

*На правах рукописи*

**Кореньяк**

**Дарья Александровна**

**РЕАКЦИИ ЦИКЛА ЗРИТЕЛЬНОГО ПИГМЕНТА В  
ПАЛОЧКАХ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ АМФИБИЙ И  
МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

03.03.01 – физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата биологических наук**

**Санкт-Петербург**

**2010**

**Работа выполнена в лаборатории эволюции органов чувств (заведующий – доктор биологических наук В.И. Говардовский) Учреждения Российской академии наук Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (Санкт-Петербург).**

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук В.И. Говардовский

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор Е.В. Розенгарт  
кандидат биологических наук Т.Б. Фельдман

**Ведущее учреждение:**

Учреждение Российской академии наук Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН (Москва)

Защита состоится **11 января 2011 года в 11 часов** на заседании диссертационного совета Д 002.127.01 при Учреждении Российской академии наук Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, по адресу:

*194223 Санкт-Петербург, пр. М. Горького, д. 44, конференц-зал.*

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

Автореферат разослан **8 декабря 2010**

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор биологических наук, профессор

**Марина Николаевна Маслова**

## Общая характеристика работы

### *Актуальность проблемы*

Процессы восприятия света начинаются с возбуждения фоторецепторов сетчатки – палочек и колбочек. В наружных сегментах этих клеток находятся зрительные пигменты, фотоактивация которых запускает сигнальный каскад. Зрительные пигменты принадлежат к большому семейству рецепторов, передающих сигнал через ГТФ-связывающие белки (обзоры: Costanzi et al., 2009; Rosenbaum et al., 2009). Рецепторы этого семейства играют ключевую роль в механизмах трансдукции в процессах сенсорной, гормональной и синаптической рецепции. Наиболее изученным представителем этого семейства является зрительный пигмент палочек – родопсин.

Поглощение кванта света молекулой родопсина вызывает изомеризацию ее хромофорной группы 11-*цис*-ретинала в *транс*-форму (Hubbard & Kropf, 1958; Wald, 1968). Фотоизомеризация хромофора инициирует серию конформационных изменений в белковой части молекулы (опсине), приводящих к образованию каталитически активной формы пигмента (метародопсина II), которая запускает каскад фототрансдукции (Bennett et al., 1982; Emeis et al., 1982; Liebman et al., 1987; Knowles & Pepe, 1988). Дальнейшие процессы приводят к разрыву ковалентной связи *транс*-ретинала с опсином и освобождению ретинала из хромофорного центра, т.е. происходит фотолиз пигмента.

Для восстановления способности родопсина сигнализировать о получении следующего кванта света необходима обратная конверсия *транс*-ретинала в 11-*цис*-ретиналь; последний затем рекомбинирует с опсином, регенерируя родопсин. Превращение *транс*-ретинала в 11-*цис* хромофор происходит в результате цепочки биохимических реакций – зрительного цикла. Реакции зрительного цикла палочек протекают частично в самих фоторецепторах, а частично – в клетках пигментного эпителия сетчатки

глаза, куда хромофор переносится после фотолиза (обзоры: Шуколюков, 1999; Говардовский и др., 2004; Lamb & Pugh, 2004).

Таким образом, распад долгоживущих продуктов фотолиза (метародопсинов) необходим для того, чтобы освободить хромофорный сайт на опсине и сделать его доступным для связывания новой молекулы 11-*цис*-ретиная. Кроме того, освободившийся *транс*-ретинаял служит субстратом для последующих стадий зрительного цикла, в ходе которых синтезируется «темновой» хромофор (11-*цис*-ретинаял). Поэтому процессы фотолиза, происходящие в наружном сегменте фоторецептора, являются одной из ключевых стадий зрительного цикла.

Кроме биохимического пути через пигментный эпителий, восстановление «темнового» родопсина могло бы происходить непосредственно в палочках сетчатки посредством фоторегенерации, как это делается у некоторых беспозвоночных (обзор: Шуколюков, 1999). Фоторегенерация вызывается обратной *транс-цис* изомеризацией хромофора в молекуле метародопсина при поглощении кванта света.

Врожденные или возрастные дефекты зрительного цикла препятствуют регенерации родопсина и нарушают процесс восстановления чувствительности фоторецепторов при переходе от высоких освещенностей к низким (темновую адаптацию), что приводит к развитию различных патологических состояний, вплоть до потери зрения (обзоры: Saari, 2000; Baehr et al., 2003; Kuksa et al., 2003; Thompson & Gal, 2003; Lamb & Pugh, 2004; Travis et al., 2007; Mustafi et al., 2009). По этой причине процессы фотолиза и регенерации родопсина привлекают в последнее время пристальное внимание исследователей. Однако большинство работ по изучению зрительного цикла выполнено в условиях *in vitro* на суспензии фоторецепторных мембран и экстрактах белков цикла. Очевидно, что такой подход не позволяет охарактеризовать реальную ситуацию в интактных фоторецепторах. Это диктует необходимость изучения процессов фотолиза и регенерации зрительных пигментов в условиях *in vivo*.

**Цель работы** состояла в изучении реакций зрительного цикла и возможности фоторегенерации родопсина в интактных палочках амфибий и млекопитающих в условиях, приближенных к физиологическим.

### **Задачи работы**

1. Исследовать состав продуктов фотолиза родопсина и кинетику их взаимопревращений в интактных палочках амфибий (лягушка) и млекопитающих (крыса) при температурах, физиологических для каждого животного, и сопоставить полученные результаты с имеющимися в литературе физиологическими данными по темновой адаптации.
2. Провести сравнительное исследование влияния температуры на кинетику переходов между долгоживущими продуктами в интактных палочках амфибий (лягушка) и млекопитающих (крыса) и оценить, насколько результаты экспериментов *in vitro* соответствуют ситуации *in vivo*.
3. Исследовать латеральную (поступательную) диффузию молекул родопсина в фоторецепторной мембране и поведение долгоживущих продуктов фотолиза в ходе зрительного цикла в интактных палочках амфибий (лягушка, саламандра).
4. Оценить эффективность фоторегенерации родопсина в интактных палочках амфибий (лягушка) и млекопитающих (крыса) и возможный вклад этого процесса в восстановление «темнового» пигмента.

