

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ СВЕТА НА СТРУКТУРЫ ГЛАЗА И СИСТЕМЫ ЗАЩИТЫ ОТ ТАКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

© 2005 г.

М. А. ОСТРОВСКИЙ

Институт биохимической физики им. Н.М.Эмануэля РАН, Москва

I. Введение. II. Структура и фотопревращения родопсина. Ретиналь как хромофор. III. Зрительный цикл и опасность фотоповреждения. IV. Молекулярные механизмы фотоповреждения сетчатки. V. Системы защиты структур глаза от повреждения. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Природный парадокс зрения состоит в том, что свет, являясь носителем зрительной информации, одновременно выступает как фактор риска. Действительно, сочетание света и кислорода — необходимое условие для осуществления нормального фоторецепторного процесса — одновременно способствует возникновению и развитию в структурах глаза деструктивных фотохимических реакций.

Принятые сокращения: ABCR — АТФ-связывающий кассетный переносчик ретиналя; IRBP — межфоторецепторный ретинол-связывающий белок; A2E-PE — бис-ретинилиден-фосфатидилэтанолламин; A2E — бис-ретинилиден-этанолламин.
Адрес для корреспонденции: ostrovsky@gagarinclub.ru

Работа выполнена при поддержке: Программы Президента Российской Федерации «Государственная поддержка молодых российских ученых и ведущих научных школ Российской Федерации» № НШ-1220.2003.4; Программы фундаментальных исследований ОБН РАН «Интегративные механизмы регуляции функций в организме»; Программы фундаментальных исследований ОХНМ РАН «Теоретическое и экспериментальное изучение природы химической связи и механизмов важнейших химических реакций и процессов»; гранта РФФИ № 02-04-49923; совместного инновационно-ориентированного проекта РФФИ и государственного Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (РФФИ №02-04-08012/№3646).

Чувствительность фоторецепторных клеток сетчатки и клеток пигментного эпителия к фотоповреждению связана с присутствием в них всех факторов, необходимых для свободно-радикальной реакции фотоокисления. Это, во-первых, эффективно поглощающие свет хромофоры (т.н. фотосенсибилизаторы окисления), во-вторых, — достаточно высокое парциальное давление кислорода и, в-третьих, наличие субстратов — липидов и белков, способных окисляться с большой легкостью. Именно поэтому в ходе приспособительной эволюции сформировалась достаточно надежная система защиты от опасности фотоповреждения [1], которая необходима для обеспечения дневного зрения, особенно в условиях слишком высокой интенсивности и неблагоприятного по спектральному составу света.

Спектр солнечного излучения, доходящего до Земли, определил и спектры поглощения светочувствительных зрительных пигментов животных и человека. В ходе эволюции зрительные клетки, в частности, палочка сетчатки, достигли предела световой чувствительности, допускаемого квантовой теорией, и могут детектировать всего один поглощенный квант (скотопическое или сумеречное зрение). Мозг воспринимает как еле видимую световую вспышку около десяти-пятнадцати квантов, суммируя сигналы от 10–15 палочек.

За цветовосприятие в условиях дневного, фотопического зрения ответственны колбочки — фоторецепторные клетки, содержащие, соответственно, сине-, зелено- и красночувствительные зрительные пигменты. Глаз, таким образом, как нельзя лучше приспособлен для восприятия естественного солнечного света и представляет нашему мозгу более 90% информации об окружающем мире.

Расшифровка молекулярных механизмов зрительной рецепции и механизмов защиты от фотоповреждения представляет не только исключительный естественно-научный интерес, но и позволяет надеяться на успех в профилактике и, возможно, лечении ряда тяжелых глазных заболеваний.

В настоящей статье представлены современное состояние этой проблемы и некоторые результаты, полученные нами в последнее время.

II. СТРУКТУРА И ФОТОПРЕВРАЩЕНИЯ РОДОПСИНА. РЕТИНАЛЬ КАК ХРОМОФОР

Родопсин — наиболее типичный зрительный пигмент, находящийся в палочках сетчатки человека и животных. Эта сложная молекула представляет собой хромогликопротеид, содержащий одну хромофорную группу, две олигосахаридные цепочки и водонерастворимый мембранный белок опсин. Родопсин стал первым мембранным белком

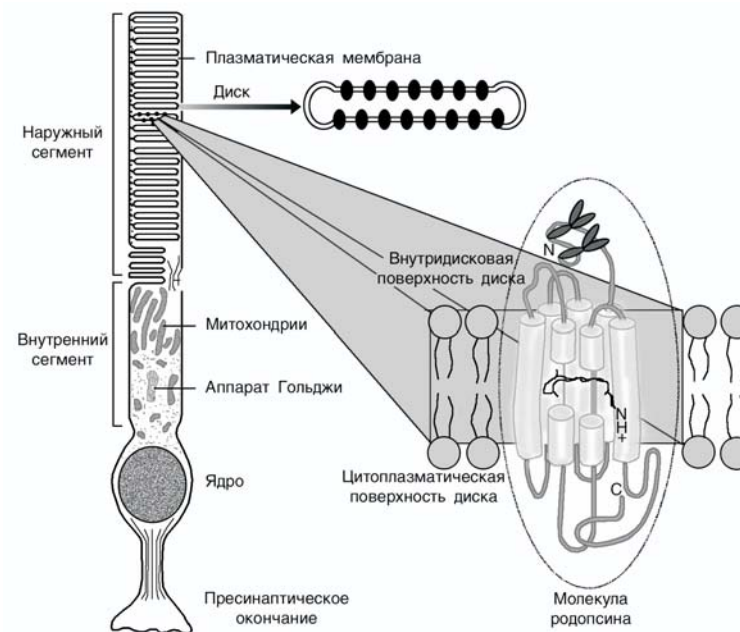


Рис. 1. Схематическое изображение палочки, фоторецепторного диска наружного сегмента, фоторецепторной мембраны диска и молекулы родопсина, в центре которой находится ее хромофорная группа — 11-цис ретиналь, ковалентно связанный с белковой частью (опсином).

животного происхождения, полная аминокислотная последовательность которого была расшифрована в начале 80-х годов [2–4].

Хромофорной группой всех без исключения зрительных пигментов человека и животных является альдегид витамина А или ретиналь, причем только одна из многих изомерных форм, а именно его изогнутая 11-цис форма.

Родопсин — сравнительно небольшой белок: молекулярная масса составляет около 40 кДа, а полипептидная цепь состоит из 348 аминокислотных остатков. Молекулы родопсина находятся в фоторецепторной мембране в мономерном состоянии и не агрегируют между собой. Расположение молекулы родопсина в фоторецепторной мембране и положение 11-цис ретиналя внутри этой молекулы показано справа снизу на рис. 1.

В молекуле родопсина можно выделить внутримембранный домен и домены, обращенные к цитоплазматической и внутридисковой поверхностям мембраны диска (внутридисковый и цитоплазматичес-

кий, соответственно). Внутримембранный домен, определяющий фотофизиологию родопсина, состоит из хромофорного центра и семи трансмембранных α -спиралей, представляющих собой остов опсина. Хромофорная группа — 11-*цис*-ретиноаль ковалентно связан с ϵ -аминогруппой лизина (Lys-296) спирали ТМ7 через протонированное Шиффово основание. Протонирование Шиффова основания увеличивает делокализацию электрона вдоль полиеновой цепи ретиналя.

В последнее время к семейству родопсинов относят все зрительные пигменты, содержащиеся в качестве хромофора ретиноаль. При этом зрительные пигменты, содержащие в качестве хромофора ретиноаль с дополнительной двойной связью в β -иононовом кольце, относят к семейству порфиросинов. Порфиросины, как правило, поглощают в более длинноволновой области спектра, нежели родопсины. Следует подчеркнуть, что природа фотопревращений порфиросинов и родопсинов одинакова.

Для родопсина, как и для других ретиноаль-содержащих белков, характерен свой спектр оптического поглощения. Спектр поглощения родопсина представлен на рис. 2. Он состоит из трех основных полос: α — (500 нм), β — (350 нм) и γ — (280 нм). Две первые связаны с поглощением хромофорной группы, а γ -полоса обусловлена, в основном, поглощением ароматических аминокислот белка — триптофана, тирозина и фенилаланина. Именно α -полоса в спектре поглощения родопсина определяет кривую видности палочкового сумеречного (скотопического) зрения с максимумом в сине-зеленой области спектра (500 нм). Фоточувствительность родопсина необычайно высока. Квантовый выход фотореакции составляет 0,67, т. е. близок к 70%.

Фотопревращение или фотообесцвечивание родопсина включает собственно фотохимическую реакцию и последующие темновые, зависящие от температуры превращения. Схема фотопревращения

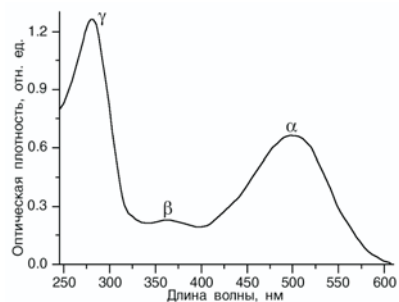


Рис. 2. Оптический спектр поглощения родопсина.

(фотолиза) молекулы родопсина показана на рис. 3. Единственной фотохимической реакцией зрения является *цис-транс* изомеризация хромофорной группы — 11-*цис* ретиноаля. Эта реакция происходит с уникально большой скоростью — менее, чем за 0,2 пикосекунды (1 пкс = 10^{-12} сек). За это время образуется первый фотопродукт — фотородопсин, в котором 11-*цис* ретиноаль уже выпрямился — перешел в полностью-*транс* форму, но

еще ковалентно связан с белком. Свет необходим только для образования фотородопсина, все последующие перестройки в молекуле родопсина происходят без участия света. Фотородопсин за 40–45 пикосекунд переходит в следующий продукт — батородопсин. На этой стадии происходят лишь небольшие структурные изменения в ближайшем белковом окружении ретиналя.

Образование батородопсина сопровождается стабилизацией значительной части энергии поглощенного кванта света, которая затем тратится на последующие конформационные (структурные) перестройки всей белковой части молекулы родопсина. Батородопсин затем в течение нескольких десятков наносекунд (1 нсек = 10^{-9} сек) переходит в следующий продукт — люмиродопсин. На этой и последующих стадиях в белке происходят уже существенные конформационные изменения. Люмиродопсин превращается далее в метародопсин I и тот, наконец, в метародопсин II. Максимум спектра поглощения метародопсина II находится при 380 нм, то есть в УФ-области спектра, хотя его довольно широкий спектр поглощения захватывает и синюю область видимого спектра. Метародопсин II и является тем промежуточным продуктом фотопревращения родопсина, который приобретает способность к взаимодействию с ГТФ-связывающим белком и который, собственно говоря, запускает как G-белок-связывающий рецептор процесс фототрансдукции (рис. 4).

