

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И СПЕКТРЫ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ АО В МИОБЛАСТАХ И ОДИНОЧНЫХ МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКНАХ

© Т. Н. Беляева, С. А. Кроленко, Е. А. Леонтьева, Т. П. Моженок, А. В. Салова, М. Д. Фаддеева

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

В режиме спектрального сканирования конфокального микроскопа Leica TCS SL изучены спектры флуоресценции акридинового оранжевого (АО) в ядрах и цитоплазме миобластов L6J1 и одиночных мышечных волокон лягушки. Для сравнения также получены спектры флуоресценции АО в солевых растворах в зависимости от концентрации свободного АО и АО в комплексе с ДНК. При распределении АО в миобластах ядра флуоресцируют в зеленой области спектра с максимумом ~530 нм. Наиболее интенсивная флуоресценция наблюдается в ядрышках. Хроматин ядра флуоресцирует неравномерно. Подобное свечение ядрышек и ядер наблюдается и в одиночных мышечных волокнах лягушки. Для цитоплазмы миобластов характерна однородная слабая зеленая флуоресценция. Что касается саркоплазмы мышечных волокон, то в ней наблюдается зеленая флуоресценция АО в А-дисках. В цитоплазме миобластов и мышечных волокон при окраске АО наблюдаются флуоресцирующие в красной, желтой и зеленой областях спектра гранулы, которые являются кислыми органеллами. Сравнение спектров АО, полученных на живых клетках, со спектрами флуоресценции различных концентраций АО и АО в комплексах с ДНК в буферных растворах позволяет оценить накопление АО в кислых органеллах, что представляет интерес при исследовании функций этих органелл в процессах внутриклеточного транспорта, адаптации, апоптоза и ряда патологических состояний.

Ключевые слова: миобласты, скелетные мышечные волокна, сканирующая конфокальная микроскопия, акридиновый оранжевый, спектры флуоресценции, кислые органеллы.

Принятые сокращения: АО — акридиновый оранжевый.

Флуоресцентный витальный краситель акридиновый оранжевый (АО) интенсивно используется в клеточной биологии для исследования количества и структур нуклеиновых кислот *in vitro* и *in vivo*, а также для изучения жизнеспособности клеток, апоптоза, злокачественного роста и других клеточных процессов. Такое широкое применение оказалось возможным благодаря различным флуоресцентным свойствам молекул АО в виде мономеров, агрегатов и в комплексах с ДНК и РНК. Так, квантовый выход флуоресценции мономеров АО, сорбированных двухспиральными структурами нуклеиновых кислот, значительно увеличивается благодаря интеркаляции мономеров АО в такие структуры: они ярко флуоресцируют в зеленой области спектра. Кроме того, из-за межмолекулярного, главным образом гидрофобного, взаимодействия мономеров АО возникает явление метахромазии, т. е. длинноволновый сдвиг спектров флуоресценции агрегатов АО по сравнению с таковыми для мономеров АО. Метахромазию АО можно наблюдать при росте концентрации АО, при сорбции АО на близко расположенных местах сорбции, когда возможны межмолекулярные взаимодействия мономеров АО, и в ряде подобных случаев. Примером является флуоресценция АО в красной области спектра при сорбции его на фосфатных группах однопольных нуклеиновых кислот (Zelenin, 1999).

Явление метахромазии АО наблюдается также при взаимодействии его молекул в замкнутых мембранных

пузырьках с кислым содержимым. Так, было показано, что при окрашивании живых клеток АО наблюдаемые в цитоплазме гранулы, флуоресцирующие в красной области спектра, представляют собой лизосомы (Millot et al., 1997). Мономеры АО накапливаются в этих кислых гранулах благодаря градиенту протонов через мембрану и внутри гранул взаимодействуют друг с другом, о чем свидетельствует характерная метахромотическая красная флуоресценция.

Ранее нами была изучена локализация кислых мембранных структур, окрашенных АО, в мышечном волокне лягушки в норме и при патологии (Krolenko et al., 2006, 2007). Было обнаружено, что гранулы АО, соответствующие кислым органеллам в саркоплазме мышечного волокна, расположены дискретно как в перинуклеарной области, так и во всем объеме волокна вблизи Т-системы. Такая локализация подтверждает современные представления о клеточных органеллах, которые участвуют в транспортных мембранных процессах. Работу проводили на конфокальном микроскопе Leica TCS SL со спектральным сканированием без анализа спектров флуоресценции АО.

Целью настоящей работы было изучение спектров флуоресценции АО в ядрах, цитоплазме и в цитоплазматических гранулах в культуре миобластов L6J1 и мышечном волокне лягушки для оценки концентрации и степени агрегации молекул АО.

Материал и методика

Миобласты крысы клеточной линии L6J1 (Российская коллекция клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург) культивировали в чашках Петри на покровных стеклах (22 × 22 мм) в среде DMEM, содержащей 20 мМ глутамин, 10 % сыворотки крови плодов коровы и 0.1 % гентамицина, в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С.

Опыты проводили также на одиночных волокнах или пучках волокон (2—3 волокна), изолированных из *m. illeofibularis* травяной лягушки *Rana temporaria* в зимний период. Подготовка волокон для наблюдения была описана ранее (Кроленко и др., 2003; Krolenko et al., 2006). Изолированное волокно с помощью нитей хирургического шелка, привязанных за оба сухожилия, помещали на предметное стекло в раствор Рингера. Использовали раствор Рингера для холоднокровных следующего состава (в мМ): NaCl — 111, KCl — 2.4, CaCl₂ — 1.8, NaHCO₃ — 2.4, pH 7.2—7.4. Раствор Рингера был ограничен слоем высоковакуумной смазки толщиной 1 мм (BDH/Merck, Lutterworth, Leics, Великобритания). Волокно и часть сухожилий были покрыты покровным стеклом. Образованная камера была менее 100 мкм толщиной. Для окраски мышечных волокон в буферный раствор Рингера добавляли АО (Merck, Германия) в концентрации 0.25 мкг/мл. Волокно окрашивали 45—60 мин.

