ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ «МЕЖДУНАРОДНЫЙ ТОМОГРАФИЧЕСКИЙ ЦЕНТР» СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Зеленцова Екатерина Анатольевна

ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И РЕАКЦИИ ХРОМОФОРОВ ХРУСТАЛИКА ЧЕЛОВЕКА

Специальность 03.01.02 – биофизика

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

Доктор химических наук, профессор

Центалович Ю.П.

Научный консультант:

Кандидат физико-математических наук

Шерин П.С.

Новосибирск – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

Около 80% информации об окружающем мире мы получаем благодаря нашему зрению. Человеческий глаз – это удивительный по своему строению орган, практически все его ткани специфичны и не похожи на другие ткани в человеческом организме. Устройство и функции человеческого глаза можно рассматривать как сложную оптическую систему: роговица является фильтром УФВ-излучения (280-315 нм); сетчатка – фотоприемник и передатчик сигнала для дальнейшего анализа; хрусталик выполняет сразу несколько оптических функций – он фокусирует изображение на сетчатке и выступает в роли фильтра для излучения УФА-диапазона (315-380 нм). Для проведения света к сетчатке хрусталик должен быть прозрачным в диапазоне видимого света, поэтому клетки хрусталика лишены всех основных органелл, которые из-за своего размера выступали бы в роли рассеивающих центров. По этой же причине в тканях хрусталика отсутствуют кровеносные сосуды. Оптическая сила линзы хрусталика обеспечивается градиентом концентрации плотно упакованных белков (кристаллинов) от центра хрусталика к периферии, что позволяет эффективно фокусировать изображение на сетчатке. Эволюция ткани хрусталика в процессе жизни человека напоминает рост луковицы – новые клетки образуются во внешнем эпителиальном слое хрусталика и оттесняют старые клетки к центру. Обновления клеток хрусталика не происходит: клетки ядра хрусталика образовались еще до рождения и останутся с человеком в течение всей жизни. Белки хрусталика также не синтезируются в клетках хрусталика, поскольку те лишены органелл. Благодаря этому факту возрастные посттрансляционные модификации хрусталика накапливаются в течение жизни и могут вести к развитию патогенных процессов.

Заболевания, приводящие к ухудшению зрения и потере человеком способности видеть, имеют крайне большое значение для общества. На первом месте в списке причин полной потери зрения стоит катаракта. Катаракта – это помутнение хрусталика, затрудняющее проникновение света к сетчатке. Несмотря на высокую распространенность данного недуга, процессы развития катаракты по-прежнему являются малоизученными, а значит и механизмы предотвращения образования и развития катаракты неизвестны. На данный момент существует только один способ лечения катаракты – хирургическая замена пораженного хрусталика на синтетический аналог. Такой способ лечения не возвращает полноценного зрения ввиду ограниченных возможностей синтетического хрусталика по аккомодации, а также может привести к заражению из-за нарушения целостности бактериального барьера глаза. Неинвазивное лечение, ранняя диагностика и профилактика данного заболевания невозможны без понимания молекулярных процессов, происходящих в тканях хрусталика в процессе жизнедеятельности и в ходе старения. Накопление информации об этих процессах позволит

построить апробированные модели развития патологий и найти пути ингибирующего воздействия на них.

Одним из основных факторов среды, вызывающих развитие катаракты, является УФ-излучение. Сетчатка крайне чувствительна к воздействию излучения солнца в данном диапазоне, поэтому хрусталик не пропускает УФ-свет, эффективно поглощая его. Основными хромофорами хрусталика являются УФ-фильтры – низкомолекулярные соединения, обладающие рядом важных свойств. В первую очередь, все УФ-фильтры имеют полосу поглощения в диапазоне 300-400 нм с высоким коэффициентом экстинкции, что позволяет хрусталику выполнять функцию фильтра в оптической системе глаза. Это позволяет защитить сетчатку, но и ткани хрусталика также нуждаются в защите. Поэтому вторым важным свойством УФ-фильтров является высокий выход внутренней конверсии из фотовозбужденного состояния в основное, что обеспечивает перевод энергии поглощенного УФ-излучения в тепло. Однако УФ-фильтры термически нестабильны, и продукты их распада могут иметь совсем иные фотохимические свойства – выступать в роли фотосенсибилизаторов. Кроме того, при более детальном исследовании фотохимических свойств УФ-фильтров было обнаружено, что при фотовозбуждении они все же могут образовывать реакционно-активные интермедиаты, такие как триплетное состояние, хоть и с низким квантовым выходом. Даже низкие концентрации реакционно-активных форм могут приводить к необратимым последствиям в тканях хрусталика, поскольку невозобновляемые белки хрусталика накапливают повреждения и теряют нативные свойства, например, растворимость. Это приводит к образованию белковых агрегатов, размер которых сравним с длиной волны света в видимом диапазоне, и, следовательно, к помутнению хрусталика. Механизм защиты белков хрусталика (кристаллинов) основан на присутствии в ткани антиоксидантов, в первую очередь аскорбиновой кислоты и глутатиона. Транспорт метаболитов вглубь хрусталика имеет диффузионный характер и с возрастом может становиться затрудненным за счет уплотнения ядерной части хрусталика. Это ведет к дефициту новых УФ-фильтров и антиоксидантов и накоплению продуктов их распада в ядре хрусталика, что может существенно ослаблять защиту хрусталика от фотоиндуцированных реакций с участием УФ-фильтров и продуктов их распада.

Для понимания процессов, происходящих в хрусталике под действием света, необходимо иметь больше информации о фотохимических свойствах его компонент: как фракций в целом (метаболомной и белковой), так и отдельных соединений, присутствующих в тканях. В литературе на данный момент недостаточно информации о фотохимии продуктов кинуренина (KN) – одного из основных УФ-фильтров человека. Корректное установление потенциальных вкладов от составляющих хрусталика в катарактогенез позволит создать модель

протекающих патогенных процессов, а также апробировать на ней возможные пути ингибирования этих процессов.

