

Биолог. журн. Армении, 1-2 (58), 2006

УДК 611.843.1-018.29+547.436

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ТАУРИНА В СЕТЧАТКЕ ГЛАЗА ЯЩЕРИЦЫ, ЛЯГУШКИ И КРЫСЫ ПРИ ТЕМНОВОЙ И СВЕТОВОЙ АДАПТАЦИИ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

А.М. ПЕТРОСЯН, Л.А. ПОГОСЯН

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыяна ИАН РА, 375014, Ереван

Исследовано содержание таурина в сетчатке глаза и ретинальном пигментном эпителии (РПЭ) ящерицы (*Laudakia caucasica*), лягушки (*Rana ridibunda*), а также в сетчатке крысы в условиях темновой и световой адаптации с использованием метода тонкослойной хроматографии (ТСХ). Содержание таурина в сетчатке агам примерно 25 - 30 мМ, лягушек 1,5 мМ и крыс 3 - 4 мМ. В пигментном эпителии содержание таурина примерно на 30% ниже, чем в сетчатке. Установлено, что под воздействием света в сетчатке белых крыс концентрация таурина снижается, а в сетчатке агам и лягушек, наоборот, несколько повышается.

Գետազոտվել է տաուրինի պարունակությունը մողեսների (*Laudakia caucasica*) և գորտերի (*Rana ridibunda*) ցանցաթաղանթում և ցանցենու պիգմենտային էպիթելում (ՑՊԷ), ինչպես նաև սպիտակ վայրի առնետների ցանցաթաղանթում. նրբաշերտ քրոմոտոգրաֆիայի (ԼԵԶ) օգնությամբ մրնային կամ լուսային ադապտացման պայմաններում: Տաուրինի պարունակությունը կազմել է մոտ 25 - 30 մՄ, 1,5 մՄ և 3-4 մՄ համապատասխանաբար մողեսի, գորտի ու առնետի ցանցաթաղանթում համապատասխանաբար: Սողեսի և գորտի ՑՊԷ-ում տաուրինի պարունակությունը մոտ 30 %-ով ցածր էր համեմատած ցանցենու հետ: Լույսի ազդեցության ներքո, առնետի ցանցաթաղանթում տաուրինի քանակը նվազում է մինչդեռ մողեսի ու գորտի ցանցաթաղանթում այն հակառակը քաճրանում է:

It has been estimated taurine content in lizards (*Laudakia caucasica*) and frogs (*Rana ridibunda*) retina and retinal pigment epithelium (RPE) and in retina of wild type albino rats, under light and dark adaptation by thin layer chromatography (TLC). Content of taurine was estimated around 25 - 30 mM, 1,5 mM and 3 - 4 mM in lizard, frog and in rat retina respectively. In lizard and frog RPE taurine was around 30% lower compared with retina. Under light taurine was decreased in rat retina while in lizard and frog retina it was rather increased.

Таурин - сетчатка - пигментный эпителий - фоторецепторы

Таурин, 2-аминоэтансульфоновая кислота, простая по структуре - $\text{NH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{SO}_3\text{H}$ и химически стабильная свободная аминокислота, широко распространена в возбудимых клетках и тканях, таких как мозг, сетчатка, нервные ткани, сердце, мышцы, нейтрофилы и тромбоциты [13]. По сравнению с другими тканями и органами, в сетчатке позвоночных содержание таурина наиболее высокое и составляет 10-40 мМ [2, 4, 12]. Большая часть, 50-80 % таурина, содержащегося в сетчатке, приходится на фоторецепторные клетки [1, 8]. Таурин вместе с токоферолом и ретинолом

