

ОБ ИЗМЕНЕНИЯХ ЛИПИДОВ МЕМБРАН СЕТЧАТКИ ПРИ РАЗВИТИИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ДИСТРОФИИ У КРЫС

ОСТАПЕНКО Н. А., ШАБАНОВА М. Е., ТЮРИН В. А., БОРИН М. Л.,
ГОРБУНОВ Н. В., ЭТИНГОФ Р. И.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. Н. М. Сеченова АН СССР,
Ленинград, Институт морфологии человека АМН СССР, Москва

При помощи метода спинных зондов установлено, что при развитии наследственной дистрофии сетчатки у крыс линии *Campbell* микровязкость мембран сетчатки была существенно больше, чем у здоровых животных в период выраженной патологии (на 35-й день жизни) и не отличалась на 15-й день жизни. Начиная с этого дня, содержание продуктов перекисного окисления липидов в мембранах сетчатки крыс линии *Campbell* было выше, чем у крыс линии *Wistar*.

При изучении жирнокислотного состава мембран сетчатки у больных животных на 10-й день жизни отмечено уменьшение содержания линолевой кислоты по сравнению со здоровыми животными. В более поздние сроки постнатального развития (35- и 75-й дни жизни) выявлено уменьшение содержания докозагексаеновой кислоты, что является, вероятно, следствием разрушения наружных сегментов палочек сетчатки. Факт изменения жирнокислотного состава мембран у больных животных на 10-й день жизни, когда еще нет наружных сегментов, свидетельствует о нарушении при наследственной дистрофии сетчатки липидного состава мембран нефоторецепторных слоев.

Ранее нами было установлено, что при развитии наследственной дистрофии сетчатки у крыс относительно рано изменяется 5'-нуклеотидазная активность мембран этой ткани [1]. При анализе этого феномена предполагалось, что отмеченные изменения связаны с изменением липидов мембран сетчатки [2]. В литературе имеются отдельные указания об изменении липидов мембран сетчатки при данном заболевании у крыс [3]. Однако они относятся к поздним (64 дня) стадиям заболевания и могут быть обусловлены наличием значительного слоя обломков нефагоцитированных наружных сегментов.

Целью настоящего исследования было сравнительное изучение микровязкости мембран сетчаток, жирнокислотного состава (ЖС) их липидов и процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) у крыс с наследственной дистрофией сетчатки и здоровых на ранних и поздних этапах постнатального развития.

Материалы и методы

Работа выполнена на крысах линии *Campbell* с наследственной дистрофией сетчатки и контрольных линии *Wistar*, разводимых в виварии Института эволюционной физиологии и биохимии им. Н. М. Сеченова, в возрасте 10, 35 и 75 дней жизни, то есть с начала формирования наружных сегментов палочек сетчатки и вплоть до развития полной слепоты у больных крыс.

Микровязкость мембран суммарной фракции сетчатки (осадок после центрифугирования гомогената сетчатки при 12000g 40 мин) оценивали по времени вращательной корреляции τ_c спинного зонда, как в работе Pontius, Delmell [4]. В

качестве спинного зонда использовали этиловый эфир 7-нуклеостеариновой кислоты [5], который вводили в суспензию мембран в буфере, содержащем 40 мМ трис-НСl, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА pH 7,4 из расчета 1 молекула зонда на 100 молекул мембранных липидов. Спектры ЭПР снимали на малогабаритном спектрометре [6]; термостатирование образцов осуществляли с точностью 0,5°; экстракцию липидов из мембран проводили по методу Folch и соавт [7]; липидный фосфор определяли по методу Vascovsky и соавт [8]; определение гидроперекисей или диеновых конъюгатов (первичных продуктов ПОЛ) проводили методом УФ-спектрофотометрии в системе растворителей метанол: гептан (5:1) [9]. Конечные продукты ПОЛ типа шиффовых оснований регистрировали по характерной флуоресценции $\lambda_{\text{возб.}}=360$ нм, $\lambda_{\text{эмис.}}=420-440$ нм [10]. Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре J 4-8960 «Aminco-Bowman» (США).

