



УДК 577.354.2

ВЛИЯНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ НА ПРОВОДИМОСТЬ ФОТОРЕЦЕПТОРНОЙ МЕМБРАНЫ ДИСКА

РЕБРИК Т. И., КАЛАМКАРОВ Г. Р., ОСТРОВСКИЙ М. А.

Институт химической физики АН СССР, Москва

Рассмотрено явление быстрого фотоиндуцированного повышения проводимости фоторецепторной мембраны и его возможные причины. Показано, что процесс фотоокисления липидов не является причиной быстрого повышения проводимости фоторецепторной мембраны диска в ответ на свт. Перекисное окисление липидов вызывает повышение проводимости фоторецепторной мембраны, но при накоплении значительного количества продуктов окисления. Регенерация родопсина в обесцвеченных дисках при добавлении 11-дис-ретиналя приводит к восстановлению амплитуды фотответа и к уменьшению проводимости фоторецепторной мембраны. Предполагается, что фотоиндуцированное повышение проводимости мембраны диска связано с фотопревращениями молекулы родопсина.

Известно, что фоторецепторная мембрана (ФРМ) отличается чрезвычайно высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот. Поэтому липиды ФРМ легко подвергаются перекисному окислению. Длительное и яркое освещение вызывает накопление продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в суспензии ФРМ, а также окисление SH-групп родопсина [1]. С другой стороны, ранее нами показано, что сопротивление ФРМ диска очень велико и составляет $\sim 1-3 \text{ МОм} \cdot \text{см}^2$ [3]. При этом неясно, какова функциональная роль столь высокого сопротивления. Кроме того, было обнаружено, что яркая вспышка света, интенсивность которой существенно превышает физиологический уровень освещенности, вызывает быстрое увеличение проводимости мембраны диска [4]. Это повышение проводимости пропорционально энергии поглощенного света. В связи с этим интересно было выяснить, не связано ли такое повышение проводимости с фотоокислением молекулярных компонентов мембраны.

Материалы и методы

Наружные сегменты палочек быка выделяли в градиенте плотности сахарозы [5]. Затем путем их лизиса в 10-кратном объеме дистиллированной воды и последующего центрифугирования при $100\,000g$ в течение 30 мин получали суспензию дисков, которую добавляли в один из отсеков кюве-

ты, разделенной на две части мембранным фильтром «Sartorius» или «Fluorog», пропитанным раствором азолектина в декане (120 мг/мл). Конечная концентрация родопсина в кювете составляла 0,25 мг/мл. Диск инкубировали в этой кювете при перемешивании в темноте 3—4 ч. Среда инкубации содержала 100 мМ NaCl, 5 мМ MES-буфер, рН 6,0. Разность потенциалов на мембранном фильтре регистрировали неполяризуемыми Ag/AgCl электродами с помощью операционного усилителя LF-355 и запоминающего устройства DL-905 («Data Lab.»). Записи электрических ответов представлены (рис. 3). Полученные данные обрабатывали на вычислительной машине IN-110 («Inter-technique», Франция). Освещение образцов проводили ксеноновой вспышкой со сплошным спектром изучения на основе стробоскопической лампы ИСШ-100-3М (длительность вспышки 10 мксек, энергия 50 Дж) или лазером на итрий-алюминиевом гранате, активированном ниодимом, с удвоением частоты на кристалле ниобата лития, энергия вспышки 30 мДж, $\lambda = 532$ нм. ПОЛ индуцировали добавлением прооксидантов— 10 мкМ Fe^{2+} и 200 мкМ аскорбата. Степень окисления определяли по концентрации малонового диальдегида [6]. Через определенные промежутки времени после начала окисления отбирали пробы по 0,5 мл суспензии с концентрацией родопсина 0,25 мг/мл и останавливали окисление добавлением 10^{-4} М ЭДТА и 0,5 мл 50% ТХУ. Затем в каждую пробу добавляли 1 мл 0,8%-ного раствора тиобарбитуровой кислоты (ТБК) и выдерживали смесь 15 мин на кипящей водяной бане. После этого пробы центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин. Оптическую плотность супернатанта определяли на спектрофотометре «Specord UV—VIS» (ГДР). $\lambda_{\text{макс}} = 532$ нм, коэффициент экстинкции окрашенного комплекса малонового диальдегида с ТБК $\epsilon_{\text{макс}} = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Фотоокисление суспензии НСП проводили в тех же условиях освещения, в которых регистрировался фотопотенциал.