образуют мощную антиоксидантную систему сетчатки и пигментного эпителия [3, 6], он является также ингибиторным нейромедиатором в сетчатке. [3]. У кошек в результате таурин-дефицитной, казеиновой диеты развивается дегенерация сетчатки с последующей слепотой [14]. На ранних стадиях такая дегенерация обратима, если в рацион добавляется таурин [14]. В 1986 г. было сделано предположение, что таурин может участвовать в транспорте ретиноидов. [7,8]. Затем был синтезирован таурет - конъюгат таурина с ретинальдегидом [6]. Далее было установлено, что таурет - ретинилидентаурин-эндогенное соединение, содержащееся в сетчатке и в пигментном эпителии животных [8, 9, 10]. При конъюгировании с таурином жирорастворимые алдегиды ретинола переходят в водорастворимую форму, чем могут способствовать регенерации родопсина [8]. В данном исследовании была поставлена задача определить содержание таурина в сетчатке и ретинальном пигментном эпителии (РПЭ) животных с различным типом сетчаток в условиях темновой и световой адаптации методом тонкослойной хроматографии. В качестве объекта исследования были выбраны кавказские агамы (*Laudakia caucasica*) - ящерицы, ведущие дневной образ жизни, обладающие колбочко-доминантной сетчаткой, озерные лягушки (*Rana ridibunda*), обладающие смешанной, палочко - колбочковой сетчаткой и белые крысы, ведущие ночной образ жизни и имеющие в сетчатке в основном только палочки.

Материал и методика. Животных перед забоем подвергали темновой (18 ч в полной темноте) или световой (агам при освещенности 5000 лк в течение 2 ч, а лягушек и крыс - при 500 лк в течение 3 ч) адаптации. Животных забивали сразу же после окончания адаптации, затем декантировали, а глаза экзуклировали. Глазное яблоко разрезали по экваториальной линии, роговицу, радужную оболочку, хрусталик и стекловидное тело удаляли. Из полученного бокала сетчатку и пигментный эпителий осторожно извлекали и отделяли друг от друга. С темноадаптированными животными все процедуры проводили в темной комнате при свете красного фотофонаря. Полученные образцы сетчаток и пигментного эпителия быстро взвешивали, прибавляли 300 мкл 0,1 М перхлорной кислоты и гомогенизировали. Образцы оставляли на 2 ч для экстракции, после чего центрифугировали при 12000 об/мин в течение 15 мин (центрифуга модели К-24). Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках «Арисорб» (несуший слой / силикагель), применяя в качестве подвижной фазы смесь бутанол / уксусная кислота / дистиллированная вода в пропорции 12 : 3 : 5. Заранее были приготовлены растворы стандарта таурина (Sigma Chemical Co., США) различных концентраций - 0,25; 0,5; 1; 2,5 и 5 мМ, на 0,1 М перхлорной кислоте. Растворы стандарта таурина и супернатанты проб в количестве по 1 мкл наносили с помощью автоматической пипетки на пластинки и хроматографировали восходящим способом в течение 2 ч. Для промывки полученных пятен пластинки опрыскивали 0,1%-ным раствором нингидрина в смеси уксусной кислоты и этилола в пропорции 1:9, с последующим нагреванием пластинок в термостате при 120° в течение 5 мин. Содержание таурина в пробах определяли визуально, по интенсивности окраски полученных пятен, учитывая влажный вес проб и степень их разбавления.

Результаты и обсуждение. Во всех исследованных образцах таурин легко идентифицировался тем, что пятна стандартного и эндогенного таурина находились на одной линии и в данной системе имели тот же R_f , равный 0,33 - 0,35. Было измерено по 6 проб темно- и светоадаптированных сетчаток и РПЭ лягушек и агам, и 8 проб сетчаток крыс. Следует отметить, что динамика изменений во всех пробах совпадала. В отличие от лягушек и



Рис. 1. Хроматограмма сетчаток крысы.
Т - темноадаптированные сетчатки (I и III)
С - светoadaptированные сетчатки (II и IV)

агам, у белых крыс слой РПЭ не развит и не пигментирован. Ввиду трудностей при разделении сетчатки и РПЭ у крыс эти слои гомогенизировали вместе. Толщина слоя РПЭ у крыс 1-2 мкм, а влажный вес его составляет менее 2 % от влажного веса сетчатки, средняя величина которого 11 мг. В темноадаптированной сетчатке крысы концентрация таурина оценивалась примерно в 3-4 мМ (рис. 1). При световой адаптации (500 лк / 3 ч) содержание таурина несколько снижалось (рис. 1). Снижение содержания эндогенного таурина на свету отмечено и другими авторами [5, 17]. Также установлено, что при освещении из изолированной сетчатки крысы происходит выброс эндогенного таурина [15].

