vol. 19. — P. 64–70.

396. Kraniou, Y. Effects of exercise on GLUT-4 and glycogenin gene expression in human skeletal muscle / Y. Kraniou, D. Cameron-Smith, M. Misso, G. Collier, M. Hargreaves // *J. Appl. Physiol.* — 2000. — Vol. 88. — P. 794–796.

397. Krizhanovsky, V. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis / V. Krizhanovsky, M. Yon, R.A. Dickins // *Cell.* — 2008. — Vol. 134(4). — P. 657–667.

398. Kronborg, T.M. Novel anti-inflammatory treatments in cirrhosis. A literature-based study / T.M. Kronborg, H. Ytting, L. Hobolth, S. Moller, N. Kimer // *Front. Med. (Lausanne).* — 2021. — Vol. 8. — 718896.

399. Krssak, M. Alterations in postprandial hepatic glycogen metabolism in type 2 diabetes / M. Krssak, A. Brehm, E. Bernroider, C. Anderwald, P. Nowotny, C. Dalla Man, [et al.] // *Diabetes.* — 2004. — Vol. 53. — P. 3048–3056.

400. Krumschnabel, G. Metabolic and ionic responses of trout hepatocytes to anisosmotic exposure / G. Krumschnabel, R. Gstir, C. Manzl, C. Prem, D. Pafundo, P.J. Schwarzbaum // *J Exp Biol.* — 2003. — Vol. 206. — P. 1799–1808.

401. Kruszynska, Y.T. Carbohydrate metabolism. / Y.T. Kruszynska, N. McIntyre // In: N. McIntyre, J.-P. Benhamou, J. Bircher, J. Rodes (Eds.). *Oxford textbook of clinical hepatology* (2 volumes). Oxford, UK: Oxford University Press, 1991. — Vol. 1. — P. 129–143.

402. Kruszynska, Y.T. Carbohydrate metabolism / Y.T. Kruszynska // In: J. Bircher, J.-P. Benhamou, N. McIntyre, M. Rizzetto, J. Rodes (Eds.). *Oxford textbook of clinical hepatology* (2 volumes). Oxford, UK: Oxford University Press, 1999. — Vol.1. — P. 257–286.

403. Kuang, Y. Hexokinase and glucose-6-phosphatase activity in woodchuck model of hepatitis virus-induced hepatocellular carcinoma / Y. Kuang, S.J. Schomisch, V. Chandramouli, Z. Lee // *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* — 2006. — Vol. 143(2). — P. 225–231.

404. Kudryavtsev, B.N. Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle / B.N. Kudryavtsev, M.V. Kudryavtseva, G.A. Sakuta, G.I. Stein // *Virchows Archiv Abteilung B Cell Pathology.* — 1993. — Vol. 64. — P. 387.

405. Kudryavtseva, M.V. The metabolic zonation of glycogen in the rat liver cells in the course of its resynthesis / M.V. Kudryavtseva, G.A. Sakuta, G.I. Stein, B.N. Kudryavtsev // *Tissue and Cell.* — 1992. — Vol. 24. — P. 31–25.

406. Kudryavtseva, M.V. Quantitative analysis of glycogen content in hepatocytes of portal and central lobule zones of normal human liver and in patients with chronic hepatitis of different etiology / M.V. Kudryavtseva, G.A. Sakuta, A.D. Skorina, G.I. Stein, A.V. Emelyanov, B.N. Kudryavtsev // *Tissue and Cell.* — 1996. — Vol. 28. — P. 279–285.

407. Kudryavtseva, M.V. Glycogen-forming function of hepatocytes in the rat regenerating cirrhotic liver after a partial hepatectomy / M.V. Kudryavtseva, A.V. Emelyanov, G.A. Sakuta, N.N. Bezborodkina, B.N. Kudryavtsev // *Tissue and Cell.* — 1998. — Vol. 30(2). — P. 261–267.

408. Kudryavtseva, M.V. Restoration of the glycogen-forming function of hepatocytes in rats with liver cirrhosis is facilitated by a high-carbohydrate diet / M.V. Kudryavtseva, N.N. Bezborodkina, B.N. Kudryavtsev // *Br. J. Nutr.* — 1999. — Vol. 81. — P. 473–480.

409. Kudryavtseva, M.V. Glycogen-forming function of hepatocytes in cirrhotically altered rat liver after treatment the chorionic gonadotropin / M.V. Kudryavtseva, N.N. Bezborodkina, B.N. Kudryavtsev // *Exp. Toxic. Pathol.* — 2001a. — Vol. 53, Issue 1. — P. 57–63.

410. Kudryavtseva, M.V. Metabolic heterogeneity of glycogen in hepatocytes of patients with liver cirrhosis: the glycogen of the liver lobule zones in cirrhosis / M.V. Kudryavtseva, N.N. Bezborodkina, S.V. Okovity, B.N. Kudryavtsev // *Europ. J. Gastroenterol. Hepatol.* — 2001b. — Vol. 13. — P. 693–697.

411. Kudryavtseva, M.V. Effects of the 2-ethylthiobenzimidazole hydrobromide (bemithyl) on carbohydrate metabolism in cirrhotic rat liver / M.V. Kudryavtseva, N.N. Bezborodkina, S.V. Okovity, B.N. Kudryavtsev // *Exp. Toxic. Pathol.* — 2003. — Vol. 54. — P. 339–347.

412. Kugler, J.H. The basis for the histochemical detection of glycogen / J.H. Kugler, W.J. Wilkinson // *J. Histochem. Cytochem.* — 1961. — Vol. 9. — P. 498–503.

413. Kumar, R. Hepatogenous diabetes: an underestimated problem of liver cirrhosis / R. Kumar // *Indian J. Endocr. Metab.* — 2018. — Vol. 22. — P. 552–559.

414. Kuntz, E. Hepatology. Textbook and Atlas / E. Kuntz, H.-D. Kuntz. — 3rd Edition. — Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2008. — 937 p.

415. Kus, I. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats / I. Kus, N. Colakoglu, H. Pekmez, D. Seckin, M. Ogeturk, M. Sarsilmaz // *Acta Histochem.* — 2004. — Vol. 106. — P. 289–297.

416. Kuwajima, M. Active hepatic glycogen synthesis from gluconeogenic precursors despite high tissue levels of fructose 2,6-biphosphate / M. Kuwajima, M.S. Golden, J. Katz, R.H. Unger, D.W. Foster, J.D. McGarry // *J. Biol. Chem.* — 1986. — Vol. 261. — P. 2632–2637.

417. Kweon, Y.O. Decreasing fibrogenesis: an immunohistochemical study of paired liver biopsies following lamivudine therapy for chronic hepatitis / Y.O. Kweon, Z.D. Goodman, J.L. Dienstag, E.R. Schiff, N.A. Brown, E. Burchardt, [et al.] // *Br. J. Hepatol.* — 2001. — Vol. 35. — P. 749–755.

418. LaBrecque, D. Liver regeneration: a picture emerges from the puzzle / D. LaBrecque // *Am. J. Gastroenterol.* — 1994. — Vol. 89(8 Suppl). — P. S86–90.

419. Lau, D.T. Resolution of chronic delta hepatitis after 12 years of interferon alfa therapy / D.T. Lau, D.E. Kleiner, Y. Park, A.M. Di Bisceglie, J.H. Hoofnagle // *Gastroenterology*. — 1999. — Vol. 117. — P. 1229–1233.
420. Laurson, J. Hepatocyte progenitors in man and in rodents--multiple pathways, multiple candidates / J. Laurson, C. Selden, H.J.F. Hodgson // *Int. J. Exp. Pathol.* — 2005. — Vol. 86(1). — P. 1–18.
421. Leary, T.S. Measurement of liver tissue oxygenation after orthotopic liver transplantation using a multiparameter sensor. A pilot study / T.S. Leary, J.R. Klinck, G. Hayman, P. Friend, N.V. Jamieson, A.K. Gupta // *Anaesthesia*. — 2002. — Vol. 57(11). — P. 1128–1133.
422. Lee, C.Y. Binding features of ethidium bromide and their effects on nuclease susceptibility of calf thymus DNA in presence of spermine / C.Y. Lee, H.W. Ryu, T.-S. Ko // *Bull. Korean Chem. Soc.* — 2001. — Vol. 22. — P. 87–89.
423. Lee, S.J. Distinguishing between genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens by gene expression profiling and bioinformatic pathway analysis / S.J. Lee, Y.N. Yum, S.C. Kim, Y. Kim, J. Lim, W.J. Lee, [et al.] // *Sci. Rep.* — 2013. — Vol. 3. — 2783.
424. Lee, N.C.W. High expression of glycolytic genes in cirrhosis correlates with the risk of developing liver cancer / N.C.W. Lee, M.A. Carella, S. Papa, C. Bubici // *Front. Cell Dev. Biol.* — 2018. — Vol. 6. — Article 138.
425. Lee-Montiel, F.T. Control of oxygen tension recapitulates zone-specific functions in human liver microphysiology systems / F.T. Lee-Montiel, S.M. George, A.H. Gough, A.D. Sharma, J. Wu, R. DeBiasio, [et al.] // *Exp. Biol. Med.* — 2017. — Vol. 242(16). — P. 1617–1632.
426. Leevy, C.M. Observations on hepatic regeneration in man / C.M. Leevy // *Adv. Int. Med.* — 1967. — Vol. 13. — P. 97–126.
427. Leibowitz, J.O. Studies in the history of alcoholism. II. Acute alcoholism in ancient Greek and Roman medicine / J.O. Leibowitz // *Br. J. Addict. Alcohol Other Drugs*. — 1967. — Vol. 62(1). — P. 83–86.
428. Leise, M.D. Drug-induced liver injury / M.D. Leise, J.J. Poterucha, J.A. Talwalkar // *Mayo Clin. Proc.* — 2014. — Vol. 89(1). — P. 95–106.
429. Levene, A.P. Physiological hepatic nuclear vacuolation — how long does it persist? / A.P. Levene, R.D. Goldin // *Histopathology*. — 2010. — Vol. 56. — P. 426–429.



430. Levinthal, G.N. Liver disease and diabetes mellitus / G.N. Levinthal, A.S. Tavill // *Clinical Diabetes*. — 1999. — Vol. 17. — P. 1–20.
431. Lewis, S.F. Cardiovascular responses to exercise as functions of absolute and relative work load / S.F. Lewis, W.F. Taylor, R.M. Graham, W.A. Pettinger, J.E. Schutte, C.G. Blomqvist // *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* — 1983. — Vol. 54(5). — P. 1314–1324.
432. Li, C. Is liver glycogen fragility a possible drug target for diabetes? / C. Li, Z. Hu // *FASEB J.* — 2020. — Vol. 34(1). — P. 3–15.
433. Lillie, R.D. Histopathologic technic and practical histochemistry / R.D. Lillie. — N.Y.: McGraw-Hill Book Company, 1965. — 648 P.
434. Lin, C.-A. Hypoxic microenvironment and hepatocellular carcinoma treatment / C.-A. Lin, L.-L. Chang, H. Zhu, Q.-J. He, B. Yang // *Hepatoma Res.* — 2018. — Vol. 4. — P. 26–33.
435. Liu, Q. Glycogen accumulation and phase separation drives liver tumor initiation / Q. Liu, J. Li, W. Zhang, C. Xiao, S. Zhang, C. Nian, [et al.] // *Cell.* — 2021. — Vol. 184(22). — P. 5559–5576.e19.
436. Liu, X. Reversibility of liver fibrosis and inactivation of fibrogenic myofibroblasts / X. Liu, J. Xu, D.A. Brenner, T. Kisseleva // *Curr. Pathobiol. Rep.* — 2013. — Vol. 1(3). — P. 209–214.
437. Liu, Z. Evaluation of the redox tolerance index on hepatic energy reserve of hepatitis B patients / Z. Liu, L. Zhao, Z. Xu // *Chin. Med. J.* — 1996. — Vol. 109. — P. 147–150.
438. Liu, Zh. Hypoxia accelerates aggressiveness of hepatocellular carcinoma cells involving oxidative stress, epithelial-mesenchymal transition and non-canonical hedgehog signaling / Zh. Liu, K. Tu, Y. Wang, B. Yao, Q. Li, L. Wang, [et al.] // *Cell Physiol. Biochem.* — 2017. — Vol. 44. — P. 1856–1868.
439. Lo, S. Determination of glycogen in small tissue samples / S. Lo, J.C. Russel, A.W. Taylor // *J. Appl. Physiol.* — 1970. — Vol. 28. — P. 234–236.
440. Locarnini, S.A. Origins and evolution of the primate hepatitis B virus / S.A. Locarnini, M. Littlejohn, L.K.W. Yuen // In: C. Osioy, L. Yuen (Eds.). *Origin and evolution of hepatitis viruses*. Lausanne: Frontiers Media SA, 2021. — P. 86–102.

