

без такого рассмотрения нельзя даже подойти к решению указанных вопросов. Дальнейшие подробности, относящиеся к фоторецепции на молекулярном уровне, см. в [109, 135].

Для понимания молекулярного механизма фоторецепции существенны исследования кинетики темновых реакций зрительного пигмента, протекающих вслед за световым воздействием. Согласно Абрахамсону [136], целесообразно разделять эти реакции на ранние и поздние стадии. К первым относятся переходы прелюмиродопсин \rightarrow люмиродопсин \rightarrow метародопсин $I \rightarrow$ метародопсин II . Они происходят быстро, как установлено с помощью импульсного фотолиза (см. [137—139]). Предполагается, что последний переход, сопровождаемый конформационными изменениями, и приводит к изменению проницаемости фоторецепторной мембраны и к генерации импульса. Это удалось подтвердить экспериментально [140]. Процессы второй стадии, следующие за указанными, по-видимому, не имеют отношения к формированию первичного электрического ответа фоторецептора и, возможно, играют роль в регенерации родопсина [141]. Они происходят очень медленно (секунды и даже минуты) и характеризуются простой кинетикой. Напротив, кинетика перехода метародопсин $I \rightarrow$ метародопсин II , изученная методом импульсного фотолиза, сложна, она аппроксимируется суммой не менее, чем трех экспонент [142]. То же относится к реакциям прелюмиродопсин \rightarrow люмиродопсин [143] и люмиродопсин \rightarrow метародопсин I [142]. Были опубликованы и другие данные. В наиболее подробном исследовании перехода прелюмиродопсин \rightarrow люмиродопсин, проведенном методом импульсного фотолиза в средах с различной вязкостью, установлено, что кинетика перехода аппроксимируется суммой трех экспонент, т. е. процесс является суммой параллельных реакций первого порядка. Константы скоростей перехода не зависят от вязкости [143, 144]. Есть основания думать, что сложная кинетика является универсальным свойством ранних темновых реакций как *in vitro*, так и *in vivo* [145]. Причины сложной кинетики и ее биологическая значимость остаются пока неясными.

§ 7.10. МЕМБРАНЫ ФОТОРЕЦЕПТОРОВ

Как уже сказано, фоторецепторные клетки содержат стопки ламелл или дисков — мембран, в которых и локализованы зрительные пигменты. Число таких дисков в одной клетке велико, оно достигает 500—1000. Мембраны содержат обычный билипидный слой, что доказывается методами рентгеноструктурного анализа, электронной микроскопии и др. [146]. Установлено, что

молекулы родопсина лежат на внутренней гидрофильной поверхности мембраны [147].

Фоторецепторные мембраны внешних сегментов палочек быка и лягушки содержат около 60% белка и 40% липидов. Родопсин является главной фракцией белка, составляя до 80% от его общего содержания. Липиды представлены главным образом фосфолипидами — фосфотидилэтаноламином, фосфотидилхолином и фосфотидилсерином, присутствует и 5—10% гликолипида.

Предложены различные модели устройства фоторецепторной мембраны, на которых мы не будем останавливаться (см. [146, 148—150]). Эти модели не всегда согласуются друг с другом.

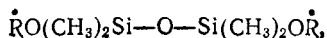
Диски внешних сегментов палочек представляют собой свободно плавающие внутриклеточные органеллы, подобные митохондриям. Мембрана диска охватывает определенное пространство, отделяемое полупроницаемой мембраной от внутриклеточного пространства фоторецептора, в котором «взвешены» диски. Мембрана непроницаема для Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Cl^- и PO_4^{---} . *In vitro* в ответ на изменения осмотического давления окружающей среды изолированные диски набухают и сжимаются [151].

Наиболее интересна проблема влияния освещения на мембрану в целом. В результате освещения мембрана становится более проницаемой — она не удерживает все растворенное вещество столь же эффективно, как мембрана, адаптированная к темноте [151]. Конформационное изменение родопсина приводит к изменению состояния мембраны, к увеличению пассивной проницаемости ионов Na и K^+ .

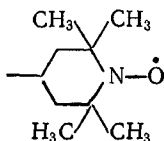
Методами рентгенографии и электронной микроскопии установлено, что в мембране диска при освещении происходят определенные структурные изменения, масштаб которых пропорционален времени экспозиции. Суть этих изменений состоит в транслокации родопсина. В результате освещения родопсин переходит с междисковой гидрофильной поверхности во внутреннюю гидрофобную фазу мембраны [152]. Такого рода транслокации имеют характер фазовых переходов. Фазовые переходы в мембранах фоторецепторных клеток лягушки и кальмара были обнаружены и изучены методом дифференциальной калориметрии [153].

