

УДК 535.217:612.84

М. Г. ГАЗАРЯНЦ, Л. А. ГАСПАРЯН, Л. П. КИШИНЕВСКИЙ, Г. В. ХАЧАТУРОВ

НЕКОТОРЫЕ ФОТОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В СЕТЧАТКЕ ГЛАЗА ЛЯГУШКИ

Изучены процессы выцветания и восстановления родопсина, окислительные и восстановительные реакции, протекающие под действием света. Приведены временные характеристики этих процессов и зависимость их от интенсивности. Сделан вывод об обратимости этих процессов, их связи и отношении к зрительному восприятию.

Зрительное восприятие представляет собой сложный процесс, включающий в себя как фотоэлектрические преобразования на основе твердотельных механизмов, так и ионные процессы, сопровождающиеся биохимическими изменениями зрительных пигментов. Поэтому наибольшую информацию о работе зрительной системы можно получить при применении фотоэлектрических, оптических, биохимических методов исследования и особенно при их совместном применении.

В настоящее время уделяется большое внимание изучению временных характеристик фоточувствительности зрительной системы в различных режимах и на различном экспериментальном материале [1, 2, 5—8].

Но несмотря на обилие материала по этому вопросу прямые измерения процессов, происходящих в пигментах сетчатки при действии света, которые позволили бы установить соответствие между временем обновления пигмента и восстановлением зрительных функций, не проводились.

Исследованиями Зикеля [9], который применял комплексный метод исследования изолированной сетчатки, омываемой питательным раствором, было показано отношение захвата кислородного иона в сетчатке к световому воздействию и связь с электроретинограммой сетчатки.

Нами была поставлена задача изучения временных характеристик выцветания и восстановления родопсина в сетчатке, окислительных процессов и изменения числа водородных ионов в сетчатке при световом воздействии, а также выявления их связи с фотолитическими процессами в родопсине, что должно позволить установить связь с процессами зрительного восприятия. Кроме того, изучалась зависимость от интенсивности светового излучения.

Материал и методика. Все эксперименты проводились на темноадаптированных свежеизолированных сетчатках глаза лягушки *Rana temporaria*. Энуклеация и извлечение сетчатки проводились по известной методике [1, 3]. Зависимость выцветания и восстановления родопсина определялась по поглощательной способности сетчатки в области максимального поглощения родопсина—503 нм. Свет от лампы накаливания через интерференционный фильтр (503 нм) попадал на предметное стекло микрофото-

метрической насадки МФ-1, на которое помещалась свежензолированная сетчатка. Прибор был снабжен полосовыми фильтрами, фотоумножителем и измерительным прибором (микроамперметр), согласованным с выходом фотоумножителя. Контролем служила капля физиологического раствора на предметном стекле. Измерения производились относительно предметного стекла. При постоянном уровне освещения сетчатки отмечались интервалы времени и соответствующие изменения коэффициента пропускания сетчатки как величины, прямо пропорциональной количеству выцветшего пигмента. В темноте кратковременным световым зондированием через определенные промежутки времени аналогично определялись изменения того же параметра.

