

ПРИМЕНЕНИЕ РЕАКТИВОВ ТИПА ШИФФА С РАЗЛИЧНЫМИ СПЕКТРАЛЬНЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЛЕГКОДОСТУПНОЙ И ТРУДНОДОСТУПНОЙ ФРАКЦИЙ ГЛИКОГЕНА В ОТДЕЛЬНЫХ ГЕПАТОЦИТАХ

© Н. Н. Безбородкина, Е. И. Киришина, Е. В. Мушинская, Б. Н. Кудрявцев

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

Исследована динамика накопления суммарного гликогена, его легкодоступной (ЛД) и труднодоступной (ТД) фракций в гепатоцитах после введения 30%-ного раствора глюкозы крысам, голодавшим в течение 48 ч. В работе применен оригинальный метод выявления и количественного определения ЛД- и ТД-фракций гликогена в отдельных гепатоцитах, основанный на использовании реактивов типа Шиффа с различными спектральными характеристиками — аурамина-SO₂ (Au-SO₂) и бромистого этидия-SO₂ (EtBr-SO₂). Окраска препаратов в течение 40 мин Au-SO₂ выявляла ЛД-фракцию (зеленая флуоресценция, $\lambda_{\text{max}} = 526$ нм), а последующая окраска тех же препаратов EtBr-SO₂ в течение 50 мин — ТД-фракцию гликогена (красная флуоресценция, $\lambda_{\text{max}} = 620$ нм) в клетках. Измерение интенсивности флуоресценции в соответствующих спектральных областях позволило определить количество той и другой фракций гликогена в отдельных клетках печени. Показано, что по мере накопления гликогена содержание ЛД-фракции в гепатоцитах нарастает. Коэффициент корреляции (r) между содержанием ЛД-фракции и содержанием суммарного гликогена для гепатоцитов, полученных из печени голодных крыс, составлял 0,95, а для гепатоцитов, изолированных через 20 и 30 мин после начала рефидинга крыс глюкозой — 0,95 и 0,98 соответственно. Через 90 и 120 мин после введения глюкозы крысам, когда популяция гепатоцитов становится асинхронной в отношении синтеза и деградации гликогена в клетках, зависимость содержания ЛД-фракции от количества суммарного гликогена становится менее выраженной ($r = 0,71$ и $0,82$ соответственно). Таким образом, применение реактивов Шиффа с различными спектральными характеристиками может дать ценную информацию о структуре гликогена в клетках и порядке его синтеза и деградации в клеточной популяции.

Ключевые слова: фракции гликогена, гепатоциты, аурамин 00, бромистый этидий, реактивы типа Шиффа.

Гликоген входит в состав многих клеток человека и животных, однако наибольшее его количество содержится в гепатоцитах. Способность печени запасать гликоген после приема пищи и расщеплять при голодании играет важную роль в поддержании стабильного уровня глюкозы в крови. Изменения физиологического состояния организма и различные заболевания приводят не только к изменению содержания гликогена в клетках, но нередко сопровождаются модификацией его структуры (Кудрявцева и др., 1988, 1992; Розенфельд, Попова, 1989; Matern et al., 1999).

Существует большое число различных химических методов, позволяющих исследовать структуру гликогена (Кеннеди, Уайт, 1986; Тюкавкина, Бауков, 2005). Однако все они применимы лишь к гликогену, выделенному из тканей. Между тем известно, что гликоген в тканях связан с ферментами его метаболизма, образующими с ним комплексы (Geddes, Chow, 1994; Roach, 2002; Lomako et al., 2004), которые в электронном микроскопе визуализируются как β -частицы или их агрегаты — α -частицы (Devos et al., 1983; Manners, 1991; Rybicka, 1996). Различные процедуры, использующиеся для выделения гликогена из

тканей, могут существенно влиять на его молекулярную массу, состав и структуру частиц гликогена (Devos et al., 1983; Розенфельд, Попова, 1989; Roach, 2002).

Широко распространенным методом, позволяющим не только выявлять гликоген в тканях, но и определять его содержание в клетках, в настоящее время является реакция PAS (periodic acid Schiff) (Lillie, 1965; Кудрявцева и др., 1970). Установлено, что в гепатоцитах человека и животных присутствуют две фракции гликогена — легкодоступная (ЛД) и труднодоступная (ТД) для окрашивания реактивом Шиффа (Кудрявцева и др., 1974). Соотношение этих фракций в клетках отражает структуру гликогена и весьма чувствительно к изменению физиологического состояния организма или повреждающему воздействию (Кудрявцева, 1987; Кудрявцева и др., 1992).

К сожалению, существующие методы не позволяют определить содержания ЛД- и ТД-фракций гликогена в отдельных клетках. Данные о содержании этих фракций можно получить лишь в виде средних значений, характеризующих клеточную популяцию в целом. Поэтому поиск методов, которые позволяли бы исследовать структуру

ру гликогена в отдельных клетках, представляет актуальную задачу.

Цель данной работы состояла в разработке цитофлуориметрического метода для определения содержания фракций гликогена в отдельных клетках печени.

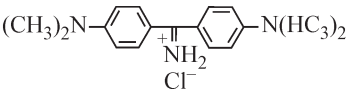
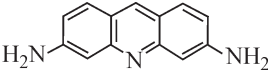
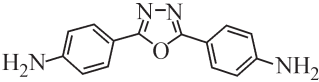
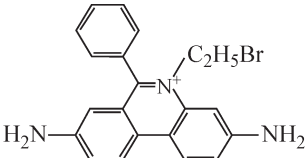
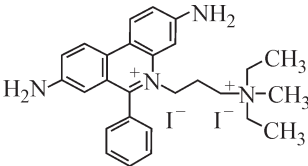
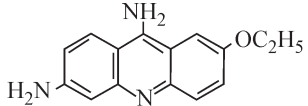
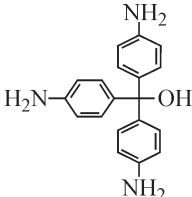
Материал и методика

Работа проведена на белых беспородных крысах-самцах с массой тела 300—350 г. Животных подвергали голоданию в течение 48 ч (вода *ad libitum*), в ходе которого запасы гликогена в печени снижались до минимума (Giardina et al., 1994; Емельянов, 1997; Безбородкина и др., 2003). Для исследования структуры гликогена и его содержания в клетках крысам перорально вводили 30%-ный раствор глюкозы (4 г на 1 кг массы тела). Затем через 0, 20, 30, 90 и 120 мин после введения глюкозы животных подвергали декапитации, печень вырезали и из ее кусочков приготавливали препараты-мазки изолированных ге-

паточитов по ранее описанной методике (Кудрявцева и др., 1983).