Общий обзор строения и свойств фоторецепторных мембран дан Деменом [154].

С помощью электронного парамагнитного резонанса было проведено исследование фоторецепторной мембраны с введенным в нее спиновым зондом — бирадикалом



где \dot{R} есть иминоксильный радикал



При освещении суспензии мембран наблюдаются значительные изменения спектров ЭПР, указывающие на увеличение времени вращательной диффузии бирадикала в мембране τ . Форма кривой зависимости τ от длительности освещения свидетельствует о том, что фотолиз пигмента сопряжен с изменением конформационного состояния мембраны, с увеличением микровязкости ее гидрофобных областей. Эти результаты можно считать прямым доказательством конформационных превращений мембраны при освещении [155].

К сходным выводам приводит изучение фоторецепторных мембран методом γ -резонансной спектроскопии (эффект Мёсбауэра). В качестве метки применялся аскорбат железа, обогащенный изотопом Fe^{57} , источником γ -излучения служил Co^{57} [156].

Особый интерес представляет АТФ-азная ферментативная активность, присущая фоторецепторной мембране. Еще в 30-х годах Энгельгардт высказал предположение об использовании энергии АТФ в первичном процессе зрения. Это предположение было косвенно подтверждено Венкстерн в исследовании АТФ-азной активности сетчатки [157, 158]. В дальнейшем была установлена локализация АТФ-азной активности в мембранах наружного сегмента фоторецепторов. АТФ-аза является Mg-активируемой, она связана с родопсином [159]. Фотолиз зрительного пигмента *in vitro* приводит к заметному ингибированию АТФ-азы, что, надо думать, обусловлено внутримолекулярной перестройкой пигмента, подвергающегося фотоденатурации на последних стадиях фотолиза. Не исключено, что на более ранних стадиях ферментативная активность увеличивается, как предполагал Уолд [160].

Можно думать, что АТФ-азная активность необходима при фоторецепции для усиления полученного фоторецепторной клеткой сигнала за счет энергии АТФ. Человеческий глаз, как уже сказано, обладает высокой чувствительностью к свету — он способен регистрировать несколько фотонов. Палочка может быть стимулирована одним фотоном с энергией порядка $4 \cdot 10^{-12}$ эрг (при λ 5000 Å). Согласно основному закону фотохимии Эйнштейна, один фотон может вызвать перестройку одной лишь

молекулы родопсина из 10^9 молекул, содержащихся в палочке. Светочувствительность палочки максимальна.

Однако энергия одного кванта недостаточна для физиологической стимуляции рецепторной клетки. Расчеты показывают, что для этого нужно усиление в несколько тысяч раз. Предположительно усиление имеет биохимический характер и происходит в результате ферментативного гидролиза АТФ. Механизм этого гипотетического процесса пока совершенно загадочен.

Именно на фоторецепторных мембранах лучше всего изучены жидкостные (жидко-кристаллические) свойства мембран (ср. § 3.8). Это оказалось возможным потому, что в фоторецепторных мембранах функционирует практически один лишь белок — родопсин, — за которым легко следить.

Уже давно было установлено, что палочки, адаптированные к темноте, обладают дихроизмом. Свет, поляризованный перпендикулярно к длинной оси палочки, поглощается в несколько раз сильнее, чем свет, поляризованный параллельно этой оси. Следовательно, хромофор родопсина ориентирован параллельно плоскости мембраны диска. Однако на этой плоскости хромофоры ориентированы беспорядочно и соответствующего дихроизма нет [161, 162]. Можно фотоиндуцировать дихроизм, проводя частичное выцветание родопсина с помощью плоскополяризованного света. В обычных условиях дихроизм не возникает, что объясняется броуновским вращательным движением молекул родопсина в сетчатке [163]. Однако при обработке сетчатки глутаровым альдегидом наблюдается очень сильный фотоиндуцированный дихроизм [164]. Глутаровый альдегид образует сшивки, препятствующие вращению молекул родопсина. Другие возможные объяснения отсутствия фотодихроизма в нормальной сетчатке исключены экспериментально. Перенос энергии между молекулами родопсина, среднее расстояние между которыми составляет около 70 Å [165], невозможен. Работа [164] доказывает вращательную подвижность родопсина в сетчатке. О том же свидетельствует изучение фотодихроизма при импульсном фотолизе [166]. При импульсном освещении происходит скачкообразное возрастание поглощения, определяемое превращением родопсина в прелюмиродопсин. Это возрастание значительно больше, если векторы поляризации действующего света и света, поглощение которого измеряется, параллельны, чем в том случае, когда оба вектора перпендикулярны друг к другу. Вспышка индуцирует дихроизм, который быстро исчезает. Половинное время исчезновения дихроизма при 20 °С составляет $3,0 \pm 1,5$ мкс. С увеличением температуры этот процесс ускоряется. Увеличение вязкости среды замедляет исчезновение фотодихроизма.

