

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕТИНАЛЯ И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ В ФОТОРЕЦЕПТОРНОЙ КЛЕТКЕ МЕТОДОМ ИМПУЛЬСНОГО ФОТОЛИЗА

© 2020 г. Г. Р. Каламкарров^{1*}, Т. Ф. Шевченко¹, П. В. Аболтин¹,
Т. С. Константинова¹, П. П. Левин¹

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: kalam2@rambler.ru

Поступила в редакцию 23.10.2019;

после доработки 23.10.2019;

принята в печать 20.11.2019

Предполагается, что одна из причин фотоповреждения сетчатки глаза — накопление в зрительных клетках полностью-*транс*-ретиноля. Однако полностью-*транс*-ретиноль в процессе фотолиза образуется внутри диска фоторецепторной клетки и переносится в цитоплазму клетки, где с высоким выходом преобразуется в ретинол — нефототоксическое соединение. Внутри диска, где полностью-*транс*-ретиноль может накапливаться, он может образовывать с аминокетонами белков и липидов шиффовы основания, которые также не являются фототоксическими соединениями. Кроме того, образующиеся свободные изомеры ретиноля связываются со специфическими ретинольсвязывающими белками, которые могут экранировать их от кислорода. Таким образом, вопрос о том, в каких концентрациях свободный полностью-*транс*-ретиноль может накапливаться внутри клетки, не ясен. В данной работе предложено оценивать концентрацию свободного полностью-*транс*-ретиноля в клетке по выходу возбужденного триплетного состояния, поскольку ни шиффовы основания полностью-*транс*-ретиноля, ни ретинол в возбужденное триплетное состояние не переходят. Показано, что в равновесном состоянии в нативной клетке 70% полностью-*транс*-ретиноля образуют шиффовы основания. Это существенно снижает вероятность того, что именно полностью-*транс*-ретиноль является основным индуктором фотоповреждения. Кроме того, показано, что квантовый выход реакции образования возбужденного триплетного состояния ретиноля при его связывании с межфоторецепторными белками существенно снижается.

Ключевые слова: ретиноль, триплетное состояние, фоторецепторная клетка, межфоторецепторный ретинольпереносающий белок, фотоиндуцированные повреждения, шиффовы основания, лазерный фотолиз.

DOI: 10.31857/S0207401X20060047

ВВЕДЕНИЕ

Ретиноль (R) является хромофором светочувствительного белка сетчатки глаза родопсина. Первичным процессом, запускающим фототрансдукцию — каскад реакций преобразования света зрительной клеткой в сенсорный сигнал — является фотоизомеризация R из 11-*цис*-конфигурации в полностью-*транс*-конфигурацию [1]. В ходе этих реакций полностью-*транс*-ретиноль (all-trans-retinal (ATR)) отделяется от белка, транспортируется в пигментный эпителий (ПЭ), где ферментативным путем преобразуется в 11-*цис*-конфигурацию и переносится обратно в фоторецепторную клетку [2].

Перенос ретиноля осуществляется системой ретинольсвязывающих белков, которые сходны по своей структуре с сывороточным альбумином

и обеспечивают перенос R в водной фазе (в цитоплазме клетки), а также его прохождение через клеточные мембраны. Перенос от родопсина в ПЭ происходит в форме ретинола, а из ПЭ к родопсину — в форме ретиноля [3]. Поскольку R и его производные являются гидрофобными соединениями, они локализованы либо в белках, либо в липидном бислое фоторецепторной мембраны, где возможно образование конъюгатов R, способных фотогенерировать активные формы кислорода [4–6].