Выявление гликогена в гепатоцитах с помощью реактивов типа Шиффа проводили в два этапа. Вначале препараты окисляли в течение 90 мин в 0.8%-ном растворе KJ_4 , приготовленном на 0.23%-ном растворе HNO_3 . В результате окисления из 1, 2-гликолиевых групп в остатках глюкозы гликогена образуются альдегидные группы (McManus, 1946). После окисления препараты в течение 5 мин промывали в проточной воде, споласкивали в одной смене дистиллированной воды и окрашивали при комнатной температуре в течение 90 мин в различных реактивах типа Шиффа. Реактивы типа Шиффа представляли собой водные растворы различных красителей соответствующей концентрации (см. таблицу), в которые был добавлен хлористый тионил (0.2 мл на 100 мл раствора красителя). В реактивах использовали следующие флуоресцирующие красители: аурамин 00 (Reanal, Венгрия), акрифлавин (Merck, Германия), 2, 5-бис-[4-аминофенил-(I')]-1, 3, 4-оксидазол и бромистый этидий (Sig-

Характеристики флуоресцирующих красителей, использованных для приготовления реактивов типа Шиффа

Краситель	Сокращенное название	Структурная формула	Концентрация, %	$\lambda_{\text{возбуждения}}$, нм	$\lambda_{\text{макс. флуоресценции}}$, нм	Литературный источник
Аурамин 00	Au		0.30000	405, 436	526	Ruch, Bosshard, 1963; Bosshard, 1964; Розанов, Кудрявцев, 1967; Кудрявцев, Розанов, 1974
Акрифлавин	Afl		0.00100	546	605	Prenna et al., 1964; Böhm, Sprenger, 1968
2, 5-бис-[4-аминофенил-(I')]-1, 3, 4-оксидазол	BAO		0.00001	365	440—450	Denoël, 1969; Yataganas, Gahrton, 1969; Weste, Penington, 1972
Бромистый этидий	EtBr		0.00040	546	595—610	Кудрявцев и др., 1974
Йодистый пропидий	PrJ		0.00030	546	615—625	Fogilieni et al., 2001
Риванол	Riv		0.01000	380—480	520	Хачатуров, Смирнова, 1966; Prenna, 1968
Парарозанилин	pRA		22.00000	590	560	Ploem, 1967; Böhm, Sprenger, 1968; Nitsch et al., 1970; Prenna et al., 1972; Fujita, 1973

ма, США), йодистый пропилий (Fluka, Германия), риванол (Акрихин ХФК, Россия) и парарозанилин (Sigma-Aldrich, США).

При исследовании зависимости интенсивности окрашивания гепатоцитов от времени обработки в реактивах типа Шиффа использовали препараты, приготовленные на покровных стеклах, полученных из материала печени сытых животных. Для проведения окисления и окрашивания покровные стекла с клетками помещали в специальный контейнер. После окисления в йодной кислоте и промывания в проточной воде (см. выше) стекла переносили в дистиллированную воду. Затем через 2, 5 или 10 мин покровные стекла вынимали из воды и помещали либо в реактив типа Шиффа Au-SO₂ (100 мл 0.3%-ного раствора аурамина 00 + 0.2 мл хлористого тионила, SOCl₂), либо в реактив типа Шиффа EtBr-SO₂ (100 мл 10⁻⁵ М раствора бромистого этидия + 0.2 мл SOCl₂). Через 140 мин после начала окрашивания все препараты (по 2 препарата на каждую временную точку) одновременно вынимали из реактива Шиффа, проводили последовательно через три смены дистиллированной воды и три смены сернистых вод (0.2 мл SOCl₂ на 100 мл дистиллированной воды в сосуде с притертой крышкой) по 3 мин в каждой. Затем в течение 20 мин их промывали в проточной воде, споласкивали в дистиллированной воде и помещали в спирты возрастающей концентрации (70, 96 и 100 %) на 5—10 мин в каждую смену. После спиртовых препаратов высушивали на воздухе и хранили в темноте. Непосредственно перед измерениями окрашенные препараты заключали в вазелиновое масло.

Чтобы проверить, насколько долго альдегидные группы сохраняют свою реакционную способность в реактиве Шиффа, препараты после окисления йодной кислотой в течение различного времени (180 → 0 мин) выдерживали при комнатной температуре в сернистой воде. После этого препараты одновременно помещали в реактив типа Шиффа Au-SO₂ и окрашивали при комнатной температуре в течение 90 мин. Дальнейшие этапы обработки препаратов были такими же, как описано выше.

Для выявления ЛД- и ТД-фракций гликогена в отдельных гепатоцитах с помощью реактивов типа Шиффа Au-SO₂ и EtBr-SO₂ препараты помещали на 90 мин в раствор периодата калия (методику см. выше). Окисленные в йодной кислоте препараты промывали 5 мин в проточной воде и далее в одной смене дистиллированной воды. Затем препараты на 40 мин помещали в Au-SO₂ и после споласкивания их в дистиллированной воде переносили на 50 мин в EtBr-SO₂. Дальнейшая обработка препаратов была аналогична той, что описана выше.

Флуоресценцию клеток, окрашенных Au-SO₂, возбуждали светом с длинами волн 405 и 436 нм, выделенным из спектра излучения ртутной лампы ДРШ-250-2 с помощью светофильтров ФС-1 (8 мм) и СЗС-24 (4 мм). Свет флуоресценции клеток ($\lambda_{\max} \sim 526$ нм), окрашенных Au-SO₂, выделяли с помощью интерференционного светофильтра ($\lambda_{\max} = 520\text{—}560$ нм). Флуоресценцию клеток, окрашенных EtBr-SO₂ ($\lambda_{\max} \sim 610$ нм), возбуждали светом ($\lambda_{\max} = 546$ нм), выделенным из спектра излучения ртутной лампы с помощью светофильтра КС-11, 2 мм (пропускание >600 нм). Изображения клеток, окрашенных реактивами типа Шиффа, с помощью черно-белой CCD-камеры типа Chiper (США) выводили на экран монитора IBM PC совместимого компьютера. Для измерений интенсивности люминесценции клеток использовали программу ВидеоТест—Морфо—3.2 фирмы ВидеоТест (Санкт-Пе-

тербург). При измерениях содержания ЛД- и ТД-фракций гликогена в гепатоцитах использовали объектив 40 × 0.65.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы SigmaPlot v 9.0. При этом определяли среднее, ошибку среднего, коэффициент корреляции (r) и коэффициент вариации (v).

Результаты и обсуждение

Ранее было показано, что зависимость интенсивности PAS-реакции в гепатоцитах от времени окрашивания их реактивом типа Шиффа Au-SO₂ имеет двухфазный характер. Двухфазный характер этой зависимости определяется наличием в клетках ЛД-фракции гликогена, выявляющейся после окрашивания препаратов в течение 40 мин, и ТД-фракции, для выявления которой требуется значительно больше времени (Кудрявцева и др., 1974). Исходя из этого мы предположили, что окрашивание клеток в течение 40 мин реактивом типа Шиффа одного цвета позволит выявить ЛД-фракцию гликогена, а последующее их окрашивание реактивом другого цвета даст возможность выявить его ТД-фракцию. При разработке данной методики было важно, чтобы красители, используемые в реактиве типа Шиффа, специфично связывались с альдегидными группами гликогена, а их спектры флуоресценции как можно меньше перекрывались между собой.

В конце 1950-х годов американский исследователь Ф. Кастен (Kasten, 1959) предложил использовать в реактиве Шиффа вместо основного фуксина другие красители, которые специфично связывались с альдегидными группами ДНК или гликогена в ходе реакции Фельгена или PAS-реакции, но имели иной цвет. Некоторые из этих основных красителей обладали способностью флуоресцировать в различных областях видимого спектра (Kasten et al., 1959). Растворы красителей — заменителей основного фуксина, содержащие сернистую кислоту, были названы реактивами типа Шиффа (Kasten, 1960).

В настоящее время для приготовления реактивов типа Шиффа, которые применяются для цитофлуориметрических измерений содержания гликогена в клетках, наиболее часто используются флуоресцирующие красители аурамин 00 (Кудрявцева и др., 1970), парарозанилин, главный компонент основного фуксина (Changaris et al., 1977; Tsuchihashi et al., 1979), и 2, 5-бис-[4-аминофенил-(I')]-1, 3, 4-оксидиазол (BAO) (Yataganas, Gahrton, 1969). Некоторые характеристики этих и других красителей, которые были использованы в нашей работе, приведены в таблице.

