

УДК 577.1:[616.36-004:599.323.4]

## КАЧЕСТВЕННЫЕ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СОДЕРЖАНИЯ ГЛИКОГЕНА В ПЕЧЕНИ КРЫС В ДИНАМИКЕ РАЗВИТИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ЦИРРОЗА

*Лебедева Е.И., Мяделец О.Д.*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»,  
Витебск, Беларусь

*Целью исследования явилось определение содержания и распределения гликогена в печени крыс в динамике развития токсического цирроза. Для достижения поставленной цели использовали гистохимический, морфометрический и статистический методы анализа. В результате исследований выявлены структурный атипизм скоплений гликогена в цитоплазме клеток печени, разнообразие его окраски в пределах среза и в пределах одной клетки и сложная динамика изменения его количества.*

**Ключевые слова:** цирроз печени, гликоген, гистохимия, морфометрия, белые крысы.

### **Введение**

Хронические заболевания печени различной этиологии – чрезвычайно актуальная проблема современной медицины. Около 500 миллионов людей в мире страдают только от вирусных гепатитов, а ежегодная смертность от хронических гепатитов достигает одного миллиона человек. Этот показатель входит в первую десятку всех причин смертности и лидирует в гастроэнтерологии. Считается, что от 50 до 80% (эти цифры в разных странах варьируют) всех смертей от цирроза печени имеют алкогольную этиологию [4, 7]. К сожалению, существующие методы терапии заболеваний печени, несмотря на определенные успехи в лечении, остаются недостаточно эффективными, что приводит к высокой частоте развития фиброза/цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы в исходе данных заболеваний. Предметом продолжающихся исследований являются критерии морфологической диагностики, их значимость. При этом внедрение современных иммуноцитохимических методов идентификации антигенов различных гепатотропных вирусов не исключает диагностических возможностей стандартных патогистологических методов.

Характерной особенностью гепатоцитов является их способность запасать и утилизировать гликоген как основной энергетический метаболит печени. Изменение физиологического состояния организма и различные заболевания приводят не только к изменению содержания гликогена в клетках, но нередко сопровождаются модификацией его структуры [1-3, 8, 9]. Известно, что алкоголь оказывает множественные и разносторонние эффекты на углеводный обмен, нарушает поглощение глюкозы. Однако точный механизм, с помощью которого алкоголь влияет на включение глюкозы в гликоген, остается пока неизвестным [7]. Неизвестны и точные механизмы, вовлеченные в метаболизм гликогена при ожирении [6]. Визуальные гистохимические исследования биоптатов не могут дать точных сведений о динамике гликогена в печени при изменении степени ее поражений. Данные о количественных и качественных изменениях содержания гликогена в динамике развития экспериментального токсического цирроза печени в изученной современной литературе отсутствуют. В связи с этим, а также значимостью морфометрических исследований патологии печени цель данной работы – выявление количественных и качественных изменений содержания гликогена в печени крыс в динамике развития токсического цирроза.

### **Материал и методы**

Исследование выполнено на 96 половозрелых беспородных белых крысах обоего пола массой

180-250 г в осенне-зимний период. На выполнение данных исследований получено разрешение этического комитета Витебского государственного медицинского университета. Животные были разделены на группы: 6 опытных (n=12, 6 самцов и 6 самок) и контрольную (n=24, 12 самцов и 12 самок). Все исследования проводили в одно и то же время суток, с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, которые используют в экспериментальных и других научных целях (г. Страсбург, 1986), и согласно правилам лабораторной практики РБ (приложение к Приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 31 от 31.10.2006). Модель токсического цирроза печени создавали путем длительного интрагастрального введения с помощью зонда 40% масляного раствора четыреххлористого углерода (CCl<sub>4</sub>) в дозе 0,2 мл/100 г массы животного два раза в неделю, в утренние часы, за 4 часа до кормления. Параллельно с этим вместо воды в качестве питья крысы получали 5% раствор этанола из поилок в режиме свободного доступа в течение 19 недель. Контрольные (плацебо) животные получали эквивалентное количество растворителя CCl<sub>4</sub> (оливковое масло) и в качестве питья использовали кипяченую воду из поилок в режиме свободного доступа. Для изучения динамики метаболических изменений опытных животных выводили из эксперимента в разные сроки от начала опыта, который длился 19 недель (через 3, 6, 9, 12, 16, 19 недель) путем декапитации с применением гильотины после их 14-часового голодания, в утренние часы, согласно утвержденным инструкциям и законодательным актам. Контрольную группу выводили из опыта по окончании эксперимента.