То обстоятельство, что в сетчатке до 5% ретиноля находится в несвязанной с родопсином форме, является, как предполагается, одной из причин фотоповреждения структур сетчатки и пигментного эпителия, приводящего к развитию ряда патологий [5]. Одним из наиболее ярких примеров таких патологий является болезнь

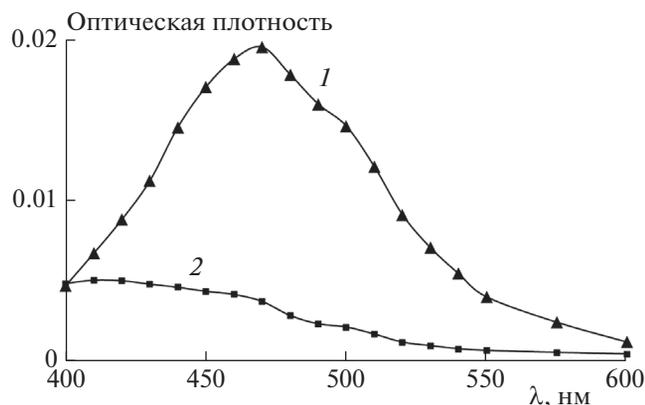


Рис. 1. Дифференциальные спектры поглощения промежуточных продуктов, полученные при лазерном фотолизе обескислороженных растворов АТР (10^{-5} моль/л) в присутствии липосом из фосфатидилхолина ($8 \cdot 10^{-3}$ моль/л ФХ) через 0.5 (1) и 100 мкс (2).

Штаргардта — заболевание, при котором в сетчатке из-за генетических дефектов образуется фототоксический конъюгат ретиналя — А2Е, который и считается причиной дегенеративных изменений [6].

Основными механизмами фототоксического действия ретиналя и его конъюгатов являются генерация под действием света активных форм кислорода (АФК) и последующее окисление белков и липидов клетки. Однако при количественной оценке возможной концентрации свободного ретиналя эти представления сталкиваются с рядом трудностей. Концентрация родопсина благодаря плотной упаковке дисков в наружном сегменте фоторецептора составляет порядка 3 ммоль/л [7], а по другим данным — 3.8 ммоль/л [8], и поэтому формально при интенсивном освещении, приводящем к полному обесцвечиванию родопсина, в фоторецепторной клетке могло бы образовываться до 4 ммоль/л АТР. Под обесцвечиванием в биологической литературе понимается изменение окраски родопсина ($\lambda_{max} = 500$ нм) при освещении, приводящем к распаду последнего на белок опсин и хромофор АТР ($\lambda_{max} = 380$ нм). Ясно, что при такой огромной концентрации, несмотря на невысокий квантовый выход генерации АФК, АТР оказывал бы катастрофическое повреждающее действие. В нативной клетке этого не происходит из-за высокой активности ретинолдегидрогеназы — фермента, катализирующего переход АТР в полностью-*транс*-ретинол [9]. Именно высокая активность фермента есть причина того, что даже при очень высоких освещенностях значительные количества R не удается обнаружить в фоторецепторной клетке. Однако восстановление R в ретинол происходит в цитоплазме клетки, а высвобождается он во внутридисковое пространство, откуда транспортируется в цитоплазму. Во внутридисковом пространстве

АТР образует шиффовы основания с аминокруппами, прежде всего с аминокруппами фосфатидилэтаноламина (ФЭА), концентрация которого в фоторецепторе составляет 10 ммоль/л [10]. Как известно, шиффовы основания АТР не образуют триплетного состояния, и поэтому не являются активными генераторами АФК. Таким образом, свободный полностью-*транс*-ретиноль может находиться только во внутридисковом пространстве и при этом — в равновесии с шиффовыми основаниями с аминокруппами белков и липидов.

В связи с этим мы поставили задачу определить, какая часть АТР во внутридисковом пространстве образует шиффовы основания и не обладает фототоксическими свойствами. Поскольку шиффовы основания не образуют триплетов, по концентрации возбужденного триплетного состояния ретиналя ($^3\text{АТР}$) можно определить константы равновесия шиффовых оснований как в липосомах из ФЭА, так и в нативных, содержащих родопсин, фоторецепторных мембранах (ФРМ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для того чтобы более точно определить локализацию ретиналя, методом лазерного фотолиза [11, 12] проведено исследование спектрально-кинетических характеристик $^3\text{АТР}$ в разбавленных водных растворах межрецепторного ретинальпереносащего белка (МРПБ) и липосом из фосфатидилхолина (ФХ). Методы приготовления образцов МРПБ белка и липосом описаны в работе [13].

