

Е. Е. ФЕСЕНКО, А. И. ЖАВОРОНОК, Н. К. ФЕСЕНКО

ИСКУССТВЕННАЯ ФОСФОЛИПИДНАЯ МЕМБРАНА С РОДОПСИНОМ КАК МОДЕЛЬ ФОТОРЕЦЕПТОРА

(Представлено академиком Ю. А. Овчинниковым 30 III 1972)

Несмотря на относительно большое число работ, выполненных в последнее время в области биофизики и биохимии фоторецепции, мы до сих пор еще не знаем механизма процесса, связывающего фотолиз родопсина с электрическим ответом фоторецептора. Чтобы установить эту связь, необходимо ответить на три вопроса: 1) какая стадия темновых превращений родопсина является триггерной в запуске электрического ответа фоторецептора; 2) какой процесс приводит к изменению проницаемости мембраны: собственно перестройка молекулы родопсина или вторичный процесс, например активация, или ингибирование одного из ферментов сетчатки, выделение медиатора и т. д.; 3) каков конкретный механизм изменения проницаемости фоторецепторной мембраны, приводящего к генерации электрического сигнала.

Ответ на второй вопрос дает, казалось бы, работа Битенского и сотрудников (¹), в которой было показано, что наружные сегменты фоторецепторов содержат чрезвычайно активную аденилциклазу, превращающую АТФ в циклический 3', 5'-АМФ (цАМФ). Активность аденилциклазы примерно в семь раз уменьшается при обесцвечивании родопсина. По мнению авторов, именно этот процесс приводит к изменению проницаемости мембраны фоторецептора.

При постановке описываемых ниже экспериментов мы исходили из того, что существенная информация по всем трем затронутым вопросам может быть получена, если удастся создать искусственную фосфолипидную мембрану, содержащую зрительный пигмент и обладающую фоточувствительностью.

В качестве исходного раствора для формирования мембраны в наших экспериментах использовался раствор фосфолипидов мозга и окисленного холестерина в декане в соотношении 3:1 (по весу). Фрагменты мембран дисков наружных сегментов, использовавшиеся для модификации искусственной мембраны, получали с помощью ультразвуковой обработки суспензии наружных сегментов.

Наружные сегменты палочек быка получали по методике, описанной в работе (²). Мембраны с родопсином были цветными и имели сопротивление на 1—2 порядка меньше сопротивления бимолекулярных мембран, не содержащих родопсина. Существенным для наблюдения фотоэффекта было использование низких температур, позволившее замедлить процессы изменения проницаемости мембраны (специальные эксперименты показали, что мембрана в водно-глицериновых растворах стабильна вплоть до температуры -40°).

На рис. 1 приведена типичная кривая изменения сопротивления мембраны с родопсином при температуре 1° в ответ на включение света. Как видно из рисунка, после латентного периода в 80 сек. (в разных экспериментах эта величина варьировала от 70 до 150 сек.) сопротивление мембраны, составлявшее первоначально 10^7 ом/см², увеличивается до 10^8 ом/см². При $4-7^{\circ}$ в некоторых случаях нам удалось наблюдать после первоначаль-

ного роста сопротивления его падение на 2—3 порядка по отношению к сопротивлению мембраны с незасвеченным родопсином. В то же время при комнатной температуре наблюдалось незначительное изменение сопротивления. Возможно, это объясняется тем, что изменения сопротивления при этой температуре происходят за время, меньшее постоянной времени регистрирующей схемы, составлявшей около 5 сек.

Увеличение сопротивления искусственной мембраны в ответ на включение света коррелирует с результатами электрофизиологических экспериментов ⁽⁴⁾, в которых возрастание сопротивления мембраны палочки наблюдалось при освещении отдельного фоторецептора. Поскольку зрительный пигмент является компонентом мембран дисков наружного сегмента, такую корреляцию можно объяснить лишь в том случае, если мембраны дисков являются частью плазматической мембраны сегмента.