При исследовании флуоресценции АО в миобластах раствор АО вносили в среду для культивирования клеток. Для окраски миобластов АО добавляли в чашки Петри в концентрации 0.25—2.00 мкг/мл, клетки инкубировали 45—60 мин в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С. После инкубации с АО в концентрации 2 мкг/мл клетки отмывали от АО. Для исследования клеток с помощью конфокального микроскопа покровное стекло с миобластами помещали на предметное стекло.

В модельных опытах по изучению спектральных свойств АО в растворах использовали салин-цитратный буфер (SSC) и раствор Рингера. Раствор АО в интервале концентраций 0.5—18.0 мМ в Рингере помещали в камеру, образованную покровным и предметным стеклами, толщина камеры составляла около 75 мкм. Аналогично изучали спектральные свойства комплекса АО с ДНК из спермы лосося (Calbiochem, США) в SSC-буфере при $[P]/[AO] = 10$, где $[P]$ — молярная концентрация фосфора в ДНК, $[AO]$ — молярная концентрация АО. Концентрацию ДНК определяли методом спектрофотометрии, используя оптическую плотность раствора (D_{260} и D_{280}).

Исследования проводили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SL. Флуоресценцию АО возбуждали аргоновым лазером (488 нм), регистрировали в двух спектральных областях — зеленой (500—560 нм) и красной (590—660 нм). Кроме того, флуоресценцию АО исследовали с помощью режима спектрального сканирования (Mode/хул) в интервале 500—660 нм с шагом 10 нм. В работе использовали объектив HCX PLAPO CS 63×/1.32. Сигнал собирали со слоя толщиной 0.7 мкм.

Для анализа спектров флуоресценции, полученных в разных опытах, использовали приведенные спектры, где максимальная интенсивность была принята за 100 %.

Анализ изображений осуществляли с помощью стандартных программ микроскопа и программы Image J.

Результаты и обсуждение

На рис. 1, а представлены миобласты крысы клеточной линии L6J1, окрашенные АО (2 мкг/мл, 45 мин) и полученные с помощью конфокального микроскопа совмещением изображений, наблюдаемых в зеленой и красной областях спектра. При этой концентрации АО окрашиваются как ядро, так и цитоплазма. Видны ярко флуоресцирующие зеленым цветом ядрышки в ядрах клеток. Зеленая флуоресценция ядрышек в данных условиях показывает, что в ядерных мембранах живых клеток L6J1 не существует барьеров для проникновения молекул АО. По-видимому, интенсивная зеленая флуоресценция ядрышек клеток L6J1 отражает интеркаляцию (внедрение) молекул АО главным образом в двухспиральные участки рибосомной РНК. Как известно, интеркаляция зависит только от двухспиральной структуры нуклеиновых кислот, а не от наличия в их составе рибозы или дезоксирибозы (Фаддеева, Беляева, 1991). Ранее было показано, что после микроинъекции РНКазы А внутрь ядер нормальных фибробластов кожи человека зеленая флуоресценция ядрышек в ядрах исчезает (Delic et al., 1991). Как видно на рис. 1, а, некоторые участки хроматина в ядре флуоресцируют также в зеленой области спектра. Они отражают те части двухспиральной нити ДНК в хроматине, которые доступны мономерам АО. Что касается интеркаляции молекул АО в двухспиральные участки ДНК в нативном хроматине ядер, то здесь, по-видимому, встречаются препятствия к интеркаляции АО в ДНК именно благодаря нуклеосомной структуре хроматина, в которой двухспиральная ДНК взаимодействует с белками. При таком взаимодействии число ячеек в двойной спирали ДНК, доступных к интеркаляции в них мономеров АО, уменьшается (Gabbay, Wilson, 1978). На рис. 1, в представлены миобласты крысы клеточной линии L6J1, окрашенные АО в меньшей концентрации (0.25 мкг/мл, 45 мин).

На рис. 2, а представлены спектры флуоресценции АО миобластов в местах, выделенных цифрами 1—3 на рис. 1, а. Спектры флуоресценции АО от ядрышка (1), ядерного хроматина (2) и цитоплазмы (3) находятся в зеленой области флуоресценции АО. На рис. 2, б представлены соответствующие приведенные спектры, в которых максимальная интенсивность флуоресценции каждого спектра принята за 100 %. Это позволяет сравнивать характер спектров флуоресценции АО, полученных в разных опытах. Было проведено сравнение этих данных, полученных на живых клетках, с данными модельных опытов по флуоресценции АО в растворах.

На рис. 3 представлены спектры флуоресценции АО в комплексе с нативной ДНК из спермы лосося в растворе, содержащем буфер SSC в концентрации 0.1 М, pH 7.2. Концентрация ДНК, определенная по фосфору, составляла 14.5 мМ, концентрация АО — 1.45 мМ, отношение $[P]/[AO] = 10$. При взаимодействии молекул АО с двухспиральной ДНК (и РНК) в полимере сначала заполняются интеркаляционные ячейки двуспиралей, причем заполнение этих ячеек идет максимум до величины $[P]/[AO] \approx 3$ из-за дальнейших стерических трудностей, связанных с необходимостью локального раскручивания двуспиралей в местах интеркаляции. Затем происходит сорбция катионов АО до образования электронейтрального комплекса с отношением $[P]/[AO] = 1$ на анионных фосфатных группах ДНК за счет электростатических сил. При таком «внешнем» связывании АО на ДНК можно на-