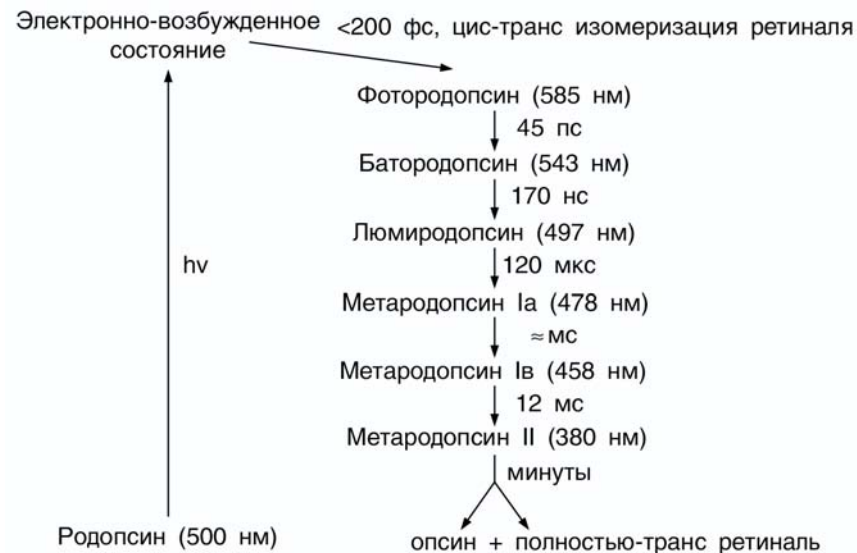


Рис. 3. Схема фотопревращения (фотолиза) родопсина (подробности в тексте).

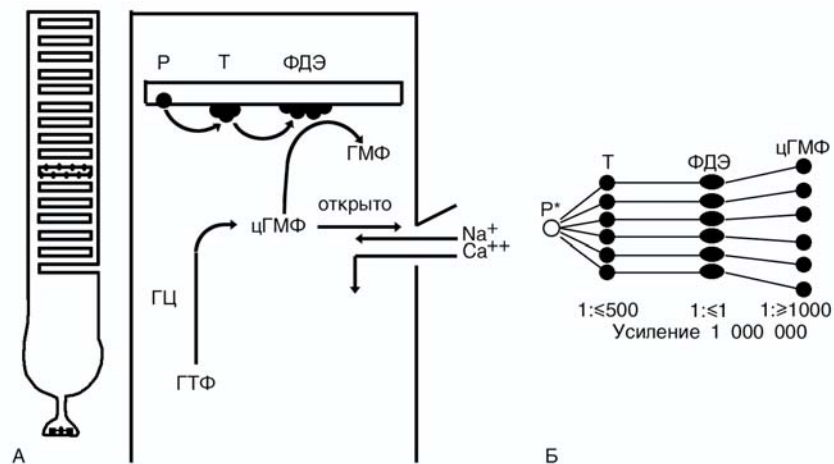


Рис. 4. Схема процесса фототрансдукции.

А. Показаны один фоторецепторный диск в наружном сегменте палочки и в нем основные белки — участники процесса фототрансдукции: Р — молекула родопсина, Т — молекула трансдуцина или ГТФ-связывающего белка, ФДЭ — молекула фермента фосфодиэстеразы. В цитоплазме наружного сегмента показан фермент гуанилатциклаза — ГЦ. В плазматической (клеточной) мембране палочки показан ионный канал в темновом состоянии.

Через открытый ионный канал внутрь клетки по градиенту концентрации поступают ионы натрия и кальция. Вследствие этого на плазматической мембране поддерживается темновой электрический потенциал, порядка 40 милливольт (минус на внутренней цитоплазматической стороне мембраны).

При поглощении кванта света молекула родопсина изменяется, приобретает способность взаимодействовать с трансдуцином и активировать его. В свою очередь трансдуцин активирует фермент фосфодиэстеразу, которая начинает с высокой скоростью разрушать (гидролизовать) циклический гуанозинмонофосфат — цГМФ. В результате концентрация цГМФ в цитоплазме падает. Как следствие, связанные в темноте с ионным каналом молекулы цГМФ от него «отваливаются», и свободный от них ионный канал переходит в закрытое состояние (блокируется). Поэтому ионы натрия и кальция перестают поступать в цитоплазму, и электрический потенциал на плазматической мембране наружного сегмента повышается, то есть мембрана гиперполяризуется (потенциал на ней становится равным примерно 70 милливольтам). Этот гиперполяризационный потенциал и является тем электрический сигнал фоторецепторной клетки, который передается через синапс следующим нервным клеткам сетчатки.

В восстановлении исходного темнового состояния зрительной клетки ключевым событием является активация фермента гуанилатциклазы (ГЦ), который вновь синтезирует цГМФ из ГТФ, восстанавливая его концентрацию в цитоплазме наружного сегмента.

Б. Цепочка: родопсин — трансдуцин — фосфодиэстераза представляет собой усилительный каскад ферментативных реакций, обеспечивающих усиление первичного светового сигнала в 10^5 – 10^6 раз.

Одна обесцвеченная молекула родопсина активирует около 500 молекул трансдуцина, трансдуцин активирует фосфодиэстеразу в отношении 1:1, и активированная ФД гидролизует до 1000 молекул цГМФ.

Таким образом, образование метародопсина II сопровождается огромным спектральным сдвигом — от 500 нм до 380 нм, т. е. на 120 нм. Именно это изменение спектра поглощения родопсина наблюдал первооткрыватель Франц Болль, когда выставил на свет изолированную сетчатку лягушки и наблюдал ее обесцвечивание — на его глазах сетчатка теряла розовый цвет и приобретала желтоватый [5].

Процесс фотопревращения (фотолиза) родопсина завершается разрывом ковалентной химической связи теперь уже полностью-*транс* ретиналя с белком. Таким образом, ретиналь высвобождается из белка и оказывается в фосфолипидном окружении фоторецепторной мембраны в свободном состоянии: ретиналь должен быть как можно скорее удален из мембраны, так как в противном случае он может стать источником опасности сначала для зрительной клетки, а затем и для клеток пигментного эпителия.

Зрительный цикл, таким образом, обеспечивает максимально эффективное удаление полностью-*транс* ретиналя из фоторецепторной мембраны с тем, чтобы затем снова вернуть его в эту мембрану, но уже в 11-*цис* изомерной форме. Только этот изомер обладает способностью «войти», как ключ в замок, в хромофорный центр («хромофорный карман») белковой части молекулы (опсин) и вновь образовать ковалентную химическую связь с 296-м лизиновым аминокислотным остатком в его седьмой α -спирали. Таков, схематично, путь регенерации родопсина, то есть возвращения его в исходное темновое состояние с максимумом оптического поглощения при 500 нм. Регенерация родопсина — одно из ключевых событий в процессе темновой адаптации сетчатки.

III. ЗРИТЕЛЬНЫЙ ЦИКЛ И ОПАСНОСТЬ ФОТОПОВРЕЖДЕНИЯ

Основные события зрительного цикла представляются в настоящее время следующим образом [6–8]. Схематически они представлены на рис. 5А. Как уже говорилось, после отщепления от белковой части (опсина) и высвобождения из молекулы зрительного пигмента *транс*-ретиналь следует как можно скорее удалить из фоторецепторной мембраны диска. Недавно выяснилось, что ключевую роль в его активном транспорте из мембраны играет специальный белок — т. н. АТФ-связывающий кассетный переносчик ретиналя (АТР-binding cassette transporter или сокращенно ABCR). Этот довольно большой мембранный белок расположен в краевой «петле» диска. С затратой энергии АТФ он активно переносит свободный *транс*-ретиналь через фоторецепторную мембрану в цитоплазму наружного сегмента [7]. Причем, скорее всего, он переносится через мембрану в комплексе с фосфатидилэтаноламином (одним из трех основных фосфолипидов

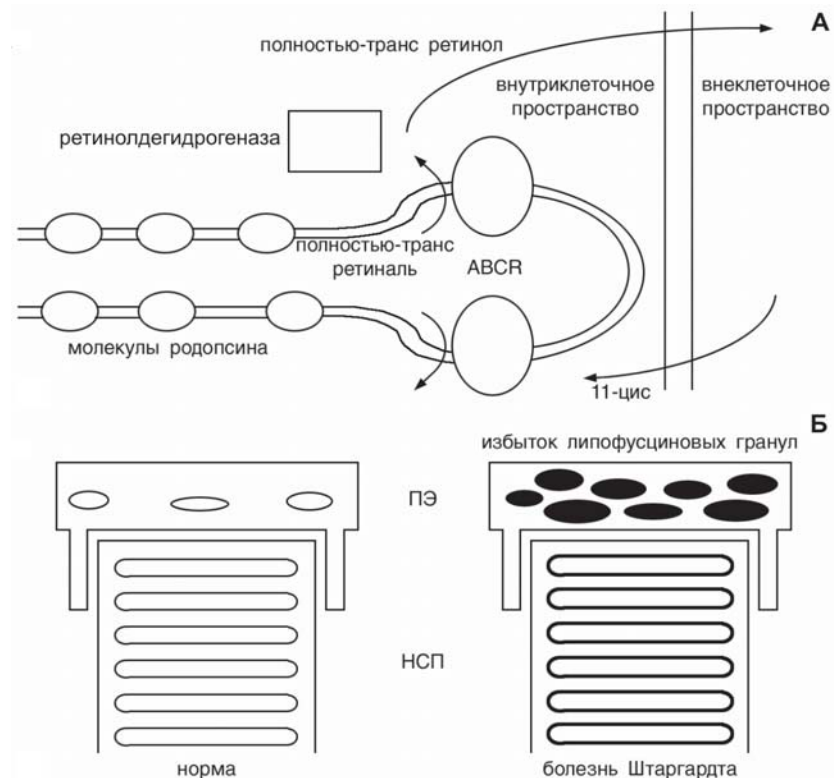


Рис. 5. А. Механизм активного удаления *trans*-ретинола из фоторецепторной мембраны диска после фотолиза родопсина (подробности в тексте).

Б. Накопление в клетках пигментного эпителия липофусциновых гранул, вызванное наследственным дефектом белка ABCR или его фотосенсибилизированным ретиналем окислением (повреждением) (по [6–8]).

фоторецепторной мембраны). Затем, будучи уже в цитоплазматическом пространстве наружного сегмента, с помощью фермента ретинолдегидрогеназы *trans*-ретинол превращается в *trans*-ретинол или витамин А, который переносится из фоторецепторной клетки в субретинольное межклеточное пространство. Здесь он связывается со следующим белком зрительного цикла – т.н. межфоторецепторным ретинол-связывающим белком (interphotoreceptor retinoid-binding protein, IRBP), и с его помощью переносится в клетку пигментного эпителия.