Сравнение наших данных с электрофизиологическими данными ^(5, 6), свидетельствующими о влиянии концентрации Na^+ во внешней среде на ответ фоторецептора, позволяет предположить, что в первый момент после засветки происходит уменьшение проницаемости для Na^+ . Механизм этого явления в настоящее время не ясен.

Что касается последующего падения сопротивления мембраны, то уместно высказать некоторые соображения о механизме этого эффекта, базирующиеся на литературных и наших собственных экспериментальных данных. Бонтинг в одной из своих работ ⁽⁷⁾ предположил, что основным результатом фотореакции родопсина может быть увеличение проницаемости мембраны для Na^+ и K^+ вследствие блокирования ретиналем ϵ -аминогрупп лизина. Это предположение основывалось в свою очередь на наблюдавшемся экспериментально увеличении проницаемости мембран эритроцитов при блокировании ϵ -аминогрупп белков фтординитробензолом ⁽⁸⁾. Представляло интерес выяснить, как действует фтординитробензол в нашем случае на искусственные мембраны с засвеченным и незасвеченным родопсином. Проведенные нами исследования показали следующее. 1. Фтординитробензол в концентрации 3 мМ уменьшает сопротивление мембраны без родопсина и мембраны с незасвеченным родопсином не более чем в 5 раз. Этот эффект связан, по-видимому, с блокированием аминогрупп фосфолипидов. 2. После освещения мембраны с родопсином при наличии в среде фтординитробензола в концентрации $2 \div 3$ мМ сопротивление мембраны через 6 мин. падает на ~ 2 порядка. Задержка в падении сопротивления обусловлена, вероятно, самим зрительным пигментом, так как сопротивление мембраны с засвеченным родопсином падает сразу после добавления фтординитробензола (если между освещением мембраны и добавлением фтординитробензола прошло более 6 мин.).

Эти результаты не противоречат, на наш взгляд, предположению Бонтинга ⁽⁷⁾ и свидетельствуют о том, что падение сопротивления, наблюдавшееся нами в ряде случаев, может быть вызвано экспонированием на мембране блокированных ретиналем ϵ -аминогрупп.

Какой же из продуктов фотопревращения родопсина ответствен за изменение сопротивления мембраны и генерацию электрического ответа? Как уже упоминалось выше, латентный период при 1° составлял примерно 80 сек. Сравнение этой цифры с временем полупревращения метародопсин I — метародопсин II в различных условиях ⁽⁹⁻¹¹⁾ показывает, что увеличение сопротивления происходит после образования метародопсина II. Возможно, за образованием метародопсина II, наблюдаемого спектрально, следует запаздывающая по отношению к оптическому изменению

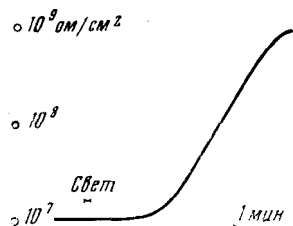


Рис. 1. Изменение сопротивления искусственной фосфолипидной мембраны с родопсином в ответ на включение света. Температура 1°

конформационная перестройка опсина, индуцирующая в свою очередь перестройку структуры липидов в окрестности молекулы белка.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что изменение проницаемости фоторецепторной мембраны может быть обусловлено самим зрительным пигментом, а не изменением активности аденилциклазы и последующим изменением концентрации цАМФ, как это предположил Битенский и др. (¹). Какова в таком случае физиологическая роль ингибирования аденилциклазы распавшимся родопсином? Учитывая, что количество распавшегося родопсина определяет чувствительность глаза (логарифм порога пропорционален фракции распавшихся молекул зрительного пигмента (¹², ¹³)), мы предположили, что ингибирование аденилциклазы является ключевым процессом в «фотохимической» адаптации глаза. Каковы возможные механизмы такой адаптации? Прежде всего следует отметить, что понижение концентрации цАМФ в результате ингибирования аденилциклазы, ведущее к замедлению обменных процессов, может вызывать снижение эффективности работы натриевого насоса, перераспределение катионов между наружным сегментом и средой и, как следствие, уменьшение электрического ответа сегмента.

