

В. Л. БОРОВЯГИН, Т. А. ИВАННА, Д. А. МОШКОВ

**ИССЛЕДОВАНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ
МЕЖДИСКОВЫХ ПРОСТРАНСТВ И ФОТОРЕЦЕПТОРНЫХ
МЕМБРАН СЕТЧАТКИ ПОЗВОНОЧНЫХ ПРИ АЛЬДЕГИДНЫХ
ФИКСАЦИЯХ, ДЕЛИПИДИЗАЦИИ И ОБРАБОТКЕ ПРОНАЗОЙ**

(Представлено академиком Г. М. Франком 31 III 1972)

Если общая субмикроскопическая организация палочек и колбочек сетчатки позвоночных изучена достаточно полно (¹⁻³), в то время как тонкое строение цитоплазмы их наружных сегментов остается невыясненным, а молекулярная структура фоторецепторных мембран (ФМ) в настоящее время интенсивно исследуется (⁴⁻⁷). Количественное содержание родопсина, определяемое в ФМ одного и того же объекта, в работах различных авторов (⁵⁻⁸) сильно различается. Это может быть связано с различной степенью «очистки» фракций ФМ от молекулярных комплексов, локализованных в цитоплазме междисковых пространств (МП) наружных сегментов. Так, например, в этих участках цитоплазмы рецепторов лягушки нами (⁹) обнаружена локализация АХЭазы. В то же время известно, что МП в наружных сегментах всех фоторецепторов позвоночных, фиксированных растворами OSO_4 или KMnO_4 , выявляются как пустоты, не содержащие каких-либо структур.

В связи с этим основной задачей настоящего сообщения является описание структур МП палочек и колбочек, выявляемых при различных условиях обработки. Кроме того, нами изучалось влияние удаления липидных и белковых компонентов ФМ на сохранность их трехслойной структуры.

В опытах использовались целые сетчатки лягушек и белых мышей, а также суспензии изолированных (¹⁰) наружных сегментов палочек лягушки. Материал фиксировали при $18-20^\circ$ 0,5, 1% глютаральдегидом или параформальдегидом на изотоническом фосфатном буфере или на воде, а в некоторых случаях с дофиксацией в 1% OSO_4 . Препараты обезживляли в спирте или ацетоне и заливали в смолу «Эпон». В отдельных экспериментах материал перед или после альдегидных фиксаций обрабатывали: растворами 2-8 М мочевины при 20° ; ацетонами (¹¹); смесью хлороформ — метанол — HCl (¹²); инкубацией в растворе Рингера при $35-80^\circ$ с антиокислителем в атмосфере аргона; инкубацией в растворе Рингера с проназой при концентрации в 250 мкг на 1 мг белка препарата при 37° в течение 6 час. Ультратонкие срезы сетчаток и суспензий, залитых в «Эпон», прокрашивали водным раствором уранилацетата и цитратом свинца, а в случаях высушенных при 20° и незалитых сетчаток срезы негативно красили 2% водным раствором молибденовокислого аммония или 2% раствором уранилацетата в 100° спирте. Объекты просматривали в электронном микроскопе JEM-7A при напряжении 80 кВ с диафрагмой объектива в 25-30 м.

В сетчатках, фиксированных только альдегидами и залитых в «Эпон», наружные сегменты рецепторов представлены ламеллярными структурами: светлые (гидрофобные) области ФМ, чередуются с постоянным периодом с интенсивно прокрашенными внутридисковыми (узкими) и междисковыми (более широкими) ламеллами (рис. 1 А, Д). В наружных сег-