441. Lomako, J. Proglycogen: a low-molecular-weight form of muscle glycogen / J. Lomako, W.M. Lomako, W.J. Whelan // *FEBS Lett.* — 1991. — Vol. 279. — P. 223–228.
442. Lomako, J. Glycogen synthesis in the astrocyte: from glycogenin to proglycogen to glycogen / J. Lomako, W.M. Lomako, W.J. Whelan, R.S. Dombro, J.T. Neary, M.D. Norenberg // *FASEB J.* — 1993. — Vol. 7. — P. 1386–1393.
443. Lomako, J. Glycogenin: the primer for mammalian and yeast glycogen synthesis / J. Lomako, W.M. Lomako, W.J. Whelan // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2004. — Vol. 1673. — P. 45–55.
444. Loria, P. Liver and diabetes. A vicious circle / P. Loria, A. Lonardo, F. Anania // *Hepatol. Res.* — 2013. — Vol. 43(1). — P. 51–64.
445. Lowes, W. Hexokinase isoenzymes in normal and cirrhotic human liver: suppression of glucokinase in cirrhosis / W. Lowes, M. Walker, K.G. Alberti, L. Agius // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1998. — Vol. 1379(1). — P. 134–142.
446. Lowry, O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall // *J. Biol.Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265–275.
447. Lysy, P.A. Stem cells for liver tissue repair: current knowledge and perspectives / P.A. Lysy, D. Campard, F. Smets, M. Najimi, E.M. Sokal // *World J. Gastroenterol.* — 2008. — Vol. 14(6). — P. 864–875.
448. Macdonald, J.R. The improvement of CCl<sub>4</sub>-induced hepatic necrosis under posttoxic cystamine treatment / J.R. Macdonald, A.J. Gandolfi, I.G. Sipes // *Toxicology.* — 1986. — Vol. 39. — P.135–148.
449. Madsen, N.B. The binding of glycogen and phosphorylase / N.B. Madsen, C.F. Cori // *J. Biol. Chem.* — 1958. — Vol. 233. — P. 1251–1256.
450. Magnusson, I. Pathways of hepatic glycogen formation in humans following ingestion of a glucose load in the fed state / I. Magnusson, V. Chandramouli, W.C. Schumann, K. Kumaran, J. Wahren, B.R. Landau // *Metabolism.* — 1989. — Vol. 38(6). — P. 583–585.
451. Magnusson, I. Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance study / I. Magnusson, D.L. Rothman, L.D. Katz, R.G. Shulman, G.I. Shulman // *J. Clin. Invest.* — 1992. — Vol. 90. — P. 1323v1327.

452. Magnusson, I. Liver glycogen turnover in fed and fasted humans / I. Magnusson, D.L. Rothman, B. Jucker, G.W. Cline, R.G. Shulman, G.I. Shulman // *Am. J. Physiol.* — 1994. — Vol. 266. — P. E796–E803.
453. Malecki, M.T. Type 2 diabetes mellitus: from genes to disease / M.T. Malecki, T. Klupa // *Pharmacol. Rep.* — 2005. — Vol. 57. — Suppl. 20–32.
454. Malekzadeh, R. Reversibility of cirrhosis in chronic hepatitis B / R. Malekzadeh, M. Mohamadnejad, N. Rakhshani // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* — 2004. — Vol. 2(4). — P. 344–347.
455. Malhi, H. Cellular and molecular mechanisms of liver injury / H. Malhi, G.J. Gores // *Gastroenterology.* — 2008. — Vol. 134(6). — P. 1641–1654.
456. Manderson, W.G. Liver glycogen accumulation in unstable diabetes / W.G. Manderson, M.T. McKiddie, D.J. Manners, J.R. Stark // *Diabetes.* — 1968. — Vol. 17. — P. 13–16.
457. Mangnall, D. The molecular physiology of liver regeneration following partial hepatectomy / D. Mangnall, N.C. Bird, A.W. Majeed // *Liver Int.* — 2003. — Vol. 23(2). — P. 124–138.
458. Marchand, I. Quantification of subcellular glycogen in resting human muscle: granule size, number, and location / I. Marchand, K. Chorneyko, M. Tarnopolsky, S. Hamilton, J. Shearer, J. Potvin, T.E. Graham // *J. Appl. Physiol.* (1985). — 2002. — Vol. 93(5) — P. 1598–1607.
459. Marchand, I. Quantitative assessment of human muscle glycogen granules size and number in subcellular locations during recovery from prolonged exercise / I. Marchand, M. Tarnopolsky, K.B. Adamo, J.M. Bourgeois, K. Chorneyko, T.E. Graham // *J. Physiol.* — 2007. — Vol. 580(Pt 2). — P. 617–628.
460. Marchesini, G. Muscle protein breakdown in liver cirrhosis and the role of altered carbohydrate metabolism / G. Marchesini, M. Zoli, A. Angiolini, C. Dondi, F.B. Bianchi, E. Pisi // *Hepatology.* — 1981. — Vol. 1(4). — P. 294–299.
461. Marcos, R. Design-based stereological estimation of hepatocyte number, by combining the smooth optical fractionator and immunocytochemistry with anticarcinoembryonic antigen polyclonal antibodies / R. Marcos, R.A.F. Monteiro, E. Rocha // *Liver Int.* — 2006. — Vol. 26(1). — P. 116–124.

462. Marshall, J.J. Application of enzymic methods to the structural analysis of polysaccharides / J.J. Marshall // *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* — 1974. — Vol. 30. — P. 257–370.
463. Massillon, D. Quantitation of hepatic glucose fluxes and pathways of hepatic glycogen synthesis in conscious mice / D. Massillon, W. Chen, M. Hawkins, R. Liu, N. Barzilai, L. Rossetti // *Am. J. Physiol.* — 1995. — Vol. 269(6 Pt 1). — P. E1037–E1043.
464. Maurer, W. Quantitatives modell der regeneration der CCl<sub>4</sub> leber der maus / W. Maurer, H. Gerhard, B. Schultze // *Virchow's Arch. Abt. B.* — 1973. — Vol. 14. — P. 361–371.
465. Mauss, S. *Hepatology. A Clinical Textbook* / S. Mauss, T. Berg, J. Rockstroh, C. Sarrazin, H. Wedemeyer. — 6th edition. — Germany: Flying publisher, 2015. — 654 P.
466. Mayatepek, E. Inborn errors of carbohydrate metabolism / E. Mayatepek, B. Hoffmann, T. Meissner // *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* — 2010. — Vol. 24. — P. 607–618.
467. McKeown, S.R. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response / S.R. McKeown // *Br. J. Radiol.* — 2014. — Vol. 87. — 20130676.
468. Meijer, A.J. Glucose 6-phosphate compartmentation and the control of glycogen synthesis / A.J. Meijer // *J. Hepatol.* — 2002. — Vol. 37(3). — P. 417–418.
469. Melchiorri, C. Ploidy and nuclearity of rat hepatocytes after compensatory regeneration or mitogen-induced liver growth / C. Melchiorri, P. Chieco, A.I. Zedda, P. Coni, G.M. Ledda-Columbano, A. Columbano // *Carcinogenesis.* — 1993. — Vol. 14. — P. 1825–1830.
470. Melchiorri, C. Diagnostic and prognostic value of DNA ploidy and cell nuclearity in ultrasound guided liver biopsies / C. Melchiorri, L. Bolondi, P. Chieco, M. Pagnoni, L. Gramantieri, L. Barbara // *Cancer.* — 1994. — Vol. 74. — P. 1713–1719.
471. Melendez, R. How did glycogen structure evolve to satisfy the requirement for rapid mobilization of glucose? A problem of physical constraints in structure building / R. Melendez, E. Melendez-Hevia, M. Cascante // *J. Mol. Evol.* — 1997. — Vol. 45. — P. 446–455.

472. Melendez, R. Physical constraints in the synthesis of glycogen that influence its structural homogeneity: a two-dimensional approach / R. Melendez, E. Melendez-Hevia, F. Mas, J. Mach, M. Cascante // *Biophys. J.* — 1998. — Vol. 75. — P. 106–114.
473. Melendez, R. The fractal structure of glycogen: a clever solution to optimize cell metabolism / R. Melendez, E. Melendez-Hevia, E.I. Canela // *Biophys. J.* — 1999. — Vol. 77. P. 1327–1332.
474. Melendez-Hevia, E. Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule / E. Melendez-Hevia, T.G. Waddell, E.D. Shelton // *Biochem. J.* — 1993. — Vol. 295. — P. 477–483.
475. Melendez-Hevia, E. Optimization of metabolism: the evolution of metabolic pathways toward simplicity through the game of the pentose phosphate cycle / E. Melendez-Hevia, T.G. Waddell, F. Montero // *J. Theor. Biol.* — 1994. — Vol. 166. — P. 201–220.
476. Mera, E. Cimetidine prevents and partially reverses CCl<sub>4</sub>-induced liver cirrhosis / E. Mera, P. Muriell, C. Castillo, M. Murrelle // *J. Appl. Toxicol.* — 1994. — Vol. 14. — P. 87–90.
477. Mercier, C. The fine structure of glycogen from type IV glycogen storage disease / C. Mercier, W.J. Whelan // *Eur. J. Biochem.* — 1970. — Vol. 16. — P. 579–583.
478. Merli, M. Splanchnic and leg exchange of free fatty acids in patients with liver cirrhosis / M. Merli, L.S. Eriksson, L. Hagenfeldt, J. Wahren // *J. Hepatol.* — 1986. — Vol. 3. — P. 348–355.
479. Metwally, K. Weight loss and improvement of hepatic fibrosis in Egyptian patients with chronic hepatitis C / K. Metwally, E. Abdelsameea, T. Refaat, K. Gameel, E. Roweisha // *Liver Pancreat. Sci.* — 2017. — Vol. 2(1). — P. 1–4.
480. Meyer, R.H. Recherches sur l'amidon V. L'amilopectine / R.H. Meyer, P. Bernfeld // *Helv. Chim. Acta.* — 1940. — Vol. 23. — P. 875–885.
481. Michalopoulos, G.K. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control / G.K. Michalopoulos // *FASEB J.* — 1990. — Vol. 4(2). — P. 176–187.
482. Middleton, P. Mitochondrial dysfunction and liver disease: role, relevance, and potential for therapeutic modulation / P. Middleton, N. Vergis // *Therap. Adv. Gastroenterol.* — 2021. — Vol. 14. — Article 17562848211031394.

483. Minassian, C. Regulatory role of glucose-6-phosphatase in the repletion of the liver glycogen during refeeding in fasted rats / Minassian C., Montano S., Mithieux G. // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1999. — Vol. 1452(2). — P. 172–178.