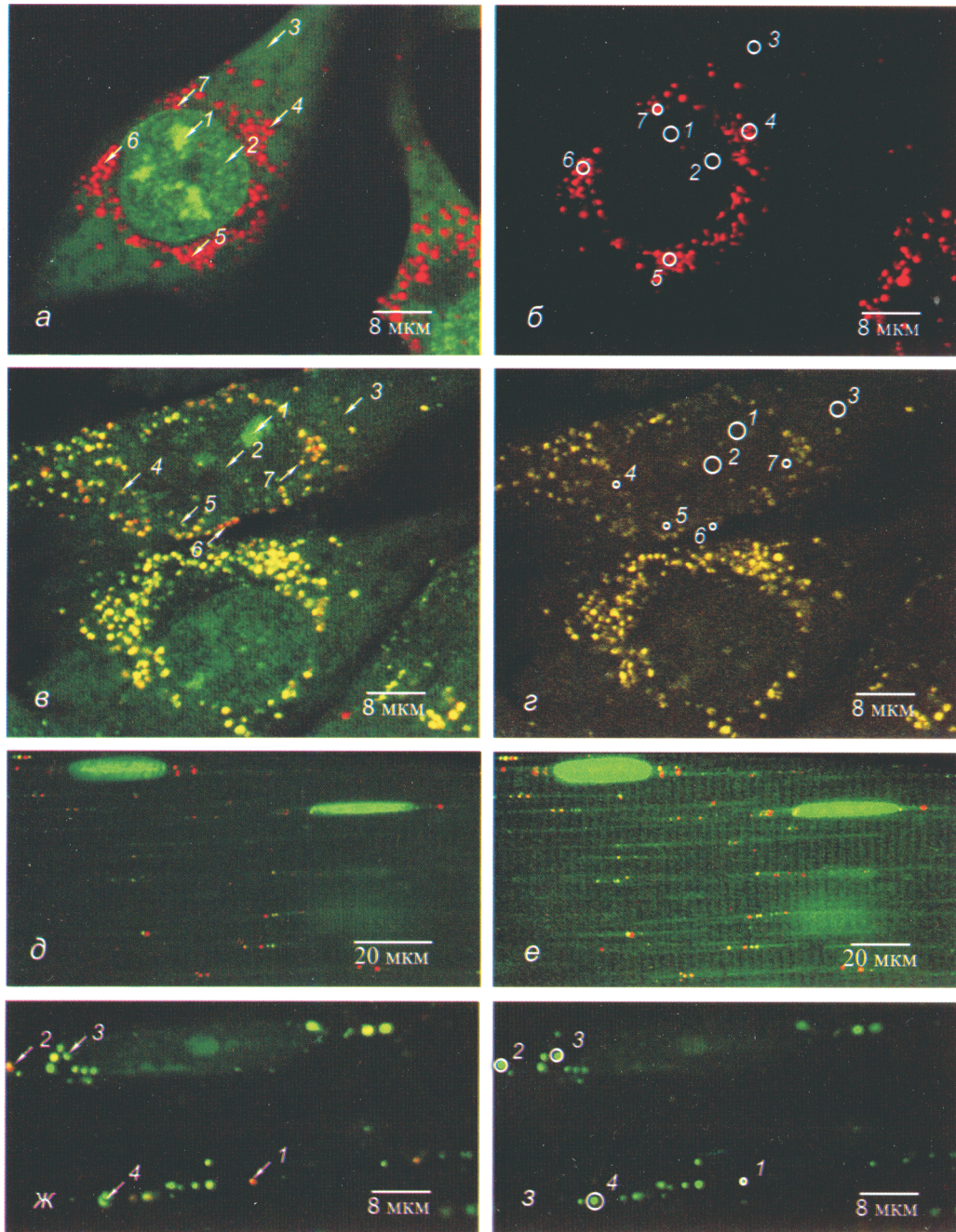


Рис. 1. Миоблесты L6J1 и интактные мышечные волокна лягушки, окрашенные акридиновым оранжевым (АО). Конфокальная флуоресцентная микроскопия.

Лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Leica TCS SL. Флуоресценцию АО возбуждали аргоновым лазером (488 нм), регистрировали в двух спектральных областях: зеленой (500—560 нм) и красной (590—660 нм). Кроме того, флуоресценцию АО исследовали с помощью режима спектрального сканирования (Mode-хул) в интервале 500—660 нм с шагом 10 нм. Объектив HCX PLAPO CS 63 × 1.32. Сигнал собирали со слоя толщиной 0.7 мкм. *a, в, д—ж* — совмещение изображений, наблюдаемых в зеленой и красной областях спектра; *б, г, з* — изображения, полученные с помощью спектрального сканирования (Mode-хул) в интервале 500—660 нм с шагом 10 нм. Из серии изображений выбраны те, которые получены при величинах длин флуоресценции АО, выявляющих наибольшее количество внутриклеточных гранул. *а* — миоблесты L6J1 (концентрация АО 2 мкг/мл, время окрашивания 45 мин); *б* — те же миоблесты при длине волны флуоресценции АО 626 нм; *в* — миоблесты L6J1 при окрашивании АО в концентрации 0.25 мкг/мл, 1 ч; *г* — те же миоблесты при длине волны 556 нм; *д* — мышечное волокно при окрашивании 0.25 мкг/мл АО, 1 ч, яркость уменьшена для выявления структуры ядра; *е* — то же волокно, яркость увеличена для выявления структуры саркоплазмы; *ж* — гранулы АО в интактном мышечном волокне (концентрация АО 0.25 мкг/мл, время окрашивания 45 мин); *з* — то же волокно при длине волны 526 нм. *1* — ядрышко, *2* — хроматин, *3* — цитоплазма, *4—7* — цитоплазматические гранулы. *Кружками* выделены площади областей клеток, в которых регистрировалась флуоресценция АО.