Жирные кислоты (ЖК) основных липидов определяли методом ГЖХ на хроматографе «Chrom-4» (ЧССР). Использовали стеклянную колонку (длина—3,5 м, внутренний диаметр—3 мм), заполненную 6% LAC-3 R-728 на хромсорбс G-AW-DMCS (80—100 меш, США). Температура колонки 186°, скорость тока газа-носителя (аргон) 60 мл/мин. Переэтерификацию остатка ЖК в молекуле липида проводили мягким щелочным метанолизом без предварительной экстракции липидов [11]. Контрольные и опытные пробы анализировали в один день, в качестве стандарта использовали стандарт Askman [12], содержание отдельных ЖК выражали в процентах; количественной оценкой содержания каждой ЖК служила площадь пика на хроматограмме.

Результаты и обсуждение

На рисунке представлены графики обратной температурной зависимости времени вращательной корреляции τ_c спин-зонда в тотальной фракции мембран сетчатки контрольных и больных крыс. В пер-

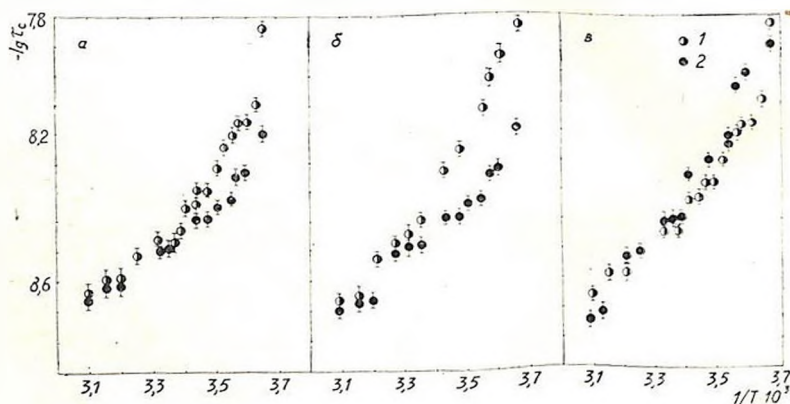


Рис. Микровязкость мембран сетчатки крыс линии Wistar и Campbell в различные сроки постнатальной жизни. а. Wistar—36 дней, Campbell 36 дней; б. Wistar—15 дней, Wistar—36 дней; в. Campbell—15 дней, Campbell—36 дней. По оси абсцисс—величина, обратная абсолютной температуре ($1/T \cdot 10^3$), по оси ординат—время вращательной корреляции. ($-lg \tau_c$).

вые дни после созревания (15—17-й день постнатальной жизни) существенных различий в показателе микровязкости мембран больных и здоровых животных не отмечено. В дальнейшем у крыс линии Wistar на 35-й день жизни наблюдали уменьшение микровязкости

мембран сетчатки по сравнению с 15-м днем жизни. У крыс линии *Campbell*, в отличие от здоровых, температурная зависимость микровязкости мембран была одинаковой в изучаемые сроки жизни. Соответственно на 35-й день жизни, то есть в период выраженной патологии у крыс *Campbell*, микровязкость мембран сетчатки у них была больше, чем у крыс линии *Wistar*. Это может быть отражением того

Таблица 1

Изменение уровня эндогенных продуктов перекисного окисления липидов мембран сетчатки крыс линий *Campbell* и *Wistar* в процессе постнатального развития

Возраст животных (дни)	Л и н и я к р ы с			
	Campbell		W i s t a r	
	оптическая плотность, $\lambda=232$ нм (гидроперекиси)	относительная интенсивность флуоресценции при $\lambda=420$ нм (шифровые основания)	оптическая плотность, $\lambda=232$ нм (гидроперекиси)	относительная интенсивность флуоресценции при $\lambda=420$ нм (шифровые основания)
15 (n=15)	0,21 $\pm$ 0,01	0,77 $\pm$ 0,08	0,13 $\pm$ 0,01	0,69 $\pm$ 0,10
45 (n=5)	0,57 $\pm$ 0,01	2,13 $\pm$ 0,06	0,14 $\pm$ 0,01	0,71 $\pm$ 0,09

Примечание. Концентрация липидного фосфора в растворах составляла 10 мкг/мл; $p < 0,05$.