Импульсное фотовозбуждение АТР в растворах липосом из ФХ ($8 \cdot 10^{-3}$ моль/л ФХ) приводит за время лазерной вспышки к образованию $^3\text{АТР}$, характеризующегося известным спектром поглощения с λ_{max} около 470 нм (рис. 1, спектр 1) [12, 14–16]. Квантовый выход $^3\text{АТР}$ в растворах липосом из ФХ примерно в 5 раз ниже, чем в растворах метанола. Такой же результат был получен ранее для липосом из кардиолипина, что свидетельствует о том, что АТР находится в полярном молекулярном окружении [12, 14–16].

Кинетика гибели $^3\text{АТР}$ как в обескислороженном, так и в воздушнонасыщенном растворе липосом из ФХ при низкой начальной концентрации $^3\text{АТР}$ описывается уравнением первого порядка. Полученное значение константы скорости тушения $^3\text{АТР}$ молекулярным кислородом близко к аналогичному значению, полученному ранее в 100%-ном метаноле и водной суспензии липосом из кардиолипина, и существенно выше, чем в водном растворе [12]. Высокое значение этой константы в липосомах обусловлено высокой концентрацией O_2 в липидном бислое (выше, чем в водном объеме) и его высокой латеральной подвижностью [17].

Фотолиз АТР в водном растворе МРПБ приводит к образованию ^3ATR (λ_{max} около 460 нм) с низким квантовым выходом (примерно в 2 раза ниже, чем в липосомах из ФХ). В присутствии МРПБ происходит, с одной стороны, ускорение, а с другой — замедление гибели ^3ATR в обескислороженных растворах. Аппроксимация кинетических кривых по двухэкспоненциальному закону дает их “быструю” и “медленную” компоненты приблизительно с одинаковыми вкладками и различающимися в 10 раз значениями константы скорости [13]. Двухэкспоненциальный характер кинетики указывает на наличие по меньшей мере двух центров связывания ретиналя, что для МРПБ выявлено ранее другими методами [18].

При переходе к воздушнонасыщенным растворам наблюдается ускорение “быстрой” компоненты и возрастание ее вклада [13]. Константа скорости гибели “медленной” компоненты практически не изменяется. Низкие наблюдаемые величины константы скорости тушения ^3ATR молекулярным кислородом свидетельствуют о том, что в белковых растворах ^3ATR защищен от кислорода, причем в МРПБ — заметно сильнее, чем в сывороточном альбумине [12]. Аналогичные эффекты наблюдались ранее при связывании с альбуминами триплетных состояний других органических молекул [19–22]. В качестве возможных причин обсуждается низкая локальная концентрация и/или подвижность растворенного кислорода в местах локализации триплетных состояний, а также стерические факторы [17, 19–23].

Введение в белковые растворы липосом приводит к резкому ускорению гибели ^3ATR в воздушнонасыщенных растворах. Кинетика гибели ^3ATR описывается в этом случае одноэкспоненциальной зависимостью с константой скорости, близкой к значению константы скорости гибели ^3ATR в растворах липосом в отсутствие белков. Однако в обескислороженных растворах кинетика гибели ^3ATR остается двухэкспоненциальной. По мере увеличения концентрации ФХ “быстрая” компонента замедляется (рис. 2), а ее вклад возрастает. Константа скорости “медленной” компоненты при этом практически не изменяется. Таким образом, АТР остается локализованным в белках и в присутствии липосом. Только при большой концентрации ФХ (≥ 5 мМ, что соответствует мольному соотношению ФХ/белок = 500) кинетика гибели ^3ATR совпадает с кинетикой гибели ^3ATR в липосомах.