блюдать межмолекулярное взаимодействие связанных молекул АО, что проявляется в метакромазии.

На рис. 3 представлен спектр флуоресценции только от интеркаляционного связывания АО с ДНК, так как в данном опыте отношение $[P]/[АО] = 10$, т. е. заполнены

только интеркаляционные ячейки. В этих ячейках молекулы АО отделены друг от друга парами азотистых оснований двуспирали и взаимодействие между ними невозможно. Поэтому полученный спектр флуоресценции АО (*кривая 1* на рис. 3) отражает спектр флуоресценции

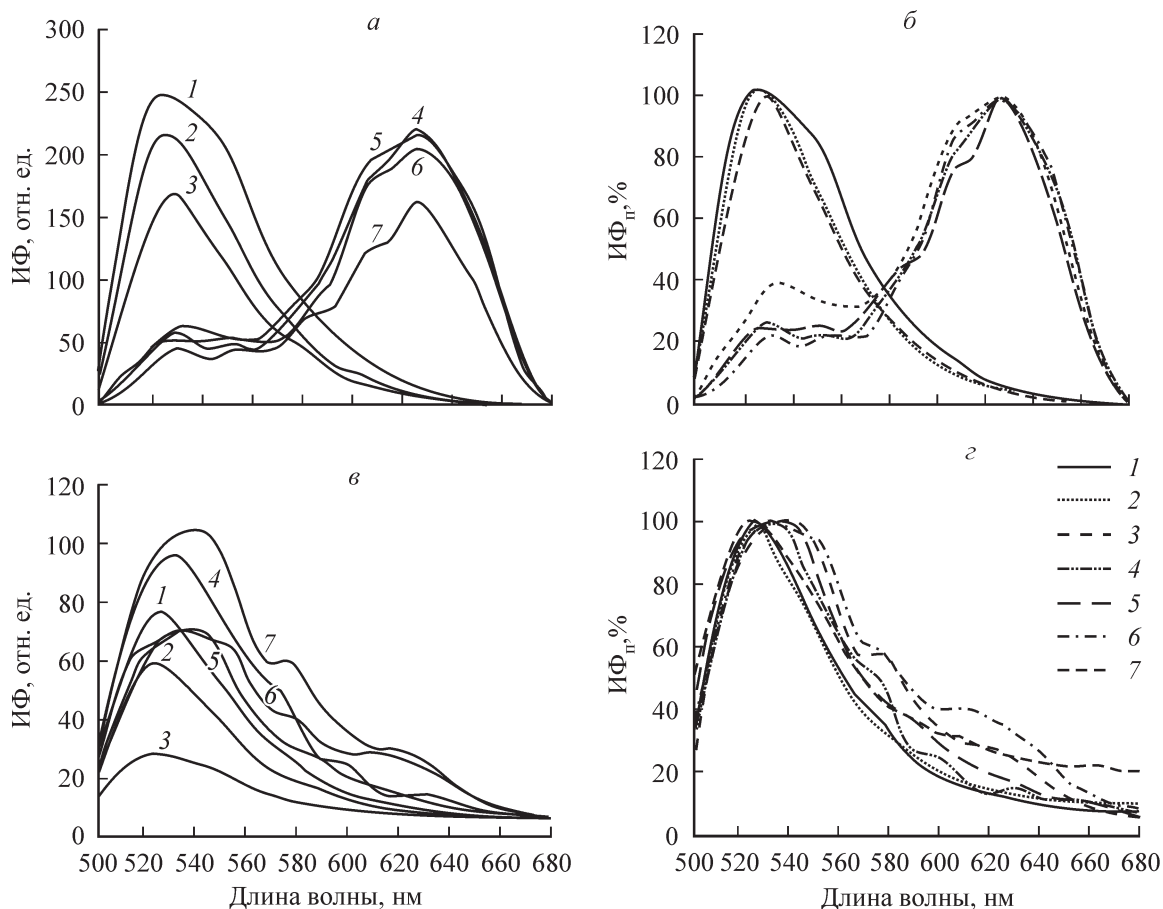


Рис. 2. Спектры флуоресценции АО областей клеток L6J1.

Спектры АО флуоресценции соответствуют тем областям клеток, которые обозначены на рис. 1, а, в, а, в — спектры флуоресценции АО; б, г — приведенные спектры флуоресценции АО, для которых максимальная интенсивность флуоресценции АО принята за 100 %. Концентрация АО и время окрашивания 2 мкг/мл и 45 мин (а, б) или 0.25 мкг/мл и 1 ч (в, г). ИФ — интенсивность флуоресценции АО.

только интеркалированных в ДНК мономеров АО («отрицательная метахромазия»). Эти мономеры АО имеют спектр флуоресценции в зеленой области спектра с максимумом около 530 нм, причем квантовый выход зеленой флуоресценции в связанном состоянии растет по сравнению со свободными молекулами АО в растворе (кривая 2 на рис. 3). Подобный спектр флуоресценции в зеленой области с максимумом около 530 нм получен нами от точек на рис. 1, а в ядре живых миобластов. По-видимому, это свечение, подобное свечению в модельных растворах, отражает интеркаляционное связывание мономеров АО с ячейками в двухспиральных ДНК или РНК.

Кривая 3 на рис. 2, а характеризует спектр флуоресценции АО в цитоплазме миобласта. Эта флуоресценция указывает на присутствие молекул АО в цитоплазме в виде мономеров.

