

В. Е. КАГАН, А. А. ШВЕДОВА, К. Н. НОВИКОВ, Ю. П. КОЗЛОВ

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ ФОТОРЕЦЕПТОРОВ

(Представлено академиком Г. М. Франком 20 XII 1972)

Мембраны фоторецепторов относятся к типу метаболически активных жидких мембран, для которых характерно высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот (в особенности докозогексаеновой, более 30%) (1), несущих существенную функциональную нагрузку. Отсутствие этих незаменимых жирных кислот в диете приводит лишь к крайне незначительному снижению уровня высокопепредельных жирных кислот в фосфатидилэтаноламине, фосфатидилхолине и фосфатидилсерине — основных фосфолипидах фоторецепторных мембран сетчатки, где сохранность полиенов обеспечивается специальными механизмами их «консервации», в то время как в других тканях развиваются характерные признаки авитаминоза F (2). Локализация значительной части молекулы светочувствительного пигмента родопсина в липидном слое мембраны диска фоторецептора и дополнительное погружение ее в липиды после освещения вследствие уменьшения величины пространственного отрицательного заряда полярной части молекулы (3, 4), а также зависимость свойств (спектральных, способности к фотолизу и регенерации) самого фоторецепторного липохромопротеидного комплекса от ассоциированных фосфолипидов (5-9) свидетельствуют о непосредственном участии липидного окружения родопсина в механизмах рецепции света.

В то же время известно, что полиеновые липиды, в том числе фосфолипиды различных мембранных структур клетки, способны претерпевать свободнорадикальное окисление, на начальных стадиях которого в гидрофобных жирнокислотных остатках фосфолипидов появляются полярные гидроперекисные группировки (10-13). Запускаемая далее цепочка метаболических превращений ацильных остатков фосфолипидов приводит к появлению лизосоединений, к изменениям структуры мембранных образований и к уменьшению активности мембранно-связанных ферментов, аналогично тому, как это наблюдается при действии фосфолипаз и детергентов (14). Указанные соображения наряду с известным фактом сенсибилизированного хлорофиллом фотоокисления жирных кислот, осуществляемого уже малыми квантами видимого света (15, 16), послужили побудительным мотивом для изучения возможности индуцированного светом свободнорадикального окисления мембранных липидов фоторецепторов сетчатки и роли родопсинового комплекса в этом фотоокислении.

Опыты проводились на предварительно темноадаптированных (в течение 2 час.) лягушках *Rana temporaria*. Через 30 мин. соответственно темновой или световой инкубации (при 2-4°) из целых сетчаток или наружных сегментов палочек, выделявшихся центрифугированием (ЦЛР-1, горизонтальный ротор РК-25, 5000g, 30 мин.) в градиенте плотности сахарозы (45, 35, 28%) (17), смесью хлороформ — метанол (2:1) извлекались липиды (18) и подвергались анализу на определение первичных продуктов свободнорадикального окисления липидов — гидроперекисей. Содержание гидроперекисей в полиненасыщенных липидах определялось по характерному для образующихся диеновых конъюгатов максимуму поглощения

в у.-ф. спектре липидов (19) и методом полярографии с ртутно-капельным электродом в системе органических растворителей (20). Результаты экспериментов обрабатывали статистически ($p \leq 0,01$).

При освещении сетчаток в интервале интенсивностей от 900 до 1600 лк содержание гидроперекисей липидов в сетчатке увеличивается (табл. 1), в то время как в близком по липидному составу гомогенате переднего мозга лягушки освещение в тех же дозах не приводит к накоплению продуктов перекисного окисления.