Окрашивание препаратов реактивами типа Шиффа показало, что все они позволяют достаточно специфично выявлять гликоген в гепатоцитах (рис. 1). Реакция на гликоген со всеми реактивами была отрицательной как после предварительной обработки препаратов α -амилазой, так и в том случае, когда препараты не подвергались окислению йодной кислотой перед помещением их в реактив типа Шиффа.

Выбор красителя для проведения цитофлуориметрических исследований, особенно в тех случаях, когда необходимо использовать два красителя или более одновременно, представляет непростую задачу. Уолкер и Ричардс (Walker, Richards, 1959) справедливо отметили, что «большинство красителей, которыми пользовались гистологи за последнюю сотню лет, могли бы служить основой

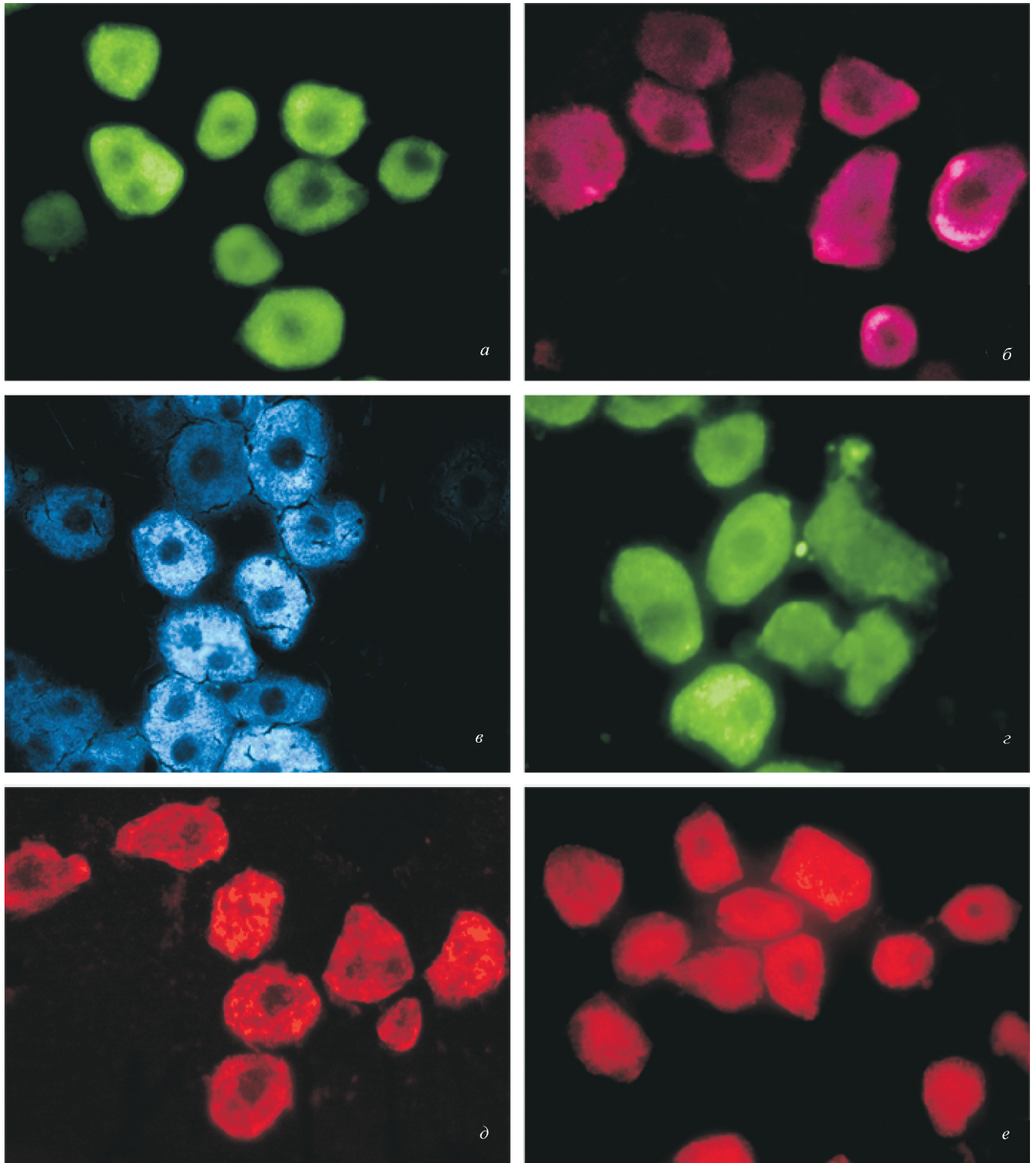


Рис. 1. Выявление гликогена с помощью различных реактивов типа Шиффа: аурамина ОО (а), основного фуксина (б), БАО (в), риванола (г), бромистого этидия (д) и акрифлавина (е).

Об. 40×.

для количественного цитохимического метода в том смысле, что при контролируемых условиях и подходящей измерительной аппаратуре с их помощью можно было бы получать воспроизводимые результаты. В действительности очень немногие из них применяются для этих целей и ни один не заслуживает полного доверия».

Поэтому при выборе пары красителей для использования их в качестве реактивов типа Шиффа разного цвета при выявлении ЛД- и ТД-фракций гликогена в клетках мы учитывали не только специфичность связывания красителей с альдегидными группами гликогена, но и другие их характеристики.

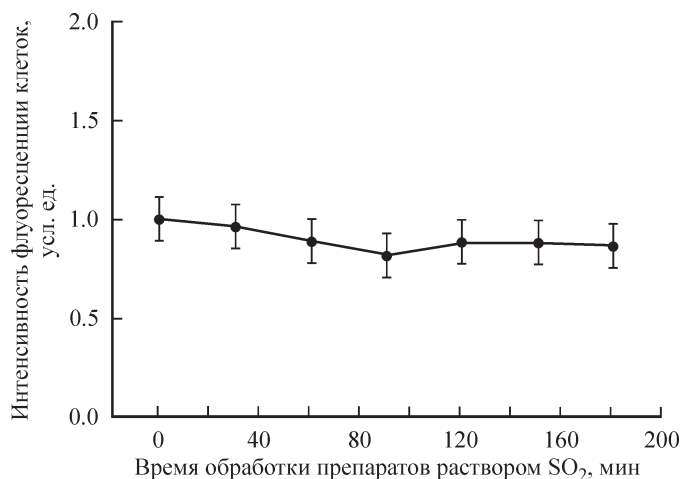


Рис. 2. Влияние времени выдерживания препаратов в растворе SO₂ на стабильность альдегидных групп гликогена в гепатоцитах.

Здесь и на рис. 2—5 вертикальные отрезки обозначают ошибку среднего.