Целью диссертационной работы является исследование фотохимических свойств продуктов распада УФ-фильтров и разработка корректной модели взаимодействия белков хрусталика с фотовозбужденными хромофорами для установления механизмов образования и развития катаракты и поиска путей ингибирования патогенных процессов.

В ходе работы были поставлены и успешно решены следующие **задачи**:

Исследование оптических и флуоресцентных свойств протеомной и метаболомной составляющих хрусталика в зависимости от возраста человека и наличия катаракты;

Изучение фотохимических свойств продуктов термического разложения одного из основных УФ-фильтров хрусталика человека кинуренина – кинуреновой кислоты (KNA) и желтого кинуренина (KNY) – для установления их возможной роли в процессе старения и катарактогенеза;

Моделирование условий, близких к тканям хрусталика, для определения влияния окружающей среды на фотохимические свойства УФ-фильтров и их продуктов;

Установление детального механизма взаимодействия фотовозбужденных УФ-фильтров с белками хрусталика;

Исследование фотоиндуцированных модификаций белков хрусталика;

Ингибирование фотоиндуцированных модификаций при помощи естественных антиоксидантов хрусталика – аскорбиновой кислоты (Asc) и восстановленного глутатиона (GHS).

Научная новизна работы заключается в том, что моделирование химических реакций в тканях хрусталика под действием света с последующим анализом продуктов производится впервые. Фотохимические реакции УФ-фильтров и продуктов их разложения ранее не рассматривались в качестве источника белковых сшивок в тканях хрусталика, а информация об их фотохимических свойствах была неполной или отсутствовала полностью. При оценке возможной роли кинуренинов в хрусталике не учитывалось влияние особенностей среды хрусталика, такие как вязкость или крайне низкая концентрация кислорода. Данная работа проведена в условиях, максимально приближенных к естественным, что является неоспоримым преимуществом перед уже имеющимися работами по фотохимии хрусталика. Кроме того, связь между изменениями оптических свойств ткани хрусталика в целом и свойствами белковой и метаболомной фракций этой ткани при старении и развитии катаракты проводится также впервые.

Теоретическая ценность работы заключается в построении адекватной модели процессов, происходящих в тканях хрусталика под действием света, на основании имеющихся в

литературе и полученных в результате исследования данных о его составляющих. Хрусталик, как уже было сказано ранее, является уникальной по своему строению тканью, поэтому на него невозможно экстраполировать данные о механизмах развития патологий в других тканях и органах.

Практическая ценность диссертационной работы заключается в расширении потенциала оптических методов для ранней диагностики патологий хрусталика. Благодаря чувствительности флуоресценции белков хрусталика к конформационным перестройкам и окружению возможно применение методов исследования автофлуоресценции тканей хрусталика для обнаружения ранних патогенных изменений до проявления клинических признаков для пациента. Наличие модели, достоверно описывающей возникновение и развитие заболевания, позволит апробировать возможные механизмы контроля патогенных процессов в ткани хрусталика, что в перспективе может привести к разработке неинвазивного лечения катаракты или метода профилактики. Кроме того, информация о фотохимических свойствах УФ-фильтров и продуктов их распада может быть полезна в работах по применению естественных УФ-фильтров в косметологии и других смежных областях промышленности.

Методология и методы исследования. В работе был задействован широкий спектр оптических и биохимических методов, включая масс-спектрометрию, хроматографию, лазерный и стационарный фотолиз, электрофорез, флуориметрию и другие. Это позволило всесторонне и полно описать исследуемые явления.

Достоверность результатов подтверждена достаточным объемом данных, а также использованием при проведении научной работы современных методов исследования и статистического анализа.

Работа выполнена в институте Международный томографический центр в группе протеомики и метаболомики лаборатории магнитно-спиновых явлений. Исследования выполнены при финансовой поддержке грантов РФФИ (16-33-00669, 14-03-31189, 14-03-00453), Президента (МК-5367.2015.3, МК-1515.2017.3) и РНФ (14-14-00056).

Личный вклад автора. Все использованные в диссертационной работе результаты были получены либо автором лично, либо при его непосредственном участии. Автор участвовал во всех этапах исследования: от постановки задач и цели, до адаптации использованных методов, получения массивов данных, проведения обработки и интерпретации результатов.

Диссертация соответствует специальности **03.02.01 – биофизика**, поскольку результаты проведенного исследования полностью отвечают области исследования паспорта специальности.

Объем и структура диссертационной работы: Данная диссертационная работа состоит из введения, 6 глав, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 126 листах и включает 9 таблиц, 7 схем и 34 рисунка.

В первой главе приведен обзор имеющейся литературы по данной тематике. В представленном тексте описаны особенности строения человеческого глаза и хрусталика в частности, приведены статистические данные, подтверждающие статус исследования как социально значимого. Кроме того, в главе подробно представлены имеющиеся знания о возможных механизмах возникновения катаракты под действием УФ-излучения, а также дана информация о фотохимических свойствах УФ-фильтров хрусталика и о механизмах их термического превращения.

Во второй главе детально описана подготовка биологических образцов, химический синтез одного из исследуемых соединений, а также представлена информация об используемых для исследования биохимических и фотохимических методах и экспериментальных установках и оборудовании.

В третьей главе представлены результаты исследования оптических и флуоресцентных свойств составляющих хрусталика. Наглядно показаны вклады от белковых (водорастворимой и мочевинорастворимой) и метаболомной составляющих ткани хрусталика в общие поглощение и флуоресценцию в зависимости от возраста человека и от наличия катаракты. Кроме того, в третье главе представлены спектральные данные поглощения и флуоресценции белков и метаболитов хрусталика. Эта часть исследования позволяет ответить на вопросы об эволюции оптических и флуоресцентных свойств биологической линзы с возрастом и в процессе развития катаракты, а также понять, за счет какого типа составляющих хрусталика (белки хрусталика или низкомолекулярные соединения – метаболиты) происходят наблюдаемые изменения.