484. Mion, F. Carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats: influence of the acute effects of the toxin on glucose metabolism / F. Mion, A. Galoun, E. Agosto, Y. Minaire // *Hepatology.* — 1996. — Vol. 23(3). — P. 582–588.

485. Mirdamadi, E.S. Liver tissue engineering as an emerging alternative for liver disease treatment / E.S. Mirdamadi, D. Kalhori, N. Zakeri, N. Azarpira, M. Solati-Hashjin // *Tissue Eng. Part B Rev.* — 2020. — Vol. 26(2). — P. 145v163.

486. Mithieux, G. A novel role for glucose 6-phosphatase in the small intestine in the control of glucose homeostasis / G. Mithieux, F. Rajas, A. Gautier-Stein // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Vol. 279. — P. 44231–44234.

487. Mithieux, G. Intestinal glucose metabolism revisited / G. Mithieux, A. Gautier-Stein // *Diabetes Res. Clin. Pract.* — 2014. — Vol. 105. — P. 295–301.

488. Mlekusch, W. Plasma concentration of glucose, corticosterone, glucago and insulin and liver content of metabolic substrates and enzymes during starvation and additional hypoxia in the rat / W. Mlekusch, B. Paletta, W. Truppe, E. Paschke, R. Grimus // *Horm. Metab. Res.* — 1981. — Vol. 13. — P. 612–614.

489. Mokdad, A.A. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis / A.A. Mokdad, A.D. Lopez, S. Shahraz, R. Lozano, A.H. Mokdad, J. Stanaway, [et al.] // *BMC Med.* — 2014. — Vol. 12. — P. 145.

490. Moore, M.C. Regulation of hepatic glucose uptake and storage in vivo / M.C. Moore, K.C. Coate, J.J. Winnick, Z. An, A.D. Cherrington // *Adv. Nutr.* — 2012. — Vol. 3(3). — P. 286–294.

491. Moses, S.W. Glycogen metabolism in the normal red blood cell / S.W. Moses, N. Bashan, A. Gutman // *Blood.* — 1972. — Vol. 40. — P. 836–843.

492. Mota-Rojas, D. Foetal and neonatal energy metabolism in pigs and human: a review / D. Mota-Rojas, H. Orozco-Gregorio, D. Villanueva-Garcia, H. Bonilla-Jaime, X. Suarez-Bonilla, R. Hernandez-Gonzalez, [et al.] // *Vet. Med.* — 2011. — Vol. 56. — P. 215–225.

493. Muller, M.J. Mechanism of insulin resistance associated with liver cirrhosis / M.J. Müller, O. Willmann, A. Rieger, A. Fenk, O. Selberg, H.U. Lautz, [et al.] // *Gastroenterology*. — 1992. — Vol. 102. — P. 2033–2041.
494. Muraca, M. The future of stem cells in liver diseases / M. Muraca, G. Galbiati, M.T. Vilei, A.S. Fabricio, M. Caruso // *Ann. Hepatol.* — 2006. — Vol. 5(2). — P. 68–76.
495. Nadal, C. Poliploidie somatique dans le foie du rat / C. Nadal, F. Zaidela // *Exper. Cell Res.* — 1966. — Vol. 42. — P. 99–116.
496. Nadalin, S. Volumetric and functional recovery of the liver after right hepatectomy for living donation / S. Nadalin, G. Testa, M. Malagó, M. Beste, A. Frilling, T. Schroeder, [et al.] // *Liver Transpl.* — 2004. — Vol. 10(8). — P. 1024–1029.
497. Nakamura, L.K. *Bacillus pulvifaciens* sp. nov., nom. rev. / L.K. Nakamura // *Int. J. Syst. Bacteriol.* — 1984. — Vol. 34(4). — P. 410–413.
498. Nakamura, M. *Handbook of starch science* / M. Nakamura. — Tokyo: Asakura-shoten, 1977. — 18 p.
499. Napoli, R. Indirect pathway of liver glycogen synthesis in humans is predominant and independent of beta-adrenergic mechanisms / R. Napoli, B. Capaldo, A. Picardi, F. Piscione, M.C. Bigazzi, C. D'Ascia, L. Saccà // *Clin. Physiol.* — 1992. — Vol. 12(6). — P. 641–652.
500. Naumov, N.V. Hepatitis C virus infection in the development of hepatocellular carcinoma in cirrhosis / N.V. Naumov // *J.Hepatol.* — 1997. — Vol. 27(2). — P. 130–135.
501. Newgard, C.B. Studies on the mechanism by which exogenous glucose is converted into liver glycogen in the rat. A direct or indirect pathway? / C.B. Newgard, S.U. Moore, D.W. Foster, J.D. McGarry // *J. Biol. Chem.* — 1983. — Vol. 258. — P. 8046–8050.
502. Newgard, C.B. Evidence for suppression of hepatic glucose-6-phosphatase with carbohydrate feeding / C.B. Newgard, D.W. Foster, J.D. McGarry // *Diabetes*. — 1984. — Vol. 33. — P. 192–195.
503. Newsholme, E.A. *Regulation in metabolism* / E.A. Newsholme, C. Start. — London, New York, Sydney, Toronto: John Wiley&Sons, 1975. — 349 p.
504. Newsholme, E.A. Role of the liver in integration of fat and carbohydrate metabolism and clinical implications in patients with liver disease / E.A. Newsholme // *Prog. Liver. Dis.* — 1976. — Vol. 5. — P. 125–135.

505. Nielsen, J. Subcellular localization-dependent decrements in skeletal muscle glycogen and mitochondria content following short-term disuse in young and old men / J. Nielsen, C. Suetta, L.C. Hvid, H.D. Schroder, P. Aagaard, N. Ortenblad // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* — 2010. — Vol. 299. — P. E1053–E1060.

506. Niemeyer, H. Adaptive character of liver glucokinase / H. Niemeyer, T. Ureta, L. Clark-Turri // *Mol. Cell Biochem.* — 1975. — Vol. 6(2). — P. 109–126.

507. Niewoehner, C.B. Metabolic effects of oral glucose in the liver of fasted rats / C.B. Niewoehner, D.P. Gilboe, F.Q. Nuttall // *Amer. J. Physiol.* — 1984. — Vol. 246. — P. E89–E94.

508. Niewoehner C.B. Mechanism of stimulation of liver glycogen synthesis by fructose in alloxan diabetic rats / C.B. Niewoehner, F.Q. Nuttall // *Diabetes.* — 1986. — Vol. 35. — P. 705–711.

509. Niewoehner, C.B. Relationship of hepatic glucose uptake to intrahepatic glucose concentration in fasted rats after glucose load / C.B. Niewoehner, F.Q. Nuttall // *Diabetes.* — 1988. — Vol. 37. — P. 1559–1566.

510. Nikolova, P. Wine as a medicine in ancient times / P. Nikolova, Z. Stoyanov, D. Doncheva, S. Trendafilova // *Scripta Scientifica Pharmaceutica.* — 2018. — Vol. 5(2). — P. 14–21.

511. Nilsson, L.H. Liver glycogen content in man in the postabsorptive state / L.H. Nilsson // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* — 1973. — Vol. 32(4). — P. 317–323.

512. Nishida, T. Diagnosis and clinical implications of diabetes in liver cirrhosis: a focus on the oral glucose tolerance test / T. Nishida // *J. Endocr. Soc.* — 2017. — Vol. 1(7). — P. 886–896.

513. Nishikawa, T. A switch in the source of ATP production and a loss in capacity to perform glycolysis are hallmarks of hepatocyte failure in advance liver disease / T. Nishikawa, N. Bellance, A. Damm, H. Bing, Z. Zhu, K. Handa, [et al.] // *J. Hepatol.* — 2014. — Vol. 60(6). — P. 1203–1211.

514. Nordlie, R.C. Evidence for the common identity of glucose 6-phosphatase, inorganic pyrophosphatase, and pyrophosphate-glucose phosphotransferase / R.C. Nordlie, W.J. Arion // *J. Biol. Chem.* — 1964. — Vol. 239. — P. 1680–1685.

515. Nordlie, R.C. Stimulation by polyamines of carbamylphosphate: glucose phosphohydrolase activities of multifunctional glucose-6-phosphatase / R.C. Nordlie, T.W.



Johnson, W.E. Cornatzer, G.W. Twedell // *Biochem. Biophys. Acta.* — 1979. — Vol. 585. — P. 2–23.

516. Nouredin, M. NASH cirrhosis trials and major adverse liver outcomes: Big data needed / M. Nouredin, S.A. Harrison // *J. Hepatol.* — 2023. — Vol. 78. — P. 5–7.

517. Nuttall, F.Q. Regulation of hepatic glucose production and the role of gluconeogenesis in humans: is the rate of gluconeogenesis constant? / F.Q. Nuttall, A. Ngo, M.C. Gannon // *Diabetes Metab. Res. Rev.* — 2008. — Vol. 24(6). — P. 438–458.

518. O'Doherty, R.M. Differential metabolic effects of adenovirus-mediated glucokinase and hexokinase I overexpression in rat primary hepatocytes / R.M. O'Doherty, D.L. Lehman, J. Seoane, A.M. Gómez-Foix, J.J. Guinovart, C.B. Newgard // *J. Biol. Chem.* — 1996. — Vol. 271(34). — P. 20524–20530.

519. Obel, L.F. Brain glycogen-new perspective on its metabolic function and regulation at the subcellular level / L.F. Obel, M.S. Muller, A.B. Walls, H.M. Sickmann, L.K. Bak, H.S. Waagepetersen, A. Schousboe // *Front Neuroenergetics.* — 2012. — Vol. 4. — Article number: 3.

520. Ogurtsova, K. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040 / K. Ogurtsova, J.D. da Rocha Fernandes, Y. Huang, U. Linnenkamp, L. Guariguata, N.H. Cho, [et al.] // *Diabetes Res. Clin. Pract.* — 2017. — Vol. 128. — P. 40–50.

521. Ohyashiki, T. Contribution of peroxidation products to oxidative inactivation of rat liver microsomal glucose-6-phosphatase / T. Ohyashiki, K. Kamata, M. Takeuchi, K. Matsui // *J. Biochem.* — 1995. — Vol. 118. — P. 508–514.

522. Okazaki, I. Formation of liver fibrosis to cirrhosis from the aspect of collagen degradation / I. Okazaki, K. Maruyama // *Exp. Pathol.* — 1985. — Vol. 28. — P. 137–138.

523. Onghena, L. Quality of life after liver transplantation: State of the art / L. Onghena, W. Develtere, C. Poppe, A. Geerts, R. Troisi, A. Vanlander, [et al.] // *World J. Hepatol.* — 2016. — Vol. 8(18). — P. 749–756.

524. Onori, P. Hepatic microvascular features in experimental cirrhosis: a structural and morphometrical study in CCl<sub>4</sub>-treated rats / P. Onori, S. Morini, A. Franchitto, R. Sferra, D. Alvaro, E. Gaudio // *J. Hepatol.* — 2000. — Vol. 33. — P. 555–563.

525. Orrell, S.A. A comparison of products obtained by various procedures used for the extraction of glycogen / S.A. Orrell, E. Bueding // *J. Biol. Chem.* — 1964. — Vol. 239. — P. 4021–4026.

526. Otto, M. Metformin inhibits glycogen synthesis and gluconeogenesis in cultured rat hepatocytes / M. Otto, J. Breinholt, N. Westergaard // *Diabetes, Obesity and Metabolism*. — 2003. — Vol. 5. — P. 189–194.

527. Owen, O.E. Hepatic, gut and renal substrate flux in patients with hepatic cirrhosis / O.E. Owen, F.A. Reichle, M.A. Mazzoli, I. Kreulen // *J. Clin. Invest.* — 1981. — Vol. 68. — P. 240–252.

