

КАК МЫ ВИДИМ

П. П. ФИЛИППОВ

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

HOW WE CAN SEE

P. P. PHILIPPOV

If you would like to know how we can see, what is the arrangement of the eye, the retina and a photoreceptor cell, how is the molecular machinery, which is responsible for visual transduction, organized, and how it functions, then you should have access to foreign scientific editions since there are no similar current books and reviews in Russian. This article would help to fill up the gap and could serve as a short introduction to the problem of visual reception.

Если у вас возник интерес к тому, как устроены глаз, сетчатка и фоторецепторные клетки, как организована и функционирует "молекулярная машина", передающая зрительный сигнал, а доступа к зарубежным научным изданиям нет, то удовлетворить этот интерес будет непросто из-за отсутствия недавно опубликованных книг и обзоров на русском языке, в которых эта информация была бы сведена воедино. Более того, в нашей литературе нельзя найти современных изданий даже по такой актуальной, хотя и более узкой проблеме, как молекулярные механизмы зрения. Автор надеется, что предлагаемая статья в какой-то мере восполнит этот пробел и послужит читателю кратким введением в проблему зрительной рецепции.

www.issep.rssi.ru

ВВЕДЕНИЕ

Разнообразие приспособлений, с помощью которых живые существа воспринимают свет и зрительные образы, очень велико. Устройства для видения есть не только у высших животных, но и у низших многоклеточных и одноклеточных организмов. Так, на поверхности некоторых одноклеточных можно обнаружить прозрачные линзообразные зерна, способные к концентрированию света и иногда покрытые с внутренней стороны пигментом. Эти образования можно считать зачаточной формой глаз в животном мире. Низшие многоклеточные, например некоторые медузы, имеют светочувствительные органы, так называемые глазки, расположенные на наружной поверхности их чашеобразного тела. У беспозвоночных могут присутствовать также одиночные светочувствительные клетки, которые, к примеру, у дождевого червя весьма многочисленны и рассеяны в эпидермисе. У морских звезд, улиток и некоторых других организмов светочувствительные клетки собраны группами в углублениях кожи — зрительных ямках. Насекомые и ракообразные обладают фасеточными глазами, состоящими из многих глазку трубочек. Глаз осьминога внешне, а судя по приключенческим романам, и своим выражением похож на глаз человека.

Если у беспозвоночных можно обнаружить все типы глаз — от простых до наиболее совершенных, — то все позвоночные, начиная с рыб, имеют парные глаза, снабженные линзой-хрусталиком. В процессе эволюции хрусталик приобрел способность изменять свою кривизну в зависимости от удаленности рассматриваемых предметов, что дало возможность четкой фокусировки изображения на светочувствительном слое глаза. Кроме того, эволюционное совершенствование зрительного аппарата привело к более плотной упаковке зрительных (фоторецепторных) клеток в светочувствительном слое, что также улучшило качество изображения; развилась вращательная способность глаза, позволившая быстро находить и удерживать в поле зрения объект наблюдения; образовался зрачок — подвижная диафрагма, регулирующая количество поступающего внутрь света; появились веки, защищающие глаз от

повреждения и высыхания. В итоге сформировался сложно устроенный и совершенный зрительный орган человека и позвоночных животных [1–4].

СТРОЕНИЕ ГЛАЗА, СЕТЧАТКИ И ФОТОРЕЦЕПТОРНЫХ КЛЕТОК

Глазное яблоко (рис. 1) имеет неправильную шаровидную форму – спереди выпуклость сильнее выражена. Линия, соединяющая передний и задний полюсы глаза, называется осью глаза и соответствует его максимальному размеру (у человека в среднем 24 мм). В глазном яблоке выделяют две основные составляющие: ядро и капсулу.

Ядро глазного яблока включает хрусталик, водянистую влагу и стекловидное тело, которые прозрачны и в большей или меньшей степени способны преломлять свет. Хрусталик имеет вид двояковыпуклой линзы с большей кривизной задней поверхности. Вещество хрусталика, прозрачное и бесцветное, не содержит сосудов и нервов, снаружи оно облечено в бесструктурную прозрачную капсулу. Хрусталик прозрачен потому, что эпителиальные клетки, из которых он состоит, в процессе дифференцировки утратили свои органеллы и сохранили лишь некоторые продольно расположенные микротрубочки и скопления свободных рибосом.