факта, что изученные мембраны отличаются разной молекулярной организацией липидов. В частности, в результате развития данной патологии может меняться соотношение жидких липидов и липидов, образующих в мембране кластеры. Одной из возможных причин наблюдаемых отличий может быть появление в мембране перекисных кластеров [13]. Как видно из данных табл. 1, уровень первичных продуктов ПОЛ у больных крыс был выше, чем у здоровых уже на 15-й день жизни. В то время, как у крыс линии *Wistar* содержание продуктов ПОЛ в процессе онтогенеза не менялось, у крыс линии *Campbell* оно нарастало, так что к 45-му дню жизни количество и первичных, и вторичных продуктов ПОЛ у больных животных было приблизительно в 3 раза больше, чем у здоровых. Такое нарастание процесса ПОЛ, вероятно, и приводило к образованию перекисных кластеров в мембране и ограничению подвижности зонда. Полученные результаты хорошо согласуются с данными авторов [13—15], которые установили, что физиологически важными модификаторами гидрофобных свойств мембран могут быть эндогенные перекиси липидов. Появление последних в мембране изменяет не только проницаемость и барьерные свойства мембраны, но и приводит к ограничению подвижности фосфолипидов во всей толще мембраны от полярных головок фосфолипидов до концевых CH_3 -групп хвостов ЖК за счет снижения доли жидких липидов в число и увеличения количества упорядоченных «кластеризованных» липидов [13—15].

Следует отметить, что усредненная микровязкость мембран всей сетчатки существенно зависит от доли, которую составляют в исследуемой фракции фоторецепторные мембраны, характеризующиеся высоким содержанием полиненасыщенных ЖК [16]. К 35-му дню жизни у больных животных фоторецепторных мембран в сетчатке еще относительно много, хотя они уже находятся в состоянии деструкции [17]. Наличие этих мембран в препаратах у больных животных позволяет полагать, что отсутствие изменения микровязкости мембран в онтогенезе обусловлено изменением их качественного состава, возможно, увеличением «кластеризованных» липидов, а не изменением соотношения фоторецепторных мембран.

Таблица 2

Жирнокислотный состав липидов сетчатки крыс (в % от суммы)

Жирная кислота	Крысы линии <i>Wistar</i>			Крысы линии <i>Campbell</i>		
	10 дней	35 дней	75 дней	10 дней	35 дней	75 дней
14:0	1,4±0,1	Сл*	Сл	Сл	Сл	Сл
16:0	25,3±0,2	19,6±0,4	19,7±0,2	25,6±0,5	20,9±0,8	22,6±0,6
16:1	4,0±0,1	0,5±0,1	0,5±0,1	5,2±0,1	0,6±0,1	1,2±0,1
17:0	Сл	0,5±0,1	Сл	Сл	0,5±0,1	0,6±0,1
18:0	16,2±0,2	22,6±0,6	24,6±0,1	16,4±0,1	21,0±0,2	22,8±0,3
18:1	15,0±0,1	10,1±0,1	11,0±0,3	15,2±0,3	9,7±0,3	15,4±0,3
18:2ω6	1,6±0,1	0,8±0,1	1,2±0,2	0,9±0,1	0,9±0,1	1,1±0,1
20:4ω6	16,0±0,6	10,3±0,1	11,0±0,3	15,5±0,4	11,3±0,1	13,5±0,2
ненасыщено	0,6±0,1	1,1±0,2	Сл	0,5±0,1	1,0±0,1	Сл
22:4ω6	3,0±0,1	2,7±0,1	2,6±0,1	2,6±0,1	2,9±0,1	2,4±0,1
22:5ω6	6,4±0,1	5,7±0,2	4,4±0,2	5,6±0,3	8,3±0,2	1,8±0,1
22:5ω3	0,5±0,1	0,5±0,1	0,5±0,1	0,6±0,1	0,6±0,1	0,7±0,1
22:6ω3	9,6±0,3	25,3±0,5	24,5±0,7	10,7±0,3	22,2±0,2	17,9±0,3
Насыщенные	42,9	42,7	44,3	43,0	42,4	46,0
Моноеновые	19,0	10,6	11,5	20,4	10,3	16,6
Полиеновые	37,7	46,4	44,2	36,4	47,2	37,3