Результаты и обсуждение

ПОЛ в суспензии дисков вызвало заметное повышение проводимости фоторецепторных мембран. На рис. 1, а представлен процесс накопления продуктов ПОЛ в суспензии дисков во время инкубации с прооксидантами в течение часа, на рис. 1, б показано изменение постоянной времени спада фотоответа дисков, вызванное ПОЛ. Из приведенных данных видно, что накопление продуктов ПОЛ в мембране в количестве 10^{-3} М/л, приводящее к уменьшению постоянной времени спада фотопотенциала, сопровождается заметным повышением проводимости мембраны диска.

В следующей серии опытов было определено фотоиндуцированное накопление продуктов ПОЛ в тех же условиях освещения, в которых мы регистрировали ранее [4] существенное фотоиндуцированное повышение проводимости ФРМ (рис. 2). В этих условиях количество образующихся продуктов ПОЛ крайне незначительно. Оно на порядок меньше, чем в случае аскорбат- Fe^{2+} -индуцированного окисления, приводяще-

го к заметному повышению проводимости ФРМ. Следовательно, повышение проводимости ФРМ в ответ на свет непосредственно не связано с фотоокислением липидов. Не исключено, что в основе этого явления лежат индуцированные светом конформационные изменения молекулы родопсина. На это указывает обнаруженная нами связь между регенерацией предварительно обесцвеченного родопсина и восстановлением проводимости ФРМ к исходному уровню. На рис. 3 представлен результат одного из таких опытов. Обесцвеченную суспензию в течение часа инкубировали с 10-кратным избытком 11-цис-ретинала. После этого диски с регенерированным таким образом родопсином встраивали в пропитанный липидами мембранный фильтр и регистрировали фотоответ. Как видно из рис. 3, регенерация родопсина привела к восстановлению высокого сопротивления ФРМ.

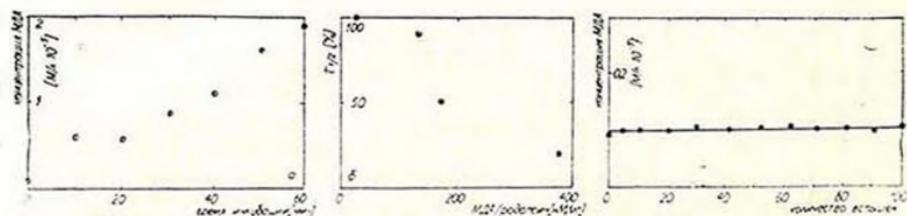


Рис. 1. а. Кинетика накопления малонового диальдегида в суспензии дисков при индукции перекисного окисления липидов системой Fe^{2+} -аскорбат. По оси абсцисс—время инкубации с прооксидантами; по оси ординат—концентрация малонового диальдегида; концентрация родопсина в суспензии 0,25 мг/мл. б. Влияние ПОЛ в ФРМ на кинетику фотопотенциала. По оси абсцисс—количество малонового диальдегида в зольной фазе на 1 мг родопсина; по оси ординат—постоянная времени спада фотопотенциала. Рис. 2. Накопление малонового диальдегида в суспензии дисков при освещении лазерными вспышками. По оси абсцисс—число вспышек; по оси ординат—концентрация малонового диальдегида. Концентрация родопсина в суспензии 0,25 мг/мл

В другой серии опытов обесцвечивали предварительно встроенные в мембранный фильтр диски. Затем к кювету добавляли 10-кратный избыток 11-цис-ретинала и через 1 ч регистрировали ответ на свет. И в этом случае регенерация родопсина приводила к замедлению спада фотоответа, то есть к уменьшению проводимости ФРМ.

Таким образом, фотоиндуцированное увеличение проводимости ФРМ может быть связано с конформационными перестройками в родопсине или с нарушениями в ней родопсин-липидных взаимодействий.

Ранее нами было показано, что в ответ на мощную лазерную вспышку происходит заметное увеличение проводимости мембран фоторецепторных дисков, которое пропорционально энергии поглощенного света и концентрации обесцвеченного родопсина. В физиологических условиях, когда палочка работает в диапазоне освещенностей 1—100 квантов/с и диск поглощает не более одного кванта, проводимость мембраны практически не меняется. Поэтому увеличение проводимости мембраны диска

в ответ на мощную вспышку, по-видимому, не играет существенной роли в физиологическом механизме фоторецепции.