Изучение окислительных реакций проводилось также с применением оптических методов. Как показано Зикелем [9], поглощение сетчаткой излучения с $\lambda = 340$ нм идентифицируется с циклическим окислением пиридиновых нуклеотидов. Редуцированная форма дифосфопиридинового нуклеотида DPN-II проявляет сильную поглощательную способность при $\lambda = 340$ нм. Установка состояла из бактерицидной лампы, дающей на свежензолированную сетчатку ультрафиолетовое излучение малой интенсивности с $\lambda = 340$ нм. Это достигалось применением набора из интерференционных, полосовых и нейтральных фильтров. УФ-излучение с $\lambda = 340$ нм, проходя через сетчатку, через систему интерференционных фильтров (вторичная фильтрация), попадало на фотокатод фотоумножителя ФЭУ-51, имеющего чувствительность в названной части спектра. Регистрация выходного тока ФЭУ-51 производилась микроамперметром, согласованным с его выходом. На сетчатку от лампы накаливания через интерференционный фильтр с $\lambda = 503$ нм ($\Delta\lambda = \pm 20$ нм) и через светопровод подавалось возбуждающее излучение. Этот источник был снабжен механическим прерывателем света (фотозатвор) и регулировкой интенсивности (механическая и электрическая). Градуировка производилась по вторичному эталону. Определение изменения числа водородных ионов под действием света проводилось на глазном бокале живой лягушки после предварительного удаления оптической части глаза с применением двух типов рН-метров (марки ЛПС-02 и рН-340) с обычными и специально изготовленными для измерений на тканях электродами. В качестве стимулятора использовалась лампа накаливания с регулировкой интенсивности света и механическим затвором. Исследовались временные зависимости изменения рН сетчатки и зависимость от интенсивности излучения.

Результаты и обсуждение. Для всех исследованных объектов длительность полного процесса выцветания, начиная с момента включения зеленого света ($\lambda = 503$ нм) и до полного насыщения (коэффициент пропускания не претерпевает дальнейших изменений), колеблется в пределах 98—110 мин, при этом коэффициент пропускания изменяется в пределах 0,08—0,65. Следует отметить, что при достижении коэффициента пропускания 0,65 дальнейшего восстановления функций в темноте не наблюдается, т. е. процесс становится необратимым. Поэтому при изучении прямой и обратной реакции сетчатки при засветке коэффициент пропускания до значения 0,65 не доводился, а прерывался на уровнях 0,4—0,5 для того, чтобы была возможность исследования кинетики темновой регенерации пигмента в сетчатке. На рис. 1 представлена временная зависимость процесса выцветания и восстановления. Как видно из графика, процесс полностью обратим, причем кинетики выцветания и восстановления весьма схожи. Для них характерен нижний уровень 0,08 и 0,05 (несколько больший начальный коэффициент пропускания связан с небольшим выцветанием родопсина в сетчатке, происходящем за время установки сетчатки на предметном стекле), одинаковый уровень верхних значений—0,5—0,4, сублинейное медленное выцветание

вблизи малых значений коэффициента пропускания и сверхлинейный крутой участок изменения T , на котором происходит основное изменение T от $\sim 0,1$ до $0,5$ приблизительно в течение 5—10 мин.

