

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

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПОЛЯРИЗАЦИОННОЙ
УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЙ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГИГАНТСКИХ МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКОН
BALANUS ROSTRATUS НОСК**

(Представлено академиком В. Н. Черниговским 16 VIII 1971)

Метод поляризационной ультрафиолетовой флуоресцентной микроскопии был применен для изучения особенностей микроструктуры и конформационных изменений триптофансодержащих белков поперечнополосатых мышечных волокон (¹⁻⁴). С помощью этого метода установлено два преимущественных направления в ориентации триптофановых остатков белков мышечного волокна (^{3, 4}) и отмечено изменение в их ориентации при растяжении и сокращении мышечного волокна (⁵).

Целью настоящей работы явилось изучение с помощью метода поляризационной у.-ф. флуоресцентной микроскопии микроструктурных особенностей белков различных участков саркомера при различных состояниях мышечного волокна.

Объектом исследования были гигантские мышечные волокна *Balanus rostratus* Носк. Значительные размеры саркомеров этих волокон (8–10 μ) позволили изучить азимутальные характеристики (а.х.) ультрафиолетовой флуоресценции как целых саркомеров, так и отдельных его участков, соответствующих анизотропному (А) и изотропному (I) дискам. Диаметр фотометрируемого поля в первом случае был 10–15 μ , во втором — 1–2 μ .

Азимутальные характеристики у.-ф. флуоресценции саркомера, так же как а.х. анизотропного и изотропного дисков, имеют период 180° (рис. 1) с двумя максимумами при $\varphi = 0^\circ$ и $\varphi = 90^\circ$ и минимумом между ними (φ — угол между направлением колебаний электрического вектора возбуждающего света и осью объекта). У саркомера и А-диска степень поляризации у.-ф. флуоресценции (P) при $\varphi = 0^\circ$ (P_0) больше, чем при $\varphi = 90^\circ$ (P_{90}). У I-диска, наоборот, P_{90} больше, чем P_0 . Минимальное значение P отмечается у саркомера при $\varphi = 50^\circ$, у А-диска при $\varphi = 70 \div 80^\circ$ и у I-диска при $\varphi = 10 \div 20^\circ$.

Асимметрия а.х. дисков свидетельствует об анизотропии в расположении триптофановых остатков сократительных белков. Так как флуоресценция возбуждалась лучами с $\lambda 300 \pm 2$ мμ (а в этих условиях поглощает и высвечивает один осциллятор молекулы триптофана, ориентированный вдоль короткой оси молекулы), то следует предположить, что в А-дисках молекулы триптофана направлены своей короткой осью вдоль или почти вдоль, а в I-дисках почти перпендикулярно к оси мышечного волокна.

Особо следует отметить высокую степень поляризации А-диска. Используя уравнение, выведенное ранее (²), и экспериментальные данные, можно оценить относительное количество ориентированных и неориентированных молекул триптофана в дисках. Расчеты показывают, что если ориентированные молекулы триптофана в А-диске направлены своей короткой осью под углом 10° к оси миофибриллы и $P_{\text{осц}}^0 = 0,7$, $q_1 = 0,5$, то ориентированных молекул триптофана будет не менее 60–70% ($P_{\text{осц}}^0$ — степень поляризации у.-ф. флуоресценции ориентированных осциллято-

ров; q_1 — отношение степени поляризации у.-ф. флуоресценции неориентированных и ориентированных осцилляторов). Расчеты показывают также наличие значительной анизотропии и в I -диске. При ориентации молекул триптофана в этом участке саркомера короткой осью под углом 70° к оси миофибриллы ориентированных молекул триптофана в I -диске будет 30—40%. Поскольку в A -диске, помимо толстых, присутствуют и тонкие протофибриллы, степень поляризации толстых протофибрилл при $\varphi = 0^\circ$ превышает, по-видимому, экспериментальные данные, полученные для A -диска, и составляет величину 70—80%. Такая значительная степень поляризации наблюдается только у некоторых кристаллов.