Вместе с тем, полученные данные свидетельствуют о развитии в зрительной клетке патологического процесса фотоповреждения. Как было показано, в основе этого процесса лежат реакции фотосенсибилизированного свободнорадикального окисления белков и липидов ФРМ [1]. Однако наблюдаемые нами изменения проводимости, по-видимому, не связаны с фотоокислением, поскольку при освещении короткой лазерной вспышкой практически не наблюдается появления продуктов ПОЛ (рис. 2). В то же время накопление большого количества таких продуктов приводит к повышению проводимости мембраны фоторецепторного диска, но по другому механизму (рис. 1).

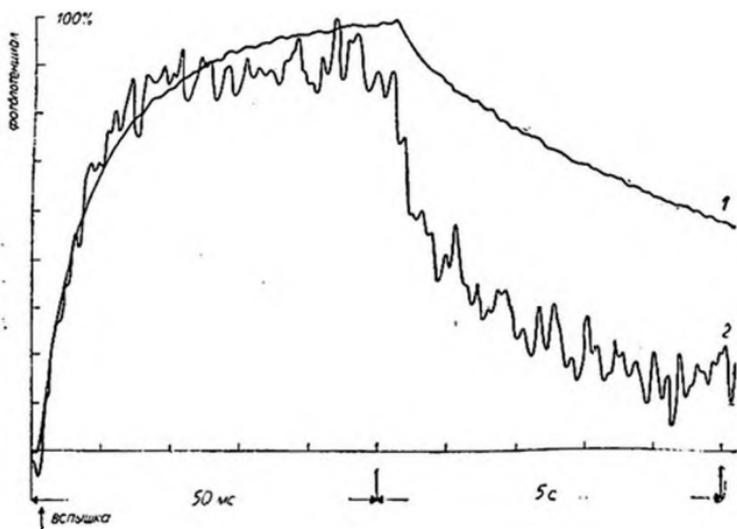


Рис. 3. Восстановление проводимости фоторецепторной мембраны диска в результате регенерации родопсина при добавлении 11-цис-ретинала (родопсин обесцвечивали, затем добавляли 11-цис-ретинал и инкубировали 1 ч). Фотоответ дисков до обесцвечивания не представлен, он близок к кривой 1. Кривая 1—ответ на 1-ю вспышку после регенерации; кривая 2—ответ на 10-ую вспышку

Изменения проводимости в ФРМ диска палочек вряд ли имеют функциональное значение. Однако в колбочках, где нет дисков, а плазматическая мембрана содержит родопсин, фотоокисление может приводить к повышению проводимости. Фотоповреждение, в частности увеличение проводимости родопсинсодержащей мембраны, приводило бы к снижению отношения сигнал/шум в фоторецепторе. Предельная светочувствительность палочек требует специальных механизмов выделения сигнала из шума. Возможно, одним из таких механизмов, возникших в ходе эволюции, было разделение в палочках фоторецепторной и плазматических мембран.

EFFECT OF LIPID PEROXIDATION ON THE PHOTORECEPTOR DISC MEMBRANE CONDUCTION

REBRİK T. I., KALAMKAROV G. R., OSTROVSKY M. A.

Institute of Chemical Physics, USSR, Acad. Sci., Moscow

The phenomenon of light-induced increase of the photoreceptor disc membrane conductivity has been studied. The process of the lipid photooxidation is shown not to be the cause of the light-induced conductivity growth. Treating of bleached discs with 11-cis retinal leads to the rhodopsin regeneration and membrane conductivity decrease. This points to the interrelation of light-induced membrane conductivity changes with rhodopsin molecule photoconversion.

ЛИТЕРАТУРА

1. Положева Н. Д., Федорович И. Б., Островский М. А., Эмануэль Н. М. Биофизика т. 26, № 3, с. 398—403, 1981.
2. Kagan V. E., Shvedova A. A., Novikov K. N., Kozlov Yu. P. Biochim. et biophys., acta, v. 330, № 1, p. 76—79, 1973.
3. Ребрик Т. И., Каламкарров Г. Р., Островский М. А. Биофизика, т. 31, № 6, с. 985—989, 1986.
4. Drachev L. A., Kalamkarov G. P., Kaulen A. D., Ostrovsky M. A., Skulachev V. P. Eur. J. Biochem., v. 117, № 3, p. 471—481, 1981.
5. Шевченко Т. Ф., Каламкарров Г. Р., Островский М. А. Биофизика, т. 25, № 3, с. 462—468, 1980.
6. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, М.: Наука, 1972.

Поступила 7. I 1987