528. Owen O.E. Nature and quantity of fuels consumed in patients with alcoholic cirrhosis / O.E. Owen, V.E. Trapp, G.A. Reichard, M.A. Mozzoli, J. Moctezuma, P. Paul, [et al.] // *J. Clin. Invest.* — 1983. — Vol. 72. — P. 1821–1832.

529. Ozen, H. Glycogen storage diseases: new perspectives / H. Ozen // *World. J. Gastroenterol.* — 2007. — Vol. 13. — P. 2541–2553.

530. Panserat, S. Nutritional regulation of glucokinase: a cross-species story / S. Panserat, N. Rideau, S. Polakof // *Nutr. Res. Rev.* — 2014. — Vol. 27. — P. 21–47.

531. Parsons, A.B. Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways / A.B. Parsons, R.L. Brost, H. Ding, Z. Li, C. Zhang, B. Sheikh, [et al.] // *Nature Biotechnology*. — 2004. — Vol. 22(1). — P. 62–69.

532. Patel, M. Does providing routine liver volume assessment add value when performing CT surveillance in cirrhotic patients? / M. Patel, P. Puangsricharoen, H.M.S. Arshad, S. Garrison, W. Techasatian, M. Ghabril, [et al.] // *Abdom. Radiol. (NY)*. — 2019. — Vol. 44(10). — P. 3263–3272.

533. Patterson, M. Residual diploidy in polyploid tissues: a cellular state with enhanced proliferative capacity for tissue regeneration? / M. Patterson, S.K. Swift // *Stem Cells Dev.* — 2019. — Vol. 28(23). — P. 1527–1539.

534. Pautsch, A. Molecular recognition of the protein phosphatase 1 glycogen targeting subunit by glycogen phosphorylase / A. Pautsch, N. Stadler, O. Wissdorf, E. Langkopf, W. Moreth, R. Streicher // *J. Biol. Chem.* — 2008. — Vol. 283. — P. 8913–8918.

535. Pellegrino, C. A quantitative cytochemical and physiological study of the rat adrenal cortex in hypertrophy after unilateral adrenalectomy / C. Pellegrino, P.D. Ricci, R. Tongiani // *Exp. Cell Res.* — 1963. — Vol. 31. — P. 167–182.

536. Perdigoto, R. Sources of glucose production in cirrhosis by  $2\text{H}_2\text{O}$  ingestion and  $2\text{H}$  NMR analysis of plasma glucose / R. Perdigoto, A.L. Furtado, A. Porto // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2003. Vol. 1637(2). — P. 156–163.

537. Perez, N. Regulation of rat liver enzymes by natural components of the diet / N. Perez, L. Clark-Turri, E. Rabajille, H. Niemeyer // *J. Biol. Chem.* — 1964. — Vol. 239(8). — P. 2420–2426.
538. Peters, R. Die Mitoseaktivitat in der regenerierenden leber von ratten in abhangigkeit von der aussentemperatur / R. Peters // *Z. Naturforsch.* — 1962. — Vol. 176. — P. 169–183.
539. Petersen K.F. Contributions of net hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis to glucose production in cirrhosis / K.F. Petersen, M. Krssak, V. Navarro, V. Chandramouli, R. Hundal, W.C. Schumann, [et al.] // *Am. J. Physiol.* — 1999. — Vol. 276. — P. E529–E535.
540. Petersen, M.C. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease / M.C. Petersen, D.F. Vatner, G.I. Shulman // *Nat. Rev. Endocrinol.* — 2017. — Vol. 13(10). — P. 572–587.
541. Petrides, A.S. Glucose and insulin metabolism in cirrhosis / A.S. Petrides, R.A. DeFronzo // *J. Hepatol.* — 1989. — Vol. 8(1). — P. 107–114.
542. Petrides, A.S. Pathogenesis of glucose intolerance and diabetes mellitus in cirrhosis / A.S. Petrides, C. Vong, D. Schulze-Berge, D. Matthews, G. Strohmeyer // *Hepatology.* — 1994. — Vol. 19. — P. 616–627.
543. Pieniasek, D. Glikogenoza typu VI i VIa / D. Pieniasek, E. Pronicka, B. Cabalska, J. Pawlovska // *Pediat. Pol.* — 1985. — Vol. 60. — P. 489–496.
544. Piscaglia, A.C. Stem cell-based therapies for liver diseases: state of the art and new perspectives / A.C. Piscaglia, M. Campanale, A. Gasbarrini, G. Gasbarrini // *Stem Cells Int.* — 2010. — Vol. 2010. — Article 259461.
545. Piston, D.W. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly / D.W. Piston, G.J. Kremers // *Trends Biochem. Sci.* — 2007. — Vol. 32. — P. 407–414.
546. Planaguma, A. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor SC-236 reduces liver fibrosis by mechanisms involving nonparenchymal cell apoptosis and PPARgamma activation / A. Planaguma, J. Claria, R. Miquel, M. López-Parra, E. Titos, J.L. Masferrer, [et al.] // *FASEB J.* — 2005. — Vol. 19. — P. 1120–1122.
547. Polakof, S. Glucosensing and glucose homeostasis: from fish to mammals / S. Polakof, T.P. Mommsen, J.L. Soengas // *Comp. Biochem. Physiol.* — 2011. — Vol. 160B. — P. 123–149.

548. Popper, H. Zur kenntnis des glykogengehaltes der leichenleber / H. Popper, O. Wozasek // *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* — 1931. — Vol. 279. — P. 819–868.
549. Powell, L.W. Reversal of “cirrhosis” in idiopathic haemochromatosis following long-term intensive venesection therapy / L.W. Powell, J.F. Kerr // *Australas Ann. Med.* — 1970. — Vol. 19. — P. 54–57.
550. Poynard, T. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C / T. Poynard, J. McHutchison, M. Manns, C. Trepo, K. Lindsay, Z. Goodman, [et al.] // *Gastroenterology.* — 2002. — Vol. 122(5). — P. 1303–1313.
551. Poyton, R.O. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling / R.O. Poyton, K.A. Ball, P.R. Castello // *Trends Endocrinol. Metab.* — 2009. — Vol. 20(7). — P. 332–340.
552. Prats, C. Dual regulation of muscle glycogen synthase during exercise by activation and compartmentalization / C. Prats, J.W. Helge, P. Nordby, K. Qvortrup, T. Ploug, F. Dela, J.F.P. Wojtaszewski // *J. Biol. Chem.* — 2009. — Vol. 284. — P. 15692–15700.
553. Prieto, I. ROS homeostasis, a key determinant in liver ischemic-preconditioning / I. Prieto, M. Monsalve // *Redox. Biol.* — 2017. — Vol. 12. — P. 1020–1025.
554. Prikhodko, V.A. Pharmacotherapy for non-alcoholic fatty liver disease: emerging targets and drug candidates / V.A. Prikhodko, N.N. Bezborodkina, S.V. Okovity // *Biomedicines.* — 2022. — Vol. 10. — Article 274.
555. Prins, D.A. Chemistry of the carbohydrates / D.A. Prins, R.W. Jeanlos // *Annu. Rev. Biochem.* — 1948. — Vol. 17. — P. 67–96.
556. Prothero, J. Organ scaling in mammals: the liver / J. Prothero // *Comp. Biochem. Physiol.* — 1982. — Vol. 71A. — P. 567–577.
557. Przybylski, W. Glycogen metabolism in muscle and its effects on meal quality in pigs — a mini review / W. Przybylski, G. Monin, M. Kocwin-Podsiadla, E. Krzecio // *Pol. J. Food Nutr. Sci.* — 2006. — Vol. 56(3). — P. 257–262.
558. Qian, Y. The glycogen synthase 2 gene (*Gys2*) displays parallel evolution between Old World and New World fruit bats / Y. Qian, T. Fang, B. Shen, S. Zhang // *J. Mol. Evol.* — 2014. — Vol. 78. — P. 66–74.

559. Rajas, F. The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats / F. Rajas, N. Bruni, S. Montano, C. Zitoun, G. Mithieux // *Gastroenterology*. — 1999. — Vol. 117. — P. 132v139.

560. Ramachandran, P. Reversibility of liver fibrosis / P. Ramachandran, J.P. Iredale // *Ann. Hepatol.* — 2009. Vol. 8(4). — P. 283–291.

561. Rappaport A.M. The acinus-microvascular unit of the liver / A.M. Rappaport // In: W. Wayne Lutt (Ed.). *Hepatic circulation in health and disease*. N.Y.: Raven Press, 1981. — P. 175–192.

562. Rasineni, K. Contrasting effects of fasting on liver-adipose axis in alcohol-associated and non-alcoholic fatty liver / K. Rasineni, C.W. Jordan, P.G. Thomes, J.L. Kubik, E.M. Staab, S.A. Sweeney, [et al.] // *Front Physiol.* — 2021. — Vol. 12. — 625352.

563. Rath, V.L. Activation of human liver glycogen phosphorylase by alteration of the secondary structure and packing of the catalytic core / V.L. Rath, M. Ammirati, P.K. LeMotte, K.F. Fennell, M.N. Mansour, D.E. Danley, [et al.] // *Mol. Cell.* — 2000. — Vol. 6. — P. 139–148.

564. Reczek, P.R. A purification of microsomal glucose-6-phosphatase from human tissue / P.R. Reczek, C.A. Vilee Jr. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1982. — Vol. 107 — P. 1158–1165.

565. Reichen, J. Aminopyrine N-Demethylation by rats with liver cirrhosis / J. Reichen, F. Arts, U. Schafroth, A. Zimmermann, B. Zeltner, T. Zysset // *Gastroenterology*. — 1987. — Vol. 93. — P. 719–726.

566. Reichle, F.A. Hepatic metabolism in patients with alcoholic cirrhosis / F.A. Reichle, O.E. Owen, M. Golsorkhi, T. Kreulen // *Surgery*. — 1978. — Vol. 84. — P. 33–36.

567. Reinke, H. Circadian clock control of liver metabolic functions / H. Reinke, G. Asher // *Gastroenterology*. — 2016. — Vol. 150(3). — P. 574–580.

568. Reith, A. The inner membrane of mitochondria under influence of triiodothyronine and riboflavin deficiency in rat heart muscle and liver: a quantitative electronmicroscopical and biochemical study / A. Reith, D. Brdiczka, J. Nolte, H.W. Staudte // *Exp. Cell. Res.* — 1973. — Vol. 77. — P. 1–14.

569. Reyes, A. All hexokinase isoenzymes coexist in rat hepatocytes / A. Reyes, M.L. Cardenas // *Biochem. J.* — 1984. — Vol. 221(2). — P. 303–309.