В четвертой главе представлены результаты исследования фотохимических свойств двух продуктов термического распада кинуренина (KN) –кинуреновой кислоты (kynurenic acid, KNA) и желтого кинуренина (kynurenine yellow, KNY) В главе подробно описаны механизмы гибели фотовозбужденных хромофоров и приведены полученные квантовые выходы продуктов и промежуточных интермедиатов. Данные соединения, в отличие от исходных УФ-фильтров, являются активными фотосенсибилизаторами, то есть могут приводить к фотоиндуцированным повреждениям окружающих тканей.

Пятая глава посвящена исследованию влияния вязкости среды на фотохимические свойства исследуемых ранее соединений – KNA и KNY. Результаты этой части работы позволяют более достоверно оценить возможную роль УФ-фильтров в фотоиндуцированных повреждениях тканей хрусталика.

Шестая глава разделена на две части по этапам описанных в ней исследований. Первая часть включает результаты исследования механизмов взаимодействия фотовозбужденных УФ-фильтров и белков хрусталика. Вторая часть посвящена результатам анализа продуктов описанных выше реакций. Кроме того, в шестой главе показано влияние естественных антиоксидантов хрусталика – аскорбиновой кислоты (Asc) и глутатиона (GSH) – на фотоиндуцированные модификации белков хрусталика.

По результатам диссертационной работы опубликовано 12 печатных работ: из них 1 статья в российском и 3 статьи в международных журналах из списка ВАК и 8 публикаций в сборниках тезисов докладов научных конференций.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Возрастные и катарактальные изменения в протеомном и метаболомном составах хрусталика включают в себя уменьшение концентрации УФ-фильтров, увеличение доли водонерастворимых белков, а также накопление возрастных посттрансляционных модификаций, поглощающих свет в УФА-диапазоне. В результате в хрусталиках среднего возраста поглощение УФА-света производится в основном УФ-фильтрами, а в возрастных и особенно в катарактальных хрусталиках – модифицированными кристаллинами. Эти изменения приводят также к увеличению общей флуоресценции ткани хрусталика.

2. Продукты распада одного из основных УФ-фильтров хрусталика KN, KNA и KNY, являются фотохимически гораздо более активными, чем исходный УФ-фильтр: при поглощении кванта света эти соединения переходят в реакционно-активные состояния, способные реагировать с белками хрусталика.

3. При анаэробном УФА-облучении альфа-кристаллинов в присутствии фотосенсибилизатора KNA происходит формирование радикалов на триптофановых и тирозиновых аминокислотных остатках белка. Рекомбинация этих радикалов приводит к необратимой агрегации альфа-кристаллинов. Природные антиоксиданты Asc и GSH ингибируют процесс агрегации за счет тушения триплетного состояния KNA и восстановления триптофановых и тирозиновых радикалов.

Содержание диссертации докладывалось на Международной научной студенческой конференции (МНСК, Новосибирск, Россия) в 2012, 2013 и 2014, всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Менделеев – 2012» (Санкт-Петербург, Россия), международной конференции по фотохимии ICP-2013 (Левен, Бельгия), азиатской фотохимической конференции APC-2014 (Тируванантапурам, Индия), центрально-европейской конференции по фотохимии CEPC-2016 (Бад Хофгаштайн, Австрия) и международной конференции «Химическая биология – 2016» (Новосибирск, Россия).

ГЛАВА 1 Литературный обзор

1.1 Хрусталик человеческого глаза и его строение

Человеческий глаз представляет собой сложную оптическую систему линз и фильтров, благодаря которой происходит формирование изображения на светоприемнике – сетчатке [1]. Основной объем глазного яблока (около 2/3) занимает стекловидное тело – желеобразное образование, которое состоит в основном из воды (99%) и белков (Рисунок 1). Своей гелеподобной структурой он обязан сети из калогеновых волокон (витрозинов), которая пронизывает весь его объем. Передней частью стекловидного тело упирается в хрусталик. Окружают стекловидное тело и хрусталик три типа оболочек: склера, переходящая в роговицу в передней чести глазного яблока (наружная оболочка); сосудистое тело с цилиарным телом и радужкой (средняя оболочка) и сетчатка (внутренняя оболочка). Зрительная часть сетчатки состоит из 10 слоев разных типов клеток, включающих слой фоторецепторных клеток и слой волокон зрительных нервов, благодаря которым и происходит восприятие электромагнитного излучения видимой части спектра и преобразование его в нервные импульсы.