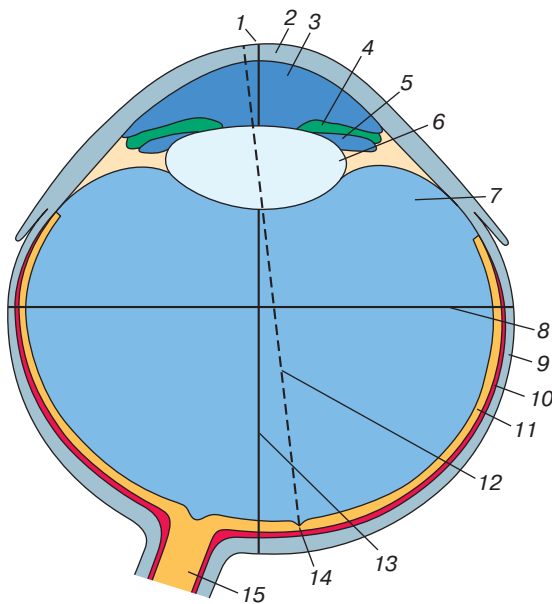


Рис. 1. Схема горизонтального разреза правого глаза человека: 1 – передний полюс глаза, 2 – роговица, 3 – передняя камера, 4 – радужная оболочка, 5 – задняя камера, 6 – хрусталик, 7 – стекловидное тело, 8 – экватор глаза, 9 – склера, 10 – сосудистая оболочка, 11 – сетчатка, 12 – зрительная ось, 13 – ось глаза, 14 – фовеа, 15 – зрительный нерв

Волокна хрусталика построены из характерного для них белка кристаллина. Водянистая влага представляет собой текучую прозрачную жидкость, близкую по своему составу плазме крови и содержащую некоторое количество гиалуроновой кислоты. Она заполняет пространство, примыкающее к передней полусфере хрусталика, тогда как задняя его поверхность соприкасается со стекловидным телом. Стекловидное тело, на которое приходится основная масса глазного яблока, облечено в прозрачную бесструктурную оболочку и большей частью своей поверхности прилегает к сетчатке. Оно представляет собой прозрачное и аморфное вещество, состоящее из белка витреина и гиалуроновой кислоты.

Капсула глазного яблока (стенка глаза) включает в себя три слоя, по медицинской номенклатуре оболочки. Это (в направлении от периферии к центру глаза) наружный опорный, средний увеальный и внутренний сетчатый слой глазной капсулы.

Опорный слой охватывает глаз снаружи и состоит из двух отделов, склеры и роговицы, практически полностью облегающих глазное яблоко (первая сзади, вторая спереди), за исключением тех мест, где склеру пронизывают кровеносные сосуды и зрительный нерв. Склера, или белочная оболочка, окрашена в белый цвет, непрозрачна, кровеносных сосудов имеет мало; то, что обычно называют белком глаза, и есть видимая снаружи часть склеры. Спереди склера резко меняет свою структуру и свойства и непосредственно переходит в роговицу, которая покрывает центральный участок глаза с его фронтальной стороны. Роговица, прозрачная и заметно выпуклая, состоит из плотной соединительной ткани и лишена кровеносных сосудов.

Увеальный слой, или увеа, богат пигментом и кровеносными сосудами, благодаря чему его также называют сосудистой оболочкой глаза. Этот слой в двух задних третях глаза представлен тонкой, имеющей бурый цвет собственно сосудистой оболочкой, которая сзади пронизана отверстием для зрительного нерва. Ближе к передней части глаза увеа утолщается, образуя так называемое цилиарное (ресничное) тело, расположенное в виде кольца в области перехода склеры в роговицу. Продолжаясь вперед, цилиарное тело переходит в радужную оболочку или радужку, которая имеет форму фронтально поставленного диска с центральным отверстием, известным как зрачок. Диаметр зрачка изменяется в пределах 3–6 мм с помощью мышц, заложенных в соединительнотканной основе радужки. Окраска радужки может варьировать (в зависимости от количества присутствующего в ней пигмента) от светло-серой и светло-голубой до темно-коричневой и почти черной. У альбиносов пигмент нацело отсутствует, так что радужка у них имеет красный цвет благодаря обилию кровеносных сосудов.

Сетчатая оболочка (сетчатка, или ретина) представляет собой по расположению самую внутреннюю, а для световосприятия — самую важную оболочку глаза, поэтому рассмотрим ее строение несколько подробнее.

Сетчатка, генетически и функционально составляющая единое целое со зрительным нервом, своей внутренней поверхностью граничит со стекловидным телом и снаружи прилегает к сосудистой оболочке. В передней части сетчатки, контактирующей с цилиарным телом, фоточувствительные элементы отсутствуют, тогда как в большей по размеру ее задней, собственно зрительной части содержатся фоторецепторные клетки, которые и обуславливают важнейшее свойство этого слоя — светочувствительность. Сетчатку иногда сравнивают со светочувствительным слоем фотопленки, хотя такое сравнение не совсем удачно: функция сетчатки (в отличие от фотопленки) не сводится лишь к восприятию света, уже на уровне сетчатки происходят анализ зрительной информации и выделение наиболее существенных элементов зрительных образов, например направления и скорости движения объекта, его величины. Зрительная часть сетчатки состоит из двух слоев, различных микроскопически: пигментного слоя, прилегающего к внутренней поверхности сосудистой оболочки, и контактирующего со стекловидным телом нервного слоя сетчатки.