ментах колбочек прокрашиваемые внутридисковые пространства несколько шире, чем в палочках. Если суспензии сегментов или целые сетчатки нагреть до 35–45°, а затем зафиксировать глутаральдегидом, то МП рецепторов, как и в случае осмиевых фиксаций, видимых структур не содержат: происходит тепловая денатурация локализованных здесь молекулярных комплексов (рис. 1Б). Обработка сетчатки или суспензий рецепторов 2–5 М мочевиной с последующей фиксацией глутаральдегидом также сопровождается полным разрушением структур МП. От разрушения должны быть защищены только белковые и гликопротеидные комплексы, структурно ассоциированные с липидными компонентами ФМ. О том, что вещества меж- и внутридисковых пространств фоторецепторов могут образовывать «жесткую» систему, сохраняющую постоянный интервал между фоторецепторными дисками и между мембранами внутри каждого диска, могут свидетельствовать картины негативно окрашенных ультратонких срезов нефиксированной, высушенной и незалитой в смолу сетчатки. При резке сухой нефиксированной сетчатки на поверхность спиртового раствора уранилацетата удавалось получать хорошую сохранность фоторецепторных дисков наружных сегментов. В этом случае их структура также состояла из чередующихся светлых (гидрофобные области ФМ) и прокрашенных внутридисковых (узких) и междисковых (более широких) ламелл (рис. 1В). Однако при резке сухой сетчатки на поверхность водных растворов негативных красителей во многих областях срезов наблюдалось образование ламеллярных структур с периодом 40–45 Å. Эти структуры соответствуют скорее всего бимолекулярным липидным слоям, образование которых вызвано резкой денатурацией молекулярных комплексов меж- и внутридисковых пространств, возникающей при регидратации ранее обезвоженных структур. Такие картины можно наблюдать только в наружных сегментах палочек. В колбочках структуры наружных сегментов удовлетворительно сохраняются при обработке нефиксированной сетчатки ацетонами и даже системой ацетон — хлороформ — метанол — HCl при последующей заливке в «Эпон». В палочках такие обработки, как правило, приводят к значительному разрушению структуры их наружных сегментов. Лучшая сохранность МП наружных сегментов колбочек наблюдается и при альдегидных фиксациях и последующей обработке органическими растворителями. Однако в этих условиях обработки структура наружных сегментов палочек также часто имеет почти 100% сохранность (рис. 1В'). Прямая обработка нефиксированной сетчатки системой: хлороформ — метанол — HCl сопровождается значительным разрушением наружных сегментов колбочек и почти полным разрушением этих структур в палочках.

Анализируя экспериментальный материал, можно утверждать, что сохранность ФМ при обработке органическими растворителями обеспечивается в основном стабилизирующим влиянием молекулярных компонентов междисковых пространств. Трехслойная структура ФМ, выявляемая после разрушения весьма нестабильных в структурном отношении молекулярных компонентов внутри- и междисковых пространств, соответствует гидрофобной (светлой) жирнокислотной области бислоя липидов ⁽¹³⁾, в полярных областях которого локализован родопсин. Сохранность белкового компонента светочувствительного пигмента обеспечивается его структурным взаимодействием с липидами. Во многих случаях (рис. 1Г) и особенно при альдегидных фиксациях (рис. 1Б) в гидрофильных областях трехслойной структуры ФМ можно видеть регулярно расположенные темные гранулы, которые могут соответствовать локализации родопсинового комплекса в бимолекулярном слое липидов ^(5, 7). Инкубация сетчатки при 80° с последующей фиксацией при той же температуре глутаральдегидом приводит к полному разрушению комплексов внутри- и междисковых пространств как колбочек, так и палочек. При этом полностью сохраняется трехслойная структура ФМ, в которой выявляется четкая асимметрия (ин-