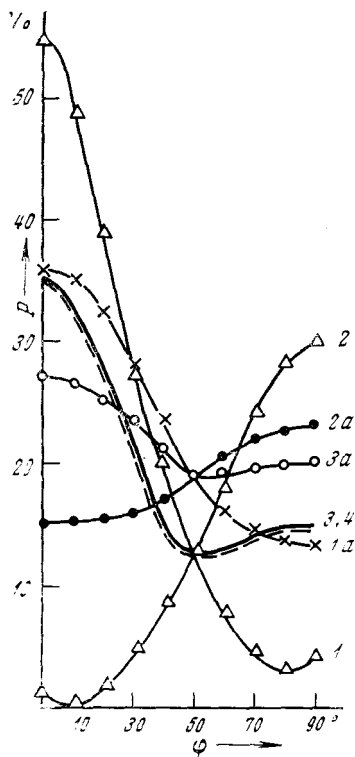


Рис. 1. Азимутальные характеристики поляризованной у.-ф. флуоресценции миофибриллы *Balanus rostratus*: анизотропного диска (1); изотропного диска (2); саркомера (3); расчетные (4); анизотропного диска после сокращения мышечного волокна на 20—30% от первоначальной длины (1а); то же изотропного диска (2а); то же саркомера (3а)

Зная величину степени поляризации и интенсивность флуоресценции каждого диска при азимутальных углах от 0 до 90° , можно вычислить а.х. саркомера. Теоретическая а.х. полностью совпадает с а.х., полученной с того же участка миофибриллы при диаметре фотометрируемого поля, равном длине саркомера (рис. 1).

Азимутальные характеристики у.-ф. флуоресценции саркомера и дисков меняются при сокращении мышечного волокна. У саркомера и A -диска P_0 уменьшается, P_{90} и P_{45} возрастают (рис. 1). У I -диска, наоборот, P_0 уменьшается, а P_0 увеличивается. Эти изменения отражают уменьшение анизотропии в расположении триптофановых остатков в A - и I -дисках при сокращении мышечного волокна, что, вероятно, является следствием конформационных изменений белков как A -, так и I -дисков.

Чтобы связать изменения в значениях степени поляризации у.-ф. флуоресценции белков мышечного волокна с определенными морфологическими изменениями в саркомере, был применен фотографический метод изучения поляризованной у.-ф. флуоресценции. С этой целью каждый изучаемый участок мышечного волокна фотографировался четыре раза. Две фотографии получались с волокна, расположенного параллельно электрическому вектору электромагнитных колебаний возбуждающего света, причем анализатор устанавливался в одном случае параллельно, а в другом

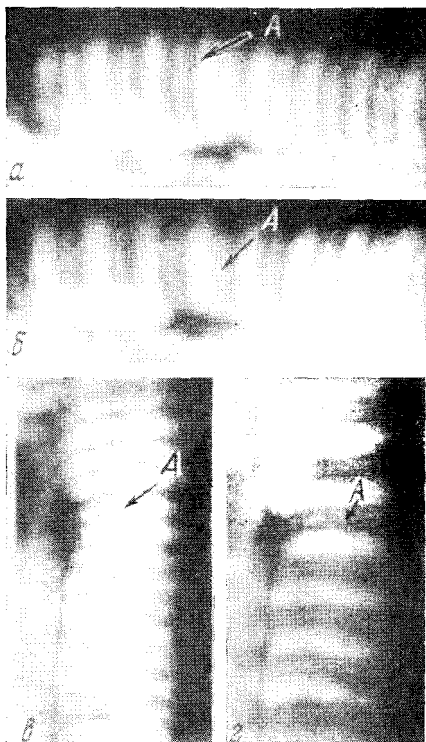


Рис. 2

Рис. 2. Поляризованная у.-ф. флуоресценция глицеринизированных мышечных волокон *Balanus rostratus*. Мышечные волокна расположены: а, б — параллельно, в, г — перпендикулярно электрическому вектору электромагнитных колебаний возбуждающего света. Положение анализатора: а, г — параллельно, б, в — перпендикулярно поляризатору. А — анизотропный диск. $\lambda_{\text{возб}} = 250-280$ м μ , $\lambda_{\text{регистр}} = 320-380$ м μ . Об. $50 \times 0,80$ (водн. имм.), ок. $3 \times$

Рис. 3. Поляризованная у.-ф. флуоресценция глицеринизированных мышечных волокон, сократившихся под влиянием АТФ. Обозначения те же, что и на рис. 2