Примечание. Сл*—следы, менее 0,5%.

Известно, что основным субстратом ПОЛ в мембранах являются полиненасыщенные фосфолипиды, которыми так обогащены фоторецепторные мембраны. Поэтому в следующей серии опытов был изучен ЖК мембран сетчатки больных и здоровых крыс на 10-, 35- и 70-й дни жизни. У крыс линии *Wistar* в процессе постнатального развития от 10-го до 35-го дня жизни наблюдали снижение содержания 16:0 и увеличение 18:0, так что процент насыщенных ЖК не менялся. В этот же срок происходит снижение содержания ЖК линолевого ряда 18:2ω6, 20:4ω6 и 22:5ω6 и увеличение содержания докозагексаеновой кислоты—ω 3 ряда (табл. 2). Во все сроки жизни количество ненасыщенных ЖК было больше, чем насыщенных, а из ненасыщенных преобладали полиненасыщенные. Увеличение количества 22:6ω3, специфического маркера фосфолипидов фоторецепторных мембран, более чем в 2 раза по сравнению с 10-м днем жизни может частично объяснить уменьшение микровязкости мембран сетчатки крыс линии *Wistar* к

35-му дню (рис. 1). С другой стороны, само увеличение процентного содержания 22:6 ω 3 среди ЖК сетчатки обусловлено ростом наружных сегментов палочек, в которых содержание этой ЖК особенно высоко и составляет у теплокровных животных приблизительно 40—50 молярных процентов [16].

При сравнении ЖС липидов сетчатки здоровых и больных крыс было показано, что у крыс линии *Campbell* уже на ранних сроках жизни (10-й день) понижено содержание эссенциальной 18:2 ω 6 в 2 раза по сравнению с контролем ($p < 0,001$), а также других длинноцепочечных кислот линолевого ряда 22:4 ω 6 ($p < 0,001$), 22:5 ω 6 ($p < 0,05$). Одновременно с этим увеличивалось содержание моноеновой кислоты 16:1 ($p < 0,001$). На 35-й день уровень 22:6 ω 3 был достоверно понижен по сравнению с нормой, что, возможно, обусловлено уменьшением ее синтеза или увеличением ее окисления в период начавшейся деструкции наружных сегментов. Подобные по характеру изменения в содержании 22:6 ω 3 отмечены в работе Organisciak и соавт. [3] на более поздних сроках заболевания. На 75-й день наблюдали дальнейшее уменьшение содержания 22:6 ω 3 в сетчатках больных крыс, что, вероятно, связано с распадом наружных сегментов в этот период [17].

Обнаруженные на 10-й день, то есть в период, когда еще нет наружных сегментов, изменения ЖС свидетельствуют о том, что нарушения ЖС относятся не только к фоторецепторному слою сетчатки, но и к мембранам других слоев. Это положение подтверждает ранее полученный факт об изменении активности 5'-нуклеотидазы в нефоторецепторных мембранах сетчатки [2]. Следует также отметить, что несмотря на то, что изменение ЖС сетчатки у больных крыс удается констатировать уже к 10-му дню жизни, оно не отражается на микровязкости мембран. Это обусловлено тем, что изменения касаются тех ЖК, доля которых от общего содержания ЖК липидов весьма незначительна. На 35-й день при одинаковом суммарном содержании полиеновых ЖК вязкость мембран сетчатки была больше у больных крыс, что свидетельствует о том, что жидкость мембран обусловлена определенным качественным составом ЖК и связанными с ним белок-липидными взаимодействиями.