570. Riggio, O. Impaired nonoxidative glucose metabolism in patients with liver cirrhosis: effects of two insulin doses / O. Riggio, M. Merli, F. Leonetti, P. Giovannetti, M. Foniciello, S. Folino, [et al.] // *Metabolism*. — 1997. — Vol. 46. — P. 840–843.
571. Roach, P.J. The endocrine pancreas and regulation of metabolism / P.J. Roach, A.V. Skurat, R.A. Harris // In: L.S. Jefferson, A.D. Cherrington (Eds.). *Handbook of physiology. Section 7. The endocrine system*. — Oxford: Oxford University Press, 2001. — Vol. 2. — P. 609–647.
572. Roach, P.J. Glycogen and its metabolism / P.J. Roach // *Curr. Mol. Med.* — 2002. — Vol. 2. — P. 101–120.
573. Roach, P.J. Glycogen and its metabolism: some new development and old themes / P.J. Roach, A.A. Depaoli-Roach, T.D. Hurley, V.S. Tagliabracci // *Biochem. J.* — 2012. — Vol. 441. — P. 763–787.
574. Roberts, M.S. Survival after liver transplantation in the United States: a disease-specific analysis of the UNOS database / M.S. Roberts, D.C. Angus, C.L. Bryce, Z. Valenta, L. Weissfeld // *Liver Transpl.* — 2004. — Vol. 10(7). — P. 886–897.
575. Roderfeld, M. Inhibition of hepatic fibrogenesis by matrix metalloproteinase-9 mutants in mice / M. Roderfeld, R. Weiskirchen, S. Wagner, M.-L. Berres, C. Henkel, J. Grötzinger, [et al.] // *The FASEB Journal*. — 2006. — Vol. 20(3). — P. 444–454.
576. Rodwell, V.W. *Harper's Illustrated Biochemistry, 30th Edition* / V.W. Rodwell, D.A. Bender, K.M. Botham, P.J. Kennelly, P.A. Weil. — N.Y.: McGraw-Hill, 2015. — 817 p.
577. Roesler, W.J. Hepatic glycogen metabolism in the db/db mouse / W.J. Roesler, S. Pugazhenthii, R.L. Khandelwal // *Mol. Cell Biochem.* — 1990. — Vol. 92. — P. 99–106.
578. Rogers, A.B. Hepatobiliary system / A.B. Rogers, R.Z. Dintzis // In: P.M. Treuting, S.M. Dintzis, K.S. Montine (Eds). *Comparative anatomy and histology: a mouse, rat, and human atlas*, 2nd edition. — London, U.K.: Academic press an imprint of Elsevier, 2018. — P. 229–240.
579. Rognstad, R. Glucose-6-phosphatase flux and the hepatic glucose balance model / R. Rognstad // *Am. J. Physiol.* — 1996. — Vol. 271(6 Pt 1). — P. E1125–E1127.
580. Rojas, J.M. Control of hepatic glucose metabolism by islet and brain / J.M. Rojas, M.W. Schwartz // *Diabetes Obes. Metab.* — 2014. — Vol. 1. — P. 33–40.
581. Romert, P. Histological evaluation of the zonation of colloidal gold uptake by the rat liver / P. Romert, B. Quistorff, O. Bhenke // *Tissue Cell*. — 1993. — Vol. 25. — P. 19–32.

582. Roncero, I. Glucokinase and glucokinase regulatory proteins are functionally coexpressed before birth in the rat brain / I. Roncero, C. Sanz, E. Alvarez, P. Vázquez, P.A. Barrio, E. Blázquez // *J. Neuroendocrinol.* — 2009. — Vol. 21. — P. 973–981.
583. Rossetti, F. Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of graft-versus-host disease / F. Rossetti, R. Dall'Amico, G. Crovetto, C. Messina, G. Montini, G. Dini, [et al.] // *Bone Marrow Transplant.* — 1996. — Vol. 18(2). — P. 175–181.
584. Rossetti, L. Mechanism by which hyperglycemia inhibits hepatic glucose production in conscious rats. Implications for the pathophysiology of fasting hyperglycemia in diabetes / L. Rossetti, A. Giaccari, N. Barzilai, K. Howard, G. Sebel, M. Hu // *J. Clin. Invest.* — 1993. — Vol. 92(3). — P. 1126–1134.
585. Rothman, D.L. Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting humans with  $^{13}\text{C}$  NMR / D.L. Rothman, I. Magnusson, L.D. Katz, R.G. Shulman, G.I. Shulman // *Science.* — 1991. — Vol. 254. — P. 573–576.
586. Rousset, Y. Stochastic modelling of a three-dimensional glycogen granule synthesis and impact of the branching enzyme / Y. Rousset, O. Ebenhöf, A. Raguin // *bioRxiv* — 2022.10.31.514469. — 2022. — Available at: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.10.31.514469v1.full> (accessed 28.07.2023).
587. Ruderman, N.B. Gluconeogenesis and its disorders in man / N.B. Ruderman, T.T. Aoki, G.F. Cahill // In: R.W. Hanson, M.A. Mehlman (Eds.). *Gluconeogenesis: its regulation in mammalian species.* — N.Y.: John Wiley and Sons, 1976. — P. 515–532.
588. Rui, L. Energy metabolism in the liver / L. Rui // *Compr. Physiol.* — 2014. — Vol. 4(1). — P. 177–197.
589. Ruohonen, S.T. Transgenic mice overexpressing neuropeptide Y in noradrenergic neurons: a novel model of increased adiposity and impaired glucose tolerance / S.T. Ruohonen, U. Pesonen, N. Moritz, K. Kaipio, M. Røyttä, M. Koulu, E. Savontaus // *Diabetes.* — 2008. — Vol. 57(6). — P. 1517–1525.
590. Rybicka, K.K. Glycosomes — the organelles of glycogen metabolism / K.K. Rybicka // *Tissue Cell.* — 1996. — Vol. 28. — P. 253–265.
591. Sajja, K.C. Age and ethnicity in cirrhosis / K.C. Sajja, D.P. Mohan, D.C. Rockey // *J. Investig. Med.* — 2014. — Vol. 62(7). — P. 920–926.

592. Santos, N.P. Animal models as a tool in hepatocellular carcinoma research: A Review / N.P. Santos, A.A. Colaço, P.A. Oliveira // *Tumour Biol.* — 2017. — Vol. 39(3). — 1010428317695923.
593. Sasse, D. Liver architecture / D. Sasse, U.M. Spornitz, I.P. Maly // *Enzyme.* — 1992. — Vol. 46. — P. 8–32.
594. Scaglione, S. The epidemiology of cirrhosis in the United States: A population-based study / S. Scaglione, S. Kliethermes, G. Cao, D. Shoham, R. Durazo, A. Luke, M.L. Volk // *J. Clin. Gastroenterol.* — 2015. — Vol. 49(8), — P. 690–696.
595. Schliess, F. Cell volume and insulin signaling / F. Schliess, D. Häussinger // *Int. Rev. Cytol.* — 2003. — Vol. 225. — P. 187–228.
596. Schmidt, U. Liver cell heterogeneity. The distribution of fructose-bisphosphatase in fed and fasted rats and in man / U. Schmidt, H. Schmid, W. Guder // *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* — 1978. — Vol. 359. — P. 193–198.
597. Schneeweiss, B. Energy metabolism in patients with acute and chronic liver disease / B. Schneeweiss, W. Graninger, P. Ferenci, S. Eichinger, G. Grimm, B. Schneider, [et al.] // *Hepatology.* — 1990. — Vol. 11(3). — P. 387–393.
598. Schneiter, P. Hepatic nonoxidative disposal of an oral glucose meal in patients with liver cirrhosis / P. Schneiter, M. Gillet, R. Chiolero, E. Jéquier, L. Tappy // *Metabolism.* — 1999. — Vol. 48. — P. 1260–1266.
599. Schofield, Z. Changes in human hepatic metabolism in steatosis and cirrhosis / Z. Schofield, M.A. Reed, P.N. Newsome, D.H. Adams, U.L. Günther, P.F. Lalor // *World J. Gastroenterol.* — 2017. — Vol. 23(15). — P. 2685–2695.
600. Schuppan, D. Liver cirrhosis / D. Schuppan, N.H. Afdhal // *Lancet.* — 2008. — Vol. 371(9615). — P. 838–851.
601. Seglen, P.O. Preparation of isolated rat liver cells / P.O. Seglen // *Meth. Cell. Biol.* — 1976. — Vol. 13. — P. 29–83.
602. Segura, J. Contribution of the kidney to glucose homeostasis / J. Segura, L.M. Ruilope // *Med. Clin. (Barc.).* — 2013. — Vol. 2. — P. 26–30.
603. Seldak, J. Estimation of total proteinbound and nonprotein sulfhydryl group in tissues with Ellmans reagent / J. Seldak, R.M. Lindsay // *Anal. Biochem.* — 1968. — Vol. 25. — P. 192–195.



604. Sell, S. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells / S. Sell // *Hepatology*. — 2001. — Vol. 33. — P. 738–750.
605. Seoane, J. Glucose 6-phosphate produced by glucokinase, but not hexokinase I, promotes the activation of hepatic glycogen synthase / J. Seoane, A.M. Gómez-Foix, R.M. O'Doherty, C. Gómez-Ara, C.B. Newgard, J.J. Guinovart // *J. Biol. Chem.* — 1996. — Vol. 271(39). — P. 23756–23760.
606. Seoane, J. Metabolic impact of adenovirus-mediated overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in hepatocytes / J. Seoane, K. Trinh, R.M. O'Doherty, A.M. Gómez-Foix, A.J. Lange, C.B. Newgard, J.J. Guinovart // *J. Biol. Chem.* — 1997. — Vol. 272(43). — P. 26972–26977.
607. Sepanlou, S.G. The global, regional, and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017 / S.G. Sepanlou, S. Safiri, C. Bisignano, K.S. Ikuta, S. Merat, M. Saberifiroozi, [et al.] // *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* — 2020. — Vol. 5. — P. 245–266.
608. Shami, G.J. Three-dimensional ultrastructure of giant mitochondria in human non-alcoholic fatty liver disease / G.J. Shami, D. Cheng, P. Verhaegh, G. Koek, E. Wisse, F. Braet // *Sci. Rep.* — 2021. — Vol. 11(1). — Article 3319.
609. Shavelle, R.M. Life expectancy after liver transplantation for alcoholic cirrhosis / R.M. Shavelle, R.C. Saur, J.H. Kwak, J.C. Brooks, B. Hameed // *Prog. Transplant.* — 2021. — Vol. 31(4). — P. 345–356.
610. Shearer, J. New perspectives on the storage and organization of muscle glycogen / J. Shearer, T.E. Graham // *Can. J. Appl. Physiol.* — 2002. — Vol. 27. — P. 179–203.
611. Shearer, J. Novel aspects of skeletal muscle glycogen and its regulation during rest and exercise / J. Shearer, T.E. Graham // *Exerc. Sport Sci. Rev.* — 2004. — Vol. 32. — P. 120–126.
612. Shearer, J. Glycogenin activity and mRNA expression in response to volitional exhaustion in human skeletal muscle / J. Shearer, T.E. Graham, D.S. Battram, D.L. Robinson, E.A. Richter, R.J. Wilson, M. Bakovic // *J. Appl. Physiol.* — 2005. — Vol. 99. — P. 957–962.
613. Shimamura, J. Hepatic key carbohydrate metabolizing enzymes in benign liver disease and hepatocellular carcinoma / J. Shimamura // *J. Med. Assos. Okayama.* — 1987. — Vol. 99. — P. 261–272.

614. Shin, D. Cellular and molecular basis of liver development / D. Shin, S.P. Monga // *Compr. Physiol.* — 2013. — Vol. 3(2). — P. 799–815.

615. Shmueli, E. Normal splanchnic but impaired peripheral insulin-stimulated glucose uptake in cirrhosis / E. Shmueli, M. Walker, G. Alberti, C.O. Record // *Hepatology.* — 1993. — Vol. 18. — P. 86–95.

616. Siegel, E.G. Insulin secretion defects in liver cirrhosis can be reversed by glucagons-like peptide-1 / E.G. Siegel, A. Seidenstucker, B. Galwitz, F. Schmitz, A. Reinecke-Lüthge, G. Klöppel, [et al.] // *J. Endocrinol.* — 2000. — Vol. 164. — P. 13–19.

617. Siller-Lopez, F. Treatment with human metalloproteinase-8 gene delivery ameliorates experimental rat liver cirrhosis / F. Siller-López, A. Sandoval, S. Salgado, A. Salazar, M. Bueno, J. Garcia, [et al.] // *Gastroenterology.* — 2004. — Vol. 126(4). — P. 1122–1133.

618. Simmonds, P. Reconstructing the origins of human hepatitis viruses / P. Simmonds // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* — 2001. — Vol. 356. — P. 1013–1026.