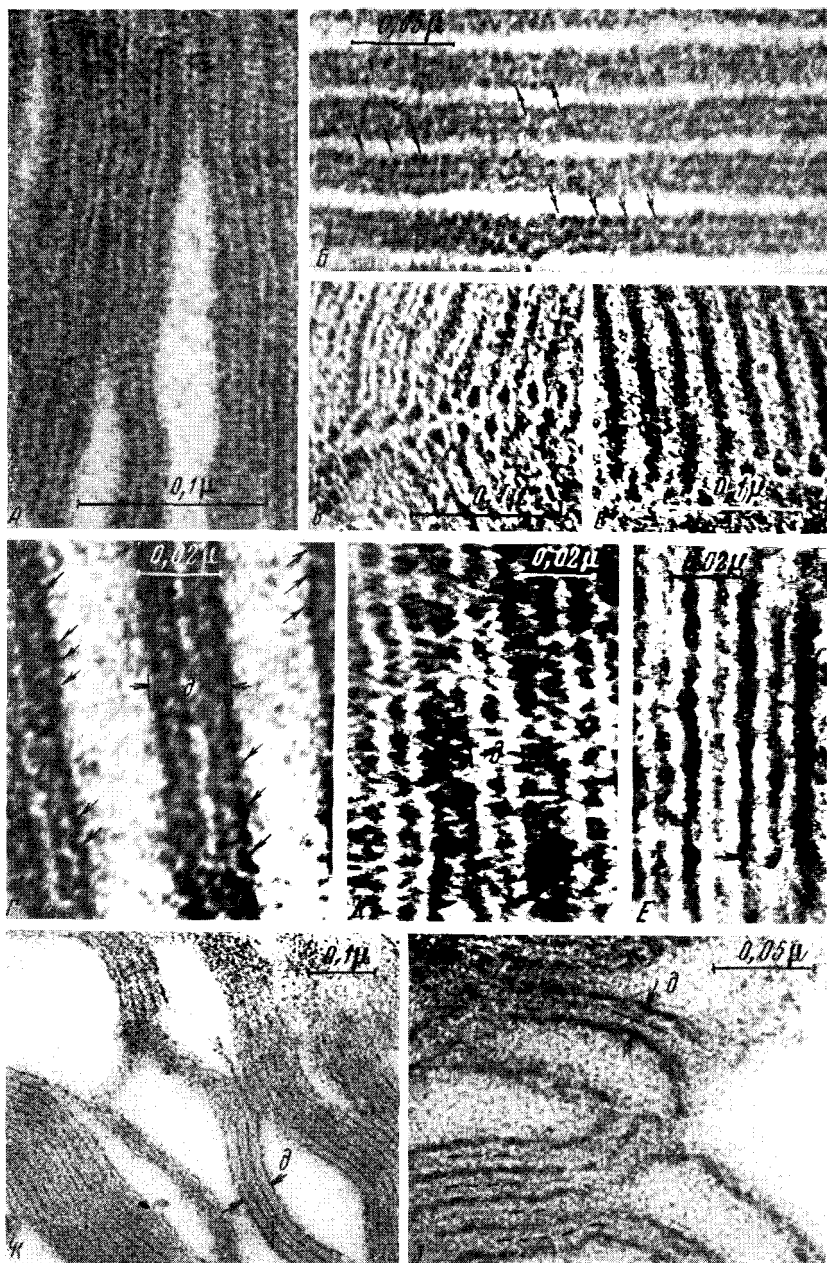


Рис. 1. Участки поперечного сечения фоторецепторных мембран сетчатки. А — колбочка лягушки; фиксация глутаральдегидом, заливка в «Эпон», темные участки — внутри- (узкие) и междисковые (широкие) пространства; В — палочка лягушки; нагревание (40°) и фиксации глутаральдегидом, заливка в «Эпон», гидрофильные зоны ФМ содержат темные гранулы (стрелки); В' — палочка лягушки; нефиксированная, высушенная, незалитая сетчатка резалась на поверхности раствора 2% уранилacetата в 100% спирте; видны меж- и внутридисковые (темные) участки; В'' — палочка лягушки; фиксация глутаральдегидом, обработка ацетон — хлороформ метанол — HCl, заливка в «Эпон»; Г, Д, Е — палочка лягушки; фиксация осмий + глутаральдегид (Г), глутаральдегид (Д), глутаральдегид при 80°C (Е), заливка в «Эпон»; Ж, З — палочка лягушки, инкубация с проназой (250 мг на 1 мг белка препарата), фиксация глутаральдегидом, заливка в «Эпон»; пунктиром обозначены двойные внутридисковые поверхности ФМ (З), δ — сечение фоторецепторного диска