Известно, что все акридиновые красители в той или иной степени обладают метакроматическими свойствами, т. е. при изменении концентрации исследуемого вещества спектр флуоресценции этих красителей также изменяется (Prenna, 1968). Кроме того, при окрашивании клеток акридиновыми красителями отмечают довольно сильный эффект внутреннего фильтра (Böhm, Sprenger, 1968). Обнаружено также, что при увеличении концентрации акридиновых красителей и ВАО в реактиве типа Шиффа может происходить неспецифическое окрашивание клеток (Prenna, 1968; Weste, Penington, 1972). При использовании ВАО-SO₂ для окрашивания полисахаридов в препаратах, предварительно окисленных йодной кислотой, было показано, что при концентрации ВАО 10⁻⁵ % в реактиве типа Шиффа α-амилаза извлекала 90 % окрашивающего

ся продукта. При увеличении концентрации красителя в реактиве до 10⁻⁴ и 10⁻³ % α-амилаза извлекала 75 и 53 % окрашивающегося продукта соответственно (Yataganas, Gahrton, 1969). Недостатком ВАО является также и то, что клетки, обработанные этим красителем, флуоресцируют в сине-зеленой области спектра, в которой, как известно, интенсивность собственной флуоресценции клеток особенно велика. Ряд недостатков отмечен и для других красителей. Аурамин 00 недостаточно устойчив к возбуждающему свету (Рух, 1969). Кроме того, реактивы типа Шиффа на основе аурамина 00 и йодистого пропидия можно использовать только 1 раз из-за образования в них осадка. Парарозанилин может применяться лишь в очень небольших концентрациях, что может привести к нарушению пропорциональности между содержанием красителя и исследуемым веществом. Кроме того, при использовании парарозанилина необходимо строго контролировать интенсивность поглощения возбуждающего света (Enerbäck, Johansson, 1973; Fujita, 1973).

По-видимому, не имеет смысла искать краситель, который бы идеально отвечал всем требованиям при проведении количественных цитохимических исследований. Каждая конкретная задача требует применения конкретного красителя и условий, в которых он должен использоваться. Тем не менее свойства красителя могут в значительной мере определять ширину границ, в которых этот краситель может использоваться, и универсальность количественного цитохимического метода. В данной работе мы остановились на двух красителях — аураине 00 и бромистом этидии — по следующим причинам: во-первых, реактивы типа Шиффа Au-SO₂ и EtBr-SO₂ при использовании их в PAS-реакции позволяют специфично выявлять гликоген в гепатоцитах, во-вторых, спектры флуоресценции гепатоцитов, окрашенных Au-SO₂ (λ_{max} ~ 526 нм) и EtBr-SO₂ (λ_{max} ~ 610 нм), слабо перекрываются между собой и, наконец, спектры флуоресценции обоих красителей не смещаются при изменении концентрации гликогена в клетках. В качестве «красного»

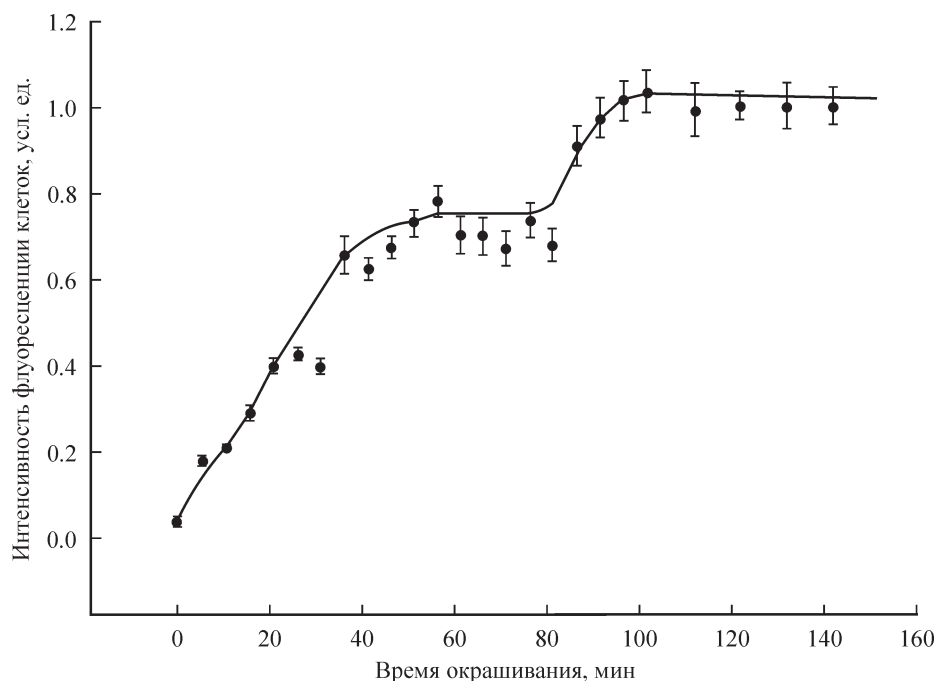


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции гепатоцитов от времени окрашивания Au-SO₂.

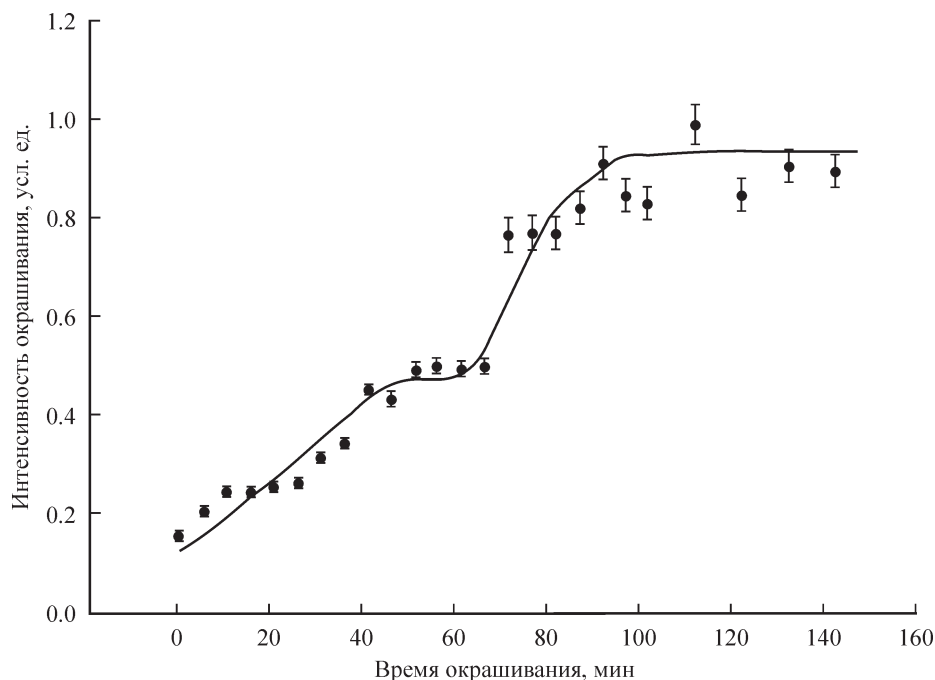


Рис. 4. Зависимость интенсивности флуоресценции гепатоцитов от времени окрашивания EtBr-SO₂.

красителя вместо бромистого этидия, по-видимому, можно было бы использовать и парарозанилин, но, учитывая большой и успешный опыт применения бромистого этидия в качестве флуоресцентного красителя, в данной работе мы отдали предпочтение последнему.

Альдегиды представляют собой класс очень реакционноспособных органических соединений, легко вступающих во многие реакции присоединения, замещения и конденсации. Поскольку окрашивание альдегидных групп, образовавшихся после окисления гликогена периодатом калия, происходит в реактиве типа Шиффа в течение длительного времени, нельзя исключить некоторую потерю их реактивности. В связи с этим мы исследовали сохранность альдегидных групп в ходе их окрашивания Au-SO₂.