В целом можно сделать вывод о том, что ретиналь при наличии в системе достаточного количества ретинальпереносящих белков (как альбумина, так и специфического МРПБ из сетчатки глаза) будет переходить из липидного бислоя в белковые “карманы”. Существенная защита ретиналя от молекуляр-

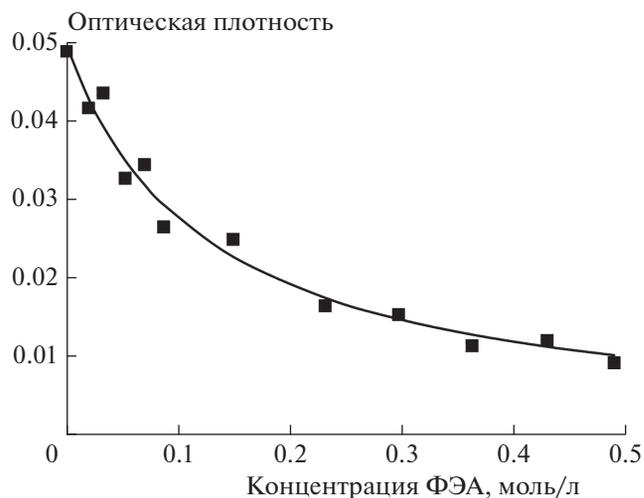


Рис. 2. Зависимость интенсивности поглощения ^3ATR при 470 нм, зарегистрированная через 20 нс после лазерного импульса в присутствии л-ФХ ($4 \cdot 10^{-3}$ моль/л ФХ), от концентрации ФЭА в системе.

ного кислорода при его связывании с белками значительно снижает вероятность образования под действием света АФК и, таким образом, оказывает существенное протекторное действие, защищающее клеточные компоненты от вредного действия света.

Целью дальнейших экспериментов была попытка выяснить, какое максимальное количество свободного АТР может образовываться в нативной фоторецепторной клетке с учетом того, что значительная его часть будет образовывать шиффовы основания с аминок группами белков и липидов как снаружи, так и внутри фоторецепторного диска. С этой целью регистрировалась относительная концентрация возникающего под действием света ^3ATR , которая пропорциональна концентрации свободного ретиналя в системе, где АТР и шиффовы основания находятся в равновесии.

В экспериментах использовали два типа липидов — ФХ, не содержащий аминок групп, и ФЭА, содержащий одну аминок группу. В первой серии экспериментов к суспензии липосом из ФХ (л-ФХ) добавляли суспензию липосом из ФЭА. Введение в раствор ФЭА приводит к уменьшению наблюдаемого выхода ^3ATR , но не влияет на кинетику его гибели. Фосфатидилэтанолламин формирует шиффово основание с АТР, которое не образует триплетное состояние при прямом фотолизе. Соответствующая концентрационная зависимость (рис. 1) указывает на существование равновесия



Зависимость на рис. 1 хорошо описывается соответствующим выражением:

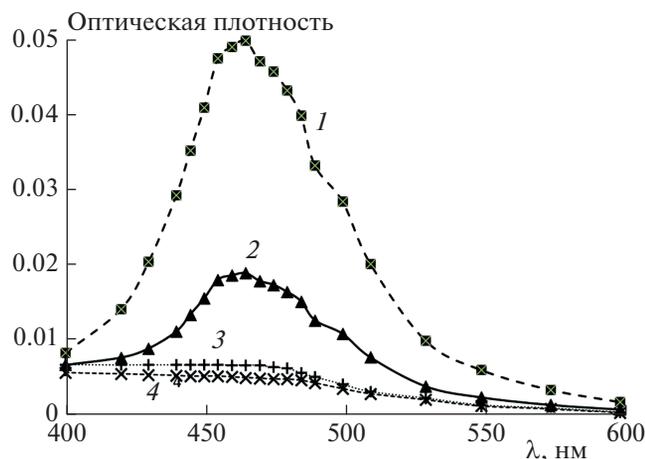


Рис. 3. Дифференциальные спектры поглощения промежуточных продуктов, полученные при лазерном фотолизе растворов АТР (10^{-5} моль/л) в присутствии л-ФХ ($4 \cdot 10^{-3}$ моль/л ФХ) и в ФРМ через 0.02 и 5 мкс после лазерного импульса: 1 – дифференциальный спектр поглощения АТР в л-ФХ через 0.02 мкс; 2 – дифференциальный спектр поглощения АТР в ФРМ через 0.02 мкс; 3 – дифференциальный спектр поглощения АТР в л-ФХ через 5 мкс; 4 – дифференциальный спектр поглощения АТР в ФРМ через 5 мкс.

