

УДК 612.803

Вахтина А.А. (4 курс, Ф.Мед.Ф, СПбГТУ),
Кудрявцев Б.Н. (зав. лаб. клеточной патологии НИИ Цитологии, д.б.н., проф.)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ МЕЖДУ РАЗМЕРОМ ГЕПАТОЦИТА, СОДЕРЖАНИЕМ В НЕМ ГЛИКОГЕНА И ДНК В НОРМАЛЬНОЙ И ЦИРРОТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННОЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

Печень выполняет огромное число различных функций в организме, являясь своеобразной химической лабораторией. Диффузные хронические поражения печени часто заканчиваются печеночной недостаточностью, или переходят в рак и в настоящее время не имеют эффективного лечения.

Одной из важнейших функций характерных для печени является ее участие в поддержании постоянного уровня глюкозы в организме. В настоящее время хорошо известны ферменты, участвующие в синтезе и распаде гликогена, факторы регулирующие эти процессы, однако, пока неясно какую роль играют клеточные размеры в процессе накопления гликогена в клетках печени. В связи с этим, в данной работе мы исследовали зависимость между содержанием гликогена в гепатоцитах и размером этих клеток в течение синтеза гликогена после введения глюкозы голодным крысам.

Размеры клеток печени, как известно, зависят от их уровня плоидности и степени гипертрофии, которая определяется содержанием белка. Поэтому в данной работе мы использовали комбинированный цитохимический метод, позволяющий последовательно количественно определять несколько параметров в одной и той же клетке (сухой вес, содержание гликогена и ДНК).

Целью моей научной работы является выявление зависимостей между размером гепатоцита, содержанием в нем гликогена и ДНК (плоидности) в нормальной и цирротически измененной печени крыс. Эти зависимости исследовали на разных этапах (0 – 30 мин) после введения глюкозы животным, голодавшим в течение 48 ч.

В работе использовали препараты-мазки изолированных гепатоцитов. На каждую временную точку: 0, 10, 20 и 30 мин исследовали по три животных. Исследование проводилось по следующей схеме:

1. Вначале на предметное стекло с клетками с помощью алмазного стеклореза наносили координатную сетку (размер квадратов составлял около 1мм x 1 мм)
2. С помощью анализатора изображений, снабженного видеокамерой, которая устлана на интерференционном микроскопе получали изображения выбранных участков препаратов (около 25).
3. На распечатанных изображениях клеток выбирали неповрежденные, отдельно расположенные гепатоциты. Каждому гепатоциту в соответствии с его расположением на предметном стекле был присвоен определенный номер. На каждом препарате отмечали более 500 клеток.
4. Для каждой из отмеченных клеток с помощью компьютерной программы Video Test и интерференционного микроскопа с установленной на нем видеокамерой измеряли следующие параметры: длину, ширину, периметр (в мкм) и сухой вес (в пг).
5. Измерения сухого веса гепатоцитов с помощью интерференционного микроскопа производили в два этапа: вначале определяли оптическую разность хода лучей для гепатоцита и среды, используя в качестве заключающей среды глицерин. Затем с помощью анализатора изображений измеряли площадь клетки (в мкм²). Сухой вес гепатоцитов рассчитывали по формуле: $P = \delta S / 100\alpha$, где P – сухой вес клетки (в пикограммах), δ - разность хода лучей (в см²), которую определяли по формуле: $\delta = (\varphi_1 - \varphi_2) \lambda / K$, где δ - разность хода

лучей, φ_1 , φ_2 – отсчеты по шкале компенсатора Сеннармона, λ - длина волны света (526 нм), $K = 180$ градусов; S – площадь клетки (мкм^2), α - удельное приращение показателя преломления, которое для белков в глицерине равно $0.00095 \text{ см}^3/\text{г}$.

6. После удаления глицерина с предметного стекла, препарат заключали в вазелиновое масло и с помощью цитофлуориметра РИФ-1 измеряли интенсивность собственной люминесценции тех же гепатоцитов, у которых измеряли сухой вес.
7. После этого препарат окрашивали на гликоген с помощью PAS (periodic-Schiff reaction) реакции (флуоресцентный вариант), заключали в вазелиновое масло и с помощью цитофлуориметра измеряли содержание гликогена в гепатоцитах.
8. Затем окраску клеток на гликоген удаляли с помощью обработки препаратов борогидридом натрия (NaBH_4). После чего проводили гидролиз препарата в $6N \text{ HCl}$ и окрашивали его на ДНК реактивом типа Шиффа аурамино- SO_2 . Содержание ДНК в гепатоцитах, у которых был измерен сухой вес и содержание гликогена, измеряли с помощью цитофлуориметра. На основании измерения содержания ДНК в клетках судили о степени их плоидности.

В настоящее время проведены измерения сухого веса, собственной люминесценции и содержания гликогена в гепатоцитах нормальной печени голодных крыс и клетках печени через 10, 20 и 30 мин после введения глюкозы голодным животным.