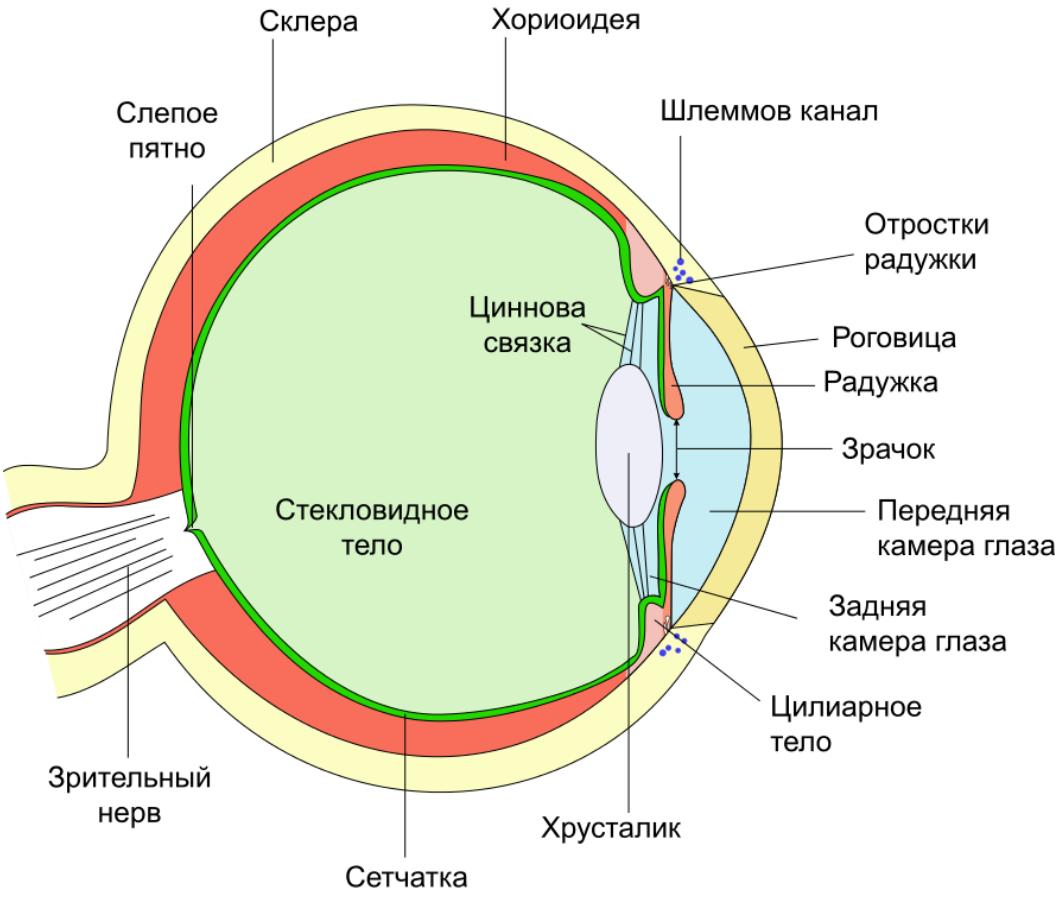

Рисунок 1. Строение человеческого глаза.

Сразу за роговицей в передней капсуле глаза находится водянистая влага. Это светопреломляющая жидкость, которая омывает радужку и хрусталик. За счет водянистой

влаги реализуется транспорт веществ к аваскулярным тканям глаза: именно эта жидкость осуществляет связь между цилиарным телом, пронизанным кровеносными сосудами, и стекловидным телом и хрусталиком. Обе эти ткани не имеют ни нервов, ни кровеносных и лимфатических сосудов, поскольку должны быть прозрачными для проведения света к сетчатке [2,3].

Хрусталик человека является уникальным органом как по своему строению, так и по комплексным функциям, которые он выполняет. Он представляет собой двояковыпуклую линзу (радиус кривизны передней поверхности хрусталика в покое составляет 10 мм, а задней – 6 мм), которая проводит и преломляет свет и фокусирует изображение на сетчатке. Оптическая сила линзы обеспечивается плотным белковым наполнением клеток хрусталика и градиентом концентрации белков от центра к периферии хрусталика. Коэффициент преломления для человеческого хрусталика близок к 1.4 [4,5]. Хрусталик покрыт тонкой капсулой, в экваториальной зоне которой происходит крепление цилиарных волокон [6]. Когда натяжение волокон увеличивается, хрусталик уплощается. Таким образом осуществляется аккомодация хрусталика [7].

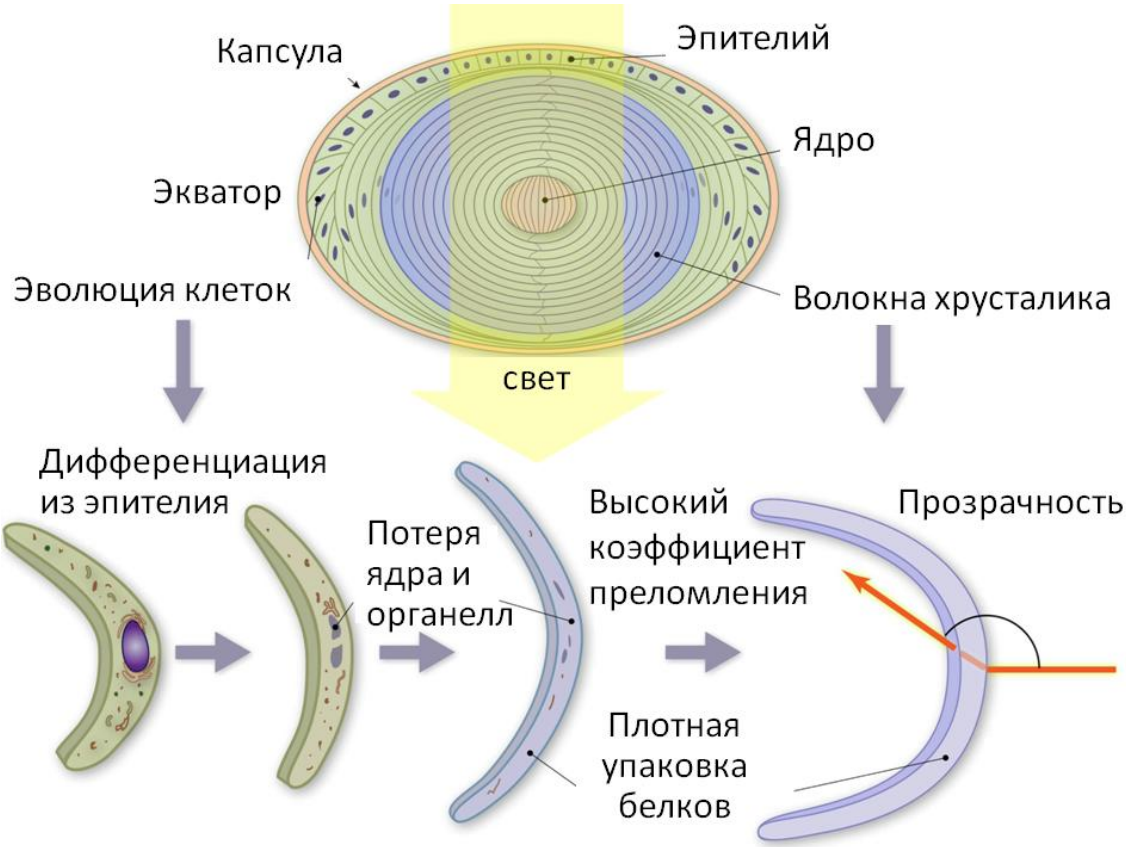

Рисунок 2. Строение хрусталика человеческого глаза. Процесс развития клеток при дифференциации из эпителиальных клеток в специфичные клетки хрусталика.