### **Научная новизна результатов исследования**

В данной работе впервые проведено сравнительное исследование реакций зрительного цикла в интактных палочках амфибий и млекопитающих в условиях, приближенных к физиологическим. Это позволило сопоставить ход процессов фотолиза родопсина в интактных клетках с результатами, полученными в экспериментах в условиях *in vitro*, а также оценить роль медленных стадий фотолиза в процессе темновой адаптации. Было показано, что процессы фотолиза протекают по-разному в

интактной клетке и в детергентном экстракте родопсина. Сопоставление полученных результатов с физиологическими данными по темновой адаптации показало, что кинетика медленных стадий фотолиза является одним из основных факторов, определяющих скорость зрительного цикла и восстановление чувствительности палочек после освещения.

Исследование латеральной диффузии пигментов в фоторецепторной мембране интактных палочек позволило охарактеризовать поведение продуктов фотолиза родопсина в ходе зрительного цикла, что важно для понимания работы цикла.

Кроме того, в работе впервые представлены результаты по фоторегенерации родопсина из метародопсина II в интактных палочках. Полученные данные позволяют говорить о существовании альтернативного механизма восстановления «темнового» родопсина, который может проявлять себя в экспериментальных условиях освещения.

### ***Основные положения, выносимые на защиту***

1. Качественно сходный ход процессов фотолиза родопсина в интактных палочках лягушки и крысы сопровождается отличиями в кинетике взаимопревращений долгоживущих продуктов.
2. Процессы фотолиза родопсина лягушки и крысы ускоряются с повышением температуры, однако в палочках крысы они протекают медленнее, чем у лягушки, даже при соответствующих физиологических температурах (17 – 25 °С для лягушки и 37 °С для крысы).
3. Кинетика процессов фотолиза в интактных палочках лягушки и крысы является одним из факторов, определяющих скорость зрительного цикла и темновую адаптацию палочек у этих животных.
4. Поведение долгоживущих продуктов фотолиза противоречит популярной сейчас «туннельной гипотезе», согласно которой диссоциация ретиноидов от опсина возможна только при поступлении в наружный сегмент фоторецептора 11-*цис*-ретинала и регенерации «темнового» родопсина.

5. Фоторегенерация родопсина из метародопсина II может быть альтернативой биохимическому зрительному циклу и вносить вклад в восстановление «темнового» родопсина, но, главным образом, в экспериментальных условиях освещения.

### ***Теоретическая и практическая значимость работы***

Проведенное исследование позволило установить ход процессов фотолиза в интактных палочках сетчатки при физиологической температуре; охарактеризовать поведение долгоживущих продуктов фотолиза родопсина; оценить эффективность фоторегенерации родопсина в условиях, приближенных к физиологическим.

В целом, полученные результаты важны для полного понимания молекулярных механизмов темновой адаптации, функционирующих в нормальных условиях и при различных патологических состояниях.

### ***Апробация работы***

Основные материалы диссертации были доложены и обсуждены на следующих научных конференциях:

- VII Международном симпозиуме «Visionarium» (Твярминне, Финляндия, 2008);
- VIII Международном симпозиуме «Visionarium» (Твярминне, Финляндия, 2009);
- IX Международном симпозиуме «Visionarium» (Твярминне, Финляндия, 2010).

### ***Публикации результатов исследования***

По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ (5 тезисов докладов и 2 статьи в рецензируемых журналах).

## **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 154 страницах и состоит из введения, четырех глав (обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения результатов), выводов и списка литературы (включает 244 источника). Диссертация иллюстрирована 48 рисунками и 3 таблицами.

## **Содержание работы**

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Исследования проводились на палочках сетчаток травяных лягушек (*Rana temporaria*), мексиканских саламандр (*Ambystoma mexicanum*) и белых крыс линии Wistar. Животных адаптировали к темноте в течение 12 часов перед началом эксперимента. Умерщвление животных проводили при тусклом красном свете; последующие манипуляции по извлечению сетчатки из глаза – под контролем инфракрасной телевизионной системы.

Выделенную сетчатку помещали в физиологический солевой раствор, состав которого зависел от вида животного. Базовый раствор для амфибий (лягушек и саламандр) содержал: NaCl (110 мМ); KCl (2.5 мМ); MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O (1 мМ); CaCl<sub>2</sub> (1 мМ); ЭДТА (20 мкМ); глюкозу (10 мМ); Na-HEPES pH 7.5 (10 мМ). При приготовлении раствора Рингера с pH 6.0 вместо HEPES-буфера использовался натрий-фосфатный буфер (10 мМ). В состав раствора для крысы входили следующие вещества: NaCl (149 мМ); KCl (3.6 мМ); MgCl<sub>2</sub> (2.4 мМ); CaCl<sub>2</sub> (1.2 мМ); ЭДТА (20 мкМ); глюкоза (10 мМ); Na-HEPES pH 7.5 (10 мМ).

Измерения проводили как на «запечатанных» (герметизированных вторым покровным стеклом) препаратах, так и на образцах в проточной камере, при перфузии физиологическим раствором. Температура раствора и камеры могла регулироваться в диапазоне 17 – 40 °С и измерялась тонкой термопарой в непосредственной близости от исследуемого участка препарата.



Спектры поглощения зрительных пигментов регистрировали с помощью скоростного поляризационного микроспектрофотометра (Говардовский и Зуева, 2000). Измерения проводили на изолированных наружных сегментах палочек (НСП) и одиночных клетках (в случае амфибий) и на «щетке» палочек, расположенных на краю кусочка сетчатки (в случае крысы) при двух направлениях поляризации измерительного светового луча: перпендикулярно оси НСП (Т-поляризация) и вдоль оси НСП (L-поляризация). Это позволяло идентифицировать спектрально сходные продукты, отличающиеся ориентацией хромофорной группы в фоторецепторной мембране.

Первичную обработку экспериментальных данных производили при помощи компьютерной программы, написанной в лаборатории. Для решения систем дифференциальных и алгебраических уравнений использовали программу MathCad 2001i Professional (MathSoft Engineering & Education, Inc., США).