Из всех изученных образцов наименьшее количество таурина

обнаружено в РПЭ лягушек. Независимо от адаптации его концентрация не превышает 1 мМ (рис. 2, III и IV). В сетчатке лягушки концентрация таурина немного выше 1,3-1,5 мМ. Заметно, что при световой адаптации (500 лк / 3 ч) концентрация таурина возрастает примерно на 30 % по сравнению с сетчаткой темноадаптированных лягушек. Наиболее высокое содержание таурина обнаружено в колбочкодоминантной сетчатке агам. В условиях темновой адаптации концентрация его в сетчатке глаза агам составляет порядка 25 мМ. На свету в их сетчатке было отмечено повышение концентрации таурина на 20-25 %. В РПЭ, наоборот, при световой адаптации содержание таурина несколько снижается. Следует отметить, что глаз агам имеет довольно оригинальное строение. Глазное яблоко имеет не шарообразную, как у других животных, а грушевидную форму. Диаметр передней камеры глаза в 3 раза меньше диаметра задней камеры. Агамы ведут дневной образ жизни и большую часть дня проводят на солнце, при освещенности несколько десятков тысяч люкс. В таких условиях скорость распада родопсина с образованием цитотоксического свободного транс-ретинала и свободных радикалов очень высока. Интересно отметить, что таурин играет важную роль в защите фоторецепторов от повреждающего действия света [6, 11].

Итак, было показано, что в зависимости от адаптации и типа сетчатки содержание эндогенного таурина изменяется. В палочкодминантной сетчатке белой крысы при световой адаптации концентрация таурина уменьшается. У лягушек с палочко - колбочковым типом сетчатки и у агам с полностью колбочковой сетчаткой на свету содержание таурина, наоборот, возрастает. По-видимому, роль таурина в функционировании этих двух типов

фоторецепторных клеток разная. И у лягушек, и у агам в РПЭ в среднем содержание таурина ниже на 30-35 %, по сравнению с сетчаткой. Необходимо отметить, что таурин был обнаружен в омматидии (сложном глазу) кузнечика, причем на свету концентрация таурина в омматидии не изменялась и составляла 1,8 мМ, в то время как концентрация аспартата резко возрастала, с 2,6 до 5 мМ [12].

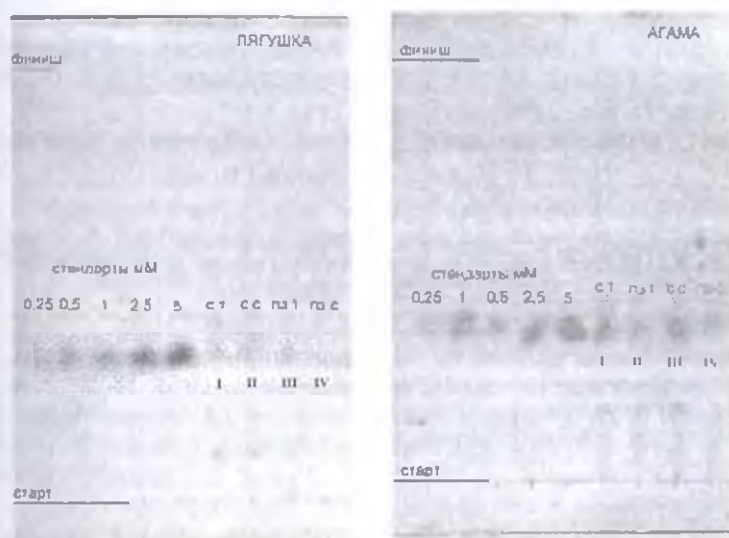


Рис. 2. Хроматограмма сетчатки и РПЭ лягушки (слева) и агамы (справа)
ст - темноадаптированная сетчатка, сс - светлоадаптированная сетчатка,
пз - темноадаптированный РПЭ, пс - светлоадаптированный РПЭ