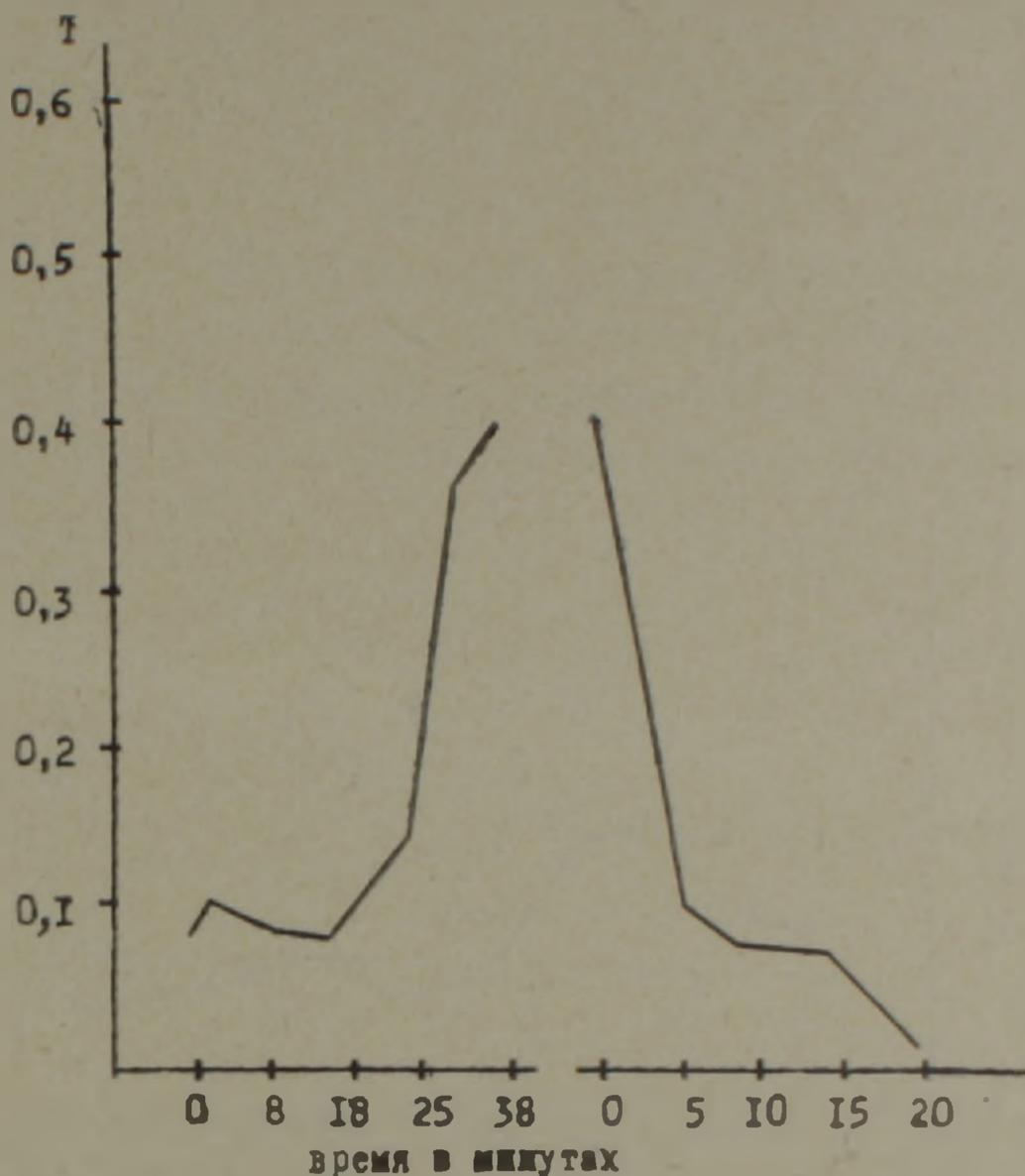


Рис. 1. Временная зависимость выцветания (при действии монохроматическим светом с $\lambda = 503$ нм) и темнового восстановления родопсина в свежееизолированной темноадаптированной сетчатке глаза лягушки: T —коэффициент пропускания сетчатки, t —время в мин.

Такая хорошая обратимость процесса зависит также от функционального состояния сетчатки (качество препаровки, длительность адаптации и др.). Следует отметить, что в литературе [7] описаны два типа восстановительных процессов, один из которых представляет собой полный распад родопсина на опсин и полностью транс-ретиналь, проходящий процессы эфиризации во внутренних сегментах, выход в пигментный эпителий (где происходит восстановление) и возвращение во внешние сегменты фоторецепторов, что, конечно, не могло иметь места в изолированной сетчатке. Как известно, этот процесс длится около одной недели. Второй из них представляет взаимобратимые переходы некоторых устойчивых продуктов фотолиза в родопсине (метародопсин II, метародопсин I) под действием света и в темноте. В данном случае, как и в случае фоторегенерации, изучаемой нашей лабораторией [3], где предполагается взаимопревращение светом метародопсина II и родопсина, также имеет место превращение в темноте одного из устойчивых продуктов фотолиза родопсина в родопсин без распада на опсин и транс-ретиналь и последующего этапа выхода из внешних сегментов для восстановления.