619. Simon, G. The effect of hepatic steatosis and fibrosis on liver weight and dimensions / G. Simon, V. Heckmann, D. Toth, D. Pauka, K. Petrus, T.F. Molnar // *Leg. Med. (Tokyo).* — 2020. — Vol. 47. — Article 101781.

620. Smejkalova, J. The time course of biochemical and histological changes following carbon tetrachloride-induced liver damage in rats of both sexes / J. Smejkalova, J. Simek, J. Rouchal, I. Dvorackova // *Physiologia Bohemoslovaca.* — 1985. — Vol. 34. — P. 494–501.

621. Snyder, W. Report on the task group on reference man / W. Snyder, M.J. Cook, E.S. Nasset, L.R. Karhausen, G. Parry Howells, I.H. Tipton. — Oxford, New York, Seoul, Tokyo: Pergamon Press, 1975. — 480 P.

622. Soares, A.F. Quantifying hepatic glycogen synthesis by direct and indirect pathways in rats under normal ad libitum feeding conditions / A.F. Soares, F.J. Viega, R.A. Carvalho, J.G. Jones // *Magn. Reson. Med.* — 2009. — Vol. 61(1). — P. 1–5.

623. Soberon, G. Changes in Effective Enzyme Concentration in the Growing Rat Liver. I. Effects of fasting followed by repletion / G. Soberon, Q.E. Sanchez // *J. Biol. Chem.* — 1961. — Vol. 236(5). — P. 1602–1606.

624. Sobesky, R. Modeling the impact of interferon alfa treatment on liver fibrosis progression in chronic hepatitis C: a dynamic view. The Multivirc Group / R. Sobesky, P.

Mathurin, F. Charlotte, J. Moussalli, M. Olivi, M. Vidaud, [et al.] // *Gastroenterology*. — 1999. — Vol. 116(2). — P. 378–386.

625. Sobrevals, L. Insulin-like growth factor I gene transfer to cirrhotic liver induces fibrolysis and reduces fibrogenesis leading to cirrhosis reversion in rats / L. Sobrevals, C. Rodriguez, J.L. Romero-Trevejo // *Hepatology*. — 2010. — Vol. 51(3). — P. 912–921.

626. Sohlenius-Sternbeck, A.-K. Determination of the hepatocellularity number for human, dog, rabbit, rat and mouse livers from protein concentration measurements / A.-K. Sohlenius-Sternbeck // *Toxicol. In Vitro*. — 2006. — Vol. 20(8). — P. 1582–1586.

627. Sotaniemi, E.A. Carbohydrate intolerance associated with reduced hepatic glucose phosphorylating and releasing enzyme activities and peripheral insulin resistance in alcoholics with liver cirrhosis / E.A. Sotaniemi, H.U. Saami, A.J. Arranto, A. Rautio // *J. Hepatol.* — 1985. — Vol. 1. — P. 277–287.

628. Souza, B.F. Theories about evolutionary origins of human hepatitis B virus in primates and humans / B.F. Souza, J.F. Drexler, R.S. de Lima, O. Rosário, E.M. Netto // *Braz. J. Infect. Dis.* — 2014. — Vol. 8(5). — P. 535–543.

629. Stapleton, D. Analysis of hepatic glycogen-associated proteins / D. Stapleton, C. Nelson, K. Parsawar, D. McClain, R. Gilbert-Wilson, E. Barker, [et al.] // *Proteomics*. — 2010. — Vol. 10. — P. 2320–2329.

630. Stearns, S.B. Structural and chemical alterations associated with hepatic glycogen metabolism in genetically diabetic (db) and in streptozotocin-induced diabetic mice / S.B. Stearns, C.A. Benzo // *Lab. Invest.* — 1977. — Vol. 37. — P. 180–187.

631. Stetten, M.R. A study of the nature of glycogen regeneration in the intact animal / M.R. Stetten, D. Jr. Stetten // *J. Biol. Chem.* — 1954. — Vol. 207. — P. 331–340.

632. Stetten, M.R. Influence of molecular size of glycogen on the phosphorylase reaction / M.R. Stetten, D. Jr. Stetten // *J. Biol. Chem.* — 1958. — Vol. 232. — P. 489–504.

633. Stevens, K.R. In situ expansion of engineered human liver tissue in a mouse model of chronic liver disease / K.R. Stevens, M.A. Scull, V. Ramanan, C.L. Fortin, R.R. Chaturvedi, K.A. Knouse, [et al.] // *Sci. Transl. Med.* — 2017. — Vol. 9(399). — eaah5505.

634. Stöcker, E. Wachstum und regeneration in parenchymatösen organen der ratte / E. Stöcker, B. Schultze, W. Heine, H. Liebscher // *Ztschr. Zellforsch.* — 1972. — Vol. 125. — P. 306–331.

635. Stowell, R.E. Histochemical and microchemical changes in experimental cirrhosis and hepatoma formation in mice by carbon tetrachloride / R.E. Stowell, C.S. Lee, K.K. Tsuboi, A. Villasana // *Cancer Res.* — 1951. — Vol. 11(5). — P. 345–354.
636. Stratton, R.J. Disease-Related Malnutrition: an Evidence-Based approach to treatment / R.J. Stratton, C.J. Green, M. Elia. — CABI Publishing, 2003. — 824 p.
637. Su, Q. Relevance of hepatic preneoplasia for human hepatocarcinogenesis / Q. Su, P. Bannasch // *Toxicol. Pathol.* — 2003. — Vol. 31(1). — P. 126–133.
638. Sullivan, M.A. Nature of  $\alpha$  and  $\beta$  particles in glycogen using molecular size distributions / M.A. Sullivan, F. Vilaplana, R.A. Cave, D. Stapleton, A.A. Gray-Weale, R.G. Gilbert // *Biomacromolecules.* — 2010. — Vol. 11. — P. 1094–1100.
639. Sullivan, M.A. Molecular structural differences between type-2-diabetic and healthy glycogen / M.A. Sullivan, J. Li, C. Li, F. Vilaplana, D. Stapleton, A.A. Gray-Weale, [et al.] // *Biomacromolecules.* — 2011. — Vol. 12(6). — P. 1983–1986.
640. Sullivan, M.A. Changes in glycogen structure over feeding cycle sheds new light on blood-glucose control / M.A. Sullivan, S.T. Aroney, S. Li, F.J. Warren, J.S. Joo, K.S. Mak, [et al.] // *Biomacromolecules.* — 2014. — Vol. 15. — P. 660–665.
641. Sun, B. Activation of glycolysis and apoptosis in glycogen storage disease type Ia / B. Sun, S. Li, L. Yang, T. Damodaran, D. Desai, A.M. Diehl, [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* — 2009. — Vol. 97(4). — P. 267–271.
642. Sun, T. Starch binding domain-containing protein 1 plays a dominant role in glycogen transport to lysosomes in liver / T. Sun, H. Yi, C. Yang, P.S. Kishnani, B. Sun // *J. Biol. Chem.* — 2016. — Vol. 291. — P. 16479–16484.
643. Sun, Y. Mortality trends of liver diseases in mainland China over three decades: an age-period-cohort analysis / Y. Sun, J. Chang, X. Liu, C. Liu // *BMJ Open.* — 2019. — Vol. 9(11). — e029793.
644. Sun, Y.-M. Regression of liver fibrosis: evidence and challenges / Y.-M. Sun, S.-Y. Chen, H. You // *Chin. Med. J (Engl).* — 2020. — Vol. 133(14). — P. 1696–1702.
645. Szende, B. Olive oil decreases liver damage in rats caused by carbon tetrachloride / B. Szende, F. Timar, B. Hargitai // *Exp. Toxicol. Pathol.* — 1994. — Vol. 46. — P. 355–359.
646. Tagliabracci, V.S. Laforin is a glycogen phosphatase, deficiency of which leads to elevated phosphorylation of glycogen in vivo / V.S. Tagliabracci, J. Turnbull, W. Wang, J.-M.

Girard, X. Zhao, A.V. Skurat, [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2007. — Vol. 104. — P. 19262–19266.

647. Tagliabracci, V.S. Phosphate incorporation during glycogen synthesis and Lafora disease / V.S. Tagliabracci, C. Heiss, C. Karthik, C.J. Contreras, J. Glushka, M. Ishihara, [et al.] // *Cell Metab.* — 2011. — Vol. 13. — P. 274–282.

648. Takegoshi, K. Hepatocellular carcinoma and type 2 diabetes mellitus: cytokeratin 8/18 expression in hepatocellular carcinoma and glycogen-storing hepatocytes / K. Takegoshi, E. Okada, Q. Su // *Hepatoma Res.* — 2016. — Vol. 2. — P. 229–230.

649. Takehara, K. Nucleic acid metabolism in the liver in cells in liver diseases 2. Observation on fatty liver in choline-deficient rat, with special reference to modification of the disease process with xylitol / K. Takehara // *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi.* — 1975. — Vol. 72(5). — P. 537–544.

650. Taketa, K. Undifferentiated patterns of key carbohydrate-metabolizing enzymes in injured livers. Acute carbon-tetrachloride intoxication of rat / K. Taketa, A. Tanaka, A. Watanabe, A. Takesue, H. Aoe, K. Kosaka // *Enzyme.* — 1976. — Vol. 21. — P. 158–173.

651. Taketa, K. Profiles of carbohydrate-metabolizing enzymes in human hepatocellular carcinomas and preneoplastic livers / K. Taketa, J. Shimamura, M. Ueda, Y. Shimada, K. Kosaka // *Cancer Res.* — 1988. — Vol. 48. — P. 467–474.

652. Takeuchi, T. Ultrafine structure of glycogen macromolecules in mammalian-tissues / T. Takeuchi, T. Iwamasa, H. Miyayama // *Journal of Electron Microscopy.* — 1978. — Vol. 27 (1). — P. 31–38.

653. Taki-Eldin, A. Triiodothyronine attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury in a partial hepatectomy model through inhibition of proinflammatory cytokines, transcription factors, and adhesion molecules / A. Taki-Eldin, L. Zhou, H.-Y. Xie, K.-J. Chen, D. Yu, Y. He, S.-S. Zheng // *J. Surg. Res.* — 2012. — Vol. 178(2). — P. 646–656

654. Takusagawa, F. Chapter-15. Glycogen metabolism / F. Takusagawa // *Takusagawa's Note.* — 2010. — Available at: <https://studylib.net/doc/8670852/chapter-17--glycogen-metabolism> (accessed at 26.07.2023).

655. Tan, A.W.H. Regulation of synthase phosphatase and phosphorylase phosphatase in rat liver / A.W.H. Tan, F.Q. Nuttall // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1976. — Vol. 445. — P. 118–130.

656. Tan, X. Proteomic Investigation of the Binding Agent between Liver Glycogen  $\beta$  Particle / X. Tan, M.A. Sullivan, S.S. Nada, B. Deng, B.L. Schulz, R.G. Gilbert // *ACS Omega*. — 2018. — Vol. 3(4). — P. 3640–3645.

657. Tang, K. Hypoxia promotes breast cancer cell growth by activating a glycogen metabolic program / K. Tang, L. Zhu, J. Chen, D. Wang, L. Zeng, C. Chen, [et al.] // *Cancer Res*. — 2021. — Vol. 81. — P. 4949–4963.

658. Tarao, K. DNA synthesis activities of hepatocytes from noncancerous cirrhotic tissue and hepatocellular carcinoma (HCC) cells from cancerous tissue can predict the survival of hepatectomized patients with HCC / K. Tarao, Sh. Ohkawa, A. Shimizu, M. Harada, Y. Nakamura, N. Okamoto, [et al.] // *Cancer*. — 1993. — Vol. 71. — P. 3859–3863.