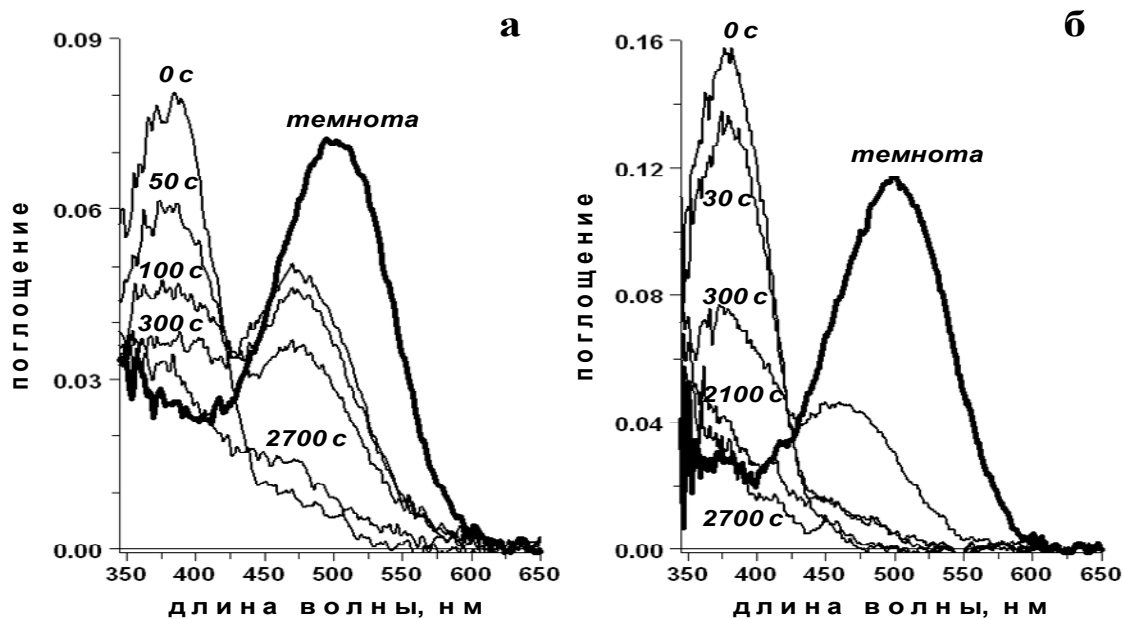
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### *Влияние температуры на ход процессов фотолиза родопсина в интактных палочках лягушки и крысы*

На рис. 1 представлены спектры поглощения, показывающие взаимопревращения продуктов при обесцвечивании родопсина в палочках лягушки (рис. 1а) и крысы (рис. 1б) при температурах, физиологических для каждого животного.

Спектр поглощения темноадаптированных палочек, с максимумом поглощения около 500 нм (маркирован «темнота»), соответствует родопсину. Освещение 525-нм вспышкой приводит вначале к появлению равновесной смеси метародопсинов I и II: мета I соответствует плечо поглощения > 440 нм, мета II – пик поглощения при 380 нм (кривые 0 с на рис. 1а, б). В дальнейшем эта смесь частично превращается в метародопсин III

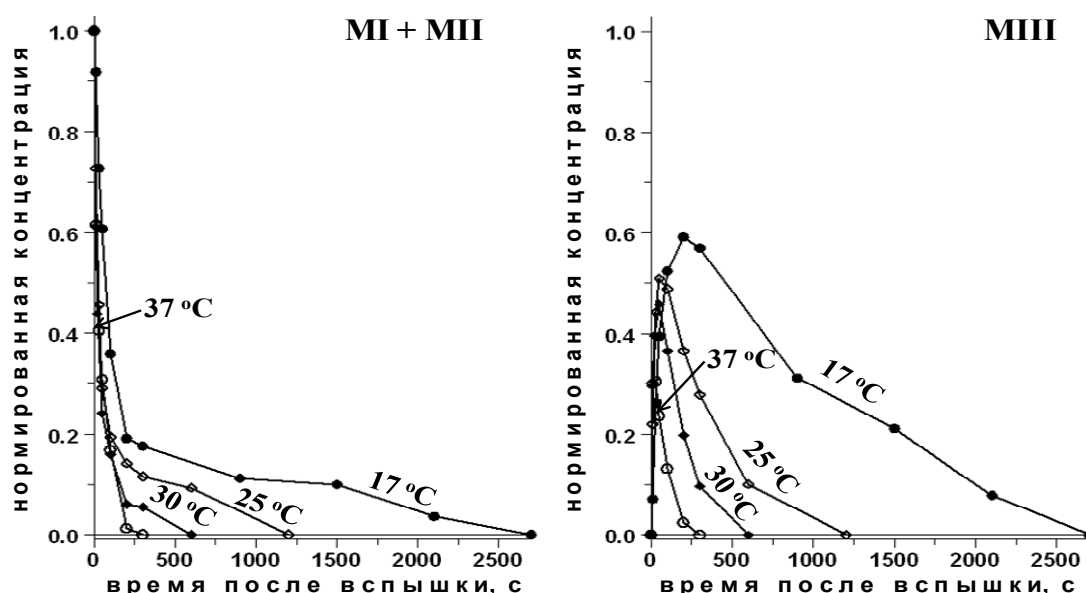
(уменьшение пика поглощения на 380 нм и возрастание поглощения в области 420 – 600 нм, кривые 50 с и 100 с на рис. 1а; кривые 30 с и 300 с на рис. 1б). Последующие записи демонстрируют дальнейший распад смеси мета I и II и параллельное исчезновение образовавшегося мета III (кривые 300 с и 2700 с на рис. 1а; кривые 2100 и 2700 на рис. 1б). Конечные продукты фотолиза в изолированных НСП лягушки представлены смесью свободного *транс*-ретинала (пик поглощения при 380 нм) и продуктами его вторичного связывания с нехромофорными сайтами на опсине (плечо поглощения > 450 нм; кривая 2700 с на рис. 1а). В отличие от НСП лягушки, метаболически активные интактные палочки на краю кусочка сетчатки крысы быстро превращают *транс*-ретиаль в ретинол, о чем можно судить по появлению пика поглощения с максимумом < 340 нм (кривые 2100 с и 2700 с на рис. 1б).



**Рис. 1.** Спектральные изменения при фотолизе родопсина лягушки при 17 °С (а) и крысы при 37 °С (б), Т-поляризация (некоторые спектры не показаны, чтобы не загромождать рисунок). На рис. 1а представлены усредненные спектры (9 НСП). Стандартный физиологический раствор рН 7.5.

Такая же последовательность спектральных изменений наблюдается и при других исследуемых температурах. Однако качественно сходный ход процессов фотолиза сопровождается отличиями в кинетике образования и распада отдельных продуктов.