Из других особенностей следует отметить, что в зависимости от функционального состояния сетчатки и уровня, до которого доведено выцветание, восстановление может быть частичным либо вообще не иметь места. Двадцатиминутная темновая адаптация, прерывающая процесс выцветания, возвращает характеристику к начальному состоянию.

При изучении окислительных реакций в сетчатках прежде всего следует отметить, что существует четкая реакция на включение и выключение возбуждающего зеленого света ($\lambda = 503$ нм), что подтверждает данные Зикеля [9] по одновременной регистрации ЭРГ и окислительной реакции на сетчатках, омываемых питательным раствором.

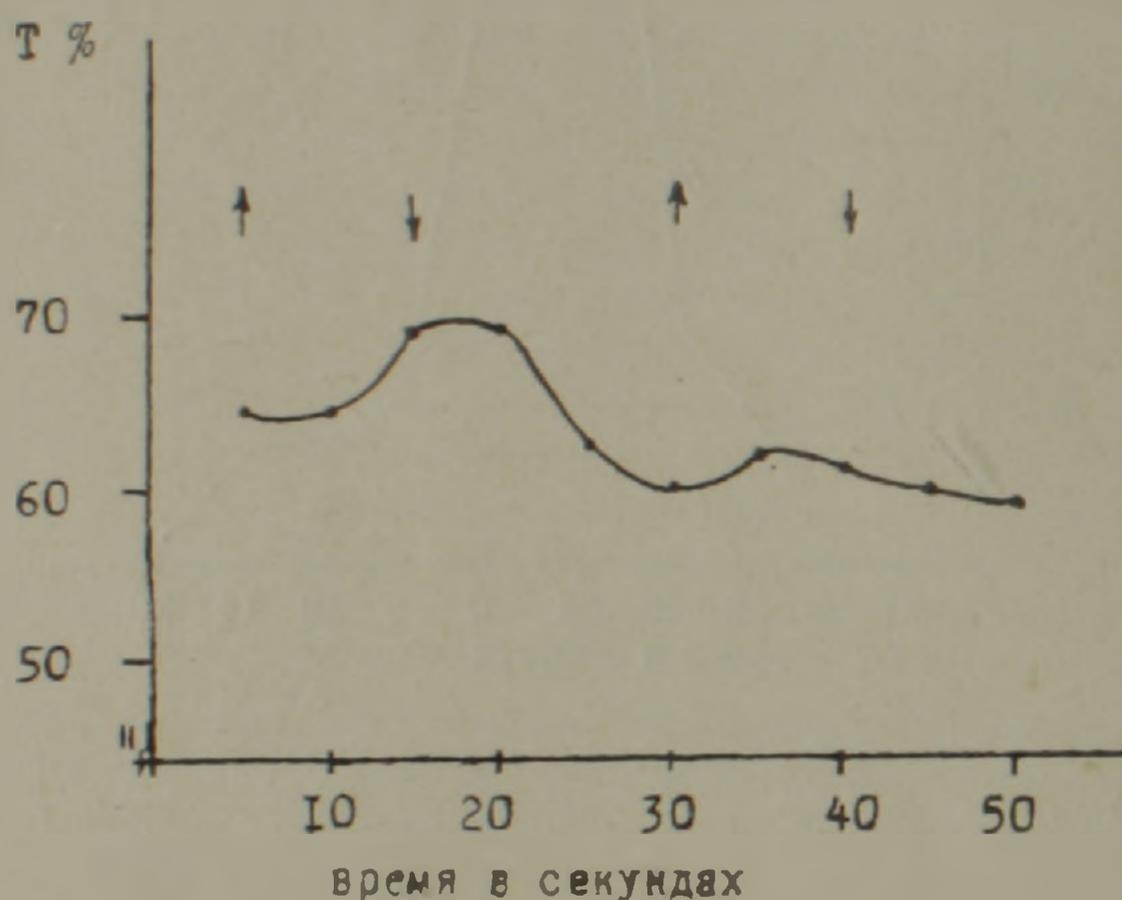


Рис. 2. Кинетика окислительной реакции в свежеизолированной темноадаптированной сетчатке глаза лягушки при включении (стрелка вверх) и выключении (стрелка вниз) монохроматического света с $\lambda = 503$ нм по поглощательной способности в УФ области спектра ($\lambda = 340$ нм) при двух градациях энергии возбуждающего излучения.