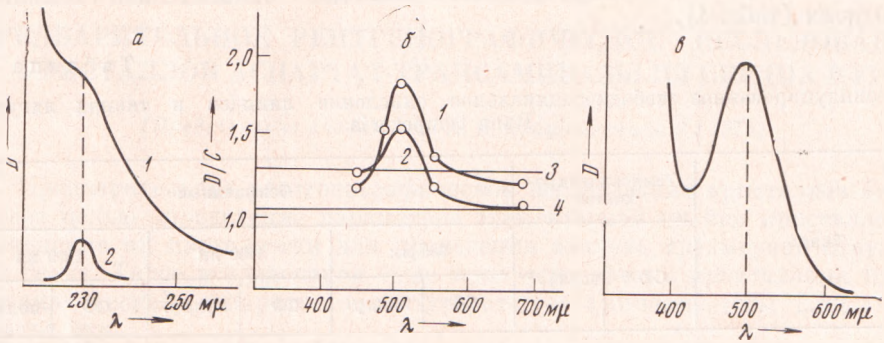


Рис. 1. а — у.-ф. спектры поглощения липидов из паружных сегментов палочки сетчатки лягушки: 1 — липиды из освещенных сегментов, 2 — разностный спектр «свет — темнота»; б — спектр действия фотохимического окисления липидов сетчаток и наружных сегментов палочек (по данным спектрофотометрии): 1 — освещенные сегменты, 2 — освещенные сетчатки, 3 — темноадаптированные сегменты, 4 — темноадаптированные сетчатки; в — спектр поглощения трионовых экстрактов родопсина (тритон X-100 в трис-НСл-буфере, рН 7,4) в видимой области

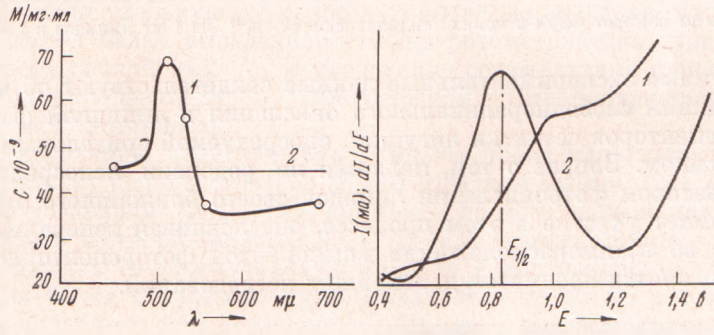


Рис. 2. Слева — спектр действия фотохимического окисления липидов наружных сегментов палочек сетчатки (по данным полярографии); справа — полярограмма липидов из наружных сегментов палочек сетчатки лягушки. 1 — интегральная запись (—); 2 — дифференциальная запись

Для выяснения роли родопсинового комплекса в процессе свободнорадикального окисления липидов был снят спектр действия этого процесса на целых сетчатках и наружных сегментах палочек (рис. 1). При освещении равноквантовыми световыми потоками ($6,5 \cdot 10^{14}$ квантов на 1 см^2 за 1 сек.) различных длин волн (набор интерференционных светофильтров с максимумами пропускания при 455, 494, 508, 539, 551 и 668 мμ) максимальное количество гидроперекисей липидов накапливается в области 508 мμ, уменьшаясь до величины неосвещенного контроля как в сторону более коротких (455 мμ), так и в сторону более длинных волн (668 мμ) (см. рис. 2). Обращают на себя внимание два обстоятельства: во-первых, амплитуда накопления продуктов свободнорадикального окисления в липидах из наружных сегментов выше, чем в целых сетчатках, что указы-

вает на преимущественную локализацию процесса перекисления в мембранах фоторецепторных клеток. Во-вторых, спектр действия фотохимического окисления липидов совпадает со спектром поглощения родопсина и кривой спектральной чувствительности сетчатки глаза лягушки (преимущественно палочковой), что говорит о вовлечении родопсинового комплекса в этот процесс. Наконец, освещение суспензии наружных сегментов палочек в присутствии природного ингибитора свободнорадикальных реакций *d, l, α*-токоферола (в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ M) не приводит к превышению содержания гидроперекисей липидов относительно темнового контроля (табл. 1).