Наследственные или приобретенные дефекты любого из участников зрительного цикла способны привести к его нарушению. В настоящее время накапливается все больше сведений о том, что мутация гена, кодирующего синтез одного из ключевых участников зрительного цикла, а именно синтез белка ABCR, ответственна за избы-

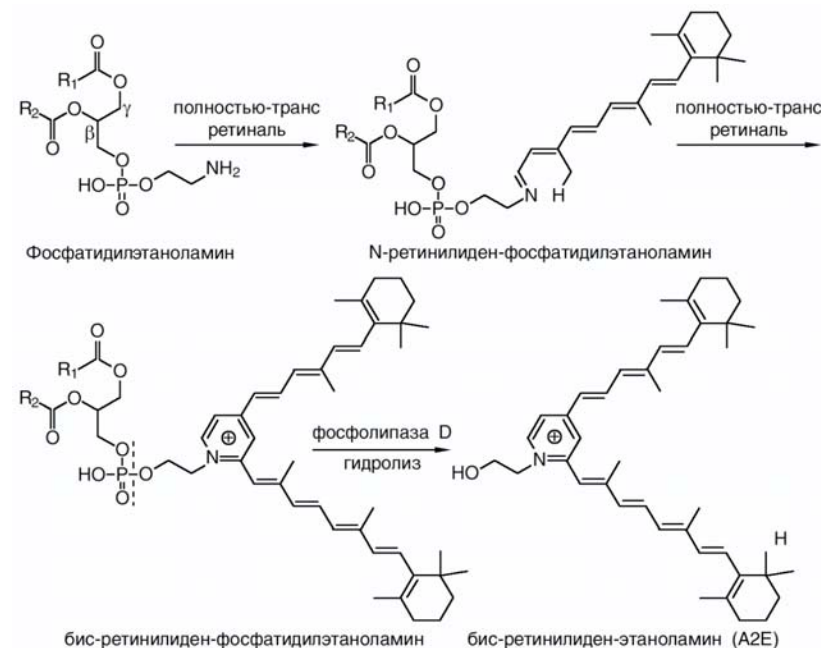


Рис. 6. Синтез основного флуорофора липофусциновой гранулы – бис-ретинолиден-этанолamina (A2E) из двух молекул полностью-*trans* ретинола и фосфатидилэтанолamina.

точное накопление в пигментном эпителии липофусциновых гранул (рис. 5Б) и за возникновение и развитие болезни Штаргарда [9]. Подобные изменения этого же ABCR-гена обнаружены и у пациентов, страдающих старческой макулярной дегенерацией сетчатки [10].

Связь дефекта белка ABCR с развитием ряда форм дегенерации сетчатки представляется следующим образом. Невозможность нормального, достаточно быстрого удаления ретинола из фоторецепторной мембраны диска приводит к его накоплению в этой мембране, что представляет опасность в силу его фототоксичности (см. ниже), и затем к его химическому взаимодействию с одним из трех основных фосфолипидов в этой мембране – с фосфатидилэтанолaminом. Ситуация при этом усугубляется тем, что с одной молекулой фосфатидилэтанолamina взаимодействуют сначала одна, а потом и вторая молекула *trans*-ретинола. В результате в мембране образуется т. н. бис-ретинолиден-фосфатидилэтанолamin (A2E-PE). Судя по всему, он и сам по себе фототоксичен, но главное – он служит предшественником следующего крайне фототоксичного соединения – бис-ретинолиден-этанолamina (в англоязычной литературе *pyridinium bisretinoid* или сокращенно A2E) (рис. 6). A2E является основным флуорофором

липофусциновых гранул; в них обнаруживается более десятка флуорофоров. Поэтому липофусциновые гранулы сильно флуоресцируют. В культуре клеток пигментного эпителия А2Е способен проявлять как детергентные свойства, повреждая, например, наружную митохондриальную мембрану и запуская апоптоз клетки [11], так и выступать в качестве фотосенсибилизатора свободно-радикального повреждения клетки, что, в конечном счете, также способно вызвать ее апоптоз. Механизм образования А2Е до конца не выяснен. В частности, твердо не установлено, где именно происходит образование А2Е из А2Е-РЕ — либо в клетке пигментного эпителия в фаголизосоме*, либо — в наружном сегменте, в самой фоторецепторной мембране, и затем уже в составе обломка наружного сегмента попадает в пигментный эпителий.

Согласно современным представлениям, избыточное накопление липофусциновых гранул и А2Е в пигментном эпителии связано с дегенеративными изменениями сетчатки, а также с усугубляющим действием УФ- и синего света при различных формах дегенерации [12]. Механизм этой связи в настоящее время интенсивно изучается.

IV. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОТОПОВРЕЖДЕНИЯ СЕТЧАТКИ

В принципе, можно выделить два класса фотоповреждений. В первом случае речь идет о сравнительно низких интенсивностях света и, главное, о его длительном действии (от дней до недель), во втором — о гораздо более высоких световых интенсивностях и облучении от секунд до часов. В первом случае повреждаются, в основном, фоторецепторы, во втором — в первую очередь, клетки пигментного эпителия, а затем сетчатки. Максимум спектра действия для первого класса фотоповреждений соответствует спектру поглощения родопсина, т.е. наиболее эффективна сине-зеленая область видимого спектра, для второго — спектр действия находится в УФ- и синей областях спектра (см. [1, 13]). Для человека и дневных животных гораздо большую опасность представляет слишком яркий свет в ультрафиолетовой и синей областях спектра. О механизмах такого рода повреждения, в основе которого лежат фотохимические реакции сенсibilизированного свободно-радикального окисления, далее и пойдет речь. Эффективность этих реакций определяется тремя факторами: наличием поглощающих свет фотосенсибилизаторов, субстратов окисления и присутствием кислорода. Как уже говорилось, в сетчатке и в пигментном эпителии все три фактора присутствуют в полной мере.

* Фаголизосома — это слившаяся с лизосомой фагосома; фагосома же — это фагоцитированный пигментным эпителием обломок наружного сегмента фоторецептора.

ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ И ФОТОТОКСИЧНОСТЬ ЛИПОФУСЦИНОВЫХ ГРАНУЛ

Фотосенсибилизаторами могут служить как эндогенные, так и экзогенные окрашенные соединения. К эндогенным фотосенсибилизаторам сетчатки и пигментного эпителия, в первую очередь, относятся ретиналь и продукты его превращения.

Начнем их рассмотрение с липофусциновых гранул и их основного флуорофора — бис-ретинолиден-этанолamina (А2Е).

Ранее считалось, что липофусциновые гранулы являются безвредным балластом, накапливающимся в постмитотических клетках по мере старения организма. Однако оказалось, что они фототоксичны, поскольку обладают способностью образовывать при действии света активные формы кислорода — синглетный кислород и его супероксидные радикалы [14–19].

Спектры действия, то есть зависимость генерации этих активных форм кислорода от длины волны облучения, указывают на то, что УФ- и синий свет действуют гораздо эффективнее (опаснее), нежели зеленый и красный. На рис. 7 показана зависимость накопления супероксидных анион-радикалов кислорода от длины волны облучения суспензии липофусциновых гранул, выделенных из пигментного эпителия донорских глаз человека [17]. Давно описанная опасность повреждающего действия синего света на сетчатку и пигментный эпителий [20] скорее всего связана с фототоксичностью липофусциновых гранул.

Выступая в роли сенсibilизаторов фотоокисления, липофусциновые гранулы способны стимулировать окисление липидов и кардиолипидных липосом, белков (инактивацию их ферментативной активности), повреждать биологические мембраны [16, 18]. Согласно нашим предварительным данным, липофусциновые гранулы способны при их облучении синим светом вызывать апоптоз клетки пигментного эпителия, то есть ее запрограммированную гибель. Облучение же в культуре ткани клеток пигментного эпителия, нагруженных флуорофором липофусцина — А2Е, неизбежно приводит к их апоптозу [21]. Следует отметить, что апоптоз рассматривается сейчас как общий конечный путь гибели клеток при многих заболеваниях сетчатки, включая различные формы дегенерации и дистрофии.

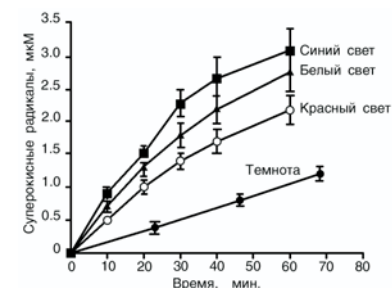


Рис. 7. Зависимость генерации липофусциновыми гранулами супероксидных радикалов кислорода от длины волны облучения (подробности см. [17]).

Механизм свободно-радикального фотоокисления включает как прямую реакцию взаимодействия активированного сенсibilизатора с компонентами клетки, так и образование сначала активных форм кислорода, которые, в свою очередь, взаимодействуют и повреждают ее нуклеиновые кислоты, белки и липиды. Недавно было показано как высокотоксичный синглетный кислород, образующийся при облучении А2Е синим светом, повреждает не только биохимические компоненты клетки, но атакует и сами молекулы А2Е, превращая их в еще более токсичную эпоксидную форму [22, 23].

Исследования фототоксичности липофусциновых гранул и их флуорофоров, особенно А2Е, активно продолжается. Цель этих работ — подробное выяснение их роли в патогенезе ряда дегенеративных заболеваний сетчатки.

ФОТОТОКСИЧНОСТЬ РЕТИНАЛЯ

Ретиналь — хромофор в молекуле зрительного пигмента и предшественник А2Е — флуорофора липофусциновых гранул. Он представляет собой один из эффективных природных сенсibilизаторов. Как видно из таблицы, его фотосенсibilизирующая активность лишь вдвое ниже, чем у такого классического сенсibilизатора, как рибофлавин [24].

Как говорилось выше, конечным продуктом обесцвечивания родопсина ($\lambda_{\text{макс.}} = 500 \text{ нм}$) является метародопсин II ($\lambda_{\text{макс.}} = 380 \text{ нм}$) или уже высвободившийся полностью — *транс* ретиналь ($\lambda_{\text{макс.}} = 380 \text{ нм}$).

Таблица.

Относительный выход фотоокисления глицилтриптофана в присутствии различных эндогенных фотосенсibilизаторов (облучение УФ-светом — 313 нм)*

Фотосенсibilизатор	Максимум спектра поглощения, λ , нм	Относительный выход фотоокисления
Никотиновая кислота	261,5	9,7
Флавинмононуклеотид	450	1,1
Рибофлавин	372,5	1,0*
Пиридоксин	325	0,74
Ретиналь	380	0,51
НАДН ₂	339	0,05
Фолиевая кислота	365	0,05
Кобаламин	361	>0,05
Рутин	362	>0,05
Билирубин	453	>0,05

* За единицу принято значение выхода для рибофлавина. Концентрация глицилтриптофана — 10^{-3} моль/л, оптическая плотность всех растворов при 313 нм — 0,05; 0,01 моль/л фосфатный буфер рН 7,0; время освещения 2 мин.