Из временных характеристик, представленных на рис. 2, видно, что окислительный процесс усиливается при действии монохроматического света ($\lambda = 503$ нм) на сетчатку и уменьшается при выключении его. Длительность нарастания и спада примерно равны и принимают значения от 5 до 10 сек. Чувствуется зависимость уровня реакции и остроты кинетики от интенсивности возбуждающего света. При большом уровне интенсивности растет уровень окислительной реакции и обостряется кинетика. Зависимость уровня окислительной реакции от энергии возбуждающего сетчатку монохроматического света ($\lambda = 503$ нм) (рис. 3), выраженного коэффициентом поглощения в УФ-области при $\lambda = 340$ нм, до уровня 5 мквт носит линейный характер, достигая максимума, после чего следует некоторый спад до 7 мквт и дальнейшее нарастание. Коэффициент поглощения УФ-излучения, приведенный в отсутствие сетчатки к 0, может достигать максимального значения—0,5. Наклон характеристики и величина уровня реакции зависят от функционального состоя-

ния сетчатки и имеют большой разброс. Таким образом, удалось наметить связь между дыхательными процессами сетчатки и возбуждением ее светом, причем удалось определить временные характеристики порядка нескольких секунд и линейную зависимость от энергии возбуждающего света, что еще раз подтверждает возможное отношение к зри-

