

Ю. М. РОЗАНОВ, И. Я. БАРСКИЙ, Ю. С. БОРОВИКОВ, М. С. ШУДЕЛЬ,
Н. А. ЧЕРНОГРЯДСКАЯ

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛЯРИЗОВАННОЙ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ОДИНОЧНЫХ МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКОН

(Представлено академиком Г. М. Франком 26 V 1970)

В последнее время начали появляться работы, посвященные исследованиям поляризованной флуоресценции клеток и клеточных структур⁽¹⁻⁴⁾. Большой интерес представляет изучение параметров поляризованной у.-ф. флуоресценции, связанной с триптофансодержащими белками клетки.

В настоящей работе приводятся результаты изучения азимутальных характеристик (а.х.) поляризованной у.-ф. флуоресценции одиночных

мышечных волокон. Под а.х. флуоресценции понимается зависимость степени поляризации флуоресценции от угла (φ) между направлением электрического вектора электромагнитных колебаний возбуждающих флуоресценцию лучей и осью объекта. Азимутальные характеристики у.-ф. флуоресценции клеток могут дать дополнительную информацию о структуре и расположении молекул белка этих объектов, а также об изменениях, происходящих в живых клетках под влиянием различных воздействий.

Живые одиночные мышечные волокна выделялись из *m. ileofibularis* лягушки *Rana temporaria*. Флуоресценция возбуждалась коротковолновыми у.-ф. лучами, выделяемыми двойным монохроматором; регистрация флуоресценции производилась в области спектра 320—380 м μ .

На рис. 1 приведены а.х. у.-ф. флуоресценции живого мышечного волокна и поврежденного нагреванием. Подобные а.х. были получены ранее Каулиным^(1, 2) при исследовании флуоресценции мышечных волокон, окрашенных акридиновым оранжевым. На основании анализа экспериментальных данных Каулин предположил, что часть молекул красителя ориентируется по спирали, повторяя вторичную структуру молекул миозина. Параметры а.х. собственной у.-ф. флуоресценции мышечных волокон отличаются от параметров а.х. волокон, окрашенных акридиновым оранжевым. Минимум полученных нами а.х. находится всегда при $\varphi > 45^\circ$ (в работах Каулина $\varphi_{\min} = 45^\circ$). Значения P_{\min} были в большинстве случаев отрицательными. Положительные значения P_{\min} получались

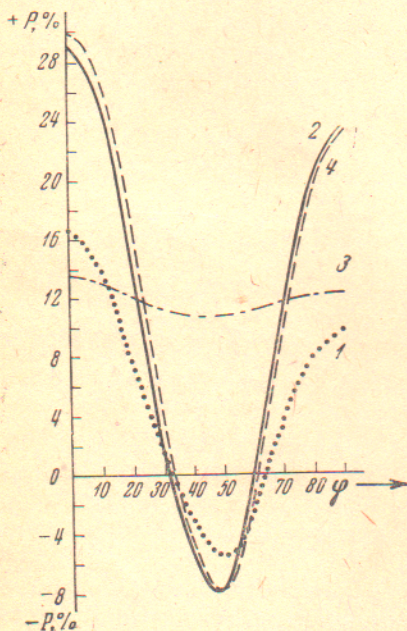


Рис. 1. Азимутальные характеристики у.-ф. флуоресценции мышечных волокон. 1, 2 — живое волокно (1 — λ 280 м μ , 2 — λ 303 м μ); 3 — волокно, поврежденное нагреванием до 58°; 4 — теоретически рассчитанная а.х.

212

у нас, как правило, для поврежденных волокон (в работе Каулина не могли быть зарегистрированы отрицательные значения P , но можно было заметить переход кривой $P(\varphi)$ через 0).