Пигментный слой сетчатки принято включать в ее состав, хотя он и не вовлекается в передачу зрительного сигнала и анатомически более тесно связан с сосудистой оболочкой, чем с нервным слоем сетчатки. В некоторых случаях, например даже при незначительном вытекании стекловидного тела в результате хирургического вмешательства, может происходить отслоение нервного слоя сетчатки от пигментного эпителия, приводящее к дегенерации ее нервных клеток. Пигментный слой получает питательные вещества из кровеносных сосудов средней оболочки глаза и обеспечивает потребности собственно фоточувствительных клеток. На клетках пигментного эпителия присутствуют микроворсинки, которые прилегают к фоторецепторным клеткам, но не связаны с ними. Микроворсинки играют важную роль в обновлении наружных сегментов фоторецепторных клеток, как бы sluшивая путем эндоцитоза самую крайнюю в данный момент часть фоторецептора. Кроме того, пигментный эпителий поглощает ту значительную часть попавшего в глаз света, которая, проходя через светочувствительный слой сетчатки, не поглотилась им. Здесь уместна аналогия между функциями пигментного эпителия и черного покрытия внутренней поверхности фотокамеры, состоящими в поглощении лишнего, рассеянного света.

Нервный слой сетчатки устроен очень сложно и, в свою очередь, состоит из девяти слоев, то есть сетчатка

в целом с учетом пигментного эпителия включает десять слоев. Следует заметить, однако, что не все они представляют собой истинные слои, которые могут быть физически отделены друг от друга, скорее это микроскопически различимые зоны, отличающиеся друг от друга составляющими элементами. Остановимся на самом важном элементе нервного слоя сетчатки — фоторецепторных клетках.

Фоторецепторные клетки (палочки и колбочки) представляют собой высокоспециализированные нейроны, выполняющие в сетчатке собственно сенсорную функцию. Палочек в сетчатке человека примерно 120 млн, причем расположены они преимущественно по периферии ее зрительной части. Колбочки (их около 7 млн на сетчатку) концентрируются в центральной ее зоне, особенно высока плотность колбочек в центральной ямке (фовеа). Палочки отвечают за сумеречное зрение при низкой освещенности, которое имеет малую разрешающую способность (остроту) и преобладают у животных, ведущих ночной образ жизни. Колбочки эффективно работают при достаточно ярком освещении и обеспечивают цветное зрение, имеющее высокую остроту; соответственно их больше у животных, активных преимущественно днем.

Оба типа фоторецепторов — это длинные, узкие клетки, представляющие собой высокоспециализированные сенсорные нейроны, которые состоят из двух основных отделов: наружного и внутреннего сегментов (рис. 2).

Наружный сегмент фоторецепторных клеток своим окончанием вдавливается в пигментный слой сетчатки, и, следовательно, он (по отношению к телу клетки) обращен наружу глаза. У палочек наружные сегменты тонкие и цилиндрические, у колбочек они значительно более утолщенные — отсюда и название этих фоторецепторных клеток. Через тонкую ножку (цилию) наружный сегмент соединен с внутренним, который обращен внутрь глаза.

Внутренний сегмент содержит ядро, митохондрии, рибосомы, другие клеточные органеллы и характеризуется очень высокой метаболической активностью. Оконечность внутреннего сегмента, противоположная от наружного, переходит в аксон, снабженный синаптическим окончанием с многочисленными синаптическими пузырьками. Заметим, что в отличие от большинства других нейронов, которые выбрасывают нейромедиатор в состоянии возбуждения, фоторецепторные клетки выделяют его в состоянии покоя (в темноте), тогда как при их возбуждении (на свету) выделение нейромедиатора подавляется. Нейромедиатор воздействует затем на постсинаптические окончания дендритов, принадлежащих уже нейронам второго порядка — биполярным и горизонтальным клеткам, от которых нервный

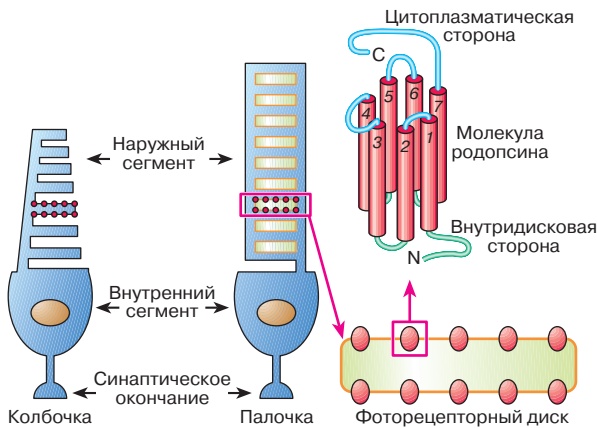


Рис. 2. Строение колбочки и палочки. Слева – общий вид, справа – вертикальный разрез фоторецепторного диска (внизу) и молекула родопсина (вверху). Липидная мембрана фоторецепторных дисков выделена оранжевым цветом, цитоплазма – голубым, родопсин – красным. Цитоплазматические и внутридисковые петли на увеличенном изображении молекулы родопсина окрашены голубым и зеленым соответственно

сигнал поступает к нейронам третьего порядка – ганглиозным клеткам – и от них по зрительному нерву в мозг.