Таблица 1

Фотоиндуцированное свободнорадикальное окисление липидов в тканях лягушки *Rana temporaria*

Ткань	Темноадаптированные		Освещенные					
	СФ *	поляр. **	900 лк		1400 лк		1600 кл	
			СФ	поляр.	СФ	поляр.	СФ	поляр.
Сетчатка	$2,01 \pm 0,14$	$18,4 \pm 1,6$	$2,11 \pm 0,29$	$22,4 \pm 2,6$	$3,23 \pm 0,28$	$22,8 \pm 2,4$	$2,89 \pm 0,34$	$27,6 \pm 2,4$
Передний мозг	$1,15 \pm 0,15$	$12,9 \pm 4,0$	—	—	—	—	$1,28 \pm 0,33$	$7,4 \pm 1,9$
Наружные сегменты палочек сетчатки в присутствии <i>d, l, α</i> -токоферола	1,62	13,2	—	—	1,57	12,0	—	—

* По данным спектрофотометрии в единицах оптической плотности на 1 мг липидов в 1 мл раствора.

** По данным полярографии в молях гидроперекисей $\times 10^{-9}$ на 1 мг липидов в 1 мл раствора

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют об индукции светом реакций свободнорадикального окисления в липидной фазе мембран фоторецепторов сетчатки лягушки, опосредуемой зрительным пигментом родопсином. Вопрос о том, является ли родопсин непосредственным сенсибилизатором фотоокисления липидов своего ближайшего окружения или принимает участие в этом процессе, обуславливая генерализованные изменения во взаиморасположении компонентов фоторецепторной мембраны (^{3, 21}), является предметом дальнейших исследований.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
19 XII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. E. Anderson, L. Sperling, Arch. Biochem. and Biophys., 144, 673 (1971).
- ² R. E. Anderson, M. Maude, ibid., 151, 270 (1972).
- ³ J. K. Blasie, Biophys. J., 12, 191 (1972).
- ⁴ J. K. Blasie, Biophys. J., 12, 205 (1972).
- ⁵ N. Krinsky, Arch. Ophthalmol., 60, 688 (1958).
- ⁶ R. G. Adams, Lipid Res., 8, 245 (1967).
- ⁷ R. P. Poincelot, P. G. Millar et al., Nature, 221, 256 (1969).
- ⁸ J. M. P. M. Borggreven, F. J. M. Daemen, S. L. Bonting, Biochim. et biophys. acta, 202, 374 (1970).
- ⁹ R. P. Poincelot, E. W. Abrahamson, Biochemistry, 9, 1820 (1970).
- ¹⁰ H. E. May, P. B. McCay, J. Biol. Chem., 243, 9, 2288 (1968).
- ¹¹ R. C. McKnight, F. E. Hunter, J. Biol. Chem., 241, 12, 2757 (1966).
- ¹² Ю. П. Козлов, В. С. Данилов и др., Свободнорадика. окисление липидов в биол. мембранах, М., 1972.
- ¹³ E. D. Wills, Biochem. J., 113, 2, 315 (1969).
- ¹⁴ E. D. Wills, Biochem. J., 123, 5, 983 (1971).
- ¹⁵ А. В. Карякин, Усп. хим., 30, 8, 1050 (1961).
- ¹⁶ G. E. Hall, D. G. Roberts, J. Chem. Soc. B, 11, 1109 (1966).
- ¹⁷ E. Kimura, M. Okubo et al., Med. J. Osaka City, 4, 107 (1957).
- ¹⁸ J. Folch, M. Lees et al., J. Biol. Chem., 191, 2, 833 (1951).
- ¹⁹ J. L. Bolland, H. P. Koch, J. Chem. Soc., 7, 445 (1945).
- ²⁰ В. С. Данилов, В. Е. Каган и др., Изв. АН СССР, сер. биол., 88, 4 (1972).
- ²¹ Л. Я. Гендель, И. Б. Федорович и др., ДАН, 205, № 6, 1469 (1972).