Второй возможный механизм адаптации, который не может быть исключен из рассмотрения, — снижение эффективности синаптической передачи вследствие ингибирования аденилциклазы. В ряде работ, выполненных на нервно-мышечном синапсе позвоночных (^{14–17}), были получены указания на то, что добавление в раствор адреналина и бромида прозерина, ускоряющих синтез цАМФ, жирорастворимого аналога цАМФ или веществ, блокирующих фосфодиэстеразу, гидролизующую цАМФ (теофиллина, кофеина и т. д.), приводит к облегчению высвобождения ацетилхолина из пресинаптического окончания. Это подтверждалось тем, что теофиллин и жирорастворимый аналог цАМФ значительно увеличивали частоту, но не амплитуду миниатюрных потенциалов концевой пластинки. Добавление этих веществ увеличивало также число «квантов» медиатора, высвобождающихся в ответ на стимуляцию нерва (¹⁷). Было высказано предположение, что этот эффект цАМФ связан с ускорением гликолиза и (или) с увеличением концентрации ионов Ca^{2+} (¹⁷, ¹⁸). В свете этих данных механизм «фотохимической» адаптации может заключаться в понижении концентрации цАМФ при фотолизе родопсина и затруднении высвобождения «квантов» медиатора из пресинаптического окончания фоторецепторов.

Согласно Бызову (¹⁹) «фотохимическая» адаптация проявляется только тогда, когда новые условия освещения значительно отличаются от предыдущих, к которым глаз успел адаптироваться. В опытах Рапсона (¹²) «фотохимическая» адаптация наблюдалась лишь в том случае, если под действием света распадалось более 1% родопсина. В рамках предложенной гипотезы эти факты можно объяснить, по-видимому, тем, что количество молекул родопсина в наружном сегменте значительно превышает количество молекул аденилциклазы.

В заключение следует отметить, что аналогичную роль аденилциклаза, возможно, играет и в других рецепторных системах.

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пушкино-на-Оке

Поступило
3 III 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. W. Bitenski, R. E. Gorman, W. N. Miller, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 68, 561 (1971). ² M. Takagi, Ann. Rep. Biol. Works, 19, 107 (1965). ³ F. E. Erhard, S. E. Ostroy, E. W. Abrahamson, Biochim. et biophys. acta, 112, 256 (1966). ⁴ J. Toyoda, H. Nosaki, T. Tomita, Vision Res., 9, 453 (1969). ⁵ T. Furukawa, I. Hanawa, Japan J. Physiol., 5, 289 (1955). ⁶ A. J. Sillman,

H. Ito, T. Tomita, *Vision Res.*, **9**, 1443 (1969). ⁷ F. J. M. Daemen, S. L. Bonting, *Biochim. et biophys. acta*, **183**, 90 (1969). ⁸ H. C. Berg, J. M. Daemen, D. C. Marfey, *Science*, **150**, 64 (1965). ⁹ R. G. Matthews, R. Hubbard et al., *J. Gen. Physiol.*, **47**, 215 (1963). ¹⁰ D. C. Pratt, R. Livingston, K. H. Grellman, *Photochem. Photobiol.*, **3**, 121 (1964). ¹¹ E. W. Abrahamson, J. Marquisee et al., *Zs. Electrochem.*, **64**, 177 (1960). ¹² W. A. H. Rushton, *J. Physiol.*, **156**, 193 (1961). ¹³ J. E. Dowling, *J. Gen. Physiol.*, **46**, 1287 (1963). ¹⁴ B. McBreckenridge, J. H. Burn, R. M. Matchinsky, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **57**, 1893 (1967). ¹⁵ D. Elmquist, D. S. Feldman, *J. Physiol. (London)*, **181**, 487 (1965). ¹⁶ W. W. Hofman, *Am. J. Physiol.*, **216**, 621 (1969). ¹⁷ A. L. Goldberg, J. J. Singer, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **64**, 134 (1969). ¹⁸ H. Rasmussen, *Science*, **170**, 404 (1970). ¹⁹ А. Л. Бызов, Электрофизиологическое исследование сетчатки, «Наука», 1966.