659. Tarao, K. Significance of hepatocellular proliferation in the development of hepatocellular carcinoma from anti-hepatitis C virus-positive cirrhotic patients / K. Tarao, S. Ohkawa, A. Shimizu, M. Harada, Y. Nakamura, Y. Ito, [et al.] // *Cancer*. — 1994. — Vol. 74(4). — P. 1149–1154.

660. Tejwani, G.A. The purification of properties of rat liver fructose-1,6-biphosphatase / G.A. Tejwani, F.O. Pedrosa, S. Pontremoli, B.L. Horecker // *Arch. Biochem. Biophys*. — 1976. — Vol. 177. — P. 253–264.

661. Tessari, P. Protein metabolism in liver cirrhosis: from albumin to muscle myofibrils / P. Tessari // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. — 2003. — Vol. 6(1). — P. 79–85.

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

663. Teutsch H.F. The modular microarchitecture of human liver / H.F. Teutsch // *Hepatology*. — 2005. — Vol. 42. — P. 317–325.

664. Tirnitz-Parker, J. Liver progenitor cells, cancer stem cells and hepatocellular carcinoma / J. Tirnitz-Parker, G. Yeoh, J. Olynyk // In: P.M. Baptista (Ed.). *Liver regeneration*. Chapter 2. — London, UK: InTech, 2013. — P. 17–42.

665. Tolman, K.G. Spectrum of liver disease in type 2 diabetes and management of patients with diabetes and liver disease / K.G. Tolman, V. Fonseca, A. Dalpiaz, M.H. Tan // *Diabetes Care*. — 2007. — Vol. 30(3). — P. 734–743.

666. Tongiani, R. Hepatocyte population dynamics during hydrocortisone and thioacetamide treatment / R. Tongiani, N. Lopek, E. Puccianelli // *Histochemistry*. — 1976. — Vol. 47. — P. 1–21.

667. Torbenson, M. Pathology of liver disease: advances in the last 50 years / M. Torbenson, K. Washington // *Hum. Pathol.* — 2020. — Vol. 95. — P. 78–98.

668. Torres, T.P. Defective glycogenesis contributes toward the inability to suppress hepatic glucose production in response to hyperglycemia and hyperinsulinemia in Zucker diabetic fatty rats / T.P. Torres, Y. Fujimoto, E.P. Donahue, R.L. Printz, K.L. Houseknecht, J.L. Treadway, M. Shiota // *Diabetes*. — 2011. — Vol. 60(9). — P. 2225–2233.

669. Toyoda, Y. Tissue and subcellular distribution of glucokinase in rat liver and their changes during fasting-refeeding / Y. Toyoda, I. Miwa, M. Kamiya, S. Ogiso, T. Nonogaki, S. Aoki, J. Okuda // *Histochem. Cell Biol.* — 1995. — Vol. 103. — P. 31–38.

670. Trovao, N.S. Reconstruction of the origin and dispersal of the worldwide dominant Hepatitis B Virus subgenotype D1 / N.S. Trovao, M. Thijssen, B. Vrancken, A.-C. Pineda-Peña, T. Mina, S. Amini-Bavil-Olyaei, [et al.] // *Virus Evolution*. — 2022. — Vol. 8(1). — P. 1–7.

671. Uchigama, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Uchigama, M. Michera // *Anal. Biochem.* — 1978. — Vol. 86. — P. 271–278.

672. Ueda, M. Hepatic hexokinase isozyme in liver diseases / M. Ueda, K. Taketa, J. Shimamura, K. Kosaka // *Clin. Chim. Acta.* — 1974. — Vol. 53. — P. 381–383.

673. Ureta, T. Comparative studies on glucose phosphorylating isoenzymes of vertebrates. I. The influence of fasting and the nature of the diet on liver glucokinase and hexokinases of rodents / T. Ureta, C. Gonzalez, S. Lillo, H. Niemeyer // *Comp. Biochem. Physiol.* — 1971. — Vol. 40B. — P. 71–80.

674. Ureta, T. The comparative isozymology of vertebrate hexokinases / T. Ureta // *Comp. Biochem. Physiol.* — 1982. — Vol. 71B. — P. 549–555.

675. Uyeda, K. Phosphofructokinase / K. Uyeda // *Adv. Enzymol.* — 1979. — Vol. 48. — P. 193–244.

676. Vallance-Owen, J. Liver glycogen in diabetes mellitus / J. Vallance-Owen // *J. Clin. Pathol.* — 1952. — Vol. 5. — P. 42–53.

677. Van de Werve, G. Liver glycogen metabolism: an overview / G. Van de Werve, B. Jeanrenaud // *Diabetes Metab. Rev.* — 1987. — Vol. 3. — P. 47–78.

678. van der Helm, D. Local but not systemic administration of mesenchymal stromal cells ameliorates fibrogenesis in regenerating livers / D. van der Helm, M.C. Barnhoorn, E.S.M. de Jonge-Muller, I. Molendijk, L.J.A.C. Hawinkels, M.J. Coenraad, [et al.] // *J. Cell Mol. Med.* — 2019. — Vol. 23. — P. 6238–6250.

679. van Dijk, T.H. Acute inhibition of hepatic glucose-6-phosphatase does not affect gluconeogenesis but directs gluconeogenic flux toward glycogen in fasted rats. A pharmacological study with the chlorogenic acid derivative S4048 / T.H. Van Dijk, F.H. van der Sluijs, C.H. Wiegman, J.F. Baller, L.A. Gustafson, H.J. Burger, [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2001. — Vol. 276. — P. 25727–25735.

680. Vähätalo, L.H. Neuropeptide Y in the noradrenergic neurones induces obesity and inhibits sympathetic tone in mice / L.H. Vähätalo, S.T. Ruohonen, S. Makela, M. Kovalainen, A. Huotari, K.A. Mäkelä, [et al.] // *Acta Physiol. (Oxf).* — 2015. — Vol. 213(4). — P. 902–919.

681. Vandercammen, A. Species and tissue distribution of the regulatory protein of glucokinase / A. Vandercammen, E. Van Schaftingen // *Biochem. J.* — 1993. — Vol. 294. — P. 551–556.

682. Vardanis, A. Particulate glycogen of mammalian liver: specificity in binding phosphorylase and glycogen synthase / A. Vardanis // *Biochem. Cell. Biol.* — 1992. — Vol. 70. — P. 523–527.

683. Verbrugge, A. Nutritional modulation of insulin resistance in the true carnivorous cat: a review / A. Verbrugge, M. Hesta, S. Daminet, G.P. Janssens // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* — 2012. — Vol. 52(2). — P. 172–182.

684. Vieira Ferreira, L.F. Luminescence quantum yield determination for molecules adsorbed onto solid powdered particles / L.F. Vieira Ferreira, T.J.F. Branco, A.M. Botelho do Rego // *Chem. Phys. Chem.* — 2004. — Vol. 5. — P. 1848–1854.

685. Villar-Palasi, C. The role of glucose 6-phosphate in the control of glycogen synthase / C. Villar-Palasi, J.J. Guinovart // *FASEB J.* — 1997. — Vol. 11. — P. 544–558.

686. Vinuela, E. Glucokinase and hexokinase in liver in relation to glycogen synthesis / E. Vinuela, M. Salas, A. Sols // *J. Biol. Chem.* — 1963. — Vol. 238(3). — P. 1175–1177.



687. von Wilamowitz-Moellendorff, A. Glucose-6-phosphate-mediated activation of liver glycogen synthase plays a key role in hepatic glycogen synthesis / A. von Wilamowitz-Moellendorff, R.W. Hunter, M. García-Rocha, L. Kang, I. López-Soldado, L. Lantier, [et al.] // *Diabetes*. — 2013. — Vol. 62(12). — P. 4070–4082.

688. Waddell, I.D. Transverse topology of glucose-6-phosphatase in rat hepatic endoplasmic reticulum / I.D. Waddell, A. Burchell // *Biochem. J.* — 1991. — Vol. 275. — P. 133–137.

689. Waldegger, S. Cell volume and gene expression / S. Waldegger, F. Lang // *J. Membr. Biol.* — 1998. — Vol. 162. — P. 95–100.

690. Walker, G.J. The mechanism of carbohydrase action. 8. Structures of the muscle-phosphorylase limit dextrins of glycogen and amylopectin / G.J. Walker, W.J. Whelan // *Biochem. J.* — 1960. — Vol. 76. — P. 264–270.

691. Wang, Q. Chronic drug-induced liver injury: updates and future challenges / Q. Wang, A. Huang, J.-B. Wang, Z. Zou // *Frontiers Pharmacol.* — 2021. — Vol. 12. — Article: 627133.

692. Wang, W.-J. Growing burden of alcoholic liver disease in China: A review / W.-J. Wang, P. Xiao, H.-Q. Xu, J.-Q. Niu, Y.-H. Gao // *World J. Gastroenterol.* — 2019. — Vol. 25(12). — P. 1445–1456.

693. Wang, Z. Nonalcoholic fatty liver disease progression in rats is accelerated by splenic regulation of liver PTEN/AKT / Z. Wang, N. Li, B. Wang, J. Lin // *Saudi J. Gastroenterol.* — 2015. — Vol. 21. — P. 232–238.

694. Wang, Z. The Extraction of liver glycogen molecules for glycogen structure determination / Z. Wang, Q. Liu, L. Wang, R.G. Gilbert, M.A. Sullivan // *J. Vis. Exp.* — 2022. — Vol. 180. — e63088.

695. Wanless, I.R. Regression of human cirrhosis. Morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis / I.R. Wanless, E. Nakashima, M. Sherman // *Arch. Pathol. Lab. Med.* — 2000. — Vol. 124. — P. 1599–1607.

696. Wanless, I.R. Use of corticosteroid therapy in autoimmune hepatitis resulting in the resolution of cirrhosis / I.R. Wanless // *J. Clin. Gastroenterol.* — 2001. — Vol. 32. — P. 371–372.

697. Wanson, J.C. Rabbit skeletal muscle glycogen. A morphological and biochemical study of glycogen  $\beta$ -particles isolated by the precipitation-centrifugation method / J.C. Wanson, P. Drochmans // *J. Cell Biol.* — 1968. — Vol. 38. — P. 130–150.

698. Warren, S. The effect of insulin on pathologic glycogen deposits in diabetes mellitus / S. Warren // *Am. J. Med. Sci.* — 1930. — Vol. 179. — P. 482–488.

699. Wasserman, D.H. Four grams of glucose / D.H. Wasserman // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* — 2009. — Vol. 296(1). — P. E11–E21.

700. Watanabe, M. DNA synthesis in polyploid and binucleate hepatic cells in the regenerating rat liver of different ages / M. Watanabe // *Nagoya J. Med. Sci.* — 1970. — Vol. 33. — P. 1–11.

701. Watanabe, T. A cytophotometrical study on the centenarian hepatocyte / T. Watanabe, Y. Tanaka, Y. Kimura // *Virchows Arch. B. Cell. Pathol. Incl. Mol. Pathol.* — 1984. — Vol. 46. — P. 265–268.

702. Watford, M. Is the small intestine a gluconeogenic organ / M. Watford // *Nutr. Rev.* — 2005. — Vol. 63. — P. 356–360.

703. Weber, F.L. Increased muscle protein catabolism caused by carbon tetrachloride hepatic injury in rats / F.L. Weber Jr., P.T. Macechko, S.R. Kelson, E. Karajiannis, M.O. Hassan // *Gastroenterology.* — 1992. — 102(5). — P. 1700–1706.

704. Weinbren, K. Structural aspects of the liver in patients with biliary disease and portal hypertension / K. Weinbren, N.S. Hadjis, L.H. Blumgart // *J. Clin. Pathol.* — 1985. — Vol. 38(9). — P. 1013–1020.