На рис. 1, д, ж представлено интактное одиночное мышечное волокно, окрашенное в течение 1 ч АО в концентрации 0.25 мкг/мл, полученное совмещением изображений, наблюдаемых в зеленой и красной областях спектра с помощью конфокального микроскопа. Хроматин в ядрах виден в зеленой области спектра, причем ядра флуоресцируют неравномерно. Очевидно, это флуоресценция мономеров АО при интеркаляции в двухспиральные участки ДНК, а также свечение АО в двухспиральных участках РНК в ядрышках. На рис. 1, е приводится это же изображение при увеличении чувствительности каналов. Вид-

но слабое зеленое свечение саркоплазмы, на фоне которого можно различить более интенсивно флуоресцирующие в зеленой области спектра А-диски, по-видимому, за счет

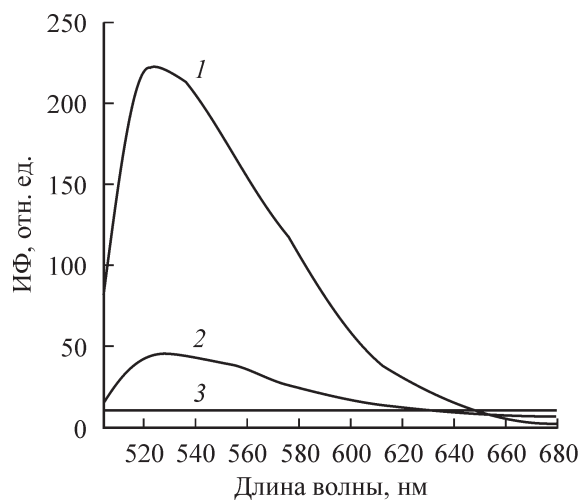


Рис. 3. Спектры флуоресценции АО и АО в комплексе с нативной ДНК.

1 — АО в комплексе с нативной ДНК, 2 — АО в буфере SSC 0.1 М, 3 — контроль — спектр буфера SSC 0.1 М. Концентрация [АО] — 1.45 мМ, концентрация [ДНК] — 14.5 мМ (по фосфору), отношение [р]/[АО] = 10.

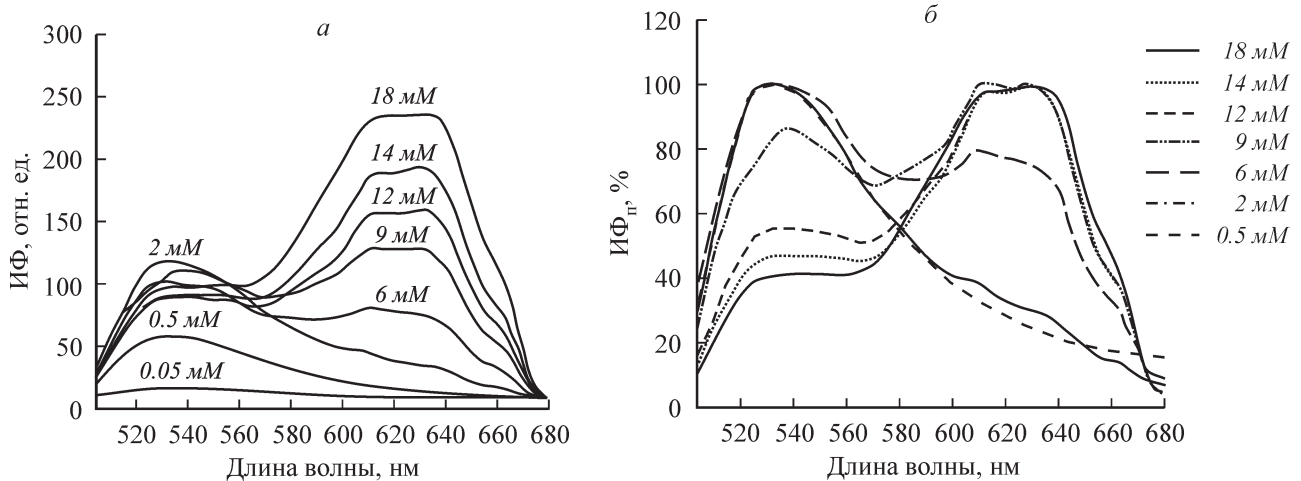


Рис. 4. Спектры флуоресценции АО в растворе Рингера.

а — при различных концентрациях красителя; б — приведенные спектры флуоресценции АО, для которых максимальная интенсивность флуоресценции АО принята за 100 %.

присутствия в них миозина. Так, ранее было показано, что миозин связывает АО в мономерной форме (Каламкарова и др., 1965; Гамалей, Каулин, 1988).

В конфокальном микроскопе наблюдаются три основных вида цитоплазматических гранул АО в живых миоблестах в культуре (рис. 1, а—з) и нативных мышечных волокнах лягушки (рис. 1, е): зеленые, содержащие момеры АО, красные, содержащие агрегаты молекул АО, и желтые. Накопление АО в гранулах идет в большей степени, чем это можно объяснить, учитывая протонный градиент через мембраны этих пузырьков, поддерживаемый за счет работы мембранных Н⁺-АТФаз (Clerc, Varenholz, 1998). Это накопление связано с агрегацией молекул АО внутри пузырьков за счет межмолекулярного взаимодействия, которое усиливает аккумуляцию молекул АО в гранулах, движимую протонным градиентом (Palmgren, 1991).

Для изучения концентрационной агрегации молекул АО в клетках в качестве модели использовали концентрации АО в водно-солевых растворах, вызывающие явления метакромазии. На рис. 4 приведены спектры флуоресценции АО в растворе Рингера, полученные с помощью конфокального микроскопа, в зависимости от концентрации АО. Были проанализированы спектры флуоресценции растворов АО в диапазоне концентраций от 0.05 до 18.00 мМ (рис. 4). При концентрации АО 0.5 мМ наблюдается флуоресценция с максимумом в зеленой области спектра при 526 нм. При увеличении концентрации АО с началом процесса межмолекулярной агрегации происходит изменение спектра флуоресценции, что приводит к появлению пика в красной области спектра. На рис. 4 видно, что при концентрации АО 9 мМ и выше обнаруживается ярко выраженный пик в красной области спектра. Полученные с помощью спектрального сканирования микроскопа Leica TCS SL спектры флуоресценции АО в зависимости от концентрации АО в растворе (рис. 4) и спектры флуоресценции АО и АО в комплексе с ДНК (рис. 3) находятся в соответствии с имеющимися в литературе данными спектроскопии (Zelenin, 1999). Эти результаты характеризуют адекватность применения используемого нами метода регистрации флуоресценции АО.