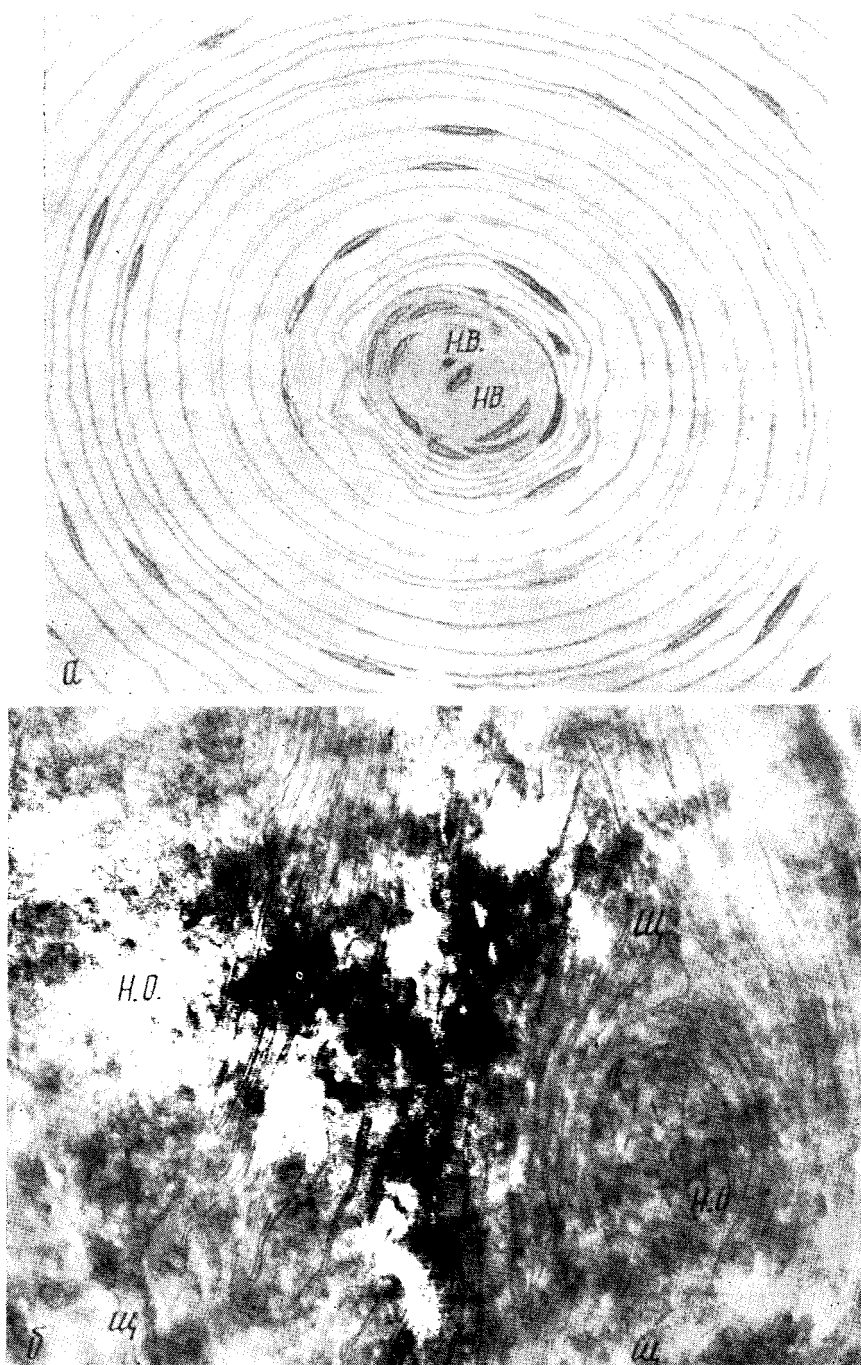


Рис. 1. Поперечное сечение в средней части тельца Начини. *а* — 300 $\times$, в срез попали 2 поперечно перерезанных нервных волокна (н.в.); *б* — 1400 $\times$. Видны окончания 2 нервных волокон (н.о.), окруженных пластинчатыми слоями клеток внутренней колбы. *щ* — «щели», рассекающие слои внутренней колбы в направлении обоих нервных окончаний

тенсивнее прокрашена гидрофильная область со стороны МП), менее выражена гранулярность темных слоев и значительно увеличено поперечное сечение светлой гидрофобной области мембраны (рис. 1Е). Картины поперечного сечения ФМ после инкубации сетчатки или суспензии палочек лягушки с проназой при последующей отмывке и фиксации глютаральдегидом напоминают картины высокотемпературной фиксации. Вещества внутри- и междисковых пространств разрушены, а трехслойные структуры ФМ, обладающие более выраженной асимметрией, часто образуют плотно упакованные миелопоподобные структуры (рис. 1Ж, 3). Внутридисковые вдвоенные поверхности ФМ образуют едва различимую линию (на рис.

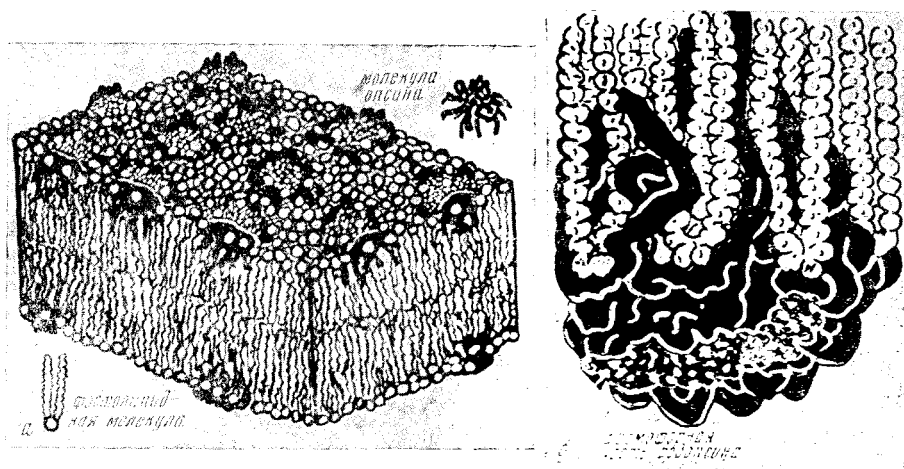


Рис. 2. Объемная модель молекулярной организации участка ФМ (а) и родопсिन-ового комплекса (б), состоящего из молекул фосфолипидов (светлое), белковой молекулы (темное), хромофорной группы (пятнистое)