Отдельно стоит отметить процесс формирования клеток хрусталика и их эволюцию в процессе жизнедеятельности (Рисунок 2). Образуясь еще в пренатальный период, хрусталик

состоит только из эпителиальных клеток. С возрастом эпителий будет составлять только один слой передней части хрусталика, но именно в нем происходит основной метаболизм. В экваториальной зоне эпителиальные клетки дифференцируются и становятся волокнами. Процесс дифференциации сопровождается потерей клетками ядра и других органелл, так как клетки хрусталика должны быть прозрачными для проходящего через них света. Клетки вытягиваются, белки, входящие в состав внутриклеточного содержимого, активно синтезируются и формируют плотную упаковку. Новые клетки оттесняют старые волокна к центру и тем самым формируют слоистое «лукоподобное» тело хрусталика. Клетки хрусталика не обновляются, этим хрусталик существенно отличается от других органов. Процесс роста новых слоев протекает на протяжении всей жизни человека, ядро хрусталика сформировано еще в раннем детстве [8,9]. Клетки хрусталика соединены щелевыми контактами и имеют плотную упаковку, таким образом межклеточные пространства в хрусталике практически отсутствуют.

Кроме того, хрусталик является преградой для проникновения микробов из передней камеры в полость стекловидного тела, то есть выполняет функцию защитного барьера.

Обладая такой особенной по своим свойствам структурой и сложными комплексными функциями, хрусталик и происходящие в нем процессы являются перспективными объектами для изучения.

1.2 УФ-излучение и органы зрения

Как уже было сказано ранее, человеческий глаз является сложной системой для восприятия и преобразования в нервные импульсы электромагнитного излучения, однако речь идет только о достаточно узком диапазоне спектра солнечного излучения – видимого света (380-780 нм). И хотя максимум излучения солнца приходится на видимый диапазон, ткани глаза подвергаются воздействию всего спектра [10].

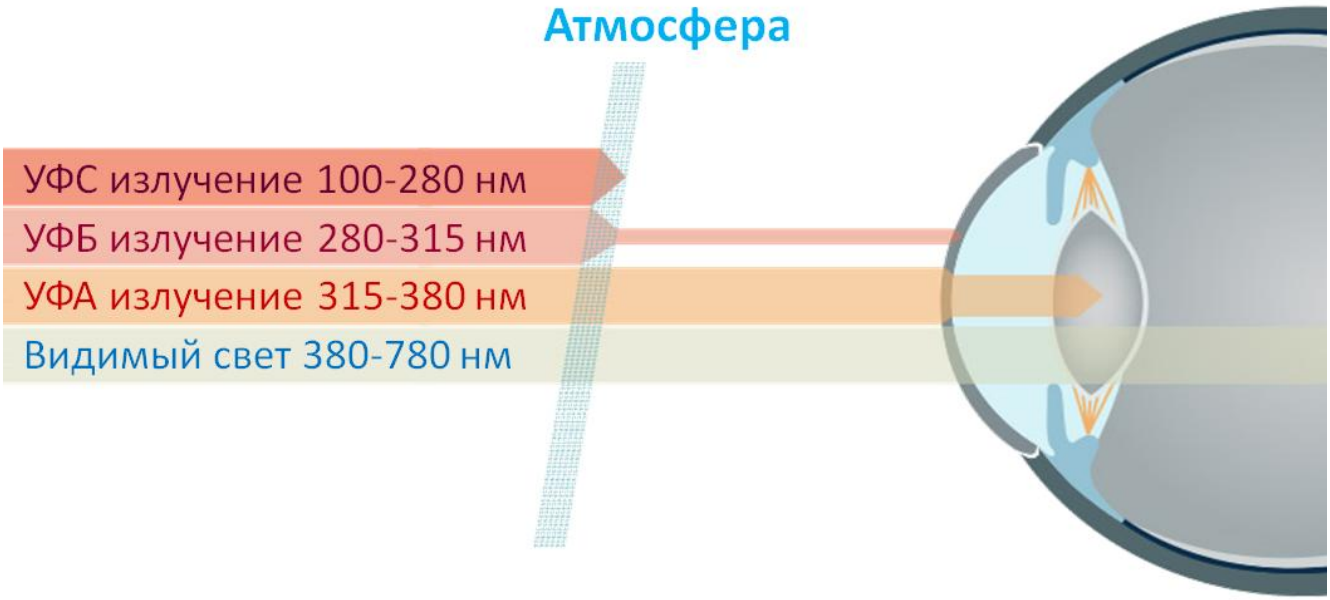

Рисунок 3. УФ-излучение и ткани человеческого глаза.

Особенно интересно с точки зрения медицины и здравоохранения влияние на ткани ультрафиолетового излучения (УФ-излучения), поскольку именно с этим диапазоном длин волн света связывают разные заболевания: от рака кожи до катаракты.

Самую коротковолновую часть УФ-излучения (100-280 нм, УФС) практически полностью поглощает и рассеивает атмосфера (озоновый слой, водяной пар, кислород и другие компоненты газовой оболочки планеты). УФВ-излучение (280-315 нм) также существенно задерживается атмосферой, однако небольшая его доля достигает поверхности Земли, оказывая воздействие на органы зрения. Этот диапазон излучения эффективно поглощается тканями роговицы – первого биологического фильтра человеческого глаза (Рисунок 3).

УФА-излучение (315-380 нм) проникает к поверхности земли, поэтому именно излучение УФА-диапазона оказывает существенно воздействие на ткани органов зрения. Излучение данного диапазона длин волн не поглощаются роговицей, свободно проходя в ткани хрусталика человека. Именно хрусталик защищает сетчатку глаза от повреждения УФА-излучением, поглощая опасное излучение. Доказательством этого служили эксперименты, проводимые для здоровых людей и людей с врожденной афакией (отсутствием хрусталика): в темной комнате с источников УФ-излучения первые не видели ничего, вторые различали объекты [11]. Поглощение УФ-излучения в тканях хрусталика осуществляется низкомолекулярными соединениями, относящимися к классу УФ-фильтров [12].