$$[{}^3\text{ATR}]_{\text{набл}} = [{}^3\text{ATR}]_0 / (1 + K[\text{ФЭА}]), \quad (2)$$

где $[{}^3\text{ATR}]_{\text{набл}}$ – наблюдаемая начальная концентрация ${}^3\text{ATR}$ в присутствии ФЭА, $[{}^3\text{ATR}]_0$ – начальная концентрация ${}^3\text{ATR}$, наблюдавшаяся в отсутствие ФЭА, а $K = 8.0$ (мольн. доля) $^{-1}$ – константа равновесия. Выражение (2) получается при соответствующем рассмотрении кинетической схемы (1) при условии $[\text{ATR}] \ll [\text{ФЭА}]$, которое хорошо выполняется в данных экспериментальных условиях.

В следующей серии экспериментов использовали суспензию ФРМ, выделенных из зрительных клеток и засвеченных до полного распада комплекса опсина с 11-*цис*-ретиналом (рис. 3). Фотолиз такого образца приводит к образованию ${}^3\text{ATR}$, спектрально-кинетиические характеристики которого практически полностью совпадают с аналогичными параметрами л-ФХ (рис. 1).

Однако квантовый выход ${}^3\text{ATR}$ в фоторецепторных мембранах составляет только 30% от соответствующего выхода, получающегося при фотолизе АТР, добавленного в раствор л-ФХ в эквимольном количестве. Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод, что при полном обесцвечивании родопсина 70% АТР образует шиффовы основания и не генерирует АФК.

Важно отметить, что определить константы равновесия процесса перехода АТР в шиффовы основания можно было бы по сдвигу максимума поглощения, однако в нативной фоторецепторной

мембране, содержащей родопсин, это сделать невозможно из-за наличия долгоживущих продуктов фотолиза родопсина, максимум поглощения которых отличается от аналогичной характеристики АТР из-за его локализации в “белковых карманах” родопсина. Поэтому можно полагать, что определение равновесия по квантовому выходу ${}^3\text{ATR}$ является более адекватным методом. Использование метода исследования кинетики тушения возбужденных триплетных состояний для изучения нативной биологической системы оказалось крайне плодотворным. Такой подход применялся только к химическим или модельным биологическим системам [24–27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фоторецепторные клетки сетчатки позвоночных работают в условиях высокого содержания кислорода. Относительный объем водной фазы фоторецепторной клетки очень мал, практически весь объем клетки занимают фоторецепторные диски, представляющие собой замкнутые мембранные образования с крайне высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот, а концентрация кислорода в липидной фазе существенно выше, чем в воде. Более 90% фоторецепторных клеток сетчатки человека в силу ее эволюционного развития составляют палочки – клетки, которые должны работать при крайне низкой освещенности, а находятся в условиях, когда освещенность много выше. При высоких освещенностях в ходе фотолиза родопсина свободный полностью-*транс*-ретинол образуется в значительных количествах, а он является фототоксическим соединением, которое генерирует активные формы кислорода с высоким квантовым выходом. При рассмотрении возможных механизмов повреждения фоторецепторных клеток одним из ключевых является вопрос о том, как долго АТР может оставаться в свободном состоянии.