В свое время нами было показано, что при действии света на обесцвеченные фоторецепторные мембраны, содержащие метародопсин II или *транс*-ретиналь, наблюдается фотоокисление и белковой части родопсина (SH-групп опсина), и липидов фоторецепторной мембраны [25]. В этой же работе был определен спектр действия, т.е. зависимость окисления белков и липидов этой мембраны от длины волны облучающего света. Оказалось, что их фотоокисление наиболее выражено в области 380 нм, то есть в той же области, что и спектр поглощения свободного ретиналя (или метародопсина II). Следствием этого являются необратимая агрегация молекул родопсина в фоторецепторной мембране, уменьшение способности родопсина к регенерации при добавлении извне 11-*цис* ретиналя, т.е. нарушение его нативных свойств (также см. ниже).

ФОТОТОКСИЧНОСТЬ ЛЕКАРСТВ

Лекарства как экзогенные фотосенсibilизаторы, а также окрашенные продукты их метаболизма как эндогенные фотосенсibilизаторы могут представлять опасность, попадая в доступные свету структуры глаза, в первую очередь сетчатку и пигментный эпителий (подробнее см. [26]). Особенно опасны экзогенные фотосенсibilизаторы для афакичного, т.е. лишённого хрусталика, глаза, а также для нормального детского глаза, хрусталик которого пропускает не только видимый, но частично и ультрафиолетовый свет [27].

СУБСТРАТЫ ФОТООКИСЛЕНИЯ

Молекулярные компоненты фоторецепторной мембраны — белки (родопсин) и липиды — представляют собой идеальные субстраты для реакции фотосенсibilизированного окисления. Как и любая биологическая мембрана, эта мембрана состоит из двойного липидного бислоя и пронизывающих его мембранных белков. Основным белком этой мембраны является родопсин: на его долю приходится до 95–98% всех интегральных, мембранных белков.

Тремя основными фосфолипидами фоторецепторной мембраны являются фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин. Уникален состав этих фосфолипидов: более 60% — это полиненасыщенные жирные кислоты, причем на долю длинноцепочечной, т.н. докозагексаеновой кислоты, содержащей 22 углеродных атома и 6 двойных связей (C22:6), приходится около 75% от всех жирных кислот (см. [28]). Благодаря этому фоторецепторная мембрана обладает исключительно низкой вязкостью, равной, примерно, двум пуазам (это вязкость оливкового масла). Такая малая вязкость позволяет родопсину и другим белкам этой мембраны претерпевать быструю вращательную и более медленную латеральную диффузию, следствием чего является их способность часто сталкиваться и взаимодействовать друг с другом.

Фотоокисление белков и липидов фоторецепторной мембраны идет параллельно и практически независимо. Действительно, добавление известного ингибитора перекисного окисления липидов – 2,6-дигидро-2,6-дибутил-4-метилфенил-1-пропанол-1-тиола (дибунола) полностью предотвращает фотоокисление липидов в этой мембране и лишь частично снижает скорость окисления тиоловых групп белка [25]).

Белки и липиды по-разному реагируют и на изменение содержания кислорода: к окислению белки менее чувствительны, чем липиды [29].

Интересно сопоставить в этой связи квантовые выходы фотоокисления и обесцвечивания (фотолиза) родопсина. Квантовый выход фотоокисления родопсина невелик (около 0,04), а фотообесцвечивания почти на порядок выше (около 0,7) (см. [28]). Это объясняет, почему физиологические интенсивности света не становятся для сетчатки повреждающими.

Фотопатологическим следствием фотоокисления родопсина и липидов в фоторецепторной мембране являются:

- образование внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей («сшивок»);
- образование необратимых белковых агрегатов, подвижность которых в мембране крайне низка;
- потеря способности окисленного и агрегированного родопсина к регенерации как *in vitro*, так и *in vivo* [34].

Необратимая агрегация родопсина в мембране, вызванная повреждающими дозами света, приводит к потере его нативных свойств и нормальной функциональной активности. Чувствительным тестом на нативность зрительного пигмента является его способность к регенерации при добавлении экзогенного 11-*цис* ретиналя. И в опытах *in vitro* на суспензии фоторецепторных мембран [32] и в опытах *in vivo* при облучении глаза белой крысы [35] нами было показано, что способность родопсина к регенерации уменьшается, а электроретинограмма – подавляется или исчезает вовсе (рис. 8).

Ретиналь способен выступать фотосенсибилизатором окисления и повреждения не только родопсина, но и других ретиналь-связывающих и ретиналь-переносящих белков. Показано, что он сенсибилизирует фотоокисление и повреждение двух ключевых белков зрительного цикла – ABCR, о котором речь шла выше, и водорастворимого межфоторецепторного ретиналь/ретинол-переносящего белка (IRBP). Как недавно нами было показано, при действии света в полосе оптического поглощения ретиналя, то есть в ближней ультрафиолетовой области ($\lambda = 380$ нм), белок IRBP повреждается: часть его цистеиновых и ароматических аминокислотных остатков окисляется, и, что самое важное, при этом ухудшаются его функциональные свойства, а именно снижается способность связывать ретинол [36].

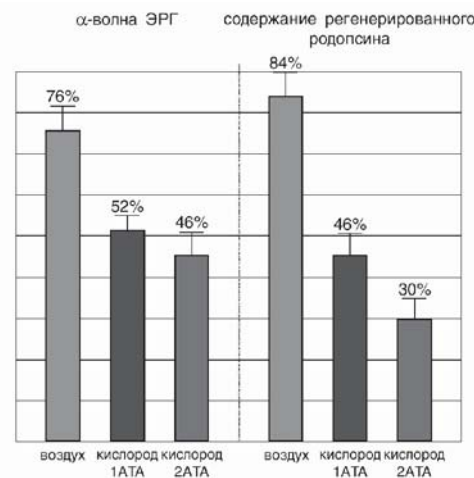


Рис. 8. Падение α -волны электроретинограммы сетчатки белой крысы (слева) и ухудшение способности обесцвеченного родопсина к регенерации при добавлении извне 11-*цис* ретиналя (справа) в результате повреждающего действия света и при различном содержании кислорода во вдыхаемой смеси (подробности см. [35]).

Крайне чувствителен к фотоповреждению, вызванному ретиналем как фотосенсибилизатором, оказался белок ABCR [8], о котором подробно шла речь выше. Как и в случае родопсина, молекулярным механизмом повреждения ABCR является его агрегация (однако не за счет образования дисульфидных связей). Фотоокисление ABCR, обладающего, помимо способности связывать и переносить ретиналь, также и АТФазной активностью, приводит к тому, что связанный с ним *транс*-ретиналь теряет способность стимулировать его АТФазную активность. В результате, ретиналь не «выбрасывается» из наружного сегмента в межклеточное пространство. Иными словами, вызванный светом дефект ABCR (как и его наследственный дефект), ведет к накоплению в фоторецепторной мембране *транс*-ретиналя, образованию из него А2Е и избыточного количества липофусциновых гранул [8] (рис. 5Б). Белок ABCR оказался более чувствительным к фотоокислению и повреждению, нежели другие белки фоторецепторной мембраны, а именно родопсин, α -субъединица трансдуцина, белок цГМФ-регулируемого ионного канала, а также периферические белки этой мембраны – родопсиновая киназа и арестин.

КИСЛОРОД

Кислород является третьим необходимым участником реакции фотоокисления.

Следует отметить, что вдоль фоторецепторной клетки сетчатки парциальное давление кислорода различно. В дистальной части ее наружного сегмента, ближе расположенной к пигментному эпителию и сосудистой оболочке, концентрация кислорода, по сравнению с проксимальной (базальной) больше. Действительно, если в области

верхушки наружного сегмента напряжение кислорода P_{O_2} составляет около 100 мм ртутного столба, что эквивалентно концентрации кислорода в артериальной крови, то в области проксимальной части (на границе с внутренним сегментом) P_{O_2} составляет всего лишь около 10 мм ртутного столба в темноте и порядка 30 мм на свету. Разница может объясняться тем, что во внутреннем сегменте фоторецепторной клетки содержится большое скопление митохондрий, которые, как известно, являются основными потребителями кислорода.

С различным парциальным давлением кислорода вдоль фоторецепторной клетки, вероятнее всего, связан градиент фотоповреждения ее наружного сегмента. Его дистальная часть содержит «старые», накопившие молекулярные дефекты диски, более чувствительные к повреждению. Свидетельством тому служит обнаруженный нами градиент уменьшения количества способных к титрованию SH-групп, идущий от вершины наружного сегмента («старые» диски) к его основанию (базальные «новые» диски) [37].

В опытах на крысах нами было показано, что избыток кислорода (гипероксия) и особенно гипербарическая оксигенация усугубляют повреждающее действие света на сетчатку, при этом существенно нарушается регенерация родопсина и намного снижается электрическая активность сетчатки [35] (рис. 8).

V. СИСТЕМЫ ЗАЩИТЫ СТРУКТУР ГЛАЗА ОТ ФОТОПОВРЕЖДЕНИЯ

Итак, сочетание света, кислорода, пигментов-фотосенсибилизаторов и легко окисляющихся субстратов (липидов и белков) создает реальную угрозу для возникновения и развития в сетчатке и пигментном эпителии фотодеструктивных процессов. Этот парадокс зрения, когда свет выступает и носителем информации, и потенциально опасным повреждающим фактором, был решен в ходе эволюции созданием достаточно надежной многоуровневой системы защиты от опасности фотоповреждения. Эта система включает:

- обновление фоторецепторных мембран,
- комплекс эндогенных антиоксидантов,
- механизм максимально быстрого удаления свободного ретиналя из зрительной клетки,
- систему оптических фильтров глаза, в которой ключевую роль играет хрусталик, желтеющий у приматов и человека с возрастом.

Естественно, нарушения в этой системе приводят к возрастанию риска светового повреждения сетчатки и пигментного эпителия.

ОБНОВЛЕНИЕ ФОТОРЕЦЕПТОРНЫХ МЕМБРАН

Итак, первый и наиболее радикальный способ защиты — это постоянное обновление фоторецепторных мембран и всего наружного сегмента зрительной клетки (и палочки, и колбочки). Обновление позволяет избежать накопления в наружном сегменте молекулярных дефектов, благодаря чему молекулярная машинерия фоторецепторного механизма остается эффективной на протяжении всей жизни организма. Процесс постоянного обновления наружного сегмента заключается в том, что в его базальной части постоянно образуются новые фоторецепторные мембраны (фоторецепторные диски), а в апикальной части пачки «старых» дисков (верхушка наружного сегмента) обламываются [38] (см. также [28, 39]). Эти «обломки» затем эффективно фагоцитируются клетками пигментного эпителия. Процесс этот исключительно интенсивный: в течение суток около 100 дисков заново образуется и обламывается в каждой палочке. Поскольку многочисленные отростки клетки пигментного эпителия окружают более десятка палочек, то за сутки каждая клетка «переваривает» около тридцати тысяч (!) отработанных дисков. Клетка пигментного эпителия является одной из самых активных фагоцитирующих клеток в организме.

Процессу радикального обновления наружного сегмента фоторецепторной клетки, однако, свойственны издержки, связанные с возрастом. Речь, в частности, идет об избыточном накоплении в пигментном эпителии «пигмента старости» — липофусциновых гранул, являющихся, по-существу, недопереваренными обломками наружных сегментов (фагосомы) и обладающих фототоксичностью (см. выше). Липофусциновые гранулы могут занимать до 20% объема клетки.