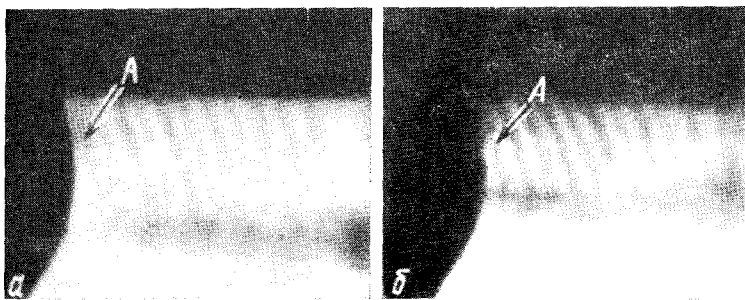


Рис. 3

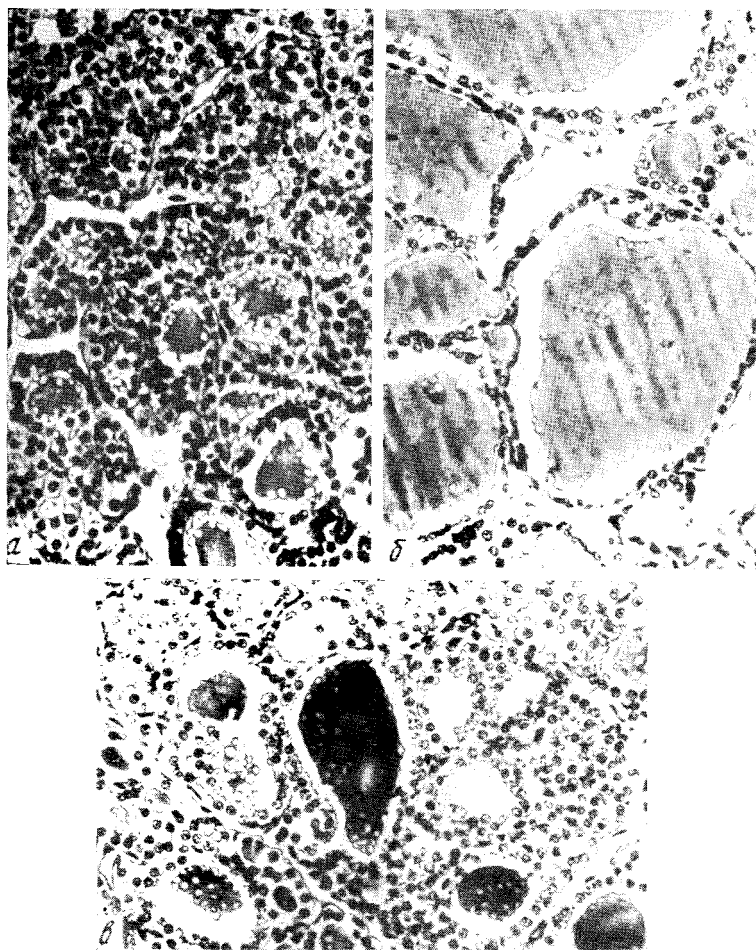


Рис. 1. Щитовидная железа intactного животного (а), через 1 год 9 мес. после удаления двенадцатиперстной кишки (б) и через 1 год после изоляции двенадцатиперстной кишки (в). Гематоксилин — эозин, Ок. 10, об. 40×

перпендикулярно поляризатору (положения *a* и *б*). Следующая пара фотографий того же участка мышечного волокна делалась при повороте его на 90° , т. е. при установке волокна перпендикулярно электрическому вектору возбуждающего света при тех же двух положениях анализатора (положения *в* и *г*). Положение поляризатора при этом не менялось. Сравнением интенсивности флуоресценции *A*- и *I*-дисков при двух положениях анализатора оценивалась степень поляризации у.-ф. флуоресценции каждого участка саркомера при положении мышечного волокна параллельно и перпендикулярно электрическому вектору возбуждающего света.