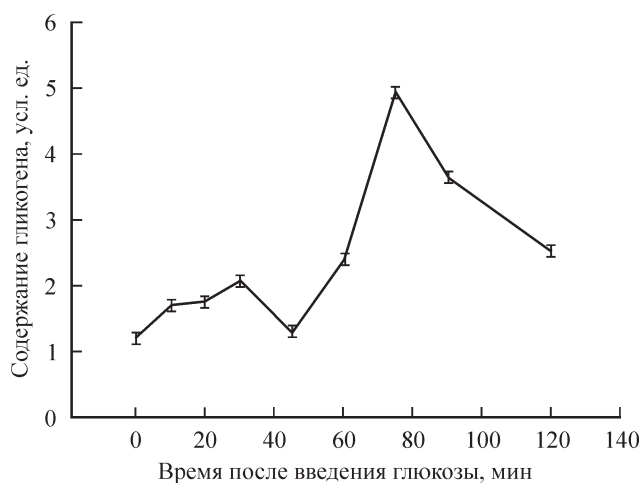


Рис. 5. Содержание гликогена в клетках печени через разные интервалы времени после введения глюкозы голодным животным.

Данные, представленные на рис. 2, свидетельствуют о том, что по крайней мере в течение 3 ч нахождения препаратов в водном растворе SO₂, концентрация которого была идентичной концентрации SO₂ в реактиве Шиффа, потери альдегидных групп не происходило. С учетом этих данных была исследована зависимость интенсивности окрашивания препаратов от времени их обработки различными реактивами типа Шиффа.

Результаты, представленные на рис. 3 и 4, свидетельствуют о том, что зависимость интенсивности флуоресценции гепатоцитов от времени их окрашивания в случае как Au-SO₂, так и EtBr-SO₂ имеет схожий двухступенчатый характер. В интервале 0—40 мин происходит быстрое связывание красителей, после чего в интервале 40—75 (80) мин оно резко замедляется. Однако затем наблюдается новая волна интенсивного связывания Au и EtBr в реактивах типа Шиффа. После 90 мин окрашивания клеток Au-SO₂ и EtBr-SO₂ кривая зависимости интенсивности флуоресценции клеток от времени фактически выходит на плато, свидетельствуя о максимальном связывании красителей альдегидными группами гликогена в ходе PAS-реакции. Полученные нами данные подтверждают ранее сделанный вывод о том, что в гепатоцитах присутствуют две фракции гликогена (Кудрявцева и др., 1974). Одна из этих фракций (ЛД) окрашивается Au-SO₂ или EtBr-SO₂ быстро, в течение первых 40 мин после начала обработки препаратов в реактивах типа Шиффа. Окрашивание другой фракции (ТД) происходит со значительной задержкой. Быстрое связывание красителей ТД-фракцией начинается примерно через 75—80 мин после начала обработки препаратов в обоих реактивах типа Шиффа.

Природа ЛД- и ТД-фракций гликогена в настоящее время не совсем ясна. ЛД-фракция экстрагируется из препаратов трихлоруксусной кислотой, в то время как для удаления ТД-фракции требуется обработка их КОН (Russet, Bloom, 1955; Кудрявцева и др., 1974; Розенфельд, Попова, 1989; Lomako et al., 2004). Имеются данные о том,

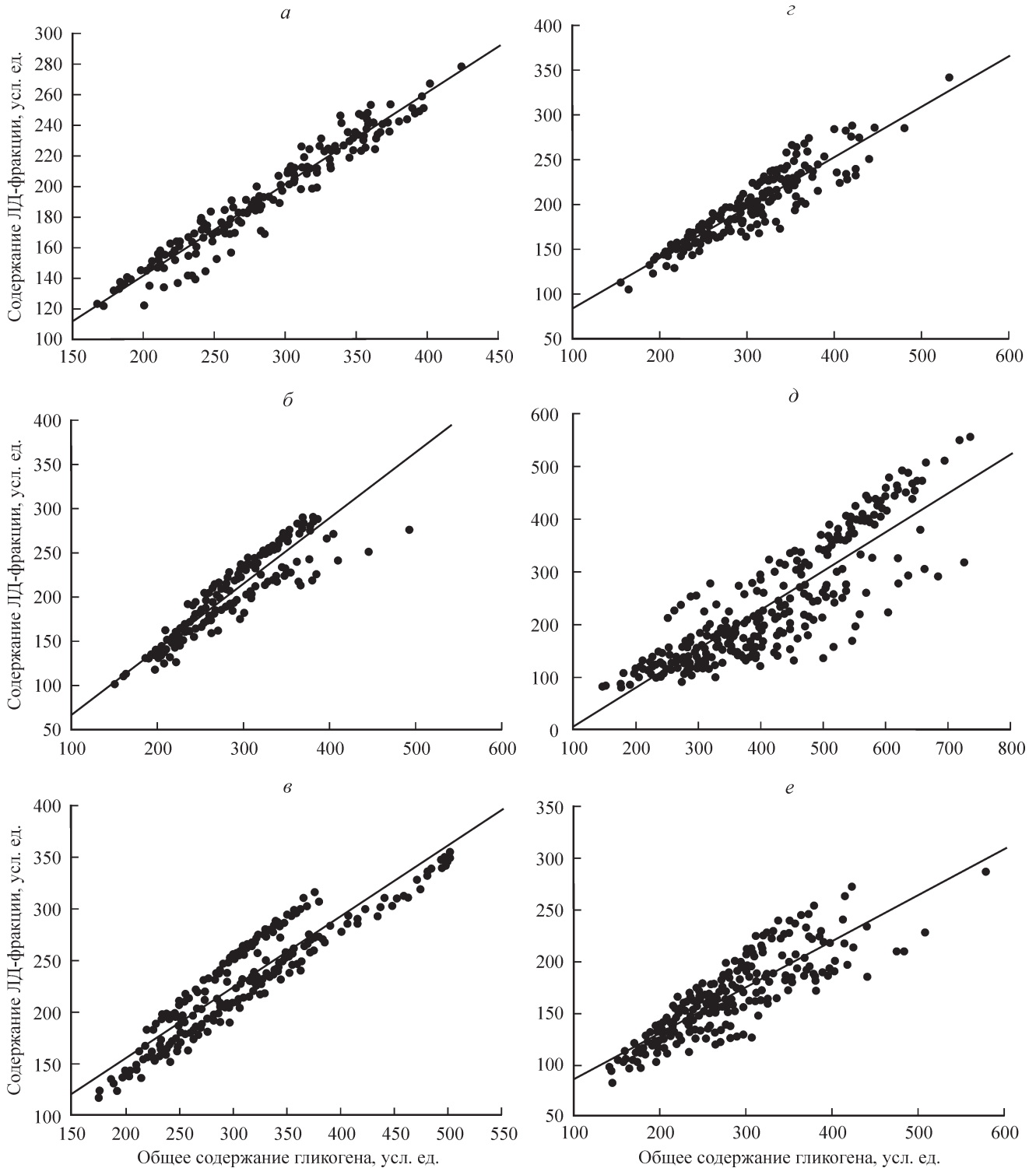


Рис. 6. Зависимость содержания ЛД-фракции гликогена от содержания суммарного гликогена в гепатоцитах на разных этапах рефидинга крыс глюкозой.

а — 0 мин, б — 10 мин, в — 20 мин, г — 30 мин, д — 90 мин, е — 120 мин после введения глюкозы голодным крысам. Каждая точка на графиках соответствует отдельной клетке.