АНТИОКСИДАНТЫ

Следующая линия защиты от фотоповреждения — антиоксидантная. Речь идет о торможении процессов свободно-радикального фотосенсибилизированного окисления. В эту систему входят витамины E (α -токоферол), C (аскорбиновая кислота), таурин и набор антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, пероксидаза, каталаза). В дополнение к этому, в своё время нами было показано, что антиоксидантную систему защиты усиливают экранирующие пигменты глаза — меланосомы (у позвоночных и человека) и оммохромы (у беспозвоночных) [40–44]. Этим, в значительной мере, объясняется, почему альбиносы столь чувствительны к фотоповреждению. Интересно, что недостаток меланина у альбиносов частично компенсируется повышенным содержанием в их сетчатках α -токоферола [44].

УДАЛЕНИЕ СВОБОДНОГО ПОЛНОСТЬЮ-ТРАНС РЕТИНАЛЯ ИЗ ЗРИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

О механизме максимально быстрого удаления свободного полностью-транс ретиналя из зрительной клетки в результате работы зрительного цикла, и в первую очередь одного из его ключевых белков — АТФ-зависимого каскадного переносчика ABCR, говорилось выше.

ОПТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ЗАЩИТЫ

Наконец, важная система защиты сетчатки и пигментного эпителия от фотоповреждения — оптическая. Эта система состоит из последовательности светофильтров — роговицы, хрусталика, экранирующих пигментов (меланосом и оммохромов) (подробнее см. [43]). Эти светофильтры отсекают от сетчатки и пигментного эпителия коротковолновое излучение — ультрафиолетовое и частично синее, кроме того, они уменьшают хроматическую абберацию, улучшая, таким образом, контрастную чувствительность и остроту зрения.

ХРУСТАЛИК КАК СВЕТОФИЛЬТР

Роль ключевого светофильтра играет хрусталик. У многих позвоночных животных, обитающих в яркой световой среде, хрусталик от рождения интенсивно желтый, то есть эффективно отсекающий от сетчатки и пигментного эпителия УФ- и синий свет. У человека хрусталик с возрастом желтеет, то есть в старческом (некатарактальном!) хрусталике перед сетчаткой как бы «вводится» дополнительный желтый светофильтр [27] (рис. 9).

Это крайне важно для сетчатки и пигментного эпителия, поскольку возрастает эффективность их оптической защиты. У детей же и в молодом возрасте хрусталик, как правило, бесцветный и эффективно поглощает лишь ультрафиолетовое излучение. Следует отметить, что в младенческом возрасте хрусталик имеет «ультрафиолетовое окно», то есть пропускает к сетчатке определенную часть падающего на глаз УФ-света. Остается не ясным, является ли это «окно» лишь следствием несовершенства постнатального хрусталика (его белков кристаллинов) или оно необходимо для постнатального развития сетчатки и

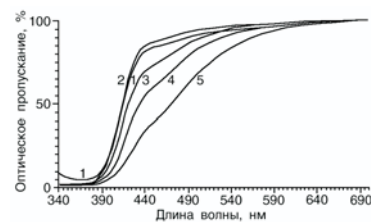


Рис. 9. Естественное возрастное пожелтение хрусталика глаза человека (подробности см. [27]).

- 1 — новорожденные,
- 2 — от 8 до 29 лет (10 хрусталиков),
- 3 — от 31 до 49 лет (25 хрусталиков),
- 4 — от 52 до 65 лет (14 хрусталиков),
- 5 — старше 70 лет (13 хрусталиков).

пигментного эпителия. Примерно к 15 годам УФ-«окно» исчезает, и постепенно происходит пожелтение хрусталика, наиболее выраженное в старческом возрасте.

Роль светофильтра способен выполнять на ранних стадиях помутнения и катарактальный хрусталик [45, 46]. Ухудшая качество изображения на сетчатке, такой желтоватый хрусталик эффективно задерживает коротковолновое излучение, способен до некоторой степени уменьшить хроматическую абберацию и предотвратить вызванное светом усугубление некоторых форм дегенерации сетчатки.

Неблагоприятным следствием экстирпации хрусталика при катаракте является многократное повышение риска повреждения сетчатки УФ- и синим светом. Исходя из этих представлений, нами еще в середине 80-х годов был разработан и внедрен в клиническую практику «искусственный хрусталик» — новая окрашенная интраокулярная линза «Спектр» [47–49]. Подобно естественному хрусталику пожилого человека, эта линза полностью отсекает ультрафиолетовую, и, в значительной мере, коротковолновую (фиолетово-синюю) часть видимого спектра. Важно отметить, что нормальное цветовосприятие пациента с имплантированным желтоватым хрусталиком не нарушается.

На рис. 10 сведены спектры поглощения основных эндогенных фотосенсибилизаторов — ретинола, ретиналя, липофусцина, а также спектры пропускания хрусталика глаза пожилого человека и линзы «Спектр». Видно, что и хрусталик глаза пожилого человека, и желтоватая линза в значительной мере отсекают коротковолновую часть видимого спектра, в которой поглощают свет опасные для сетчатки фотосенсибилизаторы. К сожалению, эффективных и безопасных лекарственных средств (антиоксидантов), способных предотвратить фотосенсибилизированное повреждение сетчатки и пигментного эпителия, пока не найдено.

МЕХАНИЗМЫ ФОТОПОВРЕЖДЕНИЯ ХРУСТАЛИКА И ЕГО ЗАЩИТЫ ОТ ТАКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ (ФОТОКАТАРАКТОГЕНЕЗА)

Фотоповреждение хрусталика

Поглощая коротковолновое излучение, глазные светофильтры сами подвержены риску фотоповреждения. В первую очередь, речь идет о хрусталике и риске возникновения и развития катаракты при действии на него ультрафиолетового и частично синего света [50].

Согласно многочисленным эпидемиологическим данным, УФ-свет принимает активное участие в возникновении и развитии катаракты [51–53]. Действительно, т.н. «ближний ультрафиолет» (от 315–320 нм до 380–400 нм) составляет 97% солнечного спектра [54, 55].

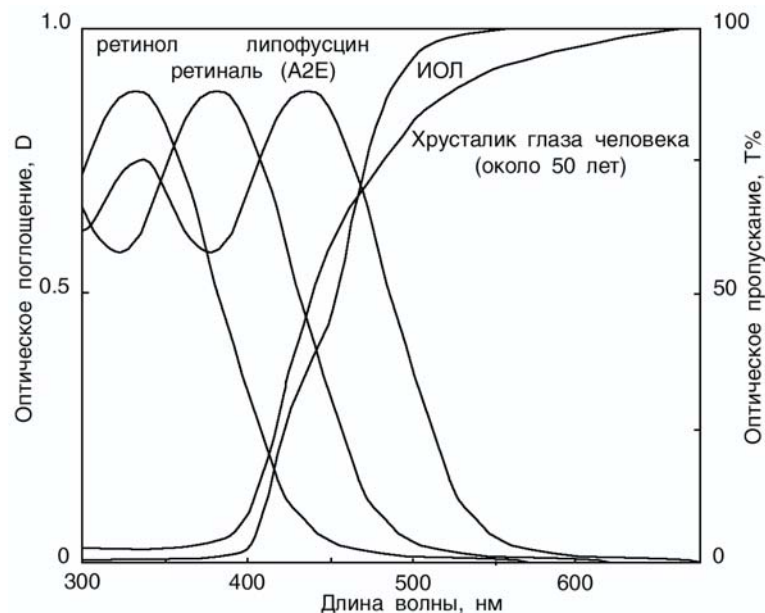


Рис. 10. Спектры поглощения (D) эндогенных фотосенсибилизаторов — ретинола, ретиналя и липофусцина и спектры пропускания (T%) хрусталика глаза человека около 50 лет и желтоватой интраокулярной линзы (ИОЛ «Спектр»).

Многие макромолекулярные и структурные изменения, связанные со старением хрусталика и развитием катаракты, могут иметь много общего с фотокатарактой, вызванной УФ-светом [56–58]. УФ-индуцированная катаракта в эксперименте *in vitro* на целых интактных изолированных хрусталиках может быть вызвана как при добавлении фотосенсибилизаторов, так и без их участия. Основной причиной помутнения хрусталика при этом является фотоагрегация кристаллинов, то есть образование ковалентно-связанных высокомолекулярных агрегатов. Существенный интерес могло бы представить исследование процесса помутнения изолированного хрусталика без добавления обычных фотосенсибилизаторов, например таких, как кинуренины, рибофлавин или метиленовая синь. Ранее такая попытка предпринималась [59]. Недавно мы попытались при облучении ультрафиолетом зарегистрировать кинетику помутнения ядерной части изолированного хрусталика белой мыши (предварительные данные М.А. Островского, Ю.В. Сергеева и Д.Аткинсона). Для постановки этого эксперимента были использованы мощный эксимерный лазер (Lambda-

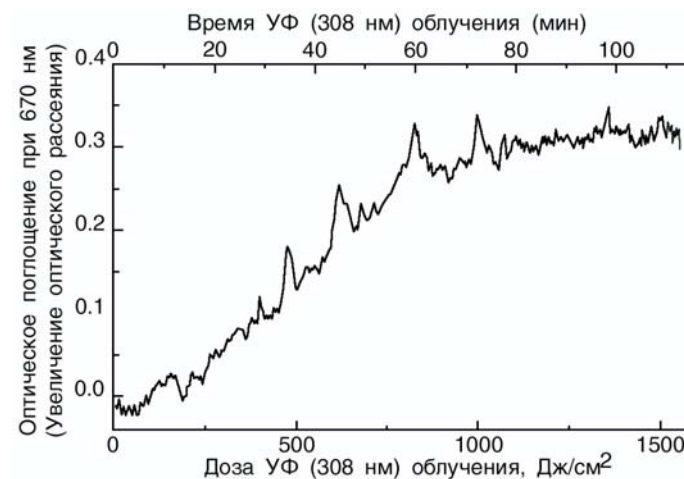


Рис. 11. Кинетика нарастания оптического рассеяния (помутнения) изолированного ядра хрусталика белой мыши в зависимости от дозы ультрафиолетового облучения эксимерным лазером при длине волны 308 нм.

Physik EMG-201-MS) с длиной волны 308 нм, которая, в основном, поглощается триптофановыми остатками белков, а в качестве луча, регистрирующего появляющееся светорассеяние — красный гелий-неоновый лазер с длиной волны 633 нм (методические подробности см. [60]). Как видно на рис. 11, относительная оптическая плотность (оптическое рассеяние) изолированного ядра хрусталика белой мыши была до облучения около нуля, то есть ядро совершенно прозрачно. При облучении ультрафиолетом и нарастании дозы облучения, наблюдается характерная кривая возрастания светорассеяния и уменьшения пропускания в видимой области спектра с выходом на насыщение при высоких дозах. Иными словами, четко регистрируется кинетика помутнения ядерной части хрусталика белой мыши в ходе УФ-облучения. Биохимический и рентгеноструктурный анализ такого хрусталика может дать важную информацию о молекулярных механизмах фотоагрегации белков хрусталика. Подобный подход для исследования повреждающего действия света на хрусталик (в данном случае ультрафиолета), а возможно и других физических факторов или химических агентов, представляется крайне перспективным для исследования процессов старения хрусталика и катарактогенеза на органном уровне.