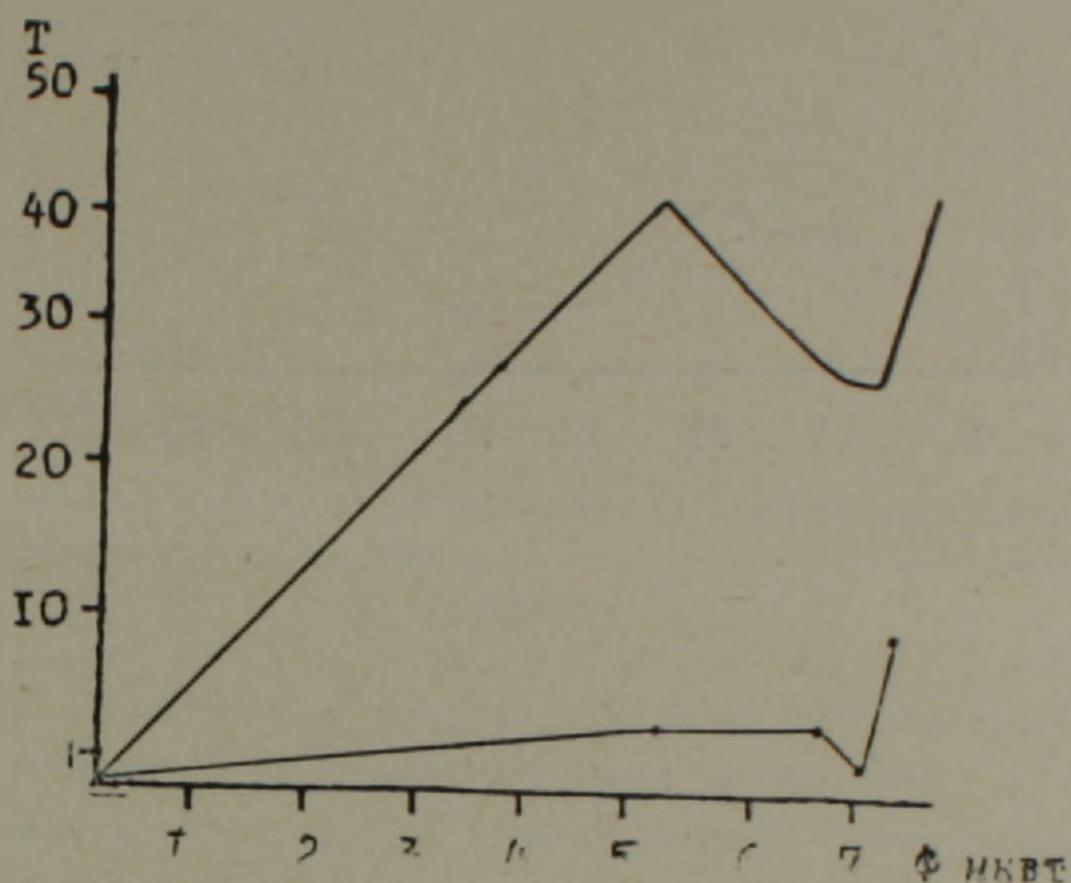


Рис. 3. Зависимость уровня окислительной реакции от энергии возбуждающего зеленого ($\lambda = 503$ нм) света по коэффициенту поглощения в УФ области спектра ($\lambda = 340$ нм). Разный наклон кривых определяет различное функциональное состояние сетчаток (сухость, усталость и т. д.).

тельным актам, хотя к быстрым электрическим процессам глаза они, по-видимому, не имеют отношения. Одновременно с изучением окислительных реакций в изолированной сетчатке проводились измерения рН в глазном бокале живой лягушки. Эти исследования показали явную реакцию рН сетчатки на свет, отмечено изменение рН на свету в кислую сторону. Процесс, как и в случае окислительных реакций, обратимый, так как после выключения света возвращает рН сетчатки к первоначальному значению и временные характеристики изменения рН в обоих случаях похожи (рис. 4).

Концентрация водородных ионов понижается наиболее резко в течение первых 5-ти мин после включения, а весь процесс от включения до стабилизации показания длится приблизительно 20 мин, т. е. время, примерно равное времени выцветания. При включении и выключении света рН меняется на 0,15—0,2 ед. Сетчатка содержит глютамины и легко его гидролизует при освещении. При гидролизе глютамина выделяется карбоксильная группа и аммиак, причем кислотные свойства карбоксильной группы выражены сильнее, чем основные у аммиака. Очевидно, именно гидролиз глютамина и повышает кислотные свойства сетчатки при освещении [4, 5].

Пири и ван Гейнинген [5], анализируя работу Кабаковой [4], пришли к выводу, что хотя и неизвестно отношение этих изменений к распаду

родопсинна, однако эти данные указывают на прямую связь либо с распадом родопсинна, либо с прохождением нервного импульса по нейронам сетчатки. Кинетические (временные) характеристики, полученные нами, указывают на отношение этих процессов к фотолизу родопсинна.