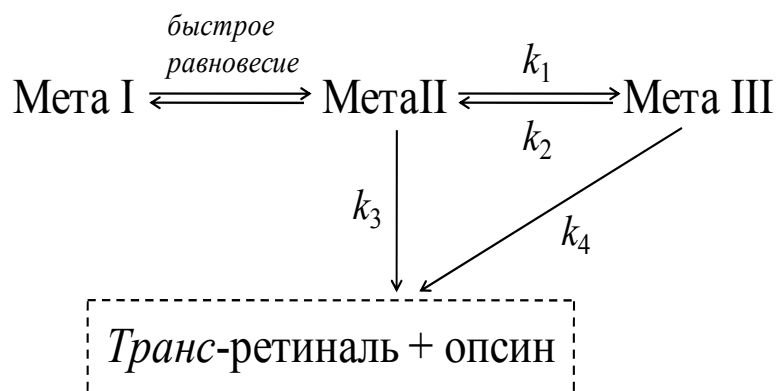
В ходе фотолиза образуется 5 продуктов: смесь мета I/II (смесь метародопсинов I и II можно считать одним продуктом, поскольку равновесие между ними устанавливается быстро, примерно за 1 мс), мета III, свободный *транс*-ретиноаль, продукты его вторичного связывания и ретинол. Некоторые из них имеют близкие максимумы спектров поглощения, например, мета II и *транс*-ретиноаль ( $\lambda_{\text{макс}} \approx 380$  нм); мета I, мета III и продукты вторичного связывания ретиналя ( $\lambda_{\text{макс}} \approx 450 - 475$  нм). Однако спектрально сходные продукты отличаются ориентацией хромофорной группы (в некоторых из них хромофор лежит почти строго в плоскости фоторецепторной мембраны, а в некоторых – перпендикулярно мембране). Поэтому измерения поглощения при двух направлениях поляризации (T и L) позволяют различить эти продукты и затем рассчитать их концентрации.



**Рис. 2.** Временной ход концентраций метародопсинов (смеси мета I/II и мета III) в НСП лягушки при разных температурах. Стандартный физиологический раствор pH 7.5.

На рис. 2 показан временной ход изменения концентраций метародопсинов в НСП лягушки. Видно, что с повышением температуры процессы образования и распада метапродуктов ускоряются.

Общая кинетическая схема переходов между долгоживущими продуктами фотолиза показана на рис. 3.



**Рис. 3.** Общая схема взаимопревращений долгоживущих продуктов фотолиза родопсина, по (Kolesnikov et al., 2003). Штриховой прямоугольник, заключающий *транс*-ретиаль и опсин, обозначает все продукты, образующиеся после гидролиза нативной связи в молекуле родопсина;  $k_i$  – константы скоростей реакций.

Константы скоростей реакций ( $k_i$ ) определяли, приближая временной ход концентраций мета II и мета III двумя экспонентами. Вычисленные значения констант скоростей реакций представлены в таблице 1.

**Таблица 1**

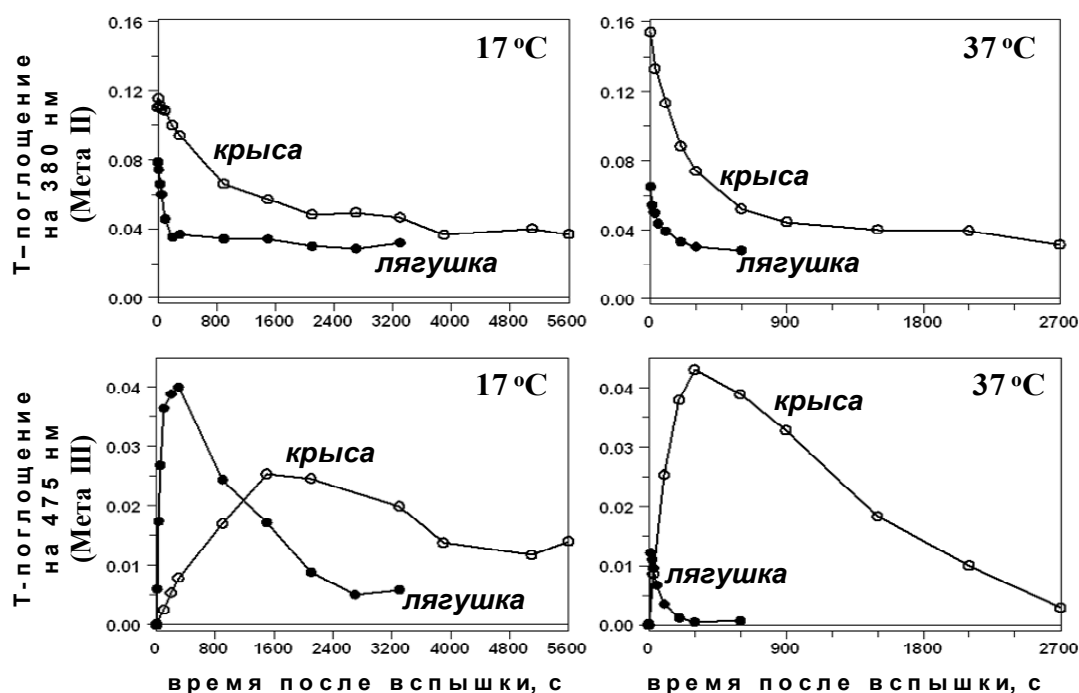
Константы скоростей переходов между долгоживущими продуктами фотолиза родопсина лягушки при разных температурах (средние значения  $\pm$  ошибка среднего)

константы температура	$k_1$	$k_2$	$k_3$	$k_4$
<b>17 °C</b>	$10 \cdot 10^{-3}$	$2.8 \cdot 10^{-3}$	$1.1 \cdot 10^{-3}$	$1.1 \cdot 10^{-3}$
<b>25 °C</b>	$(27.3 \pm 1.2) \cdot 10^{-3}$	$(10.6 \pm 1.5) \cdot 10^{-3}$	$(5.2 \pm 2.4) \cdot 10^{-3}$	$(2.7 \pm 1.3) \cdot 10^{-3}$
<b>30 °C</b>	$(41.3 \pm 2.9) \cdot 10^{-3}$	$(20.3 \pm 2.4) \cdot 10^{-3}$	$(10.6 \pm 0.9) \cdot 10^{-3}$	$(3.8 \pm 0.5) \cdot 10^{-3}$
<b>37 °C</b>	$(69.1 \pm 3.5) \cdot 10^{-3}$	$(95.7 \pm 41.7) \cdot 10^{-3}$	$(9.7 \pm 1.6) \cdot 10^{-3}$	$(22.7 \pm 2.9) \cdot 10^{-3}$

Фотолиз родопсина в палочках крысы протекает значительно медленнее, чем у лягушки, и проследить распад метaproдуктов до конца не удастся из-за ограниченного времени жизни препарата. Это обстоятельство не позволяет строго рассчитать концентрации исследуемых продуктов и константы скоростей реакций кинетической схемы, представленной на рис. 3.