1.3 Метаболиты хрусталика

1.3.1 УФ-фильтры

1.3.1.1 УФ-фильтры: свойства

Как уже было сказано ранее, именно ткани хрусталика поглощают УФА-излучение солнца. Молекула, поглотившая квант света, переходит в неустойчивое возбужденное синглетное состояние. Гибель этого состояние может происходить по одному из следующих каналов: молекула может высветить квант света (флуоресценция, ФЛ); может перейти в триплетное состояние (интеркомбинационная конверсия, ИКК); претерпеть химическое превращение; релаксировать в основное состояние (внутренняя конверсия, ВК) (Рисунок 4, левая часть).

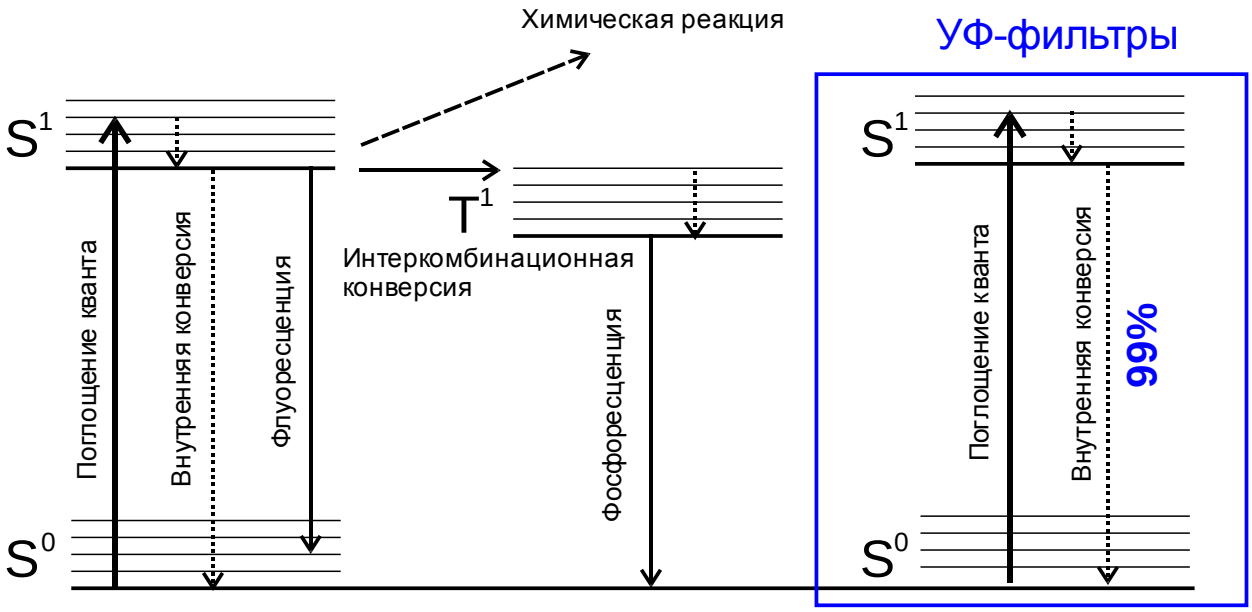

Рисунок 4. Диаграмма Яблонского (слева). Упрощенная модель для УФ-фильтров (справа).

Класс низкомолекулярных соединений, называемый УФ-фильтрами, имеет очень высокие скорости внутренней конверсии и существенно более низкие скорости других каналов гибели возбужденного синглетного состояния. Кроме того, данные соединения имеют большие коэффициенты экстинкции для УФА-диапазона. Говоря иначе, эти молекулы эффективно поглощают УФ-излучение солнца и переводят его энергию в тепло (Рисунок 4) с минимальным выходом реакционно-активных форм или продуктов. Они защищают тем самым сетчатку, для которой воздействие УФ-излучения губительно, и предохраняют ткани хрусталика от фотоповреждений.

В человеческом хрусталике основными УФ-фильтрами являются кинуренины.

Эти соединения синтезируются с эпителиальных клетках хрусталика из аминокислоты триптофана (Trp) (Схема 1). Поступает Trp в хрусталик из водянистой влаги. Синтез KN начинается за счет необратимого раскрытия индольного кольца в L-триптофане под действием двух ферментов: триптофан-пирролазы и индоламин 2,3-диоксигеназы, приводящего к образованию N-формилкинуренина. Далее N-формилкинуренин под действием фермента формамидазы трансформируется в кинуренин. Именно кинуренин и ряд его производных образуют класс УФ-фильтров: кинуренин (KN), 3-гидроксикинуренин (3OHKN), 3-гидроксикинуренин O-β-D-гликозид (3OHKG), 4-(2-амино-3-гидроксифенил)-4-оксобутановая кислота гликозид (AHBG), глутатион-3-гидроксикинуренин гликозид (GSH-3OHKG) и другие [13].