МОРФОЛОГИЯ И СОСТАВ НАРУЖНЫХ СЕГМЕНТОВ ПАЛОЧЕК

Морфология наружного сегмента палочки (НСП) весьма своеобразна. НСП имеет цилиндрическую форму и по диаметру примерно соответствует внутреннему сегменту палочки. У человека диаметр НСП составляет 2 мкм, длина его равна 40–60 мкм, объем $1,6 \cdot 10^{-13}$ л; у быка соответствующие параметры НСП составляют 2 мкм, 7–10 мкм, $2,7 \cdot 10^{-14}$ л, у лягушки 5–7 мкм, 35–50 мкм, $1 \cdot 10^{-12}$ л. Существование тонкой перемычки между наружным и внутренним сегментами палочек оказалось счастливым обстоятельством, которое сильно облегчило исследование НСП. Дело в том, что НСП могут быть легко получены в довольно чистом виде с хорошим выходом после гомогенизации препаратов сетчатки в мягких условиях или путем их встряхивания. При этом происходит разрушение цилии, НСП отламываются от тела клетки, плазматическая мембрана в месте отрыва замыкается и образуется замкнутая структура, по строению и составу близкая, если не идентичная исходным НСП, прикрепленным к телу клетки. Таким простым способом удается избавиться от всех клеточных органелл (ядра, митохондрий, рибосом), а значит, и от большей части белков, присутствующих в теле фоторецепторной клетки. Соответственно полу-

ченные препараты содержат преимущественно те структуры и белки, которые имеют более или менее прямое отношение к главной функции НСП как световой антенны и преобразователя светового сигнала в электрофизиологический ответ.

Хотя НСП не содержат обычных клеточных органелл, они обладают характерной структурой. Их можно уподобить замкнутому мешку, образованному внешней (плазматической) клеточной мембраной, в который помещена стопка из сотен или даже тысяч (в зависимости от вида животного) уплощенных замкнутых структур, называемых фоторецепторными дисками (см. рис. 2). Фоторецепторные диски образуются у основания НСП как впячивание плазматической мембраны, причем внутреннее пространство вновь образованных дисков еще сообщается с внеклеточным пространством. Позднее диски как бы отпочковываются от плазматической мембраны, превращаясь в замкнутые структуры, и становятся независимыми как от нее, так и друг от друга. Тем самым наружная поверхность плазматической мембраны оказывается внутренней поверхностью дисков, а их просвет как бы ведет свое происхождение от внеклеточного пространства (заметим, что наружные сегменты колбочек по своему строению принципиально отличаются от НСП тем, что “колбочковые диски” представляют собой складки плазматической мембраны и их внутреннее пространство сообщается с внеклеточной средой). Если на поперечном разрезе диск выглядит как две параллельные мембраны, разделенные узким пространством и соединенные по краям, то в плане это действительно диск, хотя и не идеальной формы: его край имеет разрезы, или инцисуры, направленные от периферии к центру и придающие диску дольчатый вид. Глубина и число разрезов варьируют в зависимости от вида: у приматов и амфибий их более двух десятков, тогда как у грызунов присутствует только один глубокий разрез. Поскольку диски расположены друг над другом стопкой, то разрезы образуют как бы желобки, идущие вдоль НСП, и в этих желобках помещаются микротрубочки, берущие начало в аксонеме у основания наружного сегмента.

Подавляющая часть мембран НСП – это мембраны фоторецепторных дисков, на плазматическую мембрану приходится всего лишь 1–5% общей массы мембран НСП. Число фоторецепторных дисков на один наружный сегмент, как уже было сказано, может варьировать: в НСП человека их содержится около 1000, быка – 500, лягушки – 2000. Толщина мембраны дисков составляет 60–70 Å, расстояние между мембранными поверхностями в просвете диска 10–30 Å, зазор между дисками 150 Å.

Фоторецепторные клетки, будучи нейронами, подчиняются известному правилу, гласящему, что нервные

клетки не восстанавливаются. Однако это правило не распространяется на палочковые диски, которые в течение всей жизни палочки претерпевают непрерывное обновление, происходящее следующим образом. По мере образования у основания НСП и отпочковывания от плазматической мембраны фоторецепторные диски постепенно перемещаются в направлении верхушки сегмента. Одновременно на их место приходят новые диски, поступающие со стороны цилии. В конечном счете старые диски отшелушиваются с конца НСП, фагоцитируются клетками пигментного эпителия, после чего деградируют под действием его лизосомальной системы. Процесс обновления фоторецепторных дисков происходит непрерывно и с высокой скоростью. Так, у лягушек ежедневно обновляется до 80 дисков на НСП, что соответствует биосинтезу порядка $6 \cdot 10^7$ молекул зрительного пигмента родопсина в день на палочку и что сравнимо со скоростью образования иммуноглобулинов в клетках крови. Интересно, что скорость обновления фоторецепторных дисков непостоянна в течение суток. Например, у крыс она резко ускоряется в течение 0,5–2 часов после рассвета, а спустя еще 1–2 часа возвращается к фоновому уровню, причем этот ритм сохраняется при длительном содержании животных в темноте. Напротив, при 24-часовом искусственном световом дне отшелушивание дисков подавляется, хотя достаточно всего лишь 2 часов темноты, чтобы нормальный ритм их обновления вновь восстановился.