Однако временной ход концентраций основных продуктов фотолиза – мета II и мета III – можно охарактеризовать кривыми изменения поглощения в их соответствующих максимумах (для мета II – это 380 нм, для мета III – 475 нм). Таким способом мы сравнили кинетику фотолиза родопсина лягушки и крысы при различных температурах.

На рис. 4 показаны кривые временного хода поглощений метародопсинов в палочках лягушки и крысы при 17 °С и 37 °С. Видно, что процессы фотолиза в палочках крысы ускоряются с повышением температуры. Однако они протекают медленнее, чем у лягушки, даже при соответствующих физиологических температурах (37 °С для крысы, 17 °С для лягушки).



**Рис. 4.** Временной ход изменения T-поглощения метародопсинов лягушки и крысы на 380 нм и 475 нм (длина волны указана на оси ординат) при 17 °С и 37 °С. Стандартный физиологический раствор рН 7.5.

Сопоставление полученных нами результатов с физиологическими данными из литературы показывает, что процессы фотолиза в интактных палочках лягушки и крысы соответствуют характерному времени темновой адаптации этих животных, и, следовательно, их скорость в значительной мере определяет работу зрительного цикла и регенерацию родопсина.

Сравнение результатов экспериментов на интактных палочках с данными, полученными другими исследователями *in vitro*, показало, что поведение продуктов и кинетика медленных стадий фотолиза в значительной степени зависят от условий экспериментов, и результаты, полученные *in vitro*, нельзя распространять на ситуацию *in vivo*.

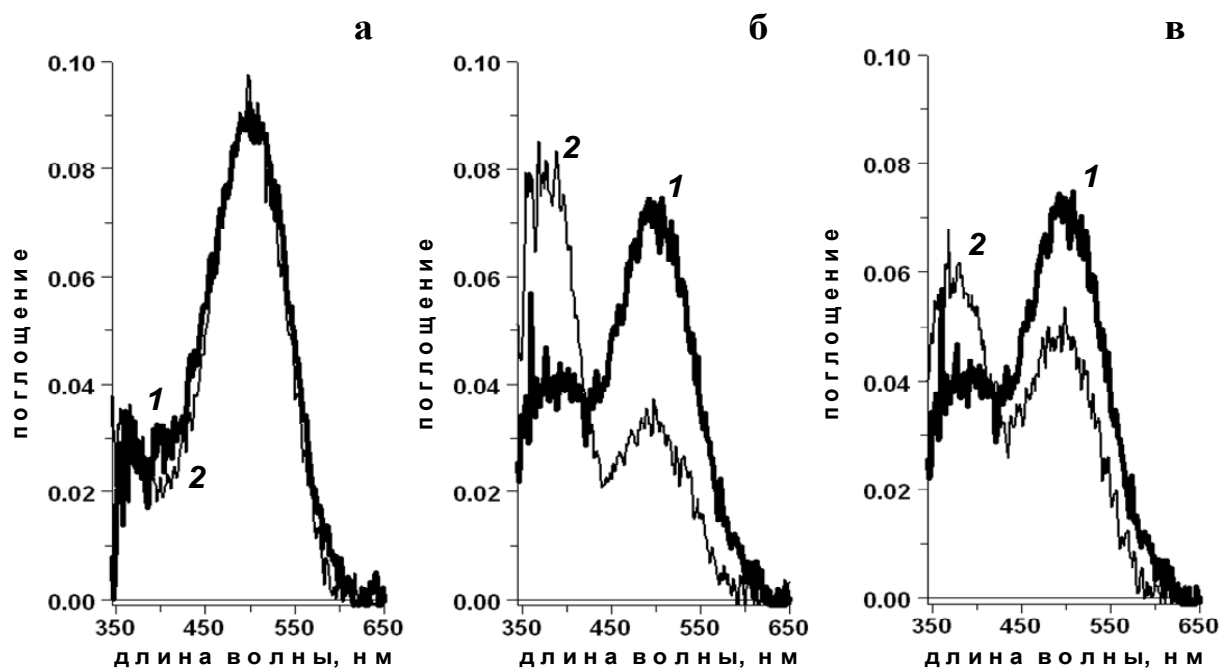
### ***Диффузия родопсина и продуктов его фотолиза в фоторецепторной мембране интактных палочек сетчатки амфибий***

Для понимания работы зрительного цикла существенное значение имеет справедливость или ложность так называемой «туннельной» гипотезы (Heck et al., 2003; Schädel et al., 2003). Согласно этой гипотезе, молекула родопсина имеет три сайта связывания ретиналя – «входной», хромофорный и «выходной». После гидролиза нативной связи в молекуле пигмента *транс*-ретиналь переносится из хромофорного в «выходной» сайт, где он может превратиться в *транс*-ретинол. Высвобождение ретиноидов из молекулы родопсина происходит только после связывания вновь синтезированной в зрительном цикле молекулы 11-*цис*-ретиналя с «входным» сайтом на опсине. Если эта гипотеза верна, то доступность 11-*цис* хромофора будет лимитировать не только рекомбинацию опсина с имеющимся хромофором, но и снабжение пигментного эпителия субстратом для изомеразной реакции.