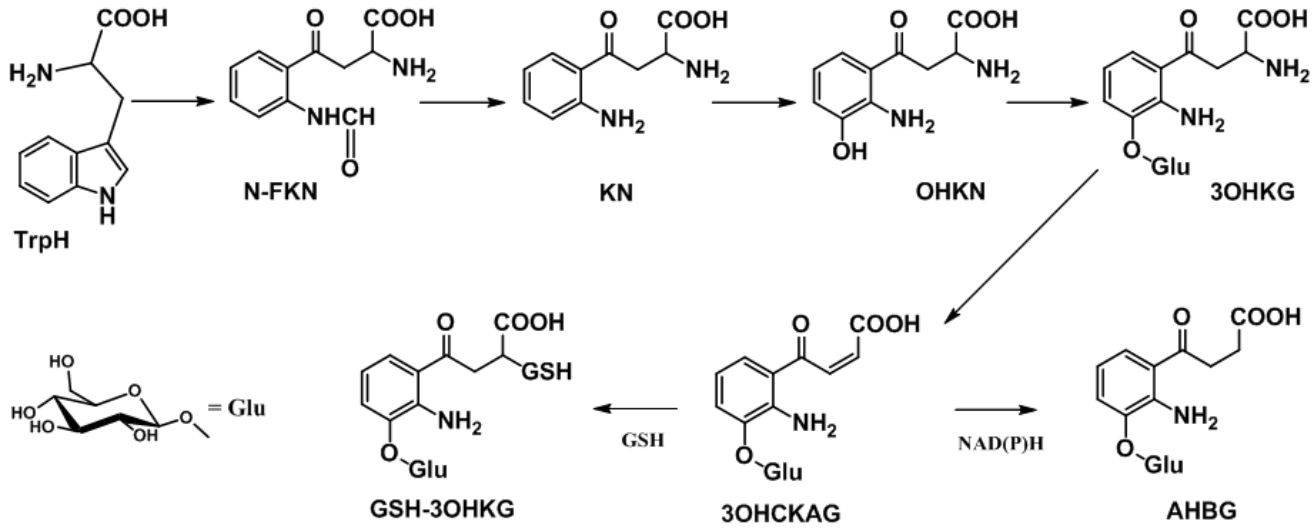

Схема 1. Образование первичных и вторичных УФ-фильтров

Первые три соединения относят к первичным УФ-фильтрам, они ферментативно синтезируются из Trp в эпителиальном слое хрусталика (Схема 1). Распространение их в толще ткани хрусталика осуществляются путем пассивной диффузии. С возрастом их концентрация в тканях хрусталика снижается, особенно ярко этот эффект проявляется для ядра хрусталика. Причиной этого может выступать формирование транспортного барьера между ядром хрусталика и периферийными тканями, который возникает в процессе постоянного роста новых клеток и уплотнения упаковки старых [14,15].

Вторичные УФ-фильтры (такие, как AHBG и GSH-3OHKG) образуются в тканях хрусталика в результате следующих реакций: первичные УФ-фильтры могут подвергаться дезаминированию, формируя ненасыщенный карбоксикетоалкен; восстановление дезаминированного 3OHKG антиоксидантом NADH приводит к формированию AHBG, а в случае восстановления антиоксидантом глутатионом – образуется аддукт антиоксиданта и УФ-фильтра GSH-3OHKG. Соотношение между содержанием первичных и вторичных УФ-

фильтров с возрастом изменяется в пользу вторичных. В молодых хрусталиках концентрация самого распространенного УФ-фильтра, 3OHKG, варьируется от 300 до 600 нмоль/г, в 80-ти летнем хрусталике уровень 3OHKG падает до 30 – 150 нмоль/г. При этом содержание GSH-3OHKG, количество которого в молодых хрусталиках минимально, в возрасте 80 лет достигает 30 – 120 нмоль/г. Уровень AHBG слабо изменяется в течение жизни: 20 – 80 нмоль/г в молодых хрусталиках и 10 – 50 нмоль/г в старых [16].

1.3.1.2 УФ-фильтры: фотохимические реакции

Долгое время кинуренины считались фотохимически инертными соединениями, за исключением N-формилкинуренина. Так как N-формилкинуренин является только промежуточным продуктом ферментативного синтеза кинуренина, то его концентрация в хрусталике очень низкая, его возможную роль в хрусталике к УФ-фильтрам не относили [17–19].

При фотолизе насыщенных кислородом растворов кинуренина и 3-гидроксикинуренина наблюдается очень слабый выход синглетного кислорода и супероксида O2•- [20]. Синглетное возбужденное состояние кинуренинов релаксирует в основное состояние в пикосекундной временной шкале [21]. На основе этих данных делались выводы о том, что в тканях хрусталика кинуренины не являются фотосенсибилизаторами: поглощаемая световая энергия расходуется в процессах, не приводящих к повреждениям тканей, и, в конечном счете, переходит в тепло.

Позднее был установлен механизм быстрой внутренней конверсии в протонных растворителях. Причина лежит во взаимодействии между молекулой ^{S1}KN и молекулами растворителя через межмолекулярные водородные связи. Фотовозбуждение KN приводит к локализации электронной плотности на атоме кислорода карбонильной группы. Благодаря этому увеличивается кислотность аминогруппы и основность карбонильной группы, что приводит к более интенсивным взаимодействиям этих функциональных групп с молекулами растворителя посредством водородных связей. В результате происходит образование комплекса из возбужденного KN и молекул растворителя, которые тесно связаны водородными связями. Сдвиг полосы флуоресценции KN в красную область спектра при переходе от апротонного к протонному растворителю указывает на участие межмолекулярных водородных связей в стабилизации S^1 состояния. В образовавшемся комплексе валентные колебания водородных связей выступают в роли акцепторных мод для безызлучательного перехода $S^1 \rightarrow S^0$, и, таким образом, энергия электронного возбуждения переходит в энергию колебательного возбуждения водородных связей [22].

В процессе изучения облученных гомогенатов хрусталика человека оптическими и ЭПР методами было обнаружено формирование радикалов. Учитывая тот факт, что основными хромофорами хрусталика в УФ-диапазоне являются УФ-фильтры, естественным предположением стало участие данных соединений в фотоиндуцированных модификациях белков хрусталика [23,24]. Эти выводы стали основанием к последующим работам по исследованию механизмов фотовозбуждения УФ-фильтров.

Позднее было обнаружено, что кинуренины могут участвовать в реакциях фотовосстановления кислорода и нитрометана, сенсибилизировать фотоокисление аминокислотных остатков триптофана, тирозина, цистеина и ряда других биологически важных молекул, включая белки хрусталика [25].

Воздействие ультрафиолетового излучения на водные растворы KN приводит к образованию короткоживущего интермедиата кинуренина – триплетного возбужденного состояния (Таблица 1). В нейтральном растворе квантовый выход этого интермедиата составляет величину $(7.0\pm1.7)\times10^{-3}$ [26], а коэффициент экстинкции в максимуме поглощения на 430 нм – 3700 $М^{-1}см^{-1}$ [27]. Триплетная форма кинуренина под воздействием второго кванта света может фотоионизоваться с образованием катион радикала и сольватированного электрона. Этот механизм справедлив и для 3OHKN [28].

Таблица 1. Фотохимические свойства основных УФ-фильтров [26].