Материалом для патоморфологических исследований служили фрагменты нормальной и патологически измененной левой боковой доли печени животных. Для выявления общих гистологических и фибропластических изменений срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по Маллори в собственной модификации. Гликоген в печени выявляли гистохимическим методом по Шабашу. Контрольные срезы обрабатывали амилазой слюны в термостате при температуре 370С в течение 30 мин.

Для морфометрической оценки гликогена использовали метод полуколичественного компьютерного анализа результатов. Качественную окраску превращали в количественную с помощью программного обеспечения анализа изображений Image Score Color. Высчитывали относительную площадь, занимаемую гликогеном на срезе печени крыс в процентах. С этой целью производили микрофотосъемку

случайных полей зрения микропрепаратов цифровой камерой OLYMPUS XC 30 на базе микроскопа OLYMPUS BX 51 (Japan). Статистический анализ полученных результатов проводили в табличном процессоре Microsoft Office Excel 2007 и STATISTIKA 6,0. Определяли средние значения и стандартные отклонения. Учитывая малую выборку животных, неправильное распределение исследуемых признаков, а также неравенство дисперсий для статистической обработки полученных результатов, был использован непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

#### Результаты и обсуждение

Гистологический анализ органа подопытных крыс показал развитие хронического патологического процесса в динамике, основными проявлениями которого являлись фиброз и цирроз печени. Гепатоциты находились в состоянии белковой, гидропической дистрофии и диффузной мелко- и крупнокапельной липидной инфильтрации. Определялись дисконфлексация печеночных балок, пролиферация соединительной ткани и паренхимы. В поле зрения наблюдались большое количество некротизированных гепатоцитов, серозный отек паренхимы, лимфоидно-макрофагальные инфильтраты. Гистологическая картина печени крыс контрольной группы по данным гистологического исследования в целом соответствовала критериям нормы.

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что у контрольных животных гликоген в гепатоцитах выявлялся в виде зерен фиолетово-вишневого цвета, которые заполняли всю цитоплазму, как бы нафаршировывая ее (рис. 1), но в части гепатоцитов он был распределен в виде сети. Представляет интерес тот факт, что у контрольных животных отмечены достоверные половые различия по содержанию гликогена в гепатоцитах (табл.).

**Таблица.** – Содержание относительной площади, занимаемой гликогеном, при гистохимической окраске от выделенной области интереса на снимке с гистологического препарата на разных этапах эксперимента

Группы животных	Гликоген в печени самцов, %	Гликоген в печени самок, %
Контрольная	60,18±0,97	65,5±0,87
3 недели эксперимента	4,65±0,37*	4,35±0,3*
6 недель эксперимента	6,2±0,28*	22,63±1,36*
9 недель эксперимента	29,95±1,37*	31,25±1,44*
12 недель эксперимента	14,05±0,64*	13,02±0,94*
16 недель эксперимента	32,2±1,38*	22,2±0,87*
19 недель эксперимента	14,52±0,94*	15,13±1,22*

Примечание: \* – различия достоверны при сравнении с контрольной группой,  $p < 0,05$

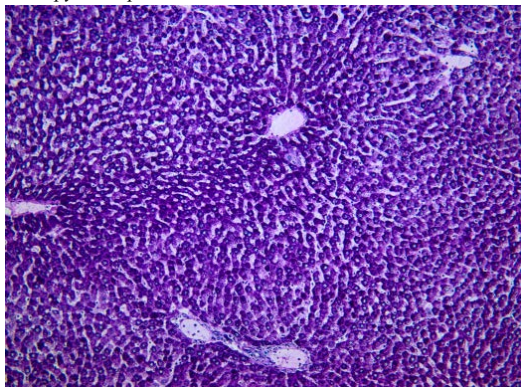


Рисунок 1. – Срез печени контрольных животных. Гликоген окрашен в фиолетово-вишневый цвет. Окраска по методу Шабадаша. Ув. 200

Через 3 недели эксперимента содержание гликогена в клетках резко снижалось (у самцов в 12,9 раза, а у самок в – 15 раз по сравнению с контрольной группой, табл.). На срезах выявлялись лишь единичные клетки, заполненные гликогеном фиолетово-вишневого цвета (рис. 2).