что ТД-фракция гликогена в гликоген-ферментном комплексе более прочно связана с белком; возможно, поэтому ее содержание в клетках относительно слабо меняется при разных воздействиях (Russel, Bloom, 1955; Butler et al., 1977; Alonso et al., 1995). Напротив, ЛД-фракция гликогена гораздо более лабильна, ее уровень подвергается

значительным колебаниям при изменении физиологического состояния организма в течение суток или при патологии (Russel, Bloom, 1955; Wilkinson, Kugler, 1961; Кудрявцева, Шалахметова, 1976; Кудрявцева и др., 1982). Установлено, что накопление гликогена в гепатоцитах при рефидинге крыс обусловлено главным образом

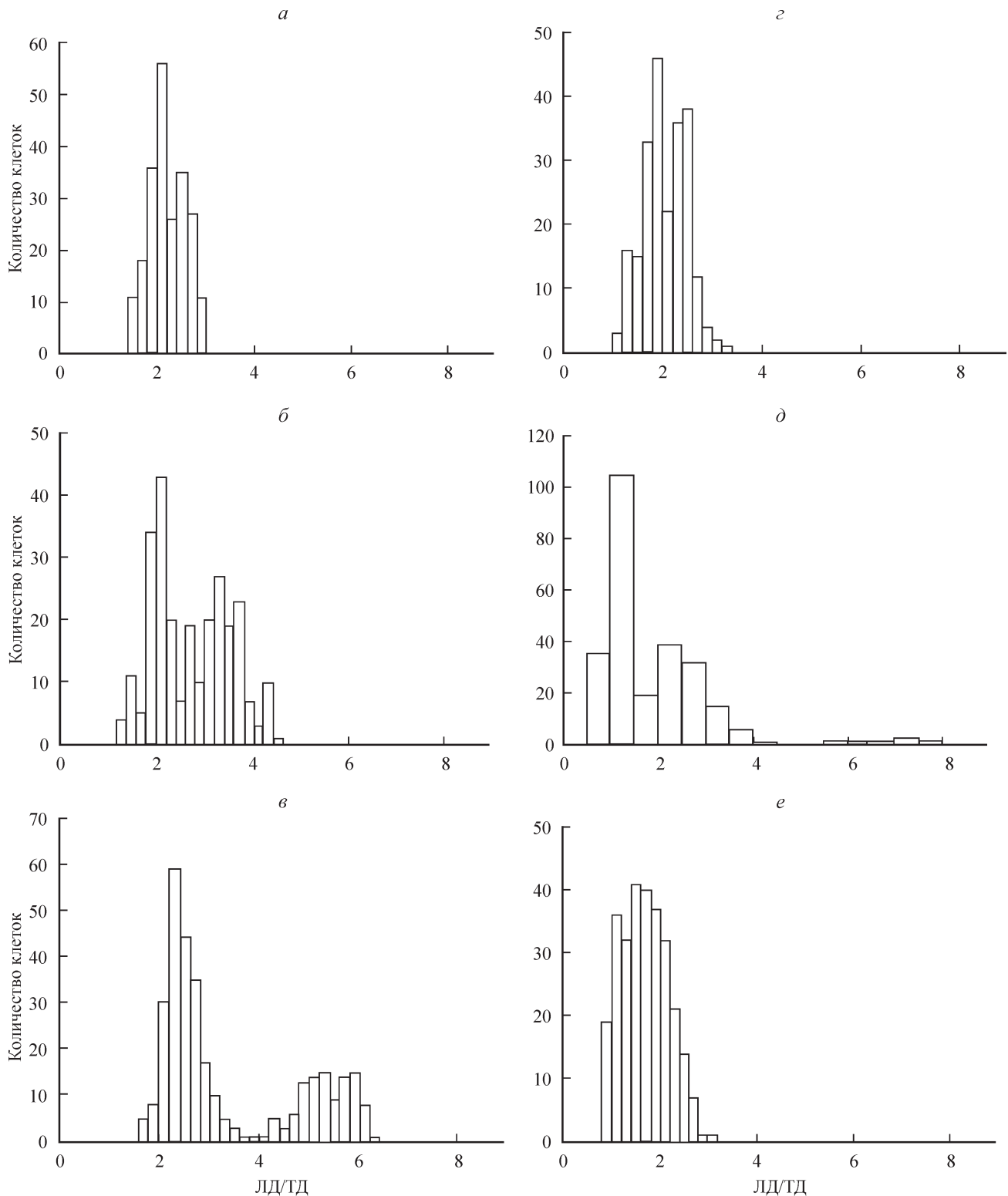


Рис. 7. Гистограммы распределения соотношения ЛД/ТД на разных этапах ресинтеза гликогена.
 а — 0 мин, б — 10 мин, в — 20 мин, г — 30 мин, д — 90 мин, е — 120 мин после введения глюкозы голодным крысам.

ЛД-фракцией (Кудрявцева и др., 1982, 1990). Показано также, что при хронических поражениях печени доля ТД-фракции гликогена в гепатоцитах увеличивается. Если в норме доля ТД-фракции гликогена составляет 10—20 %, то при циррозе она возрастает до 30—40 %, возможно указывая на более прочное взаимодействие

гликогена с белками (Кудрявцева, 1987; Кудрявцева и др., 1988, 1992).

Результаты, представленные на рис. 5, свидетельствуют о том, что содержание гликогена в гепатоцитах крыс после 48 ч голодания находится на очень низком уровне, подтверждая тем самым данные других авторов, получен-

ные на крысах и человеке (Giardina et al., 1994; Petersen et al., 1999). Введение глюкозы голодным крысам стимулирует накопление гликогена в клетках. В результате содержание гликогена в гепатоцитах уже через 10 мин после введения глюкозы становится выше, чем у голодных животных ($P < 0.01$). После этого содержание гликогена в клетках продолжает нарастать и достигает максимума через 75 мин после введения глюкозы, который превышает исходный уровень гликогена в 4.7 раза. Интенсивное отложение гликогена в клетках печени после введения *per os* крысам аналогичных доз глюкозы отмечалось рядом авторов (Niewoehner et al., 1984; Niewoehner, Nuttall, 1988; Ercan et al., 1994).

Известно, что в печени происходит непрерывный оборот гликогена, т. е. постоянное добавление глюкозных единиц к молекулам гликогена и их отщепление (Magnuson et al., 1994; Roden et al., 1996; Hellerstein et al., 1997). Из данных, представленных на рис. 5, следует, что накопление гликогена в гепатоцитах после введения глюкозы голодным крысам не является монотонным процессом. В ходе рефиндинга периоды быстрого накопления гликогена (0—30 и 45—75 мин), когда синтез гликогена значительно преобладает над его распадом, сменяются периодами, когда скорость расщепления гликогена становится выше, чем его синтеза (30—45 и 75—120 мин).

Данные, представленные на рис. 6, свидетельствуют о том, что содержание ЛД-фракции в клетках нарастает по мере накопления суммарного гликогена. Коэффициент корреляции (r) между содержанием ЛД-фракции и содержанием суммарного гликогена в гепатоцитах особенно велик, когда вектор метаболизма гликогена направлен на его синтез. В печени голодных крыс $r = 0.95$, а через 10, 20 и 30 мин рефиндинга глюкозой — 0.93, 0.97, 0.99 соответственно (рис. 6, *a—e*). Через 90 и 120 мин после введения глюкозы, когда деградация гликогена преобладает над его синтезом, зависимость содержания ЛД-фракции от содержания суммарного гликогена в клетках становится менее выраженной ($r = 0.71$ и 0.82 соответственно).

На рис. 7 представлены данные о распределении значений соотношения ЛД/ТД в популяции гепатоцитов через различные интервалы времени после введения глюкозы голодным крысам. Из полученных нами данных следует, что соотношение ЛД/ТД увеличивается в интервале 0—30 мин, когда синтез гликогена значительно превалирует над его распадом, и снижается, когда в популяции одновременно происходят как синтез, так и деградация гликогена.