Уже первые оценки показывают, что в нашем случае ориентированные осцилляторы играют заметно большую роль в определении поляризационных характеристик флуоресценции мышечного волокна: φ_{\min} заметно больше 45° (чаще всего φ_{\min} равно $48-49^\circ$, но иногда были значения 50°

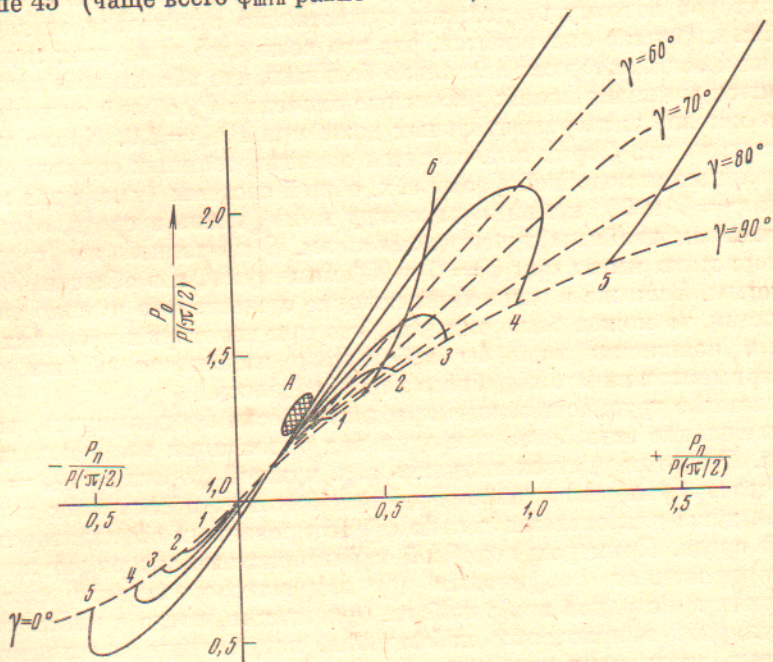


Рис. 2. Диаграмма, показывающая соотношение величин P_0 , $P(\pi/2)$ и P_n , полученных экспериментально (область А) и рассчитанных для системы неориентированных и ориентированных по касательной к спирали осцилляторов. Кривые 1—5 показывают изменение соотношения при изменении γ для $X = \text{const}$: 1 — $X = 0,1$, 2 — $X = 0,2$, 3 — $X = 0,3$, 4 — $X = 0,5$, 5 — $X = 1$, 6 — соответствует параметрам системы, при которых выполняется условие $\varphi_{\min} = 50^\circ$. Прерывистые кривые показывают сдвиг соотношения при изменении X для $\gamma = \text{const}$

и более); величина спонтанной поляризации (P_n) у.-ф. флуоресценции больше (5—6%), чем P_n окрашенных акридиновым оранжевым волокон (1,5—2%).

Нами были рассчитаны значения P_0 , P_{90} и P_n для системы, состоящей из ориентированных по спирали и хаотически расположенных излучающих осцилляторов при всех возможных значениях угла наклона спирали (γ) и различных соотношениях концентраций ориентированных (n_0) и неориентированных (n_n) молекул. Полученные данные представлены на рис. 2. Каждому сочетанию параметров γ и x на диаграмме соответствует одна точка. Нанесены также экспериментальные точки. Диаграмма построена в предположении, что степень поляризации флуоресценции для отдельных неориентированных и ориентированных молекул равны друг другу ($P_{\text{осц}}^n = P_{\text{осц}}^0$).

Рис. 2 показывает, что теоретические кривые для любых возможных γ и x не перекрываются с областью экспериментальных значений. При других значениях $P_{\text{осц}}^n / P_{\text{осц}}^0$ также не удастся получить согласия с экспериментальными данными.

Проведенные расчеты привели нас к выводу, что осцилляторная модель мышечного волокна, построенная на основе предположения о наличии только одного вида ориентации в цилиндрически симметричной системе

(линейная вдоль волокна, спиральная, радиальная в плоскости, перпендикулярной оси симметрии), не может удовлетворить экспериментальным данным.