На фотографиях живых мышечных волокон в положении *a* в саркомере отчетливо выявляются узкие флуоресцирующие полосы. Несколько более широкие и яркие полосы соответствуют *A*-дискам; более узкие и менее ярко флуоресцирующие — центральной части *I*-диска. При повороте анализатора на 90° (положение *б*) интенсивность флуоресценции *A*-дисков резко снижается; ширина и интенсивность флуоресценции *I*-дисков увеличивается. Наблюдаемые изменения в интенсивности флуоресценции дисков при повороте анализатора свидетельствуют об анизотропии в расположении триптофановых остатков белков в области *A*- и *I*-дисков и о том, что в *A*-диске триптофановые остатки ориентированы своей короткой осью преимущественно вдоль, а в *I*-диске — преимущественно перпендикулярно оси мышечного волокна.

В положениях *в* и *г* *I*-диски флуоресцируют ярче *A*-дисков. Этот факт подтверждает вышеупомянутые представления об особенностях ориентации триптофановых остатков в *A*- и *I*-дисках и свидетельствует о большей анизотропии *A*-дисков.

В глицеринизированных мышечных волокнах в положении *a* ярко флуоресцируют *A*-диски; *I*-диски, за исключением области *Z*-линии, флуоресцируют очень слабо (рис. 2*a*). В положении *б* флуоресценция *A*-диска практически исчезает; *I*-диск, напротив, начинает ярко флуоресцировать (рис. 2*б*). В положении *в* в мышечном волокне наблюдаются узкие полосы, почти равные по ширине и интенсивности флуоресценции (рис. 2*в*). В положении *г* флуоресценция большей части *A*-диска исчезает, заметная флуоресценция сохраняется только в области, соответствующей *M*-линии. *I*-диски при этом положении волокна и анализатора имеют особенно яркую флуоресценцию (рис. 2*г*).

Таким образом, в глицеринизированных мышечных волокнах при повороте анализатора на 90° изменение интенсивности флуоресценции дисков наблюдается как в положении мышечного волокна параллельно, так и перпендикулярно электрическому вектору возбуждающего света. Это свидетельствует о большей анизотропии в расположении триптофановых остатков сократительных белков в различных участках саркомера в глицеринизированных мышечных волокнах по сравнению с живыми, что связано, по-видимому, с удалением при глицеринизации водорастворимых белков, в результате чего уменьшается относительное количество неориентированных остатков.

При сокращении глицеринизированного мышечного волокна под влиянием АТФ ($1 \cdot 10^{-3}$ *M*) интенсивность флуоресценции как *A*-, так и *I*-дисков уменьшается. Все фотографии, сделанные при различных положениях волокна и анализатора, практически идентичны (рис. 3). Это говорит о существенном уменьшении степени ориентации триптофановых остатков белков мышечного волокна при сокращении. Описанные изменения происходят не одновременно по всему *A*-диску. Интенсивность флуоресценции средней части *A*-диска в начале сокращения продолжает несколько меняться при повороте анализатора, что можно объяснить сохранением некоторой ориентации триптофановых остатков в этой области *A*-диска. Таким образом, при сокращении мышечного волокна дезориентация триптофановых остатков в молекулах белка периферических частей *A*-диска наступает раньше, чем в центральной его части. Поскольку пери-

ферические участки *A*-диска при этом флуоресцируют интенсивнее средней его части, *A*-диски на этой стадии сокращения мышечного волокна становятся как бы двойными.

Таким образом, проведенное исследование обнаружило наличие очень высокой анизотропии в расположении триптофановых остатков в анизотропном и значительную анизотропию изотропного диска.

Уменьшение анизотропии в расположении триптофановых остатков при сокращении мышечного волокна заставляет предполагать конформационные изменения белков как в *A*-, так и в *I*-дисках; при этом наблюдается переход от более упорядоченной конформации к менее упорядоченной.

Институт цитологии
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
6 VIII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. Я. Барский, Ю. М. Розанов и др., Изв. АН СССР, сер. биол., **32**, № 9, 1546 (1968). ² J. E. Agonson, M. F. Morales, J. Biochemistry, **8**, 11, 4517 (1969). ³ Ю. М. Розанов, И. Я. Барский и др., ДАН, **197**, № 1, 242 (1971). ⁴ Ю. М. Розанов, Н. А. Черногрядская и др., Цитология, **18**, № 2, 190 (1971). ⁵ Ю. С. Боровиков, М. С. Шудель и др., ДАН, **196**, № 4, 962 (1971).