Результаты, представленные на рис. 7, свидетельствуют также о том, что в период синхронного синтеза гликогена гепатоцитами (0—30 мин) коэффициент вариации значений ЛД/ТД в клетках невелик ($v = 13—20\%$). Через 90 и 120 мин после введения глюкозы голодным крысам, когда деградация гликогена преобладает над его синтезом и популяция гепатоцитов становится асинхронной в отношении этих процессов, коэффициент вариации величины соотношения ЛД/ТД в клетках возрастает в среднем до 30%. Исходя из этих данных можно предположить, что в это время вероятность присутствия в гепатоцитах не полностью сформированных гранул гликогена становится значительно выше.

Таким образом, проведенное исследование показало, что применение реактивов типа Шиффа с различными спектральными характеристиками может дать ценную информацию о структуре гликогена в клетках, а также о порядке его синтеза и деградации в клеточной популяции.

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

Список литературы

- Безбородкина Н. Н., Кудрявцева М. В., Оковитый С. В., Нилова В. К., Кудрявцев Б. Н. 2003. Динамика содержания гликогена в нормальной и цирротически измененной печени после введения глюкозы голодным крысам. Цитология. 45 (10): 1019—1026.
- Емельянов А. В. 1997. Некоторые особенности метаболизма гликогена в гепатоцитах при хронических поражениях печени: Автореф. канд. дис. СПб. 22 с.
- Кеннеди Д. Ф., Уайт К. А. 1986. Липиды, углеводы, макромолекулы, биосинтез. В кн.: Общая органическая химия. М.: Химия. 2: 207—282.
- Кудрявцев Б. Н., Кудрявцева М. В., Фадеева М. Д. 1974. Цитофлуориметрия ДНК с этидиум бромидом-SO₂. Цитология. 16 (1): 107—112.
- Кудрявцев Б. Н., Розанов Ю. М. 1974. Цитофлуориметрия. Общие принципы. В кн.: Методы биологии развития. М.: Наука. 497—500.
- Кудрявцева М. В. 1987. Гликогеноз клеток печени при хроническом гепатите и его диагностическое значение. Успехи гепатол. 13: 201—211.
- Кудрявцева М. В., Емельянов А. В., Сакута Г. А., Скорина А. Д., Слепцова Л. А., Кудрявцев Б. Н. 1992. Цитофлуориметрическое исследование содержания гликогена и его фракций в гепатоцитах больных циррозом печени различной этиологии. Цитология. 34 (11/12): 102—109.
- Кудрявцева М. В., Завадская Е. Э., Кудрявцев Б. Н. 1982. Цитофлуориметрическое исследование содержания гликогена и его фракций в клетках печени крыс в условиях его синтеза и распада. Цитология. 24 (7): 777—783.
- Кудрявцева М. В., Завадская Е. Э., Скорина А. Д., Смирнова С. А., Кудрявцев Б. Н. 1983. Метод получения изолированных клеток печени из материала прижизненных пункционных биопсий. Лаб. дело. 9: 21—22.
- Кудрявцева М. В., Кудрявцев Б. Н., Розанов Ю. М. 1970. Определение количества гликогена в клетках печени крыс с использованием флуоресцентного красителя аурамина 00. Цитология. 12 (8): 1060—1067.
- Кудрявцева М. В., Кудрявцев Б. Н., Розанов Ю. М. 1974. О двух фракциях гликогена в клетках печени крысы (цитофлуориметрическое исследование). Цитология. 16 (7): 851—858.
- Кудрявцева М. В., Сакута Г. А., Штейн Г. И., Кудрявцев Б. Н. 1990. Динамика синтеза гликогена в гепатоцитах различных зон долек печени крыс. Цитология. 32 (10): 1010—1018.
- Кудрявцева М. В., Скорина А. Д., Смирнова С. А., Дейнека З. Г., Кудрявцев Б. Н. 1988. Цитофлуориметрическое исследование фракций гликогена в клетках печени больных хроническим вирусным и алкогольным гепатитами. Цитология. 30 (6): 705—710.
- Кудрявцева М. В., Шалахметова Т. М. 1976. Микрофлуориметрическое исследование фракций гликогена в клетках печени крыс при различных условиях перфузии печени и питания животных. Цитология. 18 (4): 506—508.
- Розанов Ю. М., Кудрявцев Б. Н. 1967. Метод флуоресцентной цитофотометрии для количественного определения ДНК. Цитология. 93 (3): 361—368.
- Розенфельд Е. Л., Попова И. А. 1989. Врожденные нарушения обмена гликогена. М.: Медицина. 240 с.
- Рух Ф. 1969. Определение содержания ДНК методом микрофлуориметрии. В кн.: Введение в количественную цитохимию. М.: Мир. 229—238.
- Тюкавкина Н. А., Бауков Ю. И. 2005. Биоорганическая химия. М.: Дрофа. 542 с.
- Хачатуров Е. Н., Смирнова Е. А. 1966. Применение риванола-SO₂ для цитофлуориметрии ДНК. Изв. АН СССР. 6: 900—905.