При концентрации АО 2 мкг/мл в клетках миоблестов L6J1 наблюдали гранулы, ярко флуоресцирующие в красной области спектра (рис. 1, а). При спектральном скани-

ровании клеток гранулы обнаруживаются в красной области спектра (рис. 1, б: изображение гранул при длине волны 626 нм). Спектры флуоресценции АО в гранулах, обозначенных цифрами 4—7 на рис. 1, а, б, имеющие максимум в красной области при длине волны 626 нм, представлены на рис. 2, а, б, кривые 4—7, что свидетельствует о большом накоплении красителя в гранулах, когда он практически весь представлен в виде олигомеров.

При концентрации АО 0.25 мкг/мл в клетках L6J1 регистрируются гранулы с различными спектрами флуоресценции (рис. 1, в). Для их анализа также было проведено спектральное сканирование. На рис. 1, з приведено изображение миоблестов при длине волны 556 нм, когда рассматриваемые гранулы наиболее выражены. Исследование спектров флуоресценции показывает, что при накоплении АО в гранулах максимум спектра флуоресценции смещается в длинноволновую область спектра (рис. 2, в, з). На рисунке видно, что спектр флуоресценции выделенной области цитоплазмы (кривая 3) имеет максимум 524 нм, в то время как спектры флуоресценции гранул АО — 535 нм (кривые 4—7); более красные гранулы интенсивнее флуоресцируют в длинноволновой области спектра (кривые 6, 7). Спектры флуоресценции показывают, что свечение наблюдается за счет присутствия зеленой (524 нм) и красной (620—630 нм) флуоресценции. Однако кривые 6 и 7 на рис. 2 имеют выраженные области, соответствующие желтой флуоресценции (570—580 нм), что свидетельствует о разной агрегации молекул АО при накоплении в кислых органеллах. Это показывает, что представленные на рис. 1, в гранулы содержат разное количество красителя. Следует отметить, что существует соответствие между изображением гранул на рис. 1, а, в, ж и их спектрами на рис. 2 и 5.

На рис. 1, д—з видны гранулы АО в мышечном волокне. Как в случае миоблестов, так и в случае мышечного волокна при окраске АО в концентрации 0.25 мкг/мл наблюдается сходная флуоресценция гранул (рис. 1, в, д). Как отмечалось ранее, окраска мышечного волокна АО отличается от окраски одноядерных клеток; также имеются различия и в расположении гранул АО. Гранулы АО присутствуют у полюсов ядер, а также локализованы во всем объеме волокна между миофибриллами в виде коротких параллельных рядов, часто состоящих из 2—3 гра-

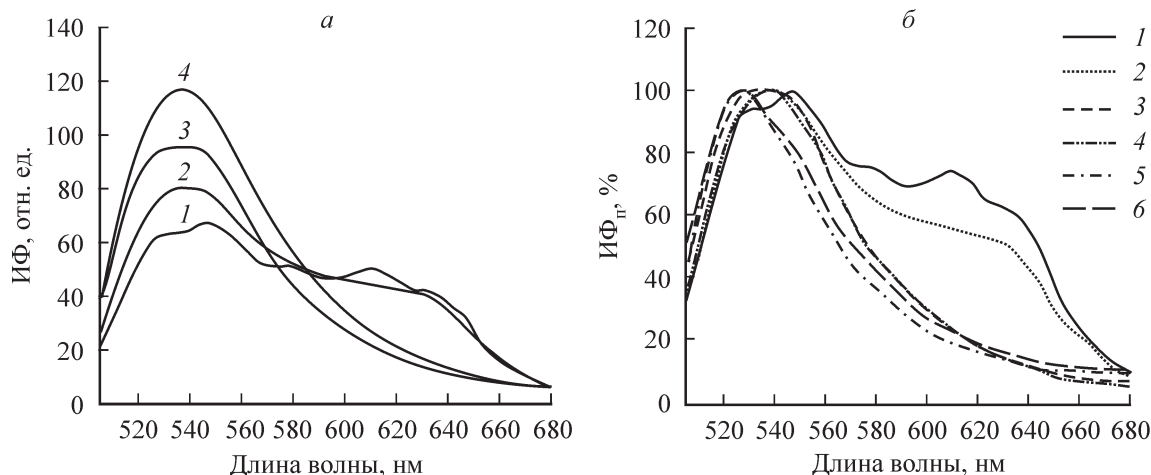


Рис. 5. Спектры флуоресценции АО областей мышечного волокна.

Номера спектров флуоресценции АО соответствуют цифрам у стрелок цитоплазматических гранул мышечного волокна (1—4), которые обозначены на рис. 1, ж. Кругами на рис. 1, з выделены площади областей волокна, в которых регистрировалась флуоресценция АО; б — приведенные спектры флуоресценции АО, для которых максимальная интенсивность флуоресценции АО принята за 100%. Приведенные спектры флуоресценции АО 5 (хроматин) и 6 (цитоплазма) регистрированы от областей другого волокна, изображение которых в данной работе не приводится.

нул, расположенных в соседних саркомерах (Krolenko et al., 2006). С помощью спектрального сканирования были исследованы спектры флуоресценции этих гранул в интервале 500—660 нм. На рис. 1, з представлены гранулы при длине волны флуоресценции АО 526 нм.