Возникающие затруднения упрощенно можно представить следующим образом. Ориентированные осцилляторы находятся в волокне в довольно заметной концентрации и, следовательно, оказывают заметное влияние на форму общей а. х. системы. Параметры а. х. самих ориентированных осцилляторов поэтому не должны существенно отличаться от параметров общей а. х. Однако оказывается, что это возможно при углах между осью системы и осцилляторами настолько больших, что абсолютная величина P_0 становится слишком малой; расчетные значения P_0 общей системы оказываются меньше экспериментальных даже при $P_{\text{осц}}^0 = 1,0$. Кроме того, следует сказать, что форма а. х. системы ориентированных осцилляторов при этом получается подобной форме а. х. общей системы (имеет два максимума при $\varphi = 0$ и 90° и минимум между ними) лишь в среде, обладающей значительным двойным лучепреломлением. В изотропной же среде такая характеристика имеет при $\varphi = 0$ и 90° минимумы, а в области $40-45^\circ$ — максимумы. Если же в мышечном волокне существовал именно такой вид ориентации, то можно было ожидать, что при некоторых условиях он проявится в появлении хотя бы небольшого максимума вблизи $\varphi = 45^\circ$. В экспериментах ничего подобного не наблюдалось.

Указанные трудности можно преодолеть, если предположить, что в мышечном волокне есть более чем один вид ориентации излучающих осцилляторов. При этом удается получить а. х. нужной формы с $\varphi_{\text{min}} = 48-50^\circ$ и отрицательными значениями P_{min} при высоких абсолютных значениях P_0 и P_{90} , даже для системы только ориентированных осцилляторов в изотропной среде. Примером подобной характеристики может служить а. х., зарегистрированная Феофиловым ⁽⁴⁾ для макроскопически изотропных кубических кристаллов при такой их ориентации, когда в плоскости, перпендикулярной направлению наблюдения, излучающие осцилляторы располагались вдоль двух перпендикулярных друг другу направлений, причем концентрация осцилляторов вдоль одного из направлений оказывалась больше. Подобная система ориентации осцилляторов может существовать и в мышечном волокне.

Наиболее общим случаем упорядоченного расположения осцилляторов в такой цилиндрически симметричной системе, какой является мышечное волокно, можно считать расположение вдоль прямолинейной образующей поверхности конуса, ось которого совпадает с осью симметрии системы. Различные виды ориентации (спиральная, линейная, вдоль волокна и др.) при этом могут быть охарактеризованы различными величинами углов при вершине конуса. Пусть имеются два таких угла δ_1 и δ_2 (считаем $\delta_1 < \delta_2$). При $\delta_1 = 0$ и $\delta_2 = 90^\circ$ будем иметь систему, подобную указанной выше: одни осцилляторы линейно ориентированы вдоль оси волокна, другие расположены в плоскости, перпендикулярной оси по радиусу от нее. При этом, поскольку некоторые из осцилляторов, расположенных перпендикулярно оси, составляют с направлением наблюдения угол, значительно отличающийся от 90° , при одинаковой концентрации осцилляторов обоих типов ($n_{01} = n_{02}$) получается нужная асимметрия а. х. Эта форма а. х. будет сохраняться и при многих других соотношениях углов δ_1 и δ_2 .

Как известно ⁽⁵⁾, осцилляторная модель молекулы триптофана в ближней у.-ф. области спектра состоит из двух осцилляторов L_a и L_b , между которыми имеется достаточно большой угол ($\Phi = 45-90^\circ$). Однако не существованием этих двух различных осцилляторов одной молекулы обеспечиваются два вида ориентации в мышечном волокне. Это следует хотя бы из сопоставления а. х., снятых при $\lambda_{\text{возб}} = 280$ мμ (когда нужно рассматривать совместное действие L_a и L_b) и при $\lambda_{\text{возб}} = 303$ мμ (когда L_b можно исключить из рассмотрения) (рис. 2). При переходе от $\lambda_{\text{возб}} = 280$ мμ к $\lambda_{\text{возб}} = 303$ мμ а. х. не только не сглаживается, но становится

более характерной: максимумы возрастают (и сближаются), минимум располагается еще ниже. Следовательно, можно предполагать два разных вида ориентации для осцилляторов L_a , т. е. существование различных видов ориентации молекул триптофана.