С целью проверки этой гипотезы мы исследовали латеральную диффузию родопсина и продуктов его фотолиза в мембране НСП сетчатки амфибий. Измерения проводились при помощи узкого светового луча, пропускаемого поочередно через две стороны НСП. Таким способом мы

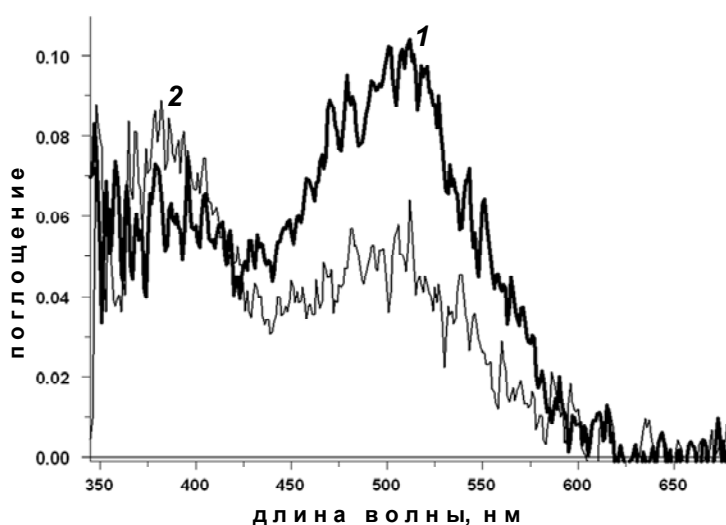
прослеживали изменение поглощения на определенной длине волны, либо регистрировали спектры поглощения продуктов.

На рис. 5а показаны спектры поглощения темноадаптированных НСП лягушки, записанные при двух положениях измерительного луча. Видно, что родопсин в палочках распределен симметрично. Освещение одной половины НСП короткой 525-нм вспышкой приводит вначале к появлению большой разности поглощений (рис. 5б): на обесцвеченной стороне (кривая 2) пик поглощения «темнового» родопсина ( $\lambda_{\text{макс}} \approx 500$  нм) уменьшается, и появляется высокий пик метародопсина II ( $\lambda_{\text{макс}} \approx 380$  нм); на необесцвеченной стороне (кривая 1) спектральные изменения минимальны и обусловлены светорассеянием. Со временем разность поглощений уменьшается, демонстрируя диффузионный обмен родопсином и продуктами его обесцвечивания между двумя половинами НСП (рис. 5в).



**Рис. 5.** Т-спектры поглощения НСП лягушки при двух положениях измерительного луча: а – записи от темноадаптированного НСП, б – немедленно после вспышки, в – через 50 с после вспышки; спектры 1 относятся к неосвещенной половине, а кривые 2 – к обесцвеченной половине НСП. Раствор Рингера рН 6.3, 20 °С.

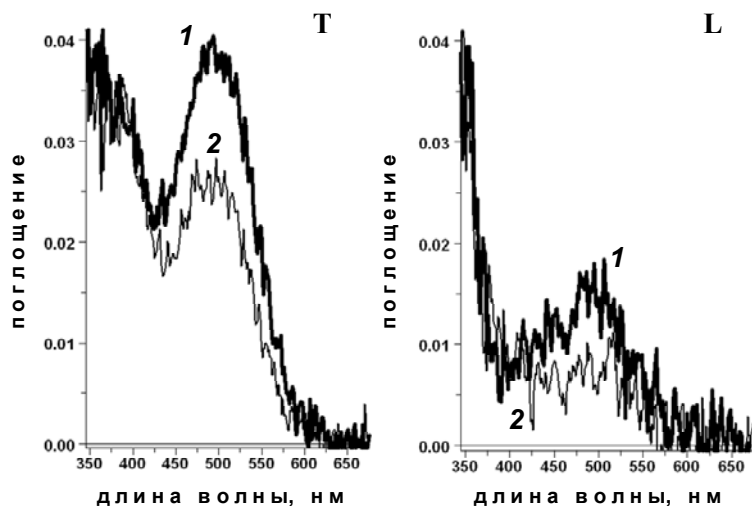
Однако в большинстве препаратов полное равновесие не достигается – часть «темнового» пигмента остается на неосвещенной стороне (кривая 1 на рис. 6), а часть фотопродуктов – на обесцвеченной (кривая 2 на рис. 6). Это свидетельствует о том, что *транс*-ретиаль, покинув хромофорный центр, остается связанным с опсином в другом сайте, что в принципе согласуется с «туннельной» гипотезой, хотя точное место связывания хромофора с опсином неизвестно.



**Рис. 6.** Т-спектры поглощения НСП саламандры через 11 мин. после 525-нм вспышки. Спектр 1 относится к неосвещенной половине, а кривая 2 – к обесцвеченной половине НСП. Раствор Рингера рН 6.3, 20 °С.

С другой стороны, в метаболически активных палочках (на краю кусочка сетчатки) *транс*-ретиаль превращается в ретинол, который равномерно распределяется в мембране. На это указывает совпадение амплитуд пиков поглощения ретинола ( $\lambda_{\text{макс}} < 340$  нм) на двух сторонах НСП (рис. 7). При этом уравнивание ретинола происходит в отсутствие в среде 11-*цис*-ретиная. Следовательно, процессы высвобождения ретиноидов из молекулы пигмента и присоединение 11-*цис*-ретиная к опсину протекают независимо, что находится в противоречии с «туннельной» гипотезой.





**Рис. 7.** Т- и L-спектры поглощения, записанные от неосвещенной (кривая 1) и обесцвеченной (кривая 2) половин интактных палочек лягушки на 8 мин. после вспышки. Каждый спектр – среднее из записей от 3 клеток. Стандартный физиологический раствор рН 7.5, 20 °С.

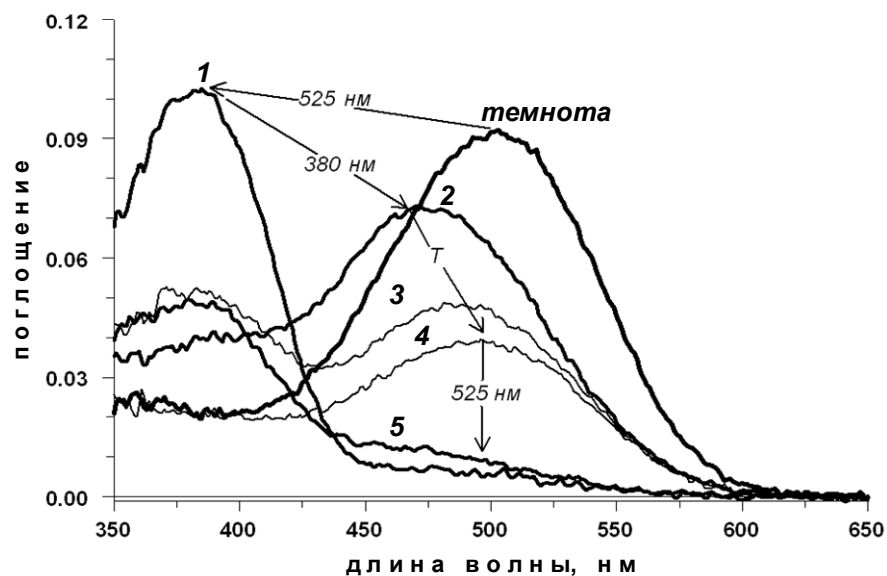
### **Фотореакции метародопсина II в интактных палочках лягушки и крысы**

Как было сказано, обратная изомеризация хромофора после обесцвечивания родопсина может происходить в результате поглощения светового кванта молекулой метародопсина. Фоторегенерация родопсина позвоночных была показана в условиях *in vitro* (Кронгауз и др., 1975; Matthews et al., 1963), однако оставалось неясным, насколько результаты этих исследований справедливы для интактных фоторецепторов.