705. Weisberg, J. Distribution of glycogen in the rat heart / J. Weisberg, S. Rodbard // *Amer. J. Physiol.* — 1958. — Vol. 193. — P. 466–468.

706. Weisfeld, M. Aging, Changes in the cardiovascular system, and responses to stress / M. Weisfeld // *Am. J. Hypertens.* — 1998. — Vol. 11. — P. 41–45.

707. Welt, K. Ultrastructure, immunohistochemical and biochemical investigations of the rat liver exposed to experimental diabetes and acute hypoxia / K. Welt, J. Weiss, R. Martin, D. Dettmer, T. Hermsdorf, K. Asayama, [et al.] // *Exp. Toxicol. Pathol.* — 2004. — Vol. 55. — P. 331–345.

708. Westergaard, N. Glucose-6-phosphatase inhibitors for the treatment of Type 2 diabetes / N. Westergaard, P. Madsen // *Expert Opin. Ther. Pat.* — 2001. — Vol. 11(9). — P. 1429–1441.

709. Whelan, W.J. Enzymic explorations of the structures of starch and glycogen / W.J. Whelan // *Biochem. J.* — 1971. — Vol. 122. — P. 609–622.
710. Whitton, P.D. Glycogen synthesis in the perfused liver of streptozotocin-diabetic rats / P.D. Whitton, D.A. Hems // *Biochem. J.* — 1975. — Vol. 150. — P. 153–165.
711. Willstatter, R. Protein binding of physiologically important substances. The conditions of glycogen in liver, muscle and leucocytes / R. Willstatter, M. Rhodewald // *Z. Physiol. Chem.* — 1934. — Vol. 225. — P. 103–124.
712. Wilson, G.K. Hypoxia inducible factors in liver disease and hepatocellular carcinoma: current understanding and future directions / G.K. Wilson, D.A. Tennant, J.A. McKeating // *J. Hepatol.* — 2014. — Vol. 61(6). — P. 1397–1406.
713. Wilson, R.J. Relating glycogenin protein levels and glycogen content post-contraction in human and rodent skeletal muscle / R.J. Wilson // Thesis Univ. Guelph. — 2009.
714. Wilson, W.A. Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria / W.A. Wilson, P.J. Roach, M. Montero, E. Baroja-Fernández, F.J. Muñoz, G. Eydallin, [et al.] // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2010. — Vol. 34(6). — P. 952–985.
715. Wimmer, M. The development of the acinar heterotopic pattern of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in the newborn rat / M. Wimmer, C. Luttringer, M. Colombi // *Histochemistry.* — 1990. — Vol. 94. — P. 55–59.
716. Winternitz, W.W. Liver glycogen reserves in experimental diabetic ketosis / W.W. Winternitz, W.E. Lattanzi // *Endocrinology.* — 1956. — Vol. 58(2). — P. 232–242.
717. World Health Organization. Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021. Accountability for the global health sector strategies 2016–2021: actions for impact. — Geneva: World Health Organization, 2021. — 108 p.
718. Wright, E.M. Renal Na(+)-glucose cotransporters / E.M. Wright // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* — 2001. — Vol. 280. — P. F10–F18.
719. Wu, C. Reproduction of hepatic glucose production as a therapeutic target in the treatment of diabetes / C. Wu, D.A. Okar, J. Kang, A.J. Lange // *Current Drug Target — Immune, Endocrine & Metabolic Disorders.* — 2005. — Vol. 5. — P. 51–59.
720. Xu, G. Prevalence of diagnosed type 1 and type 2 diabetes among US adults in 2016 and 2017: population based study / G. Xu, B. Liu, Y. Sun, Y. Du, L.G. Snetselaar, F.B. Hu, W. Bao // *BMJ.* — 2018. — Vol. 362. — k1497.

721. Xu, Y. Clinical application of stem cells in liver diseases: from bench to bedside / Y. Xu, Q. Zhang // In: Y.-W. Zheng (Ed.). Stem cells and cancer in hepatology. From the essentials to application. — N.Y., London, Oxford: Academic Press, 2018. — Ch.15. — P. 317–346.

722. Xu, Z.-J. Characterization of high-fat, diet-induced, non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis in rats / Z.-J. Xu, J.-G. Fan, X.-D. Ding, L. Qiao, G.-L. Wang // Dig. Dis. Sci. — 2010. — Vol. 55(4). — P. 931–940.

723. Yang, S. Mitochondrial respiratory function and antioxidant capacity in normal and cirrhotic livers following partial hepatectomy / S. Yang, T.M. Tan, A. Wee, C.K. Leow // Cell. Mol. Life. Sci. — 2004. — Vol. 61. — P. 220–229.

724. Yataghanas, X. Microspectrofluorometry of a periodic acid-schiff reaction in blood cells / X. Yataghanas, G. Gahrton, B. Thorell // Exp. Cell Res. — 1969. — Vol. 56(1). — P. 59–68.

725. Ye, F. The burden of liver cirrhosis in mortality: results from the global burden of disease study / F. Ye, M. Zhai, J. Long, Y. Gong, C. Ren, D. Zhang, [et al.] // Front. Public Health. — 2022. — Vol. 10. — Article: 909455.

726. Young, T.A. Chronic ethanol consumption decreases mitochondrial and glycolytic production of ATP in liver / T.A. Young, S.M. Bailey, C.G. Van Horn, C.C. Cunningham // Alcohol Alcohol. — 2006. — Vol. 41(3). — P. 254–260.

727. Yovchev, M.I. Repopulation of the fibrotic/cirrhotic rat liver by transplanted hepatic stem/progenitor cells and mature hepatocytes / M.I. Yovchev, Y. Xue, D.A. Shafritz, J. Locker, M. Oertel // Hepatology. — 2014. — Vol. 59(1). — P. 284–295.

728. Zal, T. Using live FRET imaging to reveal early protein–protein interactions during T cell activation / T. Zal, N.R. Gascoigne // Curr. Opin. Immunol. — 2004. — Vol. 16. — P. 674–683.

729. Zarrinpar, A. Liver transplantation: past, present and future / A. Zarrinpar, R.W. Busuttil // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. — 2013. — Vol. 10(7). — P. 434–440.

730. Zhai, L. Do rodents have a gene encoding glycogenin-2, the liver isoform of the self-glucosylating initiator of glycogen synthesis? / L. Zhai, J. Schroeder, A.V. Skurat, P.J. Roach // IUBMB Life. — 2001. — Vol. 51. — P. 87–91.

731. Zhai, L. Crystal structure of glycogen debranching enzyme and insights into its catalysis and disease-causing mutations / L. Zhai, L. Feng, L. Xia, H. Yin, S. Xiang // *Nature Communications*. — 2016. — Vol. 7. — 11229.

732. Zhai, M. The burden of liver cirrhosis and underlying etiologies: results from the global burden of disease study 2017 / M. Zhai, J. Long, S. Liu, C. Liu, L. Li, L. Yang, [et al.] // *Aging (Albany NY)*. — 2021a. — Vol. 13(1). — P. 279–300.

733. Zhai, M. The incidence trends of liver cirrhosis caused by nonalcoholic steatohepatitis via the GBD study 2017 / M. Zhai, Zh. Liu, J. Long, Q. Zhou, L. Yang, Q. Zhou, [et al.] // *Sci. Reports*. — 2021b. — Vol. 11. — Article: 5195.

734. Zhang, Q. Evaluation of intra-tumoral vascularization in hepatocellular carcinomas / Q. Zhang, J. Wu, X. Bai, T. Liang // *Frontiers in Medicine*. — 2020. — Vol. 7. — 584250.

735. Zhang, X. The global burden of type 2 diabetes attributable to high body mass index in 204 countries and territories, 1990–2019: An analysis of the Global Burden of Disease Study / X. Zhang, X. Wang, M. Wang, B. Hu, W. Tang, Y. Wu, [et al.] // *Front. Public Health*. — 2022. — Vol. 10. — 966093.

736. Zhao, R. Embryonic development of the liver / R. Zhao, S.A. Duncan // *Hepatology*. — 2005. — Vol. 41. — P. 956–967.

737. Zhao, X. Gankyrin drives malignant transformation of chronic liver damage-mediated fibrosis via Rac1/JNK pathway / X. Zhao, J. Fu, A. Xu, L. Yu, J. Zhu, R. Dai, [et al.] // *Cell Death Disease*. — 2015. — Vol. 6. — e1751.

738. Zhou, W.-C. Pathogenesis of liver cirrhosis / W.-C. Zhou, Q.-B. Zhang, L. Qiao // *World. J. Gastroenterol*. — 2014. — Vol. 20(23). — P. 7312–7324.

739. Zimmerman, H.J. *Hepatotoxicity* / H.J. Zimmerman. — N.Y.: Appleton-Century Crofts, 1978. — 530 p.

740. Zipprich, A. Prognostic indicators of survival in patients with compensated and decompensated cirrhosis / A. Zipprich, G. Garcia-Tsao, S. Rogowski, W.E. Fleig, T. Seufferlein, M.M. Dollinger // *Liver Int*. — 2012. — Vol. 32. — P. 1407–1414.

741. Zois, C.E. Glycogen metabolism has a key role in the cancer microenvironment and provides new targets for cancer therapy / C.E. Zois, A.L. Harris // *J. Mol. Med*. — 2016. — Vol. 94. — P. 137–154.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность Борису Николаевичу Кудрявцеву за согласие быть научным консультантом диссертации, конструктивную дискуссию, полезную критику, чуткое отношение и понимание на протяжении всего времени нашего многолетнего знакомства.

Автор искренне признателен своей аспирантке Анне Честновой за интерес к тематике исследования и плодотворное научное сотрудничество, Галине Сакута, Екатерине Байдюк, Андрею Степанову и всем сотрудникам Лаборатории клеточной патологии ИНЦ РАН — за совместную работу и прекрасную атмосферу в коллективе, Григорию Израилевичу Штейну и Михаилу Воробьеву — за ценные консультации по методам микроскопии и программам анализа изображений, статистическому анализу полученных данных и их графической обработке, Юлии Габоровне Надь — за содействие в организации и сборе клинического «диабетного» материала.

Также это исследование было бы невозможно без участия студентов, выполнявших свои дипломные, бакалаврские и магистерские работы — Елены Киршиной, Александры Вахтиной, Екатерины Мушинской, Екатерины Сивовой, Натальи Матюхиной и Анастасии Маловой.

За многолетнее научное сотрудничество, помощь в осуществлении задуманного и надежность при любых обстоятельствах автор выражает самые искренние слова благодарности коллеге, соавтору и настоящему товарищу Сергею Владимировичу Оковитому.

Отдельно хотелось бы поблагодарить Никиту Чернецова за возможность продолжить и завершить работу над диссертацией в Зоологическом институте РАН, а также дорогих для меня ЗИНовцев — Наталию Борисовну Ананьеву, Ольгу Георгиевну Овчинникову, Кирилла Владимировича Галактионова, Валентину Григорьевну Кузнецову, Алексея Александровича Сухотина и Валентину Григорьевну Сиделеву, за мудрые советы и доброжелательное отношение.

За постоянную и всестороннюю помощь автор благодарен Нине Васильевне Ермолаевой, Игорю Доронину и Зауре Васильевой.

Автор очень признателен своим друзьям Леониду Адонину и Николаю Барлеву за вдохновение, дружеское участие и моральную поддержку.

Автор бесконечно благодарен своей семье за возможность остаться в профессии и заниматься любимым делом, за понимание, терпение, сопереживание и любовь.

С искренней благодарностью и теплотой автор вспоминает удивительного человека и замечательного ученого Маргариту Васильевну Кудрявцеву, чьей светлой памяти посвящена эта работа и чьи открытия стали фундаментом для данного исследования.