Низкое содержание свободного кислорода в хрусталике предотвращает потенциальную фототоксичность его желтых светофильтрующих веществ

У животных, например мышей и крыс, хрусталики которых практически не поглощают свет длиннее 320 нм, ближний УФ не способен вызвать катаракту [61]. Однако хрусталики приматов и человека уже в раннем возрасте поглощают ближний ультрафиолет благодаря содержанию в них желтоватых соединений — продуктов метаболизма триптофана. Речь идет прежде всего об основном «фильтре» — глюкозиде 3-гидроксикинуренине и продуктах его превращения [62, 63]. Очевидная функция этого соединения в хрусталике — защита сетчатки от ближнего ультрафиолета. С возрастом, однако, концентрация глюкозида 3-гидроксикинуренина в хрусталике уменьшается [64], но при этом начинает накапливаться т.н. «желтый белок», содержащий желтый пигмент, ковалентно связанный с белком [65]. Наибольшая концентрация этого белка в ядерной части хрусталика, и он полностью поглощает весь ультрафиолет, падающий на хрусталик [66]. Желтый пигмент (хромофор) «желтого белка» обладает выраженной фотосенсибилизирующей активностью, а это означает, что, поглощая УФ, он способен вызвать фотоокисление белков хрусталика и их агрегацию. В опытах *in vitro* было показано, что хромофор «желтого белка» при УФ-облучении способен образовывать активные формы кислорода, причем, в основном, наиболее токсичный из них — синглетный кислород [67]). Однако, что оказалось замечательным, по данным этих авторов: прямое облучение целого, старческого (некатарактального) человеческого хрусталика ближним ультрафиолетом высокой интенсивности (200 мВт/см² в течение 24 час) не приводит к генерации синглетного кислорода, повреждению его белков и помутнению хрусталика. Объяснение этого феномена состоит в том, что в хрусталике, особенно в его ядре, концентрация свободного кислорода, как известно, крайне низка [68], и поэтому при облучении целого хрусталика синглетный кислород из него не образуется.

Таким способом, по-видимому, решается этот «парадокс хрусталика»: «желтый белок» как светофильтр надежно защищает сетчатку (это особенно важно для старческой сетчатки и пигментного эпителия, содержащего большое количество фототоксичных липофусциновых гранул), от опасности фотоповреждения УФ- и синим светом, но сам хрусталик при этом защищен от фототоксичного хромофора «желтого белка» низким содержанием свободного кислорода и набором эндогенных антиоксидантов.

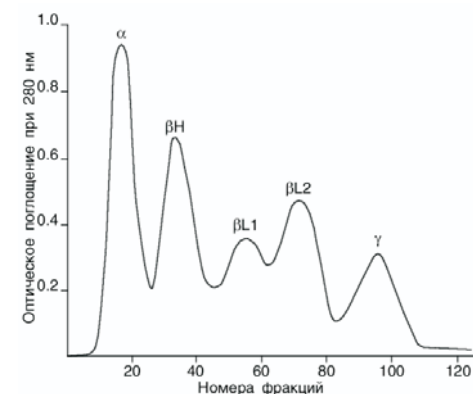
Основные структурные белки хрусталика

Более 90% водорастворимых белков хрусталика млекопитающих животных и человека приходится на долю α -, β - и γ -кристаллинов —

его основных структурных белков (рис. 12). Они играют ключевую роль в поддержании прозрачности хрусталика и его преломляющей силы. β - и γ -кристаллины весьма близки по структуре, легко подвергаются агрегации, в т. ч. при действии УФ-света, и, как правило, их относят к одному семейству кристаллинов [69–71]. Напротив, α -кристаллины образуют отдельное семейство белков, а мутации кодирующих их генов могут приводить к их неспецифической агрегации, следствием которой, в конечном счете, является образование катаракты [72]. Для α -кристаллинов характерна высокая устойчивость к агрегации при различного рода воздействиях, включая нагревание, денатурирующие химические агенты или облучение. В хрусталике α -кристаллины образуют крупные, как бы мицеллярные структуры с молекулярной массой от 600 до 900 кДа, которые составлены из небольших субъединиц α -кристаллина с молекулярной массой около 20 кДа. В большинстве хрусталиков млекопитающих животных и человека α -кристаллины распадаются на две группы — αA - и αB - кристаллины в молярном соотношении 1:3 (подробнее о кристаллинах см. [73]). Важно отметить, что обе эти группы белков экспрессируются не только в хрусталике, но и в некоторых других органах, таких как сердце, почка и мозг [74]. Причем экспрессия αB -кристаллина повышается в несколько раз при стрессе и некоторых патологических состояниях [75]. В последнее время показано, что и αA -, и αB -кристаллины очень похожи (гомологичны) на распространенное семейство небольших по молекулярной массе белков теплового шока или шаперонов, защищающих другие белки от повреждения (денатурации) (см. [76]). Важным открытием для физиологии и патологии хрусталика стало обнаружение шаперон-подобной активности α -кристаллинов, способных предотвращать тепловую агрегацию βL - и γ -кристаллинов, а также некоторых ферментов, как например алкогольдегидрогеназы, цитратсинтетазы, карбоангидразы [77]. α -Кристаллин, обладая шаперонной активностью и эффективно препятствуя агрегации β - и γ -крис-

Рис. 12. Типичная картина хроматографического разделения (гель-фильтрации) α -, β - и γ -кристаллинов бычьего хрусталика.

Отчетливо видны пики: высокомолекулярной фракции α -кристаллинов, три пика β -кристаллинов — «тяжелой» фракции βH - и двух «легких» $\beta L1$ - и $\beta L2$ -кристаллинов и, наконец, низкомолекулярной фракции γ -кристаллинов.



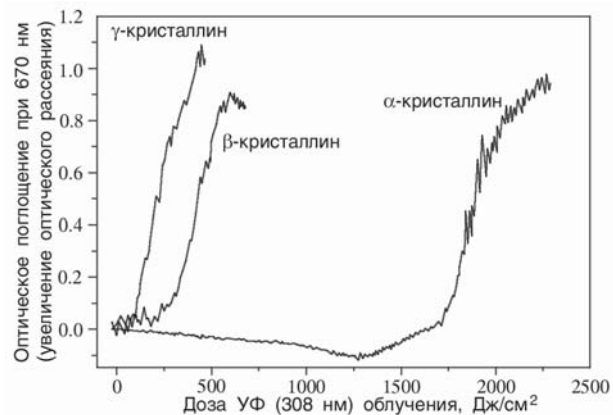


Рис. 13. Сравнение кинетики нарастания оптического рассеяния (помутнения) растворов α -, β - и γ -кристаллинов в зависимости от дозы УФ-облучения эксимерным лазером при длине волны 308 нм. Концентрация белка в каждом случае 1 мг/мл (подробности см. [60]).

таллинов, поддерживает прозрачность хрусталика на протяжении всей жизни. С возрастом, однако, структура самого α -кристаллина может нарушаться, например в результате воздействия протеолитических ферментов, УФ-облучения или других факторов, что приводит к ослаблению его шаперонной активности. Следствием этого может стать агрегация, в первую очередь легко агрегирующего γ -, а затем и β -кристаллина, что рассматривается в качестве возможной причины возникновения и развития старческой катаракты [78].

Недавно мы провели специальное исследование по сравнению кинетики увеличения оптического светорассеяния (фотоагрегации) α -, β - и γ -кристаллинов, вызванной УФ-облучением эксимерным лазером при длине волны 308 нм. В этой области поглощают ароматические аминокислоты, главным образом триптофан [60]. Как видно на рис. 13, чувствительность α -, β - и γ -кристаллинов к фотоагрегации, облученных в одних и тех же условиях и при одной и той же концентрации (1 мг/мл), существенно различается. Наиболее легко агрегирует γ -кристаллин, не слишком сильно от него отличается β -кристаллин, и разительно отличается поведение α -кристаллина, агрегация которого начинается при гигантских дозах ультрафиолетового облучения. Эта картина ясно демонстрирует, что хрусталику требуется специальный механизм для предотвращения фотоагрегации γ -, а также β -кристаллинов. Важнейшим элементом такого механизма, судя по всему, является защитная (шаперонная) функция α -кристаллина.

На рис. 14, 15 представлены результаты, полученные нами совместно с Ю.В. Сергеевым и Д.А. Аткинсоном в Национальном Институте Здоровья и Национальном Институте Стандартов и Технологий в

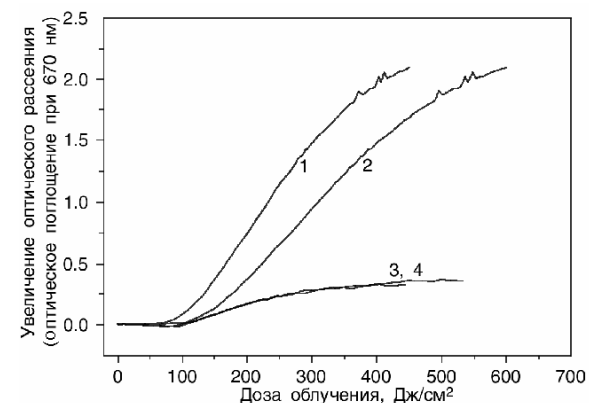


Рис. 14. Защитная (шаперонная) активность α -кристаллина в отношении кинетики нарастания оптического рассеяния (фотоагрегации) γ -кристаллина в зависимости от дозы УФ-облучения эксимерным лазером при длине волны 308 нм: кривая 1 — γ -кристаллин (1 мг/мл); кривая 2 — расчетная кривая оптического экранирования γ -кристаллина (1 мг/мл) добавленным α -кристаллином (1 мг/мл); кривые 3 и 4 — два независимых измерения кинетики нарастания оптического рассеяния в смеси γ -кристаллина (1 мг/мл) и α -кристаллина (1 мг/мл).

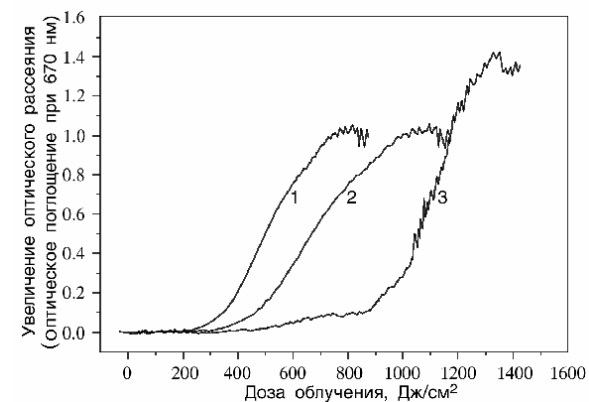


Рис. 15. Защитная (шаперонная) активность α -кристаллина в отношении кинетики нарастания оптического рассеяния (фотоагрегации) β -кристаллина в зависимости от дозы УФ-облучения эксимерным лазером при длине волны 308 нм: кривая 1 — β -кристаллин (1 мг/мл); кривая 2 — расчетная кривая оптического экранирования β -кристаллина (1 мг/мл) добавленным α -кристаллином (1 мг/мл); кривая 3 — кинетики нарастания оптического рассеяния в смеси β -кристаллина (1 мг/мл) и α -кристаллина (1 мг/мл).