Состав НСП также необычен. Фоторецепторные диски – главный структурный элемент НСП – построены почти исключительно из белков и липидов (около 60 и 40% общей массы мембран соответственно). Углеводов в НСП немного – лишь 4% их общего веса. В цитоплазме НСП, заполняющей узкие просветы между дисковыми мембранами и зазоры между внешними краями дисков и плазматической мембраной, главный компонент – это белки.

Липидный состав фоторецепторных мембран характеризуется малым количеством холестерина и большим содержанием двойных связей, что в совокупности обуславливает низкую вязкость и высокую лабильность этих мембран. Тем не менее их состав даже более консервативен, чем у менее текучих биологических мембран из некоторых жизненно важных органов. Так, например, у крыс на диете с низким содержанием незаменимых жирных кислот – предшественников мембранных липидов – жирнокислотный состав мембран сердца и почек через определенный период времени начинает изменяться, что приводит к различным функциональным нарушениям. В то же время жирнокислотный состав элементов сетчатки не затрагивается, и зрительная функция сохраняется, что называется, “до последнего”.

Белковый состав НСП уникален. В зависимости от поведения белков в гипотонической среде (в растворе с концентрацией соли около 10 мМ) они разделяются на интегральные мембранные и экстрагируемые. Интегральные мембранные белки НСП остаются в связанном с мембранами состоянии даже после их интенсивной экстракции. Таких белков около 70% (общего количества белков в НСП), причем их основная доля – около 95% (!) – приходится на зрительный пигмент родопсин. Именно родопсин, будучи непосредственным рецептором света, обеспечивает восприятие светового кванта и дальнейшую передачу сигнала через специальную систему белков. Средняя концентрация родопсина в НСП находится в пределах 0,1–1,0 мМ в зависимости от вида животного, что на много порядков выше, чем концентрация всех других белковых рецепторов в мембранах клеток, отличных от фоторецепторных. Экстрагируемые белки НСП проигрывают интегральным мембранным белкам по общей массе, зато они намного богаче по номенклатуре: первых в НСП порядка 70 типов, вторых, включая родопсин, немногим более 10. Больше всего в экстрагируемой фракции G-белка трансдуцина, количество которого примерно в 10 раз меньше по сравнению с родопсином (о G-белках см. [5]). Далее следует белок аррестин – его в НСП в несколько раз меньше, чем трансдуцина. Еще несколько белков представлено в 10–100 раз меньшим количеством, чем трансдуцин. Среди них функционально наиболее важные – фосфодиэстераза циклического GMP (сGMP-фосфодиэстераза), родопсинкиназа, гуанилилциклаза, рековерин и активатор гуанилилциклазы.

Именно интегральный мембранный рецептор родопсин и названные выше экстрагируемые белки служат компонентами молекулярной машины, обеспечивающей в НСП восприятие, передачу, усиление, регуляцию и выключение зрительного сигнала.

ФЕНОМЕНОЛОГИЯ ЗРЕНИЯ НА УРОВНЕ ПАЛОЧКИ СЕТЧАТКИ

Палочки сетчатки функционируют в условиях неяркого освещения, к примеру в сумерках, отвечая изменением мембранного потенциала на идущий через них поток фотонов. Но они способны работать и в режиме счетчика квантов: единственный квант света может вызвать электрофизиологический ответ, величина которого до определенного предела линейно возрастает пропорционально числу поглощенных палочкой фотонов. При достаточно ярком и продолжительном освещении, напротив, наступает световая адаптация фоторецепторных клеток, которая выражается в снижении их чувствительности, тем больше, чем дольше действовал на них свет и чем ярче он был.

Теперь немного об электрофизиологических событиях, происходящих в НСП после поглощения палочкой светового кванта (рис. 3). В плазматической мембране НСП локализованы катионные каналы, через которые из внеклеточного пространства в цитоплазму НСП могут входить катионы натрия и в меньшем количестве кальция. В цитоплазме НСП присутствует циклический нуклеотид сGMP, выполняющий в фоторецепторных клетках функцию вторичного сигнала [5], причем его цитоплазматический уровень, высокий в темноте, резко снижается после освещения палочек. Важнейшее свойство сGMP состоит в его способности взаимодействовать с упомянутыми каналами и держать их в открытом состоянии. Поэтому в темноте, когда сGMP в цитоплазме НСП много, катионные каналы открыты. На свету, когда цитоплазматический уровень сGMP низок, нуклеотид диссоциирует из комплекса с каналами, они закрываются, и входящий через них катионный ток прекращается — плазматическая мембрана НСП становится более отрицательно заряженной, чем в темноте. Это изменение мембранного потенциала, называемое гиперполяризацией, отличает фоторецепторные клетки от других нейронов, которые при возбуждении деполяризуются, то есть потенциал на их мембране после действия стимула становится менее отрицательным. Гиперполяризация мембраны НСП представляет собой первый этап электрофизиологического ответа палочки, который сопровождается затем снижением секрети нейротрансмиттера из ее аксона в синаптическую щель и последующей передачей возбуждения к нейронам более высокого порядка.