Резюмируя полученные данные, и в частности результаты о ранних изменениях ЖС мембран сетчаток больных крыс, можно предположить, что эти изменения могут иметь значение в патогенезе заболевания, учитывая уникальный ЖС сетчатки, и в частности наружных сегментов. Изучение конкретной значимости ранних изменений ЖС сетчаток у больных крыс является предметом дальнейших исследований.

RAT HEREDITARY DYSTROPHY AND RETINAL MEMBRANE LIPIDS

OSTAPENKO I. A., SHABANOVA M. E., TYURIN U. A., BORIN M. L.,
GORBUNOV N. V., ETINGOF R. N.

I. M Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
USSR Academy of Sciences, Leningrad.

Institute of Human Morphology, USSR Academy of Medical
Sciences, Moscow

Starting from the 35th day of life the microviscosity of rat retina membrane turned to be essentially higher in normal animals than in Campbell line ones with hereditary retinal dystrophy (tested by spin probe method). Since 35th day of life the content of the products of lipid peroxidation in Campbell rats was higher than in Wistar ones.

The amount of linolic acid dropped on the 10th day of life in diseased animals; on the 35th and 75th days a decrease in the amount of dokoza-hexaenic acid was registered pointing to a possible destruction of the outer segments of retinal rods. Changes in the fatty acids composition in retinal membrane of diseased animals on the 10th day of life (when the outer segments are not yet formed) points to the damage of retinal non-photoreceptive strata in this pathology.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Чусова Г. Г., Остапенко И. А., Этингер Р. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 93, № 9, с. 305—307, 1981
2. Остапенко И. А. Нейрохимия, т. 4, № 2, с. 126—133, 1985.
3. Organisciak D. T., Wang H—M., Kou A. L. Exp. Eye Res., v. 34, (3), p. 401—412, 1982.
4. Pontus M., Delmett M. Experientia, v. 31, (7), p. 799—801, 1975.
5. Борин М. Л., Кедин С. А., Володарский Л. В., Швеиц В. Н. Биоорг. химия, т. 10, № 2, с. 251—259, 1984.
6. Ерин А. Н., Горбунов Н. В., Брусованик В. Н., Тюрин В. А., Прилико Л. Биохимия, т. 50, № 6, с. 998—1004, 1985.
7. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. J. Biol. Chem., v. 226, p. 497—509, 1957.
8. Vaskovsky V., Kostetsky E., Vasendin I. J. Chromatogr., v. 114, p. 129—142, 1975.
9. Bolland J., Koch H. P. J. Chem. Soc., v. 7, p. 445—447, 1945.
10. Chio K. S., Tappel A. L. Biochemistry, v. 8, p. 2821—2827, 1969.
11. Foot F., Allen R., Agranoff R. W. Lipid Res., v. 6, p. 518—524, 1965.
12. Ackman R. C. Amer. Oil Chem. Soc., v. 40, p. 564—570, 1963.
13. Кляин Н. К., Тюрин В. А., Каган В. Е., Шуколюков С. А., Новиков К. Н., Азизова О. А., Владимиров Ю. А., Козлов Ю. П. Биол. науки, т. 11, с. 39—44, 1978.
14. Каган В. Е., Азизова О. А., Архипенко Ю. В., Кляин Н. К., Козлов Ю. П., Владимиров Ю. А. Биопизика, т. 22, № 4, с. 625—630, 1977.
15. Кляин Н. К., Азизова О. А., Сибельдина Л. А., Архипенко Ю. В., Каган В. Е. Биохимия, т. 48, № 4, с. 626—633, 1983
16. Fliesler S. J., Anderson R. E. Prog. Lipid Res., v. 22, p. 79—131, 1983.
17. Yates C. M., Dewar A. J., Wilson H., Winterburn A. K., Reading H. W, Exp Eye Res., v. 18, (2), p. 119—133, 1974.

Поступила 14. IV 1986