В данной работе путем измерения квантового выхода возбужденного триплетного состояния АТР в нативных фоторецепторных дисках нам удалось показать, что, хотя в зрительной клетке при высокой освещенности образуется АТР, он либо образует с аминокислотными группами белков и липидов шиффовы основания, которые не являются фототоксичными, либо связан с ретинолпереносчиками белками, которые экранируют его от кислорода и существенно снижают квантовый выход активных форм кислорода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Filipek S., Stenkamp R.E., Teller D.C., Palczewski K.* // *Annu. Rev. Physiol.* 2003. V. 65. P. 851.
2. *Strauss O.* // *Physiol. Rev.* 2005. V. 85. № 3. P. 845.
3. *Noy N.* // *Biochem. J.* 2000. V. 348. P. 438.

4. *Rozanowska M., Jarvis-Evans J., Korytowsky V.V. et al.* // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 18825.
5. *Maeda A., Maeda T., Golczak M. et al.* // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. P. 15173.
6. *Sparrow J.R., Wu Y., Kim C.Y., Zhou J.* // J. Lipid Res. 2010. V. 51. P. 247.
7. *Lamb T.D., Pugh E.N., Jr.* // Prog. Retin. Eye Res. 2004. V. 23. № 3. P. 307.
8. *Rozanowska M., Sarna T.* // J. Photochem. Photobiol. 2005. V. 81. № 6. P. 1305.
9. *Palczewski K., Jager S., Buczylo J. et al.* // Biochem. 1994. V.33. P.13741.
10. *Fliesler S.J., Anderson R.E.* // Prog. Lipid Res. 1983. V. 22. № 2. P. 79.
11. *Левин П.П., Татиколов А.С., Панова И.Г., Сульимова Н.Б.* // Химия высоких энергий. 2010. Т. 44. № 3. С. 244.
12. *Левин П.П., Аболтин П.В., Шевченко Т.Ф., Каламкаргов Г.Р.* // Химия высоких энергий. 2010. Т. 44. № 6. С. 555.
13. *Левин П.П., Аболтин П.В., Константинова Т.С., Шевченко Т.Ф., Каламкаргов Г.Р.* // Химия высоких энергий. 2013. Т. 47. № 3. С. 191.
14. *Бенассон Р., Лэнд Э., Траскот Т.* Флеш-фотолиз и импульсный радиолиз. Применение в биохимии и медицинской химии. М.: Мир, 1987.
15. *Becker R.S.* // Photochem. Photobiol. 1988. V. 48. P. 369.
16. *Harper W.S., Gaillard E.R.* // Photochem. Photobiol. 2001. V. 73. P. 71.
17. *Abuin E.B., Lissi E.A.* // Prog. React. Kinet. 1991. V. 16. P. 1.
18. *Chen Y., Noy N.* // Biochemistry. 1994. V. 33. № 35. P. 10658.
19. *Borissevitch I.E., Tominaga T.T., Schmitt C.C.* // J. Photochem. Photobiol., A. 1998. V. 114. P. 201.
20. *Lang K., Wagnerova D.M., Engst P., Kubat P.* // Intern. J. Res. Phys. Chem. Chem. Phys. 1994. V. 187. P. 213.
21. *Qu X., Komatsu T., Sato T. et al.* // Bioconjugate Chem. 2008. V. 19. P. 1556.
22. *Alarcon E., Edwards A.M., Aspee A., Borsarelli C.D., Lissi E.A.* // Photochem. Photobiol. Sci. 2009. V. 8. P. 933.
23. *Boch R., Mohtat N., Lear Y. et al.* // Photochem. Photobiol. 1996. V. 64. P. 92.
24. *Лобанов А.В., Дмитриева Г.С., Сульимова Н.Б., Левин П.П.* // Хим. физика. 2014. Т. 33. № 5. С. 15.
25. *Мардаleyшвили И.Р., Левин П.П., Иванов В.Б.* // Хим. физика. 2009. Т. 28. № 7. С. 34.
26. *Куценова А.В., Кутыркин В.А., Левин П.П.* // Хим. физика. 1989. Т. 8. С. 1388.
27. *Куценова А.В., Сульимова Н.Б., Левин П.П.* // Хим. физика. 2010. Т. 29. № 9. С. 65.