США и демонстрирующие протекторную способность α -кристаллина, а именно его способность уменьшать фотоагрегацию γ - и β -кристаллинов. На рис. 14, 15 показано, что в смесях γ - и α - (рис. 14) и β - и α -кристаллинов (рис 15), согласно расчетам, около 30% приходится на долю простого оптического экранирования γ - и β -кристаллинов со стороны α -кристаллина. В то же время, остальные 70% защитного эффекта объясняются не пассивной оптической, а активной шаперонной способностью α -кристаллина.

В отношении γ -кристаллина подобные результаты были получены ранее [79]. В настоящее время во многих лабораториях ведутся интенсивные исследования молекулярных механизмов, обеспечивающих способность α -кристаллина образовывать белковые комплексы с γ - и β -кристаллинами и с другими белками, предотвращая или уменьшая действие на них денатурирующих агентов, в первую очередь тепла и света. Успехи в этом направлении могут стать основой для понимания фундаментальных молекулярных механизмов поддержания прозрачности хрусталика на протяжении всей жизни, механизмов катарактогенеза, а также, возможно, поиска антикатарактальных препаратов, способных имитировать или поддерживать в хрусталике глаза шаперонную активность его α -кристаллина.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, очевидно, что свет в зрении способен выступать не только как носитель зрительной информации, но и как фактор риска. В обоих случаях ключевой молекулой, поглощающей свет и запускающей как нормальный фоторецепторный процесс, так и процесс фотоповреждения, является ретиналь. Сразу следует подчеркнуть, что помимо ретиналя процесс фотоповреждения могут запускать в фоторецепторных клетках и клетках пигментного эпителия и другие эффективные фотосенсибилизаторы, в первую очередь продукты фотопревращения самого ретиналя (A2E и эпокси-формы A2E), липофусциновые гранулы, флавины и флавопротеины, а также при определенных условиях меланин и меланопсин.

Если триггером фоторецепторного процесса является фотохимическая реакция изомеризации хромофорной группы в молекуле зрительного пигмента — 11-*цис* ретиналя, то в основе фотоповреждения лежат фотосенсибилизированные реакции свободно-радикального окисления.

Благодаря особенностям 11-*цис* ретиналя как хромофора и его ближайшего белкового окружения молекула зрительного пигмента

родопсина обладает уникальной фотохимической активностью: высоким квантовым выходом изомеризации (0,65), который почти втрое превышает квантовый выход изомеризации ретиналя в растворе (0,22–0,24), и фантастически высокой скоростью фотоизомеризации, которая составляет 146 фемтосекунд, в то время как в растворе эта скорость — 1–2 пикосекунды (подробнее см. [80]). Молекулярная организация хромофорного центра родопсина и основы его высокой световой чувствительности в настоящее время подробно исследуются, в том числе методами молекулярного моделирования [81].

Ретиналь в полностью-*транс* форме, высвободившийся на последней стадии фотолиза родопсина, сам по себе и особенно продукты его превращения в фоторецепторных клетках и клетках пигментного эпителия — A2E и эпокси-формы A2E обладают фототоксичностью и представляют опасность как фотосенсибилизаторы процессов окисления. Причем, если сам A2E, будучи амфифильной молекулой, связан с мембраной, то гидрофильный эпокси-A2E выходит в результате фотоокисления A2E в цитоплазму и, будучи исключительно токсичным, представляет для клетки еще большую опасность, повреждая, например, ДНК [82].

A2E является основным, но далеко не единственным, флуорофором липофусциновых гранул. Липофусциновые же гранулы, как рассматривалось выше, при освещении эффективно генерируют активные формы кислорода, включая синглетный кислород, суперокисные радикалы и гидроперекиси. Будучи токсичными, они инициируют прямо или опосредованно окисление липидов, белков, повреждение лизосом и, в конечном счете, апоптоз.

При обсуждении механизмов фотоповреждения сетчатки и пигментного эпителия особую важность представляет знание спектра действия фотосенсибилизированных реакций, вызывающих такое повреждение. Совокупность полученных к настоящему времени данных свидетельствует о том, что максимум спектра действия этих реакций находится в синей области спектра. Особенно впечатляет почти полное совпадение спектров действия фотоповреждения пигментного эпителия глаза приматов в опытах Хэма (т.н. «blue light damage») [20] и потребление кислорода липофусциновыми гранулами при их освещении [83]. В обоих случаях речь идет о синей области спектра. Поэтому исключительно велика вероятность того, что именно фототоксичность липофусциновых гранул ответственна, в основном, за повреждение клеток пигментного эпителия. Повреждение же этих клеток, как хорошо известно, ведёт затем к дегенерации и фоторецепторных клеток сетчатки.

Липофусциновые гранулы, или «пигмент старости», неумолимо накапливаются в клетках пигментного эпителия с возрастом и никуда не исчезают из этих клеток до конца жизни. Показано, что накопление липофусциновых гранул хронологически совпадает с развитием старческой макулярной дегенерации сетчатки [84].

Накоплено достаточно много эпидемиологических данных об усугубляющем действии света в патогенезе этого заболевания [21, 86–89]. И экспериментальные — исследования спектра действия фотоповреждения (см. выше), и клинические — использование интраокулярных линз (ИОЛ) без УФ-абсорбера [90], и эпидемиологические (см. выше) данные свидетельствуют о том, что не только ультрафиолетовый, но и, в значительной мере, синий свет ответственный за усугубляющее действие света в патогенезе дегенерации сетчатки. Отсюда следует, что использование светофильтров, полностью отсекающих от сетчатки ультрафиолетовую и, частично, синюю или сине-зеленую часть спектра может оказать существенный защитный, профилактический эффект. Именно исходя из этого нами еще в середине 80-х годов были предложены желтые ИОЛ, призванные защитить сетчатку и пигментный эпителий от опасности фотоповреждения как ультрафиолетовым, так и фиолетово-синим светом. Фактически, спектры пропускания этих линз имитировали спектры пропускания естественного, некатарактального хрусталика глаза человека 45–50-летнего возраста [47–49]. Кроме того, такие ИОЛ повышали за счет уменьшения хроматической аберрации контрастную чувствительность скотопического (палочкового) и фотопического (колбочкового) зрения.

Анализ результатов 17-летнего мониторинга по отдаленным клиническим последствиям имплантации наших интраокулярных линз «Спектр», проведенный за период с 1986 по 2003 годы в ГУ Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» МЗ РФ, показал, что послеоперационные осложнения — отек сетчатки в макулярной области (синдром Ирвит-Гасса), приводящее, как правило, к потере зрения оперированного глаза, наблюдались: в раннем периоде в 0,59% случаев по сравнению с 3%, а в позднем периоде в 0,06% случаев по сравнению с 1,5% [91, 92].

Наши многолетние усилия по созданию искусственного хрусталика с наиболее благоприятным, физиологически обоснованным спектром пропускания получили международное признание. Об этом, в частности, свидетельствует активное внедрение в последнее время в мировую офтальмологическую практику фирмой Alcon новых желтых ИОЛ (AcrySof® Natural IOL), спектр пропускания которых полностью соответствует спектру пропускания наших ИОЛ «Спектр».

Поиски оптимальных спектральных характеристик ИОЛ, а также спектральных очков и контактных линз, призванных максимально уменьшить риск фотоповреждения сетчатки и при этом наилучшим образом сохранить или даже улучшить качество зрительного восприятия, продолжаются [46, 93]. Совсем недавно, практически одновременно и независимо, появилось три статьи, в которых подробнейшим образом рассматривается перспективность применения светофильтров, в первую очередь окрашенных ИОЛ, отсекающих от сетчатки синюю или сине-зеленую часть видимого спектра и, тем самым, задерживающих развитие старческой макулярной дегенерации сетчатки [94–96]. В ближайшие годы во многих офтальмологических центрах будут, по всей видимости, предприняты широкие клинические исследования эффективности применения такого рода светофильтров — ИОЛ и спектральных очков — для замедления развития различных форм дегенерации сетчатки, в первую очередь старческой макулярной дегенерации сетчатки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Островский М.А., Федорович И.Б. (1987) В кн.: «Системы органов чувств. Морфофункциональные аспекты эволюции». «Наука», ЛО, с. 4–22.
2. Овчинников Ю.А., Абдулаев Н.Г., Фейгина М.Ю. (1982) Биоорган. химия, **8**, 101–1014.
3. Hargrave et al., 1982 (см. Hargrave, 2001) Hargrave P. Rhodospin: structure, function and topography. Invest. Ophthalmol., Vis. Sci. 2001, **42**, 3–9.
4. Ovchinnikov Y.A. (1982) FEBS Lett., **148**, 179–191.
5. Boll, F. (1876) Monatsber Akad Wissensch. Berlin., **23**, 783–787.
6. Saari, J.C. (2001) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **41**, 337–348.
7. Sun, H., Molday, R.S., Nathans, J. (1999) J. Biol. Chem., **274**, 8269–8281.
8. Sun, H., Nathans, J. (2001) J. Biol. Chem., **276**, 11766–11774.
9. Allikmets, R.N., Singh, N., Sun, H., et al. (1997) Nat. Genetic, **15**, 236–245.
10. Allikmets, R.N., Shroyer, N.F., Singh, N., et al. (1997) Science, **277**, 1805–1807.
11. Suter, A., et al. (2000) J. Biol. Chem., **275**, 39625–39630.
12. Fine, S.L., Berger, J.W., Maguire, M.J., et al. (2000) The New England Journal of Medicine, **342**, 483–492.
13. Kremers, J.J., van Norren, D. (1988) Lasers Light Ophthalmol., **2**, 41–52.
14. Островский М.А., Донцов А.Е., Сакина Н.Л., Боулатон М., Джарвис-Эванс Дж. (1992) Сенсорные системы, **6**, № 3, 51–54.
15. Boulton, M., Dontsov, A., Ostrovsky, M.A., Jarvis-Evans, J., Svistunenko, D. (1992) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **33**, № 4, 919.
16. Dontsov, A.E., Glickman, R.D., Ostrovsky, M.A. (1999) Free Rad. Biol. Med., **26**, 1436–1446.
17. Boulton, M., Dontsov, A., Ostrovsky, M., Jarvis-Evans, J., Svistunenko, D.