Возможность реизомеризации хромофора обесцвеченной молекулы родопсина была продемонстрирована нами в экспериментах по фотоактивации метародопсина II в интактных палочках лягушки и крысы. На рис. 8 представлены спектры поглощения, показывающие ход фотоконверсии метародопсина II в НСП лягушки.

Освещение родопсина (спектр, маркированный «темнота») вспышкой видимого света (525 нм) приводит к образованию равновесной смеси метародопсинов I и II (пик поглощения при 380 нм соответствует мета II, плечо поглощения > 440 нм – мета I, кривая 1 на рис 8). Немедленная фотоактивация мета II вспышкой ультрафиолетового света (380 нм)

генерирует смесь стабильного продукта и продукта, распадающегося в темноте (кривая 2 на рис. 8). Последующие спектры поглощения демонстрируют распад нестабильного продукта (кривые 3 и 4 на рис. 8). Оставшийся термостабильный пигмент обесцвечивается 525-нм вспышкой (кривая 5 рис. 8).

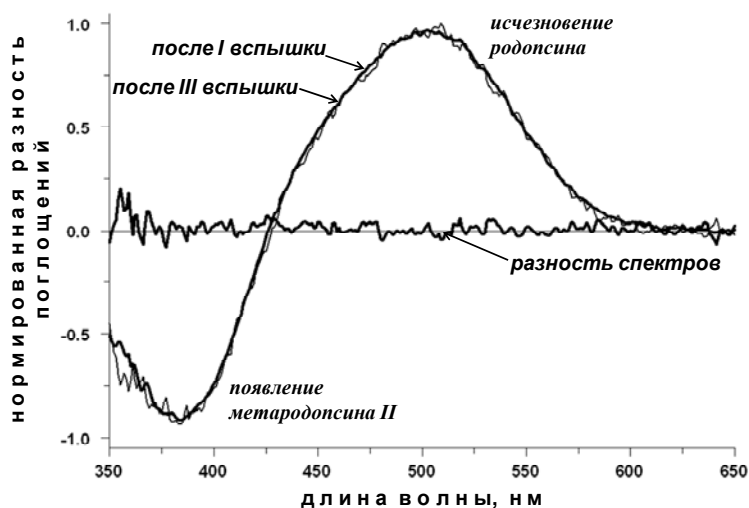


**Рис. 8.** Изменение T-спектров поглощения НСП лягушки в ходе обесцвечивания родопсина и фотоконверсии метародопсина II (некоторые промежуточные спектры не показаны). Стрелка «T» показывает процесс теплового распада нестабильного продукта фотоконверсии. Каждый спектр – среднее из 11 НСП. Стандартный физиологический раствор рН 7.5, 20 °С.

В НСП лягушки стабильный продукт – фоторегенерированный родопсин, идентичный исходному пигменту и содержащий в качестве хромофора 11-*цис*-ретиаль. На это указывает практически полное совпадение спектров поглощения этих пигментов (рис. 9). Фотоконверсией из мета II может быть регенерировано до 45% от исходного родопсина.

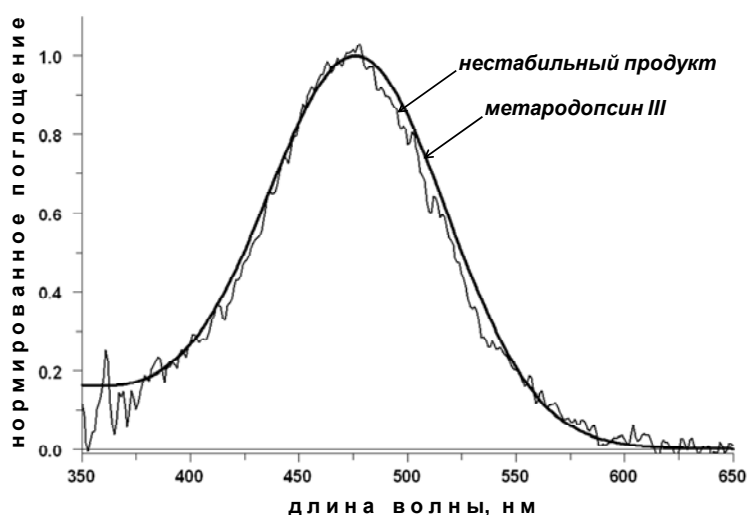
Однако в некоторых препаратах спектр поглощения стабильного пигмента смещен в коротковолновую область по сравнению со спектром «темнового» родопсина. Такой сдвиг может быть вызван образованием в ходе фотоконверсии небольшого количества изородопсина – пигмента,

имеющего максимум поглощения при 487 нм и содержащего в качестве хромофора 9-*цис*-ретиаль (Hubbard & Wald, 1952). Доля изородопсина, определенная по разности спектров поглощения «темнового» родопсина и фоторегенерированного пигмента, может достигать до 25%.



**Рис. 9.** Сравнение нормированных разностных Т-спектров исходного (после I вспышки) и фоторегенерированного (после III вспышки) родопсина лягушки. Среднее из 11 НСП. Стандартный физиологический раствор рН 7.5, 20 °С.