Если зависимость дихроизма от времени действительно определяется вращательной диффузией, то справедливо уравнение

$$\frac{\partial^2 n}{\partial \theta^2} = \tau \frac{\partial n}{\partial t}, \quad (7.12)$$

где n — доля хромофоров, ориентированных в интервале углов от θ до $\theta + d\theta$, τ — время релаксации. Для линейного хромоформа и вращательной диффузии вокруг оси, перпендикулярной к мембране диска, решение (7.12) имеет вид

$$n = 1 + f \exp(-4t/\tau) \cos 2\theta. \quad (7.13)$$

Время t измеряется от начала вспышки, θ — угол, образуемый хромофором с электрическим вектором вспышечного света, $f \leq 1$ — эмпирический множитель. Дихроичное отношение равно

$$\frac{\int_0^{n/2} n(\theta) \cos^2 \theta d\theta}{\int_0^{n/2} n(\theta) \sin^2 \theta d\theta} = \frac{2 + f \exp(-4t/\tau)}{2 - f \exp(-4t/\tau)}. \quad (7.14)$$

В идеальных условиях, когда $f = 1$, максимальное начальное отношение равно 3, что отвечает значению, найденному для сетчатки, фиксированной глутаровым альдегидом [164]. В импульсных опытах это отношение получалось равным 2, что отвечает $f = 0,7$. Значение времени вращательной диффузии τ зависит от вязкости среды η , ее температуры, а также от размеров хромофорной молекулы. Согласно Эйнштейну, для сферы радиуса r , испытывающей броуновское вращение вокруг некоторой оси,

$$\tau = \frac{8\pi r^3}{k_B T} \eta. \quad (7.15)$$

При 20°C τ для родопсина имеет значение около 20 мкс, $r = 22$ —28 Å, родопсин приближенно сферичен и погружен в мембрану. Отсюда следует, что вязкость мембраны η около 2 пуаз (интервал от 0,7 до 6 пуаз), т. е. она близка к вязкости легкого масла (такого, как оливковое). Мембрана оказывается весьма жидкой. Это согласуется с другими данными о подвижности мембран, например, с результатами изучения поступательной диффузии флуоресцирующих антител, присоединенных к антигенам на поверхностях некоторых клеток [167]. В этих случаях также получились значения η порядка 1—10 пуаз (ср. § 3.8).

В той же работе Кона [166] обсуждается вопрос о функционировании родопсина в качестве диффузионного переносчика. По-видимому, при поворотах молекулы родопсина, возникающих

вследствие его конформационных превращений, меняется степень погружения родопсина в жидкую билипидную мембрану, что существенно для изменения ее ионной проницаемости (см. [168]).

Позднее удалось наблюдать и латеральную диффузию родопсина в мембране [169]. Измерения проводились в выделенных палочках методом импульсного фотолиза и микроспектрофотометрии. Изучалось перераспределение выцветшего и невыцветшего родопсина. Найденная константа диффузии D для палочек из сетчатки лягушки равна $3,5 \pm 1,5 \cdot 10^{-9} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$. Вязкость мембраны, вычисляемая по формуле

$$\eta = \frac{k_B T}{6\pi D r}, \quad (7.16)$$

оказалась лежащей в том же интервале значений 1—4 пуаз. Время между столкновениями соседних молекул родопсина в сетчатке находится по формуле

$$s^2 = 4 D \tau_e, \quad (7.17)$$

где s — расстояние между молекулами родопсина. Если эффективный диаметр молекулы родопсина 45 \AA , а расстояние между центрами молекул 70 \AA , то $s = 25 \text{ \AA}$ и $\tau_e = 4 \text{ мкс}$, что в 5 раз меньше времени релаксации вращательной диффузии. Частота соударений составляет $10^5 - 10^6 \text{ с}^{-1}$.

Эти результаты представляют большой интерес. Они дают основу для построения теории функционирования мембран, исходящей из их жидкостных свойств (ср. стр. 142). Мы еще очень мало знаем о событиях, приводящих к возникновению нервного импульса в фоторецепторной системе. Можно думать, что эти события тесно связаны с поведением жидкой мембраны.