- (1993) *J. Photochem. Photobiol.*, **19**, 201–204.
18. *Wassel, J., Davis, S., Bardesley, W., Boulton, M.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 23828–23832.
19. *Rożanowska, M., Wassel, J., Boulton, M., et al.* (1998) *Free Radicals. Biol. Med.*, **24**, 1107–1112.
20. *Ham, W.T.J., Ruffolo, J.J.J., Mueller, H.A., et al.* (1978) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **17**, 1029–1035.
21. *Sparrow, J.R., Nakanishi, K., Paris, C.A.* (2000) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, 1981–1990.
22. *Sparrow, J.R., Zhou, J., Ben-Shabat, S., et al.* (2002) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **43**, 1222–1227.
23. *Ben-Shabat, S., Itagaki, Y., Jockusch, S., et al.* (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, No 5, 814–817.
24. *Сапежинский И.И.* (1988) Биополимеры: кинетика радиационных и фотохимических превращений. М., «Наука».
25. *Погожева И.Д., Федорович И.Б., Островский М.А., Эмануэль Н.М.* (1981) *Биофизика*, **26**, 398–403.
26. *Пирузян Л.А., Островский М.А., Ландау М.А.* (1991) *Известия АН СССР*, № 1, 43–50.
27. *Федорович И.Б., Зак П.П., Островский М.А.* (1994) *Докл. РАН*, **336**, 835–837.
28. *Островский М.А., Говардовский В.И.* (1992) В кн.: «Физиология зрения», «Наука», М., глава 1, с. 5–59.
29. *Старостин А.В., Федорович И.Б., Островский М.А.* (1985) *Биофизика*, **30**, с. 995–999.
30. *Погожева И.Д., Кузнецов В.А., Лившиц В.А., Федорович И.Б., Островский М.А.* (1981) *Докл. АН СССР*, **260**, 1254–1258.
31. *Погожева И.Д., Кузнецов В.А., Федорович И.Б., Лившиц В.А., Маношкина Н.М., Островский М.А.* (1981) *Биофизика*, **26**, 692–700.
32. *Островский М.А., Федорович И.Б.* (1982) *Физиология человека*, **8**, 572–577.
33. *Островский М.А., Федорович И.Б.* (1994) *Биофизика*, **39**, 13–25.
34. *Островский М.А., Федорович И.Б.* (1996) *Химическая физика*, **15**, 73–80.
35. *Капуста Н.В., Зак П.П., Федорович И.Б., Островский М.А., Скалацкий О.Н.* (1987) *Бюлл. эксп. биол. мед.* № 7, 102–104.
36. *Fedorovich, I.B., Semenova, E.M., Grant, K., Converse, C.A., Ostrovsky, M.A.* (2000) *Current Eye Research*, **21**, 975–980.
37. *Деревянченко Т.Г., Федорович И.Б., Островский М.А.* (1985) *Цитология*, **27**, 1197–1199.
38. *Young, R.W.* (1974) *Exp. Eye Res.*, **18**, 312–223.
39. *Островский М.А., Донцов А.Е.* (1984) В кн.: «Итоги науки и техники». Серия «Физиология человека и животных». ВИНТИ, М., т. 28, 127–176.
40. *Островский М.А., Донцов А.Е., Сакина Н.Л.* (1980) *Докл. АН СССР*, **255**, № 3, 748–752.
41. *Донцов А.Е., Островский М.А., Сакина Н.Л.* (1980) *Биохимия*, **45**, 923–928.
42. *Островский М.А., Донцов А.Е.* (1985) *Физиология человека*, **11**, № 4, 670–678.
43. *Островский М.А., Федорович И.Б., Донцов А.Е.* (1987) *Биофизика*, **32**, 896–909.
44. *Ostrovsky, M.A., Sakina, N.L., Dontsov, A.E.* (1987) *Vision Res.*, **27**, № 6, 893–899.
45. *Розенблюм Ю.З., Зак П.П., Островский М.А. и др.* (1995) *Вестник офтальмологии*, № 3, 24–26.
46. *Rosenblum, Y.Z., Zak, P.P., Ostrovsky, M.A., et al.* (2000) *J. Ophthalm. Physiol. Opt.*, **20**, № 4, 335–341.
47. *Островский М.А., Линник Л.Ф.* (1987) *Журнал «Здоровье»*, № 11, 5–6.

48. *Линник Л.Ф., Островский М.А., Салиев И.М.* (1991) *Офтальмохирургия*, № 4, 3–7.
49. *Линник Л.Ф., Островский М.А., Зак П.П., Федорович И.Б., Салиев И.М., Шимилашвили Г.Д.* (1992) *Офтальмохирургия*, № 1, 40–44.
50. *Островский М.А., Федорович И.Б., Ельчанинов В.В., Кривандин А.В.* (1994) *Сенсорные системы*, **8**, № 3–4, 135–146.
51. *McCarty, C.A., Taylor, H.R.* (1996) *Ophthalm. Vis. Sci.*, **37**, 1720–1723.
52. *West, S.K., Duncan, D.D., Munoz, B., et al.* (1998) *JAMA*, **280**, 714–718.
53. *Delcourt, C., Carrier, I., Ponton-Sanchez, A., et al.* (2000) *Arch. Ophthalmol.*, **118**, 385–392.
54. *Zigman, S.* (1995) *Optomet. Vis. Sci.*, **72**, 899–901.
55. *Sliney, D.H.* (1987) *J. Cataract Refract. Surg.*, **13**, 296–301.
56. *Корхмязян М.М., Федорович И.Б., Островский М.А.* (1983) *Биофизика*, **28**, 966–971.
57. *Кривандин А.В., Львов Ю.М., Островский М.А. и др.* (1989) *Офтальмологический журнал*, № 6, 365–366.
58. *Krivandin, A.V., Lvov, Yu.M., Ostrovsky, M.A., et al.* (1989) *Exp. Eye Res.*, **49**, 853–859.
59. *Dillon, J., Roy, D., Spector, A., et al.* (1989) *Exp. Eye Res.*, **49**, 959–966.
60. *Ostrovsky, M.A., Sergeev, Y.V., Atkinson, D.B., et al.* (2002) *Molecular Vision*, **8**, <<http://www.molvis.org/molvis/v8/a10/>>.
61. *Dillon, J., Zveng, L., Merriam, J., et al.* (1999) *Exp. Eye Res.*, **68**, 785–795.
62. *van Heyningen, R.* (1971) *Nature*, **230**, 393–394.
63. *Takikawa, O., Tamantha, K., Littlejohn, T.K., Truscott, R.J.W.* (2001) *Exp. Eye Res.*, **72**, 271–277.
64. *Bova, L.M., Sweeney, M.H., Jamie, J.F., et al.* (2001) *Ophthalmol. Vis. Sci.*, **42**, 200–205.
65. *Yu, N.N., Barron, B.C., Kuck, J.F.R.* (1989) *Exp. Eye Res.*, **49**, 189–194.
66. *Gaillard, E.R., Zheng, L., Merriam, J.C., et al.* (2000) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, 1454–1459.
67. *Ortwerth, B.J., Chemoganskiy, V., Olesen, P.R.* (2002) *Exp. Eye Res.*, **74**, 217–229.
68. *Kwan, M., Niinikoski, J., Hunt, T.K.* (1972) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **11**, 108–114.
69. *Федорович И.Б., Ельчанинов В.В.* (1989) *Биофизика*, **34**, 758–762.
70. *Федорович И.Б., Ельчанинов В.В.* (1990) *Биофизика*, **35**, 200–204.
71. *Федорович И.Б., Ельчанинов В.В.* (1990) *Биохимия*, **55**, 1304–1307.
72. *Hejtmancik, J.F.* (1998) *Am. J. Hum. Genet.*, **62**, 520–525.
73. *Bloemendal, H.* (1981) In: *Molecular and cellular biology of the eye lens* /Ed. Bloemendal, H. New York: Wiley, p. 1–47.
74. *Dubin, R.A., Wawrousek, E.F., Piatigorsky, J.* (1989) *Mol Cell Biol.*, **9**, 1083–1097.
75. *Dasgupta, S., Hohman, T.C., Carper, D.* (1992) *Exp Eye Res.*, **54**, 461–470.
76. *de Jong, W.W., Hendriks, W., Mulders, J.W., Bloemendal, H.* (1989) *Trends Biochem Sci.*, **14**, 365–368.
77. *Horwitz, J.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10449–10453.
78. *Rao, P.S., Huang, Q., Horwitz, J., Zigler, J.S.* (1995) *Biochimica et Biophysica Acta*, **1245**, 439–447.
79. *Borkman, R.F., Knight, G., Obi, B.* (1996) *Exp. Eye Res.*, **62**, 141–148.
80. *Liu, R.S., Colmenares, L.U.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 14639–14644.
81. *Kholmurodov, K.T., Feldman, T.B., Ostrovsky, M.A.* (2005) *Molecular dynamics simulation and experimental studies on the visual pigment rhodopsin: multiple conformational states and structural changes*. Nova Publishers (NY) (in press).

82. Sparrow, J.R., Zhou, J., Cai, B. (2003) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **44**, 2245–2251.
83. Pawlak, A., Rozanowska, M., Zareba, M., et al. (2002) Arch. Biochem. Biophys., **403**, 59–62.
84. Holz, F.G., Bellman, C., Staudt, S., et al. (2001) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **42**, 1051–1056.
85. Taylor, H.R., Munoz, B., West, S., et al. (1992) Arch. Ophthalmol., **110**, 99–104.
86. Cruickshanks, K.J., Klein, R., Klein, B.E.K. (1993) Arch Ophthalmol., **111**, 514–518.
87. Klein, R., Klein, B.E.K., Jensen, S.C., et al. (1998) Arch. Ophthalmol., **116**, 506–513.
88. Wang, J.J., Klein, R., Smith, W., et al. (2003) Ophthalmol., **110**, 1960–1967.
89. Tomany, S.C., Cruickshanks, K.J., Klein, R., et al. (2004) Arch Ophthalmol., **122**, 750–757.
90. Kraff, M.C., Sanders, D.R., Jampol, L.M., Lieberman, H.L. (1985) Ophthalmology, **92**, 366–369.
91. Островский М.А., Линник Л.Ф., Зак П.П. (2003) В кн.: Тезисы докладов Юбилейного симпозиума «Актуальные проблемы офтальмологии». Москва, 26–27 сентября 2003 г., с. 397.
92. Линник Л.Ф., Тахчиди Х.П., Островский М.А., Зак П.П. (2004) Здравоохранение и медицинская техника, № 5 (9), 35–36.
93. Mainster, M.A., Sparrow, J.R. (2003) Br. J. Ophthalmol., **87**, 1523–1529.
94. Meyers, S.M., Ostrovsky, M.A., Bonner, R.F. (2004) Trans. Am. Ophthalmol Soc., **102**, 83–95.
95. Nilson, S.E. (2004) Acta Ophthalmologica Scandinavica, **82**, 123–125.
96. Margrain, T.H., Boulton, M., Marshall, J., Sliney, D.H. (2004) Prog. Retina Eye Res., **23**, 5, 523–531.