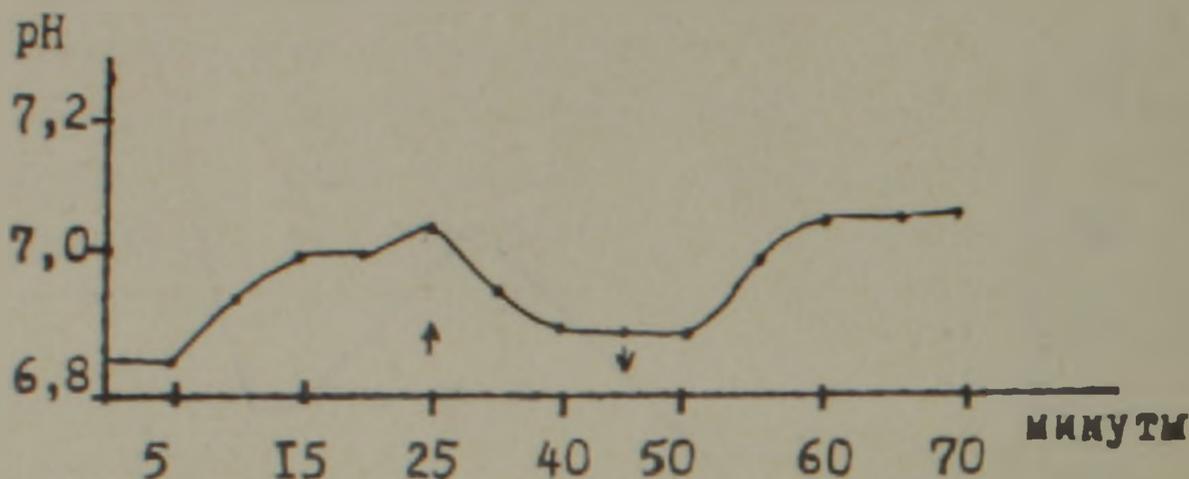


Рис 4. Кинетика изменения pH темноадаптированного глазного бокала лягушки (прижизненные измерения) на включение и выключение «белого» света.

В заключение следует отметить, что изученные нами процессы имеют отношение к зрительному акту, а временные характеристики, давая большую информацию о процессах в сетчатке, заслуживают серьезного изучения.

Институт экспериментальной биологии
АН АрмССР

Поступило 2.VIII 1974 г

Մ. Գ. ԳԱԶԱՐՅԱՆ, Լ. Ա. ԳԱՍՊԱՐՅԱՆ, Լ. Պ. ԿԻՇԻՆԵՎՍԿԻ, Գ. Վ. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ

ՈՐՈՇ ՅՈՏՈՔԻՄԻՈՎԱՆ ՌԵԱԿՑԻԱՆԵՐ ԳՈՐՏԻ ԱՂՔԻ ՑԱՆՑԱԹԱՂԱՆԹՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Հողվածում ներկայացված են գորտի աչքի մթնային ադապտացիայի ենթարկված թարմ մեկուսացված ցանցենու ոտոցայինի գունաթափման ժամանակային բնութագրերի տվյալները, երբ ցանցենին լուսավորվում էր կանաչ լույսի (λ-503նմ) միջին շափով (3—7 մկս) և մթնային վերականգնմամբ:

Ուսումնասիրված են շնչառական ռեակցիաները լույսի առկայության ժամանակ և մթության մեջ, ցանցաթաղանթի կողմից ուլտրամանուշակագույն ճառագայթների (λ-340 նմ) կլանման շափով, ինչպես նաև ցանցենու pH-ի փոփոխությունները սպիտակ լույսի ազդեցության տակ:

Նկատելի է նկարագրված պրոցեսների կապը տեսողական ընկալման հետ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Демирчоглян Г. Г., Любин В. М., Нагапетян Х. О., Гаспарян Л. А., Кишиневский Л. П., Кокина Н. Г. Тез. 1-го съезда физиологов Армении. 17—20. VI—1970, ст. 51—52.

2. Демирчоглян Г. Г., Мирзоян В. С., Нагапетян Х. О. Фоторецепция птиц. Ереван, 1972.
3. Демирчоглян Г. Г., Давтян Р. У. За рулем, 4, М., 1974.
4. Кабакова Е. Физиологический журнал СССР, 35, 385, 1946.
5. Пирн А. и Р. ван-Гейнинген, Биохимия глаза, 1968.
6. Этингоф Р. Н., Остапенко Н. А. Успехи современной биологии, 72, 2, 200, 1971.
7. Arden G. B. Progr. Biophys. and Mol. Biol., 19, 2, 371—421, 1969.
8. Bauman Ch. Pflügers Arc., 298, 61, 1967.
9. Stckel W. Reprinted from Science, 148, 3670, p. 648, 1965.