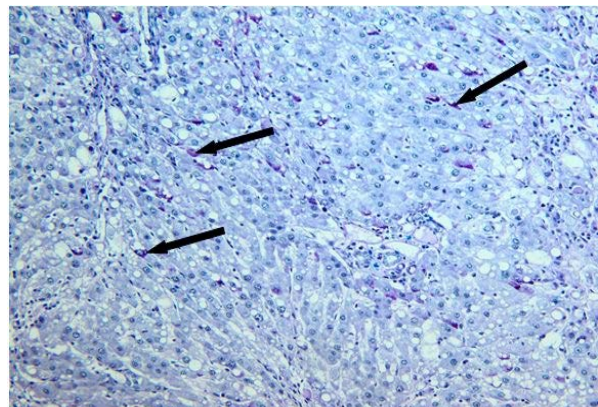


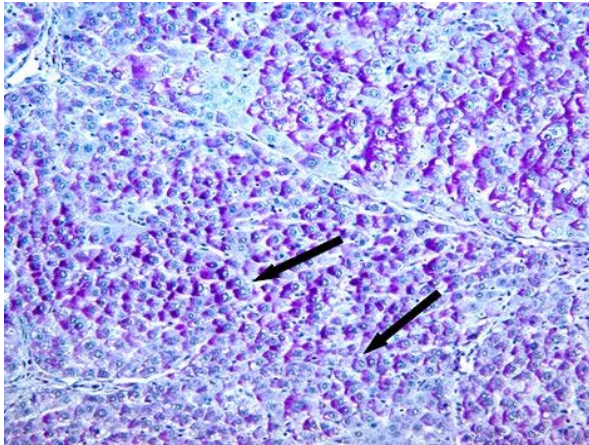
Рисунок 2. – Резкое снижение содержания гликогена в печени животных через 3 недели эксперимента. На голубом фоне препарата встречались единичные гепатоциты (отмечено стрелками), содержащие гликоген. Окраска по методу Шабадаша. Ув. 200

На фоне дальнейшей интоксикации животных (6 недель) по сравнению с 3-й неделей эксперимента было установлено достоверное увеличение содержания гликогена (у самцов в 1,3 раза, а у самок в – 5,2 раза, табл.). На данном этапе эксперимента выявлены достоверные половые различия по содержанию гликогена. При гистохимическом исследовании препаратов в отдельных гепатоцитах гликоген вообще не выявлялся. Встречались клетки, где он был гомогенно рассеян по цитоплазме или разбросан мелкими глыбками. В одних клетках гранулы формировали неправильной формы конгломераты с четкими контурами. В других клетках зерна гликогена сливались в гомогенную красную массу. Преобладали клетки с полярным расположением гликогена: полисахарид выявлялся на васкулярном полюсе гепатоцитов в непосредственной близости к синусоидному капилляру, т.е. цитоплазма клетки была заполнена гликогеном наполовину. Однако встречались и участки, где полярность нарушалась, т.е. гликоген локализовался в билиарном полюсе. Возможно, гранулы смещались на другой полюс клетки, чтобы освободить место для вновь образующихся гранул, или же часть гликогена подверглась распаду (рис. 3). Картина полярности расположения гликогена в клетках печени сохранялась на протяжении всего эксперимента.

Наряду с дистрофией, некрозом, апоптозом гепатоцитов и перестройкой печеночных долек наблюдались признаки регенераторной активности. Она выражалась в утолщении терминальной пластинки с высоким содержанием гликогена в гепатоцитах. Несмотря на не прекращающееся прогрессирование патологического процесса в печени интенсивная регенерация исчезала только к концу эксперимента (19 недель). Следует отметить, что в отдельных синусоидах встречались гранулы и зерна гликогена. Можно предположить, что это гранулы и зерна разрушенных гепатоцитов.