- Alonso M. D., Lomako J., Lomako W. M., Whelan W. J. 1995. A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J.* 9 : 26—37.
- Böhm N., Sprenger E. 1968. A valuable method for the quantitative determination of nuclear Feulgen—DNA. *Histochemie.* 16 : 100—118.
- Bosshard U. 1964. Fluoreszenzmikroskopische Messung des DNS-Gehaltes von Zellkernen. *Z. wiss. Mikr.* 65 : 391—408.
- Butler N. A., Lee E. Y., Whelan W. J. 1977. A protein-bound glycogen component of rat liver. *Carbohydr. Res.* 55 : 75—82.
- Changaris D. G., Combs J., Severs W. B. 1977. A microfluorescent PAS method for the quantitative demonstration of cytoplasmic 1, 2-glycols. *Histochemistry.* 52 : 1—15.
- Denoöl C. 1969. Microfluorometric determination of deoxyribonucleic acids in rat spermatozoid and chicken fibroblasts cultivated *in vitro*. *CR. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D.* 268 : 348—351.
- Devos P., Baudhuin P., Van Hoof F., Hers H. G. 1983. The alpha-particulate liver glycogen. *Biochem. J.* 209 : 159—165.
- Enerbäck L., Johansson K. A. 1973. Fluorescence fading in quantitative fluorescence microscopy: a cytofluorometer for the automatic recording of fluorescence peaks of very short duration. *Histochem. J.* 19 : 351—362.
- Ercan N., Gannon M. C., Nuttall F. Q. 1994. Liver glycogen synthase, phosphorylase, and the glycogen concentration in rats given a glucose load orally: a 24-hour study. *Arch. Biochem. Biophys.* 315 : 35—40.
- Fogilieni C., Meoni C., Davalli A. M. 2001. Fluorescent dyes for cell viability: an application on prefixed conditions. *Histochem. Cell. Biol.* 115 : 223—229.
- Fujita S. 1973. DNA cytofluorometry on large and small cell nuclei stained with pararosaniline Feulgen. *Histochemie.* 36 : 193—199.
- Geddes R., Chow J. C. K. 1994. Glycogen size analysis by minigradients. *Carbohydr. Res.* 261 : 79—90.
- Giardina M. G., Matarazzo M., Sacca L. 1994. Kinetic analysis of glycogen synthase and PDC in cirrhotic rat liver and skeletal muscle. *Amer. J. Physiol.* 267 : E900—E906.
- Hellerstein M. K., Neese R. A., Linfoot P., Christiansen M., Turner S., Letscher A. 1997. Hepatic gluconeogenic fluxes and glycogen turnover during fasting in humans. A stable isotope study. *J. Clin. Invest.* 100 : 1305—1319.
- Kasten F. H. 1959. Schiff-type reagents in cytochemistry. *Histochemie.* 1 : 466—500.
- Kasten F. H. 1960. The chemistry of Schiff's reagent. *Int. Rev. Cytol.* 10 : 1—100.
- Kasten F. H., Burton V., Glover S. 1959. Fluorescent Schiff-type reagent for cytochemical detection of polyaldehyde moieties in section and smears. *Nature.* 184 : 1797.
- Lillie R. D. 1965. *Histopathologic technic and practical histochemistry.* New York: McGraw-Hill Book Comp. 648 p.
- Lomako J., Lomako W. M., Whelan W. J. 2004. Glycogenin: the primer for mammalian and yeast glycogen synthesis. *Biochim. biophys. acta.* 1673 : 45—55.
- Magnusson I., Rothman D. L., Jucker B., Cline G. W., Shulman R. G., Shulman G. I. 1994. Liver glycogen turnover in fed and fasted humans. *Amer. J. Physiol.* 266 : E796—E803.
- Manners D. J. 1991. Recent developments in our understanding of glycogen structure. *Carbohydrate Polymers.* 16 : 37—41.
- Matern D., Starzl T. E., Arnaout W., Barnard J., Bynon J. S., Shewan A., Emond J., Haagsma E. B., Hug G., Lachaux A., Smit G. P., Chen Y. T. 1999. Liver transplantation for glycogen storage disease types I, III and IV. *Eur. J. Pediatr.* 158 : S43—S48.
- McManus J. A. F. 1946. Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature.* 158 : 202.
- Niewoehner C. B., Gilboe D. P., Nuttall F. Q. 1984. Metabolic effects of oral glucose in the liver of fasted rats. *Amer. J. Physiol.* 246 : E89—E94.
- Niewoehner C. B., Nuttall F. Q. 1988. Relationship of hepatic glucose uptake to intrahepatic glucose concentration in fasted rats after glucose load. *Diabetes.* 37 : 1559—1566.
- Nitsch B., Murken J. D., Brück H. J. 1970. Determining Feulgen-DNA of individual chromosomes by fluorescence cytophotometry with incident light. *Histochemie.* 23 : 254—265.
- Petersen K. F., Krssak M., Navarro V., Chandramouli V., Hundal R., Schumann W. C., Landau B. R., Shulman G. I. 1999. Contributions of net hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis to glucose production in cirrhosis. *Amer. J. Physiol.* 276 : E529—E535.
- Ploem J. S. 1967. Die Möglichkeit der Auflichtfluoreszenzmethoden bei Untersuchungen von Zellen in Durchströmungskammern und Leightonröhren. *Acta histochem.* 7 : 339—343.
- Prenna G. 1968. Qualitative and quantitative application of fluorescent Schiff-type reagent. *Microscopie.* 23 : 150—154.
- Prenna G., Banchi U. A., Zannotti L. 1964. Reazioni di Feulgen fluorescenti e loro possibilita' cytofluorometriche quantitative. 2. Derivati acridini come reagenti tipo Schiff fluorescenti nella reazione di Feulgen. *Riv. istoch. norm. pat.* 10 : 389—404.
- Prenna G., Lciva S., Mazzini G. 1972. Quantitative DNA-fluorometry by the conventional Feulgen reaction. In: *Histochemistry and cytochemistry.* Kyoto: Nakanishi Publ. Co. 201—202.
- Roach P. J. 2002. Glycogen and its metabolism. *Curr. Mol. Med.* 2 : 101—120.
- Roden M., Perseghin G., Petersen K. F., Hwang J.-H., Cline G. W., Gerow K., Rothman D. L., Shulman G. I. 1996. The roles of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glycogen synthesis and turnover in humans. *J. Clin. Invest.* 97 : 642—648.
- Ruch F., Bosshard U. 1963. Photometrische Bestimmung von Stoffmengen im Fluoreszenzmikroskop. *Z. wiss. Mikr.* 65 : 335—341.
- Russel J. A., Bloom W. L. 1955. Extractable and residual glycogen in tissues of the rat. *Amer. J. Physiol.* 183 : 345—355.
- Rybicka K. K. 1996. Glycosomes — the organelles of glycogen metabolism. *Tissue and Cell.* 28 : 253—265.
- Tsuchihashi Y., Nakanishi K., Fukuda M., Fujita S. 1979. Quantification of nuclear DNA and intracellular glycogen in a single cell by fluorescent double-staining. *Histochemistry.* 63 : 311—322.
- Walker P. M. B., Richards B. M. 1959. Quantitative microscopical techniques for single cells. In: *The cell.* New York; London. 1 : 91—138.
- Walker P. R. 1977. Regulation of liver glycogen metabolism by the portal blood glucose concentration in rats adapted to controlled feeding schedules. *Int. J. Biochem.* 8 : 555—556.
- Weste S. M., Penington D. G. 1972. Fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in bone marrow cells. The measurement of megakaryocyte deoxyribonucleic acid. *J. Histochem. Cytochem.* 20 : 627—633.
- Wilkinson W. J., Kugler J. H. 1961. The basis for the histochemical detection of glycogen. *J. Histochem. Cytochem.* 9 : 498—503.
- Yataghanas X., Gahrton G. 1969. Microspectrofluorometry of a periodic Acid-Schiff reaction in blood cells. *Exp. Cell Res.* 56 : 59—68.

APPLICATION OF SCHIFF'S REAGENTS WITH VARIOUS SPECTRAL CHARACTERISTICS
TO DETERMINE THE CONTENT OF LABILE AND STABLE GLYCOGEN FRACTIONS
IN ISOLATED HEPATOCYTES

N. N. Bezborodkina, E. I. Kirshina, E. V. Mushinskaya, B. N. Kudryavtsev

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

The dynamics of the total glycogen accumulation, its labile and stable fraction contents were studied in hepatocytes after administration of 30 % glucose to rats that had been starving for 48 h. In the study, the original method based on the use of Schiff's reagents with various spectral characteristics (auramine-SO₂ — Au-SO₂ — and ethidium bromide-SO₂ — EtBr-SO₂) was applied allowing detection and quantitative determination of the labile and stable glycogen fractions in the same hepatocytes to be achieved. Staining of the preparation by Au-SO₂ during 40 min revealed the labile glycogen fraction (green fluorescence, $\lambda_{\text{max}} = 526$ nm). The following staining of the same sample by EtBr-SO₂ during 50 min revealed stable glycogen fractions (red fluorescence, $\lambda_{\text{max}} = 620$ nm) in the cells. The measurement of fluorescence intensity in the corresponding spectrum permits the quantity of each glycogen fractions in isolated liver cells to be determined. It has been shown that as the glycogen accumulates in the hepatocytes its labile fraction content increases. The correlation coefficient (r) between the labile fraction content and the total glycogen content in hepatocytes obtained from the liver of starving rats was 0.95, and in hepatocytes isolated 20 and 30 min after the beginning of glucose refeeding to starving rats it was 0.95 and 0.98, respectively. 90 and 120 min after administration of glucose to starving rats, when the hepatocyte population becomes non-synchronous with respect to synthesis and degradation of glycogen in cells, the dependence of the labile fraction content upon the quantity of the total glycogen becomes less expressed ($r = 0.71$ and 0.82, respectively). Thus the application of Schiff's reagents with various spectral characteristics enables us to obtain valuable information about glycogen structure in cells and about the processes of its synthesis and degradation in the cell population.

Key words: glycogen fractions, hepatocytes, auramine, ethidium bromide, Schiff's reagent.