Спектры отдельных гранул представлены на рис. 5. Эти спектры сняты от гранул, обозначенных на рис. 1, ж, з. Гранулы 3 и 4, которым соответствуют кривые 3 и 4 на рис. 5, имеют максимум флуоресценции АО в зеленой области спектра, в то время как гранулы, обозначенные цифрами 1 и 2 на рис. 1, ж, з, обладают флуоресценцией как в зеленой, так и в красной областях спектра (кривые 1, 2 на рис. 5). Эти спектры характеризуют накопление АО как в мономерной, так и в агрегированных формах. Миобласты в культуре окрашиваются АО быстрее, чем нативное волокно лягушки, вероятно вследствие большей проницаемости для АО клеточных мембран и структур. При высокой концентрации АО (2 мкг/мл) и большом времени окрашивания (45 мин) цитоплазматические гранулы в миобластах флуоресцируют в красной области спектра (рис. 1, а). Это указывает на значительное накопление АО внутри гранул, что приводит к межмолекулярному взаимодействию молекул АО и их агрегации. Если сравнить спектры флуоресценции АО гранул (рис. 2, а) и спектры флуоресценции АО в физиологическом растворе (рис. 4), то можно предположить, что АО в красных кислых гранулах концентрируется приблизительно до 5—18 мМ при исходной концентрации АО 2 мкг/мл ($\sim 5 \cdot 10^{-6}$ М), т. е. примерно в 1—4 тыс. раз. Как известно, наиболее кислыми клеточными органеллами являются поздние эндосомы и лизосомы. Они накапливают краситель в наибольшем количестве.

При окраске миобластов АО в низкой концентрации (0.25 мкг/мл, 1 ч) накопление АО в кислых гранулах происходит в меньшей степени, чем при использовании более высокой концентрации АО (рис. 1, в, г; 2, в, з). На рисунках видно, что спектры флуоресценции АО в гранулах, помеченных цифрами на рис. 1, г, менее сдвинуты в красную область, т. е. имеет место более слабая агрегация молекул АО в этих гранулах, что свидетельствует о меньшей концентрации АО внутри них.

Одиночное мышечное волокно лягушки при такой же процедуре окрашивания образует в саркоплазме значительно меньше гранул АО, очевидно вследствие меньшего содержания кислых органелл, выявляемых с помощью АО в мышечном волокне (рис. 1, д—з). Малое количество лизосом в мышечном волокне было показано ранее (Kaisito et al., 1999).

Значения pH внутри кислых цитоплазматических органелл и его регуляция важны для их физиологических функций. Например, последние данные показали, что при возникновении у малигнизированных клеток фенотипа множественной лекарственной устойчивости наблюдается общий дефект в жидкофазном эндоцитозе, а именно недостаточное подкисление эндосом (Chauhan et al., 2003).

Примером может также являться тот факт, что одним из ранних событий во время клеточного апоптоза является потеря лизосомами мембранного протонного градиента. Содержимое лизосом при этом переходит в цитоплазму, которая подкисляется до величины pH 5.7 вместо 7.2 в норме. В лизосомах при этом значение pH увеличивается до 5.5 против 4.3 в норме (Nilsson et al., 2003, 2006).

В последнее время показана возможность изменения pH внутриклеточных органелл с помощью ряда химических агентов. Показано, что при инфицировании мышечных клеток полиома-вирусом вирионы попадают в ядро с помощью эндоцитоза. На определенном этапе монопиноцитозные пузырьки, несущие вирионы, сливаются с ранними эндосомами. Процесс слияния зависит от величины pH внутри эндосом. При нейтрализации pH с помощью бафиломицина А1 или NH_4Cl вирусная инфекция уменьшается или совсем прекращается (Liebl et al., 2006).

Для гидролитических реакций внутри лизосом большое значение имеет регуляция внутрилизосомного pH. Нарушение этой регуляции приводит к патологическим состояниям. Однако восстановление нормального значения pH внутри лизосом позволяет восстановить функцию гидролаз. Так, было показано (Soyombo et al., 2006), что при муколипидозе IV типа благодаря мутации в гене лизосомного ионного канала (mucolipin I) происходит

сверхподкисление внутри лизосом, при этом лизосомная липаза инактивируется и в клетках накапливаются липиды и мембранные фрагменты, что приводит к заболеванию. Авторы предполагают два механизма инактивации липазы лизосом при муколипидозе IV: 1) сверхподкисление лизосом приводит к денатурации фермента; 2) сверхподкисление органелл разрушает образование функциональных ферментных комплексов в лизосомах, поскольку образование таких комплексов зависит от величины pH в лизосомах. Выявление сверхкислых лизосом при муколипидозе IV типа было выполнено на конфокальном микроскопе при окрашивании нормальных фибробластов и клеток больных муколипидозом IV типа (в культуре) с помощью АО. Применение лизосомотропного слабого катиона хлорохина (10 нМ) или H^+/K^+ -ионофора нигерицина ($2 \cdot 10^{-7}$ М) в течение 4 сут приводило к снятию сверхподкисления внутри лизосом, активации липазы и уменьшению на 65 % накопленных лизосомных включений, а именно липидов и фрагментов мембран.

Использование нами метода построения спектров флуоресценции АО позволяет более адекватно оценивать накопление АО в кислых структурах клетки, что важно в изучении функционирования этих органелл в таких процессах, как транспорт, адаптация, апоптоз и развитие ряда патологических состояний.

Мы благодарим за участие в обсуждении результатов и консультации С. Я. Адамян, Ю. М. Розанова и Г. И. Штейна (Институт цитологии РАН).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00817) и при использовании оборудования Центра коллективного пользования «Материаловедение и диагностика в передовых технологиях».