УФ-фильтр	Время жизни флуоресценции $\tau_{фл}$, ps	Квантовый выход флуоресценции $\Phi_{фл}$	Квантовый выход триплетного состояния $\Phi_т$	Квантовый выход фоторазложения $\Phi_{фр}$
KN	26.9±0.8	9.2×10^{-4}	$(7.0\pm1.7)\times10^{-3}$	$(1.5\pm0.2)\times10^{-5}$
OHKN	10.2±1.2	1.3×10^{-4}	–	$(4.4\pm0.3)\times10^{-5}$
OHKG	29.3±0.5	6.9×10^{-4}	$(6.3\pm1.5)\times10^{-3}$	$(3.4\pm0.5)\times10^{-5}$

Кинуренин в возбужденном триплетном состоянии может вступать во взаимодействие с аминокислотами и антиоксидантами. Было показано, что среди аминокислот наиболее эффективными тушителями триплетного состояния кинуренина являются ароматические аминокислоты тирозин и триптофан. Среди антиоксидантов, присутствующих в хрусталике, только для аскорбата (Asc) наблюдается высокая константа скорости тушения ^{T}KN ($k_q = (8.5 \pm 1.2)\times10^{8}$ $л\times моль^{-1}с^{-1}$), тогда как в присутствии GSH тушения триплетного состояния кинуренина не наблюдается (константа скорости $<10^{6}$ $М^{-1}с^{-1}$). Механизм тушения заключается в переносе электрона от молекулы тушителя к молекуле кинуренина. Таким образом, тирозиновый и

триптофановый аминокислотные остатки белков хрусталика наиболее подвержены модифицированию возбужденными молекулами кинуренинов (Таблица 2) [27]. Данные выводы о возможной негативной роли УФ-фильтров в хрусталике инициировали дальнейшие исследования этого класса соединений. Для установление всех возможных механизмов реакций данных соединений в хрусталике требуется детальное изучение их фотохимических свойств и свойств их продуктов, которые также могут присутствовать в хрусталике.

Таблица 2. Константы скорости тушения триплетного состояния KN аминокислотами, антиоксидантами и кислородом.

Соединение	k_q, л×моль$^{-1}$×с$^{-1}$
L-аскорбат (AscAc)	$(8.5 \pm 1.2)\times10^8$
L-глутатион восстановленный (GSH)	$<10^6$
N-ацетил-L-триптофан (*N*-Ac-Trp)	$(3.3 \pm 0.6)\times10^8$
L-триптофан (Trp)	$(2.6 \pm 0.7)\times10^8$
N-ацетил-L-тирозин (*N*-Ac-Tyr)	$(6.7 \pm 1.5)\times10^7$
L-цистеин (Cys)	$<10^6$
N-ацетил-L-гистидин (*N*-Ac-His)	$<10^6$
N-ацетил-L-метионин (*N*-Ac-Met)	$<10^6$
Кислород (O_2)	$(2.1 \pm 0.5)\times10^9$

1.3.1.3 УФ-фильтры: термические реакции

Другой негативной для человека стороной присутствия УФ-фильтров в хрусталике может являться их термическая нестабильность. При физиологических условиях (pH=7, T=37 °C) кинуренин и другие УФ-фильтры, такие как 3OHKN и 3OHKG, нестабильны и могут претерпевать реакции термического спонтанного декарбоксилирования **[29]** и дезаминирования **[29–31]**. Таким образом, помимо УФ-фильтров, содержащихся в хрусталике с рождения, в хрусталике могут содержаться и продукты их термических реакций **[32,33]**. В результате

декарбоксилирования KN через циклизацию промежуточного соединения, аминокетоалкена, образуется 4-гидроксихинолин (4HQN).

Скорость реакции дезаминирования превышает скорость декарбоксилирования примерно в 20 раз, что играет ключевую роль в термическом разложении KN. Дезаминирование KN приводит к образованию 4-О-аминофенил-4-оксокротоновой кислоты (carboxyketoalkene, CKA), обладающей высокой реакционной способностью. Исследование температурной зависимости данной реакции позволило установить энергию активации (E_a=121±14 кДж*моль$^{-1}$) и значение константы скорости при физиологической температуре 37 °C $k_{деам}=1.5\times10^{-7}$ с$^{-1}$ **[34].** Это позволило оценить время жизни кинуренинов в хрусталике – примерно 2-3 месяца. В щелочных растворах реакция дезаминирования ускоряется. Циклизация CKA может привести к образованию 2-карбокси-8-гидрокси-4-оксо-1,4-дигидрохинолина (ксантуреновая кислота, XAN). XAN – это не связанный с белками флуорофор хрусталика, чья концентрация существенно возрастает при развитии катаракты **[35].** В отсутствие нуклеофилов основной реакцией CKA является циклизация с образованием 2-карбокси-4-оксо-1,2,3,4-тетрагидрохинолина (желтого кинуренина, KNY). Фотохимические свойства данного соединения ранее изучены не были.

В предыдущих работах нашей группы были исследованы свойства основных и фотовозбужденных состояний 4HQN и XAN. Фотохимические свойства 4HQN существенно отличаются от свойств исходного KN: УФ-облучение приводит к образование триплетного состояния 4HQN с квантовым выходом порядка 35%, что на 2 порядка выше, чем для KN. Триплетное состояние 4HQN реагирует с аминокислотными остатками триптофана и тирозина, поэтому данное соединение является эффективным фотосенсибилизатором и может участвовать в образовании и развитии катаракты **[36].**

Под воздействием УФ-излучения XAN переходит из кето-формы, в которой существует в нейтральных водных растворах, в енольную форму. Обратная таутомеризация происходит в 2 этапа: депротонирование OH-группы и протонирование атома N. В отсутствии доноров протонов происходит существенное увеличение времени жизни синглетного возбужденного состояния, что ведет к увеличению квантовых выходов флуоресценции и интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние **[37].**

Таким образом, эти исследования показали, что оба соединения являются лучшими фотосенсибилизаторами, чем кинуренины: основными короткоживущими промежуточными интермедиатами, формирующимися под действием УФ-облучения в нейтральных водных растворах, являются триплетное состояние для 4HQN и енольная форма для XAN. Присутствие данных соединений в хрусталика может давать вклад в накопление патогенных модификаций белков.