В ходе дальнейшего эксперимента (9 недель) по сравнению с 6-й неделей эксперимента было установлено продолжающееся достоверное увеличение содержания гликогена (у

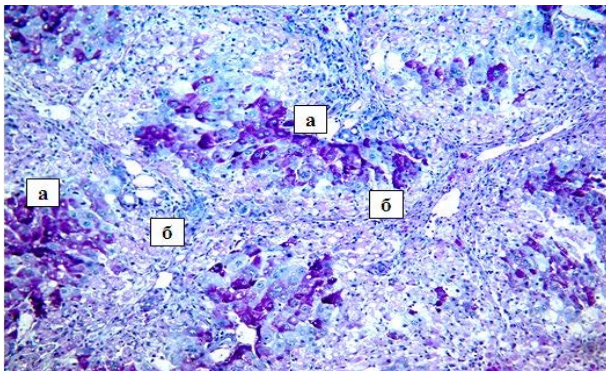




**Рисунок 3.** – Срез печени самки через 6 недель эксперимента. Стрелками отмечено полярное расположение гликогена в клетках. Окраска по методу Шабдаша. Ув. 200

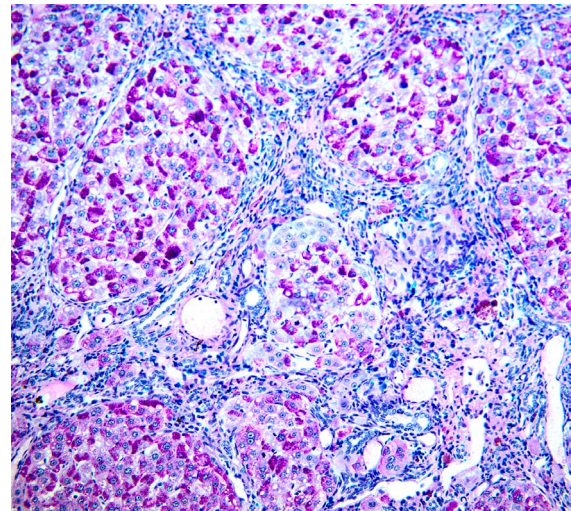
самцов в 4,8 раза, а у самок в 1,4 раза, табл.).

При дальнейшей интоксикации животных (12 недель) по сравнению с 9-й неделей эксперимента отмечалось достоверное снижение гликогена (у самцов в 2,1 раза, а у самок в – 2,4 раза, табл.). Клетки, содержащие гликоген, на препаратах располагались группами. В этих клетках преобладал крупноглыбчатый тип распределения гликогена, окрашенного в фиолетово-вишневый и фиолетово-красный цвет. Местами глыбки сливались в крупные конгломераты. Между группами клеток располагались гепатоциты с бледно-розовой окраской цитоплазмы (рис. 4), которая под действием амилазы слюны исчезала. Тем самым подтверждалась гликогеновая природа данной окраски. Только на этом этапе эксперимента в гепатоцитах были выявлены самые крупные конгломераты гликогена.



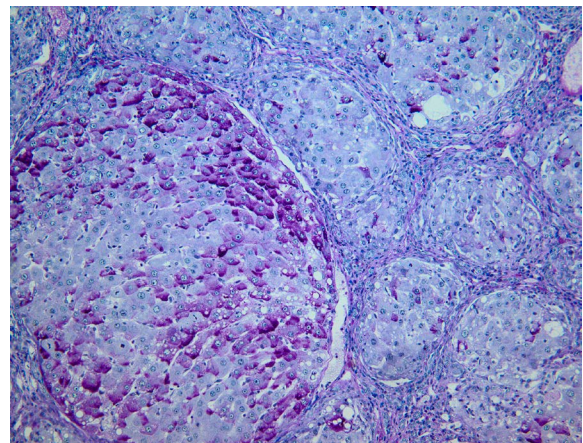
**Рисунок 4.** – Срез печени самки через 12 недель эксперимента. Обозначения: а – группы клеток, содержащие гликоген, окрашенные в фиолетово-вишневый цвет; б – группы клеток с бледно-розовой окраской цитоплазмы. Окраска по методу Шабдаша. Ув. 200

По мере развития заболевания (16 недель) по сравнению с 12-й неделей эксперимента отмечалось увеличение содержания гликогена в клетках у самцов в 2,3 раза, у самок в – 1,7 раза (табл.). Выявлены достоверные половые различия по содержанию гликогена. На этой стадии эксперимента у самок в цитоплазме преобладала более светлая окраска гликогена (рис. 5). Во многих клетках она выявлялась в виде капель и скоплений капель красного, бледно-красного цвета.