Механизм возникновения двух видов ориентации триптофановой молекулы в мышечном волокне может быть различным. В частности, это может быть связано с различным расположением молекул триптофана на какой-либо спирализованной структуре мышечного волокна, с наличием спиралей, имеющих различные характеристики, с существованием в мышечном волокне изогнутых под углом, близким к прямому, нитевидных макромолекул и т. п. Однако, какова бы ни была система ориентированных взаимодействующих осцилляторов, отрицательные значения P_{\min} для нее, как можно показать, будут всегда значительно меньше экспериментальных, если среда изотропна. Это свидетельствует о том, что при расчете необходимо учитывать эффект двойного лучепреломления (д.л.п.) в мышечном волокне лучей возбуждающего света и света флуоресценции; величина д.л.п., наряду с соотношением углов γ_1 и γ_2 ($\gamma = 90 - \delta$) очень сильно влияет на значение P_{\min} .

Окончательно а. х. рассчитывались нами для мышечного волокна как для трехкомпонентной системы излучающих молекул (неориентированные молекулы + ориентированные под углом γ_1 + ориентированные под углом γ_2) в анизотропной среде. Для полного решения этой задачи, т. е. для однозначного определения всех параметров такой системы, пока недостаточно экспериментальных данных; в частности, нет данных о величине д.л.п. для каждого отдельного волокна. Однако для нас существенно в данный момент, что, введя представление о существовании двух различных ориентаций молекул триптофана в мышечном волокне, можно найти решение, соответствующее экспериментальным данным. Как пример такого решения, на рис. 1 дана а. х. (кривая 4), рассчитанная при следующих параметрах: $\gamma_1 = 70^\circ$, $\gamma_2 = 0^\circ$, $n_{01} = n_{02}$; $(n_{01} + n_{02}) / n_n = 0,25$; $P_{\text{осц}1}^0 = P_{\text{осц}2}^0 = 0,7$; $P_{\text{осц}}^H = 0,35$; $\cos \theta_b \cdot \cos \theta_\phi = -0,5$. Здесь $P_{\text{осц}1}^0$, $P_{\text{осц}}^H$ и $P_{\text{осц}}^H$ — степень поляризации флуоресценции отдельных молекул, соответственно ориентированных под углами γ_1 и γ_2 и неориентированных, θ_b и θ_ϕ — углы, характеризующие сдвиги по фазе между обыкновенным и необыкновенным лучами, возникающие при прохождении через мышечное волокно соответственно возбуждающих лучей и света флуоресценции. Характеристики системы в этом случае: $P_b = 0,3$; $P_{90} = 0,23$, $P_n / P_{90} = 0,22$, $P_{\min} = -0,08$, $\phi_{\min} = 49^\circ$, т. е. хорошо удовлетворяют экспериментальным данным.

Изучение параметров поляризованной у.-ф. флуоресценции мышечных волокон еще раз выявило преимущество предложенного Е. М. Брумбергом (⁷) метода у.-ф. флуоресцентной микроскопии перед методами, использующими флуоресценцию связанных с изучаемыми объектами красителей. Метод у.-ф. флуоресцентной микроскопии, основанный на использовании собственной флуоресценции белков клетки, позволяет исследовать более широкий круг объектов. Кроме того, от метода можно ожидать большей чувствительности, поскольку исследуются минимально поврежденные объекты и доля ориентированных молекул значительна.

Институт цитологии
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
8 V 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Б. Каулин, Цитология, 10, № 1, 123 (1968). ² А. Б. Каулин, Цитология, 10, № 4, 431 (1968). ³ И. Я. Барский, Ю. М. Розанов, Л. А. Шифферс, Цитология, 9, № 8, 1026 (1967). ⁴ И. Я. Барский, Ю. М. Розанов и др., Изв. АН СССР, сер. физ., 32, № 9, 1546 (1968). ⁵ С. В. Конев, Электронно-возбужденное состояние биополимеров, Минск, 1965. ⁶ П. П. Феофилов, Поляризованная люминесценция атомов, молекул и кристаллов, М., 1959. ⁷ Е. М. Брумберг, Журн. общ. биол., 17, 401 (1956).