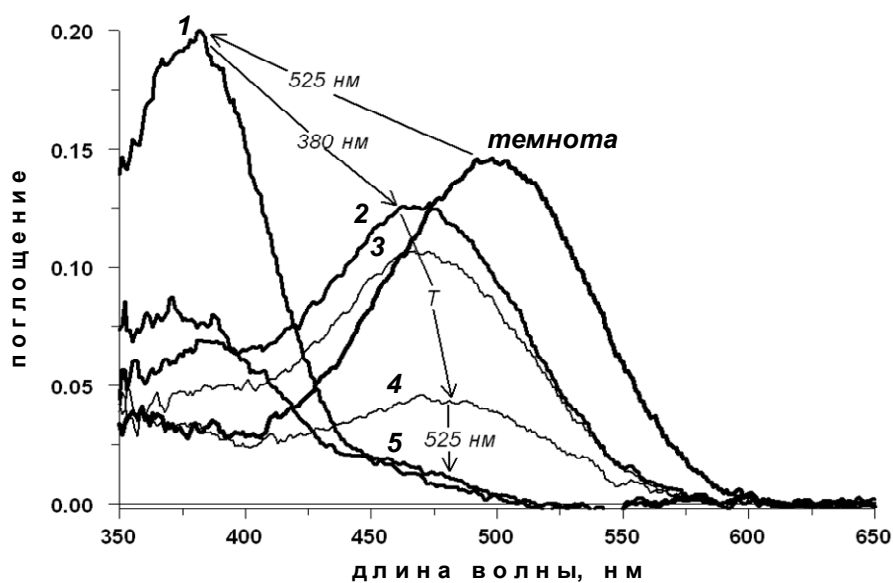
Что касается нестабильного продукта, то на основании его спектра поглощения и кинетики распада мы полагаем, что это мета III (рис. 10).



**Рис. 10.** Сравнение спектров поглощения нестабильного продукта фотоконверсии и метародопсина III лягушки. Среднее из 11 НСП. Стандартный физиологический раствор рН 7.5, 20 °С.

Мета III в НСП лягушки быстро переходит обратно в мета II (кривая 3 рис. 8). В дальнейшем наблюдается параллельный распад всех метaproдуктов (кривая 4 на рис. 8).

При фотоактивации мета II в палочках крысы наблюдались такие же спектральные изменения (рис. 11), что и у лягушки (рис. 8).



**Рис. 11.** Спектральные изменения в ходе обесцвечивания родопсина и фотоконверсии метародопсина II в палочках крысы, T-поляризация (некоторые промежуточные спектры не показаны). Стандартный физиологический раствор pH 7.5, 37 °C. Обозначения как на рис. 8.

Термостабильный продукт фоторегенерации у крысы – 11-цис родопсин, но с большей, чем у лягушки, примесью изородопсина ( $\approx 33\%$ ), вероятно, образованного в ходе побочных реакций.

Спектр нестабильного продукта соответствует мета III крысы. Однако распад образовавшегося мета III у крысы был значительно медленнее, чем у лягушки, и не сопровождался обратным переходом в мета II.

В условиях естественного освещения вклад фоторегенерации родопсина из метародопсина II в процесс восстановления «темнового» пигмента должен быть мал, поскольку доля ультрафиолетового света в солнечном спектре относительно невелика. Однако фоторегенерация может

приводить к ошибочным выводам при интерпретации результатов экспериментов по исследованию зрительного цикла. В частности, наличие фоторегенерированного родопсина может быть расценено как результат функционирования альтернативных биохимических путей восстановления «темнового» пигмента.

### Выводы

1. Последовательность взаимопревращений продуктов фотолиза в палочках амфибий (лягушки *Rana temporaria*) и млекопитающих (крысы Wistar) одинакова. Образовавшиеся после поглощения света метародопсины I и II медленно переходят в метародопсин III, и затем все три метародопсина распадаются на *транс*-ретиаль и опсин. В метаболически активных интактных палочках *транс*-ретиаль восстанавливается в *транс*-ретинол.
2. Фотолиз родопсина у крысы протекает медленнее, чем у лягушки, даже при соответствующих физиологических температурах (17 – 25 °C для лягушки и 37 °C для крысы).
3. Кинетика медленных стадий фотолиза родопсина лягушки и крысы является одним из факторов, определяющих скорость зрительного цикла и темновую адаптацию палочек у этих животных.
4. Эксперименты по латеральной диффузии родопсина и его фотопродуктов показывают, что после освобождения из хромофорного центра *транс*-ретиаль остается связанным с опсином. Связанный *транс*-ретиаль может восстанавливаться в *транс*-ретинол, который свободно диффундирует в фоторецепторной мембране и может покидать наружные сегменты палочек.
5. Возможность освобождения *транс*-ретинола и выхода его из наружного сегмента противоречит популярной сейчас «туннельной гипотезе», согласно которой диссоциация ретиноидов от опсина возможна только при поступлении в наружный сегмент 11-*цис*-ретинола и регенерации «темнового» родопсина.

6. Освещение метародопсина II 380-нм вспышкой света приводит к немедленной фоторегенерации до 45% исходного родопсина, содержащего 11-*цис* хромофор, без заметной примеси других *цис*-изомеров. Фоторегенерация из метародопсина II может быть альтернативой биохимическому зрительному циклу и вносить вклад в восстановление «темнового» родопсина (главным образом, в экспериментальных условиях освещения).

### **Список работ, опубликованных по материалам диссертации**

1. Govardovskii V.I., Korenyak D.A., Zueva L.V., Shukolyukov S.A. Lateral diffusion of rhodopsin in photoreceptor membrane: continued // *Visionarium VII.* – Tvärminne (Finland). – 2008. – P. 10.
2. Korenyak D.A., Govardovskii V.I. Slow stages of photolysis: amphibian vs. mammalian rhodopsin // *Visionarium VII.* – Tvärminne (Finland). – 2008. – P. 15.
3. Korenyak D.A., Kolesnikov A.V., Govardovskii V.I. Photoreactions of metarhodopsin II in the frog and rat rods // *Visionarium VIII.* – Tvärminne (Finland). – 2009. – P. 21.
4. Govardovskii V.I., Korenyak D.A., Shukolyukov S.A., Zueva L.V. Lateral diffusion of rhodopsin in photoreceptor membrane: a reappraisal // *Molecular vision.* – 2009. – V. 15. – P. 1717–1729.
5. Кореньяк Д.А., Говардовский В.И. Влияние температуры на медленные стадии фотолиза родопсина в палочках лягушки и крысы // Тез. докладов XXI съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. – Москва – Калуга. – 2010. – С. 295.
6. Korenyak D.A., Govardovskii V.I. On the «Tunneling hypothesis» // *Visionarium IX.* – Tvärminne (Finland). – 2010. – P. 20.
7. Колесников А.В., Кореньяк Д.А., Шуколюков С.А., Говардовский В.И. Фотореакции метародопсина II // *Сенсорные системы.* – 2011. – Т.25, №1. – С. 55–64.