13 эта линия обозначена пунктиром). Если ФМ после протеолиза обработать ацетонами, то их структуры полностью разрушаются. При использовании комбинированной фиксации альдегидами и осмием (рис. 1Г), только осмием и только альдегидами (рис. 1Б) заметной асимметрии в трехслойной структуре ФМ выявить не удастся. О симметричном расположении молекул родопсина по обе стороны ФМ можно сделать вывод и по данным рентгеноструктурного анализа (^{5,7}). Для объяснения асимметрии трехслойной структуры, выявляемой при значительной денатурации компонентов внутри- и междисковых пространств цитоплазмы рецепторов, можно предположить, что со стороны МП расположены какие-то комплексы (олиго- или полисахаридные), которые предохраняют от гидролиза или температурной денатурации часть родопсина, находящегося в гидрофильном окружении (рис. 2). Со стороны же внутридискового пространства эта часть родопсина разрушается, создавая асимметричную структуру. Не исключено, что такими комплексами может быть система восстановления родопсина, локализованная у поверхности ФМ со стороны МП (¹⁴). Если это так, то ФМ может обладать асимметрией не только в структурном, но и в функциональном отношении: родопсинный комплекс, расположенный со стороны МП, после фотолиза восстанавливается, а молекулы родопсина на противоположной стороне мембраны (со стороны внутридискового пространства) могут потенциально обладать регенерационной способностью, но не являются триггером фоторецепторного акта. В качестве частичного обоснования таких рассуждений могут служить экспериментальные данные (¹⁵), в которых было показано, что при освещении сетчатки выявляется активизация SH-групп только со стороны МП, а также модельные эксперименты (¹⁶).