Падение концентрации сGMP в цитоплазме НСП — центральное биохимическое событие, сопровождающее

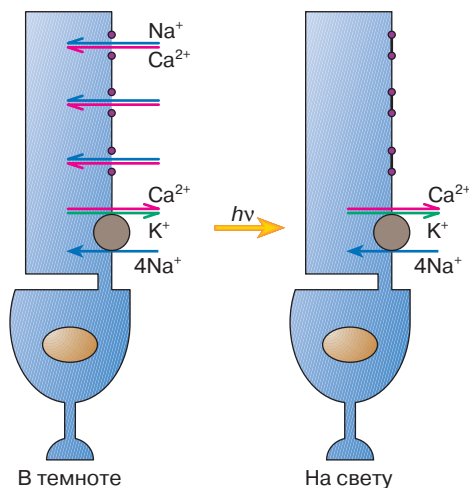


Рис. 3. Схема ионных токов в НСП в темноте и после действия света ($h\nu$)

световое воздействие на палочку сетчатки. Еще одно важное последствие этого воздействия — падение цитоплазматической концентрации ионов кальция, обусловленное следующими обстоятельствами. В мембране НСП помимо уже упоминавшихся катионных каналов присутствует Na^+/K^+ , Ca^{2+} -обменник, откачивающий из цитоплазмы избыток Ca^{2+} , высокие концентрации которого опасны для клетки, в обмен на менее вредный Na^+ . Этот обменник светонезависим, поэтому он продолжает откачивать Ca^{2+} еще некоторое время спустя после вызванного светом падения цитоплазматического уровня сGMP и закрывания катионных каналов. Значит, откачивание ионов кальция из НСП продолжается на фоне прекращения их входа, что и приводит к заметному падению цитоплазматической концентрации Ca^{2+} , что, в свою очередь, служит сигналом для запуска процессов, возвращающих фоторецепторную клетку из фотовозбужденного состояния в исходное темновое.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЗРЕНИЯ

В большинстве работ, описывающих общую картину молекулярных механизмов зрения, за основу берут относительно простую ситуацию, соответствующую поглощению единичного фотона. И ясно почему: изучение и понимание комплекса биохимических и электрофизиологических процессов, происходящих в НСП при постоянном освещении, во много раз сложнее, чем при одноразовом срабатывании зрительной молекулярной машины. По этой причине, например, до сих пор не установлены молекулярные механизмы световой адаптации фоторецепторных клеток, хотя феноменология этого явления изучена и описана в деталях.

Передача зрительного сигнала в НСП (рис. 4) происходит при участии нескольких последовательно взаимодействующих между собой белков: зрительного пигмента родопсина, G-белка трансдуцина (обычно обозначаемого как Gt) и сGMP-фосфодиэстеразы, которые в совокупности образуют зрительный, или фосфодиэстеразный, каскад фоторецепторных клеток.

Родопсин (молекулярная масса около 40 кДа) выполняет в НСП роль акцептора фотона. Его молекула состоит из двух компонентов: белковой части — опсина, — на которую приходится основная часть общей массы молекулы, и 11-*цис*-ретиная — производного витамина А, — собственно и служащего ловушкой для фотона. Родопсин представляет собой интегральный мембранный белок, который не может быть извлечен из фоторецепторной мембраны кроме как путем ее разрушения. Единственная полипептидная цепь родопсина семь раз пересекает мембрану так, что ее гидрофильный N-конец обращен внутрь диска, а C-конец, тоже гидрофильный, — в цитоплазму. Кроме того,

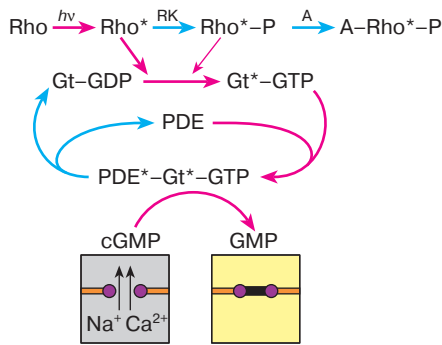


Рис. 4. Активация и выключение компонентов зрительного каскада родопсин (Rho) → трансдуцин (Gt) → cGMP-фосфодиэстераза (PDE). Другие сокращения: RK – родопсинкиназа, P – фосфатный остаток, A – аррестин. Индекс в виде звездочки означает, что соответствующий компонент каскада находится во включенном состоянии. Красные стрелки демонстрируют пути активации компонентов, голубые – пути их выключения. Внизу схематически показаны катионные каналы в мембране НСП. Они открыты при высоком уровне cGMP в цитоплазме НСП, что соответствует темновому состоянию палочки сетчатки, и закрыты на свету, когда cGMP-фосфодиэстераза активирована и интенсивно гидролизует cGMP до GMP