В настоящее время в литературе рассматриваются несколько возможных функций таурина в сетчатке. Установлено, что таурин участвует в регуляции процесса фосфорилирования белков, входящих в каскад фототрансдукции, регулирует поток ионов Ca^{2+} в фоторецепторы, выступает в качестве ингибиторного нейромедиатора в синапсах сетчатки, обладает сильной антиоксидантной активностью [3, 6]. Кроме того, таурин - осмолит и участвует в поддержании нормального объема клетки [3, 6]. Таурин, конъюгируясь с ретиноидами, переводит их в водорастворимую форму и тем самым участвует в транспорте ретиноидов из сетчатки в РПЭ и обратно [8, 9]. Изменение содержания таурина в сетчатке и пигментном эпителии под воздействием света или темноты, установленное в данном исследовании, может быть по-разному связано с каждым из вышеупомянутых процессов. Вместе с тем, метод ТСХ, несмотря на свою доступность, не позволяет делать более точные измерения. Тем не менее, он позволил оценить концентрацию таурина в сетчатке и РПЭ и выяснить динамику изменений, индуцированных светом.

Эти исследования были проведены при поддержке гранта ANSEF 05-NS-biochem-821-60 и 0629 Министерства науки и образования РА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lake N., Verdon-Smith C. Curr. Eye Res. 8, 163-173, 1989.
2. Lima L., Obregon F., Rouso T., Quintal M., Benzo Z., Auladell C. Neurochem Res. 29, 247-255, 2004.
3. Militante J., Lombardini J.B. Nutr. Neuroscience, 5, 75-90, 2002.
4. Orr H.T., Cohen A.I., Lowry O.H. J. Neurochem. 26: 609-611, 1976.
5. Oraedu A., Voaden M., Marshall J. J. Neurochem. 35, 1361-1369, 1980
6. Pasantes-Morales H., Cruz C. Brain Res.330, 154-157, 1985.
7. Petrosian A.M., Haroutounian, J.E. "Taurine: Functional Neurochemistry, Physiology, and Cardiology", (Eds. Pasantes-Morales, H., et al.). Wiley-Liss, New York, 71-475, 1990.
8. Petrosian A.M., Haroutounian J.E., Zueva L.V. "Taurine-2: Basic and Clinical Aspects". (Eds. Huxtable R., Azuma J. et al.), Plenum Publ. Corp., New York and London, 333-342, 1996
9. Petrosian A.M., Haroutounian J.E., Gundersen T., Blomhoff R., Fugelli K. and Kanli H. TAURINE 4: Taurine & Excitable Tissues. (Eds. by Della Corte L. et al.) Kluwer Academic Publ., 453-460, 2000.
10. Petrosian A.M. US Patent No: 6,391,924 B1, 2002
11. Petrosian A.M., Haroutounian J.E., Poghosyan L.A., Stepanyan R.V., Topchyan H.V. Electronic journal of Natural sciences, 1 (6), 55-59, 2006.
12. Petrosian A.M., Poghosyan L.A., Haroutounian J.E. Amino Acids, 30, 2006.
13. Schuller-Levis G.B., Park E. FEMS Microbiology, Letters, 226,195-202. 2003
14. Schmidt S.Y., Berson E.L., Watson, G., Huang, C. Inves.Ophtal.Vis.Sci. 16, 673-678, 1977.
15. Schmidt S.Y. Exp. Eye Res. 26, 529-535, 1978.
16. Voaden M.J., Lake N., Marshall J., Morjaria B. Exp. Eye Res. 25, 249-257, 1977.
17. Wasowicz M., Morice C., Ferrari P., Callebert J., Versaux-Botteri C. Invest Ophtalmol Vis Sci; 43, 813-820, 2002.

Поступила 13.11.2006