Список литературы

Гамалей И. А., Каулин А. Б. 1988. Прижизненное исследование гидрофобных взаимодействий в белковых фибриллах поляризационно-флуоресцентным методом. II. Мышечные волокна. Цитология. 30 (1) : 49—52.

Каламкарова М. Б., Кофман Е. Б., Филатова Л. Г., Штранкфельд И. Г. 1965. О связи акридинового оранжевого мышечными белками. Цитология. 7 (2) : 240—243.

Кроленко С. А., Адамян С. Я., Беляева Т. Н., Моженок Т. П. 2003. Локализация кислых органелл в скелетных мышечных волокнах лягушки. Цитология. 45 (7) : 714—721.

Фаддеева М. Д., Беляева Т. Н. 1991. ДНК-интеркаляторы: взаимодействие с ДНК и другими клеточными компонентами и

применение в биологических исследованиях. Цитология. 33 (10) : 3—33.

Chauhan S. S., Liang X. J., Su A. W., Pai-Panandiker A., Shen D. W., Hanover J. A., Gettesman M. M. 2003. Reduced endocytosis and altered lysosomes function in cisplatin-resistant cell lines. Br. J. Cancer. 88 : 1327—1334.

Clerc S., Barenholz Y. 1998. A quantitative model for using acridine orange as a transmembrane pH gradient probe. Anal. Biochem. 259 : 104—111.

Delic J., Coppey J., Magdelenat H., Coppey-Moisan M. 1991. Impossibility of acridine orange intercalation in nuclear DNA of the living cell. Exp. Cell Res. 194 : 147—153.

Gabbay E. J., Wilson W. D. 1978. Chromatin and a chromosomal proteins In: Methods in: Methods in cell biology. New York: Acad. Press. 351—384.

Kaisto T., Rahkina P., Marjomäki V., Parton R. G., Metsikkö K. 1999. Endocytosis in skeletal muscle fibers. Exp. Cell Res. 253 : 551—560.

Krolenko S. A., Adamyan S. Ya., Belyaeva T. N., Mozhenok T. P. 2006. Acridine orange accumulation in acid organelles of normal and vacuolated frog skeletal muscle fibres. Cell Biol. Int. 30 : 933—939.

Krolenko S. A., Adamyan S. Ya., Belyaeva T. N., Mozhenok T. P., Salova A. V. 2007. Confocal microscopy study of membrane organelles of the skeletal muscle fiber in the process of Zener's (spreading) necrosis. Cell and Tissue Biol. 1 : 183—190.

Liebl D., Difato F., Hornikova L., Mannova P., Stokrova J., Forstova J. 2006. Mouse polyomavirus enters early endosomes, requires their acidic pH for productive infection, and meets transferring cargo in Rab 11-positive endosomes. J. Virol. 80 : 4610—4622.

Millot C., Millot J.-M., Morjani H., Desplaces A., Manfait M. 1997. Characterization of acidic vesicles in multidrug-resistant and sensitive cancer cells by acridine orange staining and confocal microspectrofluorometry. J. Histochem. Cytochem. 45 : 1255—1264.

Nilsson C., Johansson U., Johansson A. C., Kägedal K., Öllinger K. 2006. Cytosolic acidification and lysosomal alkalization during TNF- α induced apoptosis in U937 cells. Apoptosis. 11 : 1149—1159.

Nilsson C., Kägedal K., Johansson U., Öllinger K. 2003. Analysis of cytosolic and lysosomal pH in apoptotic cells by flow cytometry. Methods Cell Sci. 25 : 185—194.

Palmgren M. G. 1991. Acridine orange as a probe for measuring pH gradients across membranes: mechanism and limitations. Anal. Biochem. 192 : 316—321.

Soyombo A. A., Tjon-Kon-Sang S., Rbaibi Y., Bashllari E., Bisceglia J., Muallem S., Kiselyov K. 2006. TRP-ML1 regulates lysosomal pH and acidic lysosomal lipid hydrolytic activity. J. Biol. Chem. 281 : 7294—7301.

Zelenin A. V. 1999. Acridine orange as a probe for cell and molecular biology. In: Fluorescent and luminescent probes for biological activity. London: Acad. Press. 117—135.

Поступила 8 IX 2008

AO DISTRIBUTION AND FLUORESCENCE SPECTRA IN MYOBLASTS AND SINGLE MUSCLE FIBRES

T. N. Belyaeva, S. A. Krolenko, E. A. Leontieva, T. P. Mozhenok, A. V. Salova, M. D. Faddejeva

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

Using spectral scanning regime of Leica TCS SL confocal microscope, acridine orange (AO) fluorescence spectra in nuclei and cytoplasm of living myoblasts L6J1 and frog single muscle fibres have been studied. AO fluorescence spectra in salt solutions dependent on free AO concentrations and in AO complexes with DNA have also been obtained for comparison. Myoblasts nuclei fluoresced in green spectral region with maximum

at ~530 nm (corresponding AO monomers fluorescence), nucleoli fluoresced most brightly. Nuclear chromatin fluoresced not uniformly in these cells. We saw similar to myoblasts AO emission in nucleoli and nuclei of frog single muscle fibres. The uniformed weak green fluorescence was observed for myoblast cytoplasm. As to the muscle fibres sarcoplasm, we saw also AO green fluorescence in A-discs. In myoblasts and muscle fibre cytoplasm we saw the fluorescent red, yellow and green granules which were acidic organelles. The comparison of AO fluorescence spectra in living cells with fluorescence spectra of different AO concentrations and complexes of AO with DNA in buffer solutions allows estimation of AO concentration in acidic granules which is of interest in the investigation of cellular organelles functions in the processes of intracellular transport, adaptation, apoptosis and a number of pathological conditions.

Key words: acridine orange, acid organelles, confocal microscopy, fluorescence spectra.