во внутридискковое и цитоплазматическое пространство экспонированы по три гидрофильных фрагмента или петли, которые соединяют между собой гидрофобные тяжи, пересекающие дисковую мембрану (см. рис. 2). К седьмому (считая от N-конца) гидрофобному тяжу ковалентно присоединен 11-цис-ретиаль, который, поглотив фотон, изомеризуется в *транс*-ретиаль, и эта изомеризация инициирует изменения в пространственной структуре молекулы опсина. В частности, его третья цитоплазматическая петля приобретает способность взаимодействовать со следующим компонентом каскада – трансдуцином Gt.

Трансдуцин представляет собой типичный гетеротримерный ($\alpha\beta\gamma$) G-белок, важнейшие характеристики которого – присутствие на его α -субъединице высокоспецифичного центра связывания для гуаниловых нуклеотидов (GTP и GDP) и его собственная ГТФазная активность. Последняя обеспечивает отщепление концевого фосфата от связанного с трансдуцином GTP таким образом, что образовавшийся GDP остается в нуклеотидсвязывающем центре Gt.

cGMP-фосфодиэстераза, третий и последний компонент зрительного каскада, обладает способностью с высокой эффективностью гидролизовать cGMP, который, как уже было сказано, выполняет в фоторецепторных клетках функцию вторичного сигнала. Молекула cGMP-фосфодиэстеразы – это $\alpha\beta\gamma_2$ -гетеротетрамер, в

котором $\alpha\beta$ -субъединицы несут на себе активный центр фермента, а γ -субъединица служит внутренним ингибитором ферментативной активности $\alpha\beta$ -субъединиц. Так что, когда все субъединицы cGMP-фосфодиэстеразы объединены в единый комплекс, то она каталитически неактивна. После удаления ингибиторной γ -субъединицы из комплекса остающиеся $\alpha\beta$ -субъединицы начинают с высокой скоростью гидролизовать cGMP до линейного GMP, который сигнальной молекулой не является.

Как перечисленные компоненты фосфодиэстеразного каскада передают зрительный сигнал? Поглощение кванта света молекулой родопсина придает ей способность взаимодействовать со следующим компонентом каскада – трансдуцином. После взаимодействия с фотовозбужденным родопсином Gt, который в неактивированном состоянии содержит прочно связанный GDP, обменивает его на присутствующий в цитоплазме GTP. В результате Gt-GDP переходит в GTP-содержащую форму (Gt-GTP), которая и есть активированная форма трансдуцина. Таким образом, первый этап передачи сигнала в зрительном каскаде состоит в катализе фотовозбужденным родопсином GDP/GTP-обмена на трансдуцине. На втором и последнем этапе каскада именно Gt-GTP, но не Gt-GDP взаимодействует с гетеротетрамерной, неактивной формой cGMP-фосфодиэстеразы, образуя комплекс с ее ингибиторной γ -субъединицей и освобождая каталитические $\alpha\beta$ -субъединицы фермента от ингибирования, что и делает их способными гидролизовать cGMP.

Описанием фосфодиэстеразного каскада мы заполнили “черный ящик” между актом поглощения света и падением цитоплазматического уровня cGMP, служащего причиной закрывания катионных каналов в плазматической мембране НСП и ее гиперполяризации.

Необходимо добавить, что фосфодиэстеразный каскад не просто передает зрительный сигнал, но к тому же многократно усиливает его. Дело в том, что за время фоторецепторного ответа, равное примерно 1 секунде, молекула фотовозбужденного родопсина успевает проактивировать несколько сот молекул Gt, тем самым на первом этапе фосфодиэстеразного каскада сигнал усиливается в 10^2 – 10^3 раз. На втором этапе каскада каждая активированная молекула Gt активирует лишь одну молекулу cGMP-фосфодиэстеразы, зато последняя катализирует гидролиз до 3000 молекул cGMP в секунду – сигнал усиливается еще в 10^3 раз. Следовательно, при прохождении зрительного сигнала через фосфодиэстеразный каскад – от фотона до cGMP – может происходить 100 000-кратное (и даже большее!) его усиление.

Выключение зрительного сигнала (см. рис. 4) – необходимая составляющая ответа фоторецепторных клеток на световой стимул: если возникший сигнал не

будет своевременно выключен, то, образно говоря, глаз будет продолжать видеть свет, который уже погас. Чтобы этого не происходило, в фоторецепторных клетках функционируют специальные механизмы, переводящие активированные компоненты фосфодиэстеразного каскада в исходное, неактивированное состояние.