**Рисунок 5.** – Срез печени самки через 16 недель эксперимента. Гликоген в гепатоцитах окрашен в красный и бледно-красный цвет. Окраска по методу Шабдаша. Ув. 200

В конце эксперимента (19 недель) по сравнению с 12-й неделей отмечалось снижение гликогена в клетках (у самцов в 2,2 раза, у самок в – 1,4 раза, табл.). Гистохимическое исследование выявило, что в отдельных ложных узлах гликоген отсутствовал. При этом в поверхностных узлах гликогена было больше, чем в узлах, расположенных внутри. Клетки, переполненные гликогеном, встречались редко (рис. 6). В гепатоцитах преобладал крупноглыбчатый, агрегированный гликоген, часто сливающийся в гомогенные массы. В отдельных клетках одновременно наблюдалась разная окраска этих гомогенных масс: фиолетово-вишневая, красная, бледно красная. Встречались клетки, где одновременно можно было наблюдать и гранулы фиолетово-вишневого цвета, и капли красного цвета.



**Рисунок 6.** – Срез печени самки через 19 недель эксперимента. Окраска по методу Шабдаша. Ув. 200

Следует также отметить, что на отдельных препаратах отмечалось гомогенное розовое окрашивание соединительной ткани. Можно предположить, что это окрашивание давали углеводные компоненты гликопротеиновых и мукоидных молекул.

#### Заключение

1. При моделировании токсического цирроза печени отмечалась сложная динамика изменения содержания гликогена в гепатоцитах.

2. Тенденцию гепатоцитов накапливать гликоген на определенных этапах эксперимента можно также объяснить либо резким усилением процессов его синтеза, либо снижением процессов его распада. Это дает основание предположить, что способность клеток печени накапливать гликоген, по-видимому, мало зависит от возрастания степени поражения печени. Механизмы, приводящие к этому состоянию, связаны, вероятно, с изменением активности ферментных систем, ответственных за метаболизм гликогена. Наблюдаемое явление можно сопоставить с некоторыми формами гликогенозов, связанных с наследственными нарушениями биосинтеза ряда ферментов гликогенолиза [10, 5].

3. Структурный атицизм выявленных в цитоплазме клеток печени скоплений гликогена, разнообразие его окраски в пределах среза и в пределах одной клетки трудно объяснимы. Можно предположить, что выявленные изменения обусловлены различиями

интенсивности метаболизма под действием токсина. Возможно, это патологически измененный гликоген.

4. Вероятно, что такие изменения гликогена в печени определяются не какой-либо одной причиной, но обусловлены комплексом причин. Дальнейшие комплексные исследования в этом направлении помогут установить истинные механизмы таких изменений. Уровень гликогена и его морфология в клетках могут иметь существенное значение при диагностике заболеваний печени.

5. Выявлены половые различия по содержанию гликогена у контрольных особей и животных с цирротическим поражением печени. Это указывает на необходимость создания стандартизованной воспроизводимой модели цирроза печени. Отсутствие такой модели затрудняет сравнительную оценку результатов многочисленных исследований эффективности лекарственных средств.