На рис. 2а представлена схема молекулярной организации ФМ палочки, включающая бислои фосфолипидных молекул и родопсиновый комплекс (рис. 2б), но не предусматривающая других нелипидных компонентов, локализованных по обе стороны мембраны. Молекула родопсина может быть гетерогенной: состоять из нескольких субъединиц, каждая из которых может обладать специфическим «набором» фосфолипидных молекул. Предварительные данные о действии гиалуронидазы на мембраны фоторецепторных дисков, полученные в последнее время в нашей лаборатории, подтверждают асимметричную локализацию родопсинового комплекса со стороны МП.

Состав и вклад в структурную стабилизацию ФМ компонентов МП в колбочках может отличаться от таковых в палочках. В качестве предварительного вывода можно предположить, что в ФМ колбочек должно преобладать полярное взаимодействие между бислоем липидов и белковой частью пигмента. Кроме того, можно высказать предположение, что между краями фоторецепторных дисков и поверхностной мембраной наружного сегмента палочек могут существовать структурные связи, осуществляющиеся через молекулярные комплексы белковой и (или) мукополисахаридной природы.

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пушино

Поступило
21 III 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ F. S. Sjostrand, In: *The Structure of the Eye*, N. Y.—London, 1961, p. 151.
- ² В. Л. Боровягин, *Биофизика*, 7, 2, 151 (1962).
- ³ В. Л. Боровягин, *Биофизика*, 7, 6, 734 (1962).
- ⁴ G. Vanderkooi, M. Sundaralingam, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 67, 1, 233 (1970).
- ⁵ A. E. Blaurock, M. Wilkins, XXV Intern. Congr. Physiol. Sci., Munich, 8, 243 (1971).
- ⁶ В. Л. Боровягин, М. А. Островский, И. Б. Федорович, *Биофизика*, 16, 350 (1971).
- ⁷ A. E. Blaurock, M. Wilkins, *Nature*, 223, 906 (1969).
- ⁸ Р. Н. Эттингер, И. А. Остапенко, *Усп. совр. биол.*, 72, 2/5, 200 (1971).
- ⁹ И. В. Галущенко, В. Л. Боровягин, М. А. Островский, *ДАН*, 206, № 2 (1972).
- ¹⁰ И. Б. Федорович, М. А. Островский, *Биофизика*, 13, 3, 449 (1968).
- ¹¹ S. Fleisher, B. Fleisher, W. Stoeckenius, *Federat. Proc.*, 24, 2, 296 (1965).
- ¹² L. Napolitano, F. Le Baron, S. Scaletti, *J. Cell. Biol.*, 34, 3, 817 (1967).
- ¹³ В. Л. Боровягин, Т. А. Иванникова, *ДАН*, 207, № 4 (1972).
- ¹⁴ I. B. Dowling, *Molecular Organization and Biological Function*, London, 1967, p. 186.
- ¹⁵ S. E. Patel, *Brit. J. Physiol. Optics*, 24, 1, 61 (1967).
- ¹⁶ H. Tien, S. P. Verma, *Nature*, 227, 5264, 1232 (1970).