Выключение родопсина достигается путем его фосфорилирования под действием родопсинкиназы, которая катализирует ковалентное присоединение к опсину фосфатного остатка (остатков), отщепляя его от присутствующего в цитоплазме АТФ. По нашим данным [4], полученным *in vitro*, чем больше фосфатных остатков включено в молекулу родопсина, тем ниже его эффективность как активатора фосфодиэстеразного каскада. Следовательно, на уровне родопсина может происходить не просто выключение сигнала, но и его постепенное ослабление (аттенуация) по мере возрастания степени фосфорилирования зрительного пигмента.

Здесь мы должны вспомнить о том, что концентрация ионов кальция в цитоплазме НСП, высокая в темноте, падает на свету. Как оказалось, фоторецепторный Ca^{2+} -связывающий белок рековерин [6, 7] ингибирует родопсинкиназу при высоком цитоплазматическом уровне Ca^{2+} и не действует на нее при низких концентрациях катиона. Следовательно, в темноте родопсинкиназа находится в комплексе с рековерином и не работает, тогда как после передачи зрительного сигнала, когда уровень Ca^{2+} снижается, этот комплекс диссоциирует, и киназа начинает фосфорилировать родопсин, тем самым выключая его. Кроме того, в НСП найден белок аррестин, который прочно связывается с родопсином при условии, что тот фосфорилирован. Образование комплекса между фосфорилированным родопсином и аррестином означает полное прекращение передачи сигнала от родопсина к трансдукцию вне зависимости от числа фосфатных остатков, перенесенных родопсинкиназой на опсин.

Выключение трансдукции и сGMP-фосфодиэстеразы начинается с гидролиза GTP, связанного с Gt, до GDP под действием собственной ГТФазной активности трансдукции. γ -Субъединица сGMP-фосфодиэстеразы во время передачи зрительного сигнала находится в комплексе с Gt-GTP, но после гидролиза GTP и образования Gt-GDP этот комплекс диссоциирует. Освободившаяся ингибиторная γ -субъединица возвращается к каталитическим $\alpha\beta$ -субъединицам сGMP-фосфодиэстеразы — гидролиз сGMP прекращается и каскад оказывается полностью выключенным.

Восстановление темного уровня сGMP, который оказался сниженным после передачи сигнала через фосфодиэстеразный каскад, — еще одно событие, которое должно произойти, чтобы фоторецепторная клетка вернулась к темновому состоянию. Синтез сGMP

катализирует фермент гуанилилциклаза, которая, как и родопсинкиназа, заингибирована при высоких концентрациях ионов кальция и активна, когда кальция в среде мало (гуанилилциклазе чувствительность к ионам кальция придает еще один фоторецепторный Ca^{2+} -связывающий белок, который так и называется — активаторный белок гуанилилциклазы). Следовательно, в темновых условиях, что соответствует высокой концентрации кальция в цитоплазме НСП, синтез сGMP, катализируемый гуанилилциклазой, идет с низкой скоростью. На свету при низкой концентрации катиона синтез сGMP ускоряется и его уровень возрастает.

Теперь, когда все компоненты фосфодиэстеразного каскада выключены и цитоплазматическая концентрация сGMP возросла, фоторецепторная клетка полностью вернулась к исходному, невозбужденному состоянию, в котором она находилась до действия светового стимула, и вновь готова ответить на следующий квант света.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Островский М.А.* Фоторецепторные клетки. М.: Знание, 1978.
2. *Филиппов П.П., Аршавский В.Ю., Дижур А.М.* Биохимия зрительной рецепции. М.: ВИНТИ, 1987.
3. *Koutalos Y., Yau K.-W.* Regulation of Sensitivity in Vertebrate Rod Photoreceptors by Calcium // *TINS*. 1996. Vol. 19. P. 73–81.
4. *Philippov P.P., Arshavsky V.Yu., Dizhoor A.M.* The Phosphodiesterase Cascade of a Photoreceptor Cell: Mechanisms of Activation and Quenching // *Sov. Sci. Rev. Physicochem. and Biol.* 1990. Vol. 9. P. 245–307.
5. *Филиппов П.П.* Как внешние сигналы передаются внутрь клетки // *Соросовский Образовательный Журнал*. 1998. № 3. С. 28–34.
6. *Дижур А.М., Некрасова Э.Р., Филиппов П.П.* Новый специфичный для фоторецепторных клеток белок с молекулярной массой 26 кДа // *Биохимия*. 1991. Т. 56. С. 225–229.
7. *Dizhoor A.M., Ray S., Kumar S. et al.* Recoverin: A Calcium Sensitive Activator of Retinal Rod Guanylate Cyclase // *Science*. 1991. Vol. 251. P. 915–918.

Рецензент статьи А.Я. Потапенко

* * *

Павел Павлович Филиппов, доктор биологических наук, профессор, зав. отделом энзимологии и заместитель директора НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, лауреат премии им. Ю.А. Овчинникова РАН. Область научных исследований — молекулярные механизмы зрения. Автор более 80 научных работ и одной монографии.