### Литература

1. Curcumin prevents and reverses cirrhosis induced by bile duct obstruction or CCl<sub>4</sub> in rats: role of TGF- $\beta$  modulation and oxidative stress / K. Reyes-Gordillo [et al] // *Clinical Pharmacology*. – 2008. – N. 22. – P. 417-422.
2. Ecstasy-induced toxicity in rat liver/ G. Beitia [et al] // *Liver*. – 2000. – N. 20. – P. 8-15.
3. Gadolinium chloride inhibits the spontaneous resolution of fibrosis in CCL<sub>4</sub> induced cirrhosis / E. Chavez [et al] // *Toxicology mechanisms and methods*. – 2006. – N. 16. – P. 507-513.
4. Global status report on alcohol and health. – WHO Press., 2011. – 286 p.
5. Hepatocellular carcinoma and focal nodular hyperplasia of the liver in a glycogen storage disease patient / Yoshihiro Mikuriya [et al] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2012. – Vol. 4, N. 6. – 191-195.
6. Hypoxia and fatty liver / T. Suzuki [et al] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 20, N. 41. – P. 15087-15097.
7. Insulin resistance, ceramide accumulation and endoplasmic reticulum stress in experimental chronic alcohol-induced steatohepatitis / T. Ramirez [et al] // *Alcohol and Alcoholism*. – 2013. – Vol. 48, N. 1. – P. 39-52.
8. Overnight glucose infusion suppresses renal ammoniogenesis and reduces hyperammonaemia induced by a simulated bleed in cirrhotic patients / L. Mpabanzi [et al] // *Alimentary Pharmacology Therapeutics*. – 2012. – N. 35. – P. 921-928.
9. Resolution of liver fibrosis in chronic CCl<sub>4</sub> administration in the rat after discontinuation of treatment: effect of silymarin, silibinin, colchicine and trimethylcolchicinic acid / P. Muriel [et al] // *Clinical Pharmacology and Toxicology*. – 2005. – N. 96. – P. 375-380.
10. Successful treatment of multiple hepatocellular adenomas with percutaneous radiofrequency ablation / Sun Young Ahn [et al] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2013. – Vol. 19, N. 42. – 7480-74-86.

### Literatura

1. Curcumin prevents and reverses cirrhosis induced by bile duct obstruction or CCl<sub>4</sub> in rats: role of TGF- $\beta$  modulation and oxidative stress / K. Reyes-Gordillo [et al] // *Clinical Pharmacology*. – 2008. – N. 22. – P. 417-422.
2. Ecstasy-induced toxicity in rat liver/ G. Beitia [et al] // *Liver*. – 2000. – N. 20. – P. 8-15.
3. Gadolinium chloride inhibits the spontaneous resolution of fibrosis in CCL<sub>4</sub> induced cirrhosis / E. Chavez [et al] // *Toxicology mechanisms and methods*. – 2006. – N. 16. – P. 507-513.
4. Global status report on alcohol and health. – WHO Press., 2011. – 286 p.
5. Hepatocellular carcinoma and focal nodular hyperplasia of the liver in a glycogen storage disease patient / Yoshihiro Mikuriya [et al] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2012. – Vol. 4, N. 6. – 191-195.
6. Hypoxia and fatty liver / T. Suzuki [et al] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 20, N. 41. – P. 15087-15097.
7. Insulin resistance, ceramide accumulation and endoplasmic reticulum stress in experimental chronic alcohol-induced steatohepatitis / T. Ramirez [et al] // *Alcohol and Alcoholism*. – 2013. – Vol. 48, N. 1. – P. 39-52.
8. Overnight glucose infusion suppresses renal ammoniogenesis and reduces hyperammonaemia induced by a simulated bleed in cirrhotic patients / L. Mpabanzi [et al] // *Alimentary Pharmacology Therapeutics*. – 2012. – N. 35. – P. 921-928.
9. Resolution of liver fibrosis in chronic CCl<sub>4</sub> administration in the rat after discontinuation of treatment: effect of silymarin, silibinin, colchicine and trimethylcolchicinic acid / P. Muriel [et al] // *Clinical Pharmacology and Toxicology*. – 2005. – N. 96. – P. 375-380.
10. Successful treatment of multiple hepatocellular adenomas with percutaneous radiofrequency ablation / Sun Young Ahn [et al] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2013. – Vol. 19, N. 42. – 7480-74-86.

## QUALITATIVE AND QUANTITATIVE PARAMETERS OF GLYCOGEN CONTENT IN RAT LIVER ACCORDING TO THE DYNAMICS OF TOXIC CIRRHOSIS

*Lebedzeva E.I., Myadelets O.D.*

Educational Establishment "Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University",  
Vitebsk, Belarus

*The aim of the study was to determine the content and distribution of glycogen in the liver of rats according to the*

*dynamics of toxic cirrhosis. To achieve this goal histochemical, morphometric and statistical methods of analysis were used. The studies revealed structural atypism of glycogen accumulation in the cytoplasm of liver cells, diversity of its color within the section and within one cell, and complicated dynamics of the glycogen amount.*

**Key words:** *cirrhosis, glycogen, histochemistry, morphometry, white rats.*

---

*Адрес для корреспонденции: e-mail: Lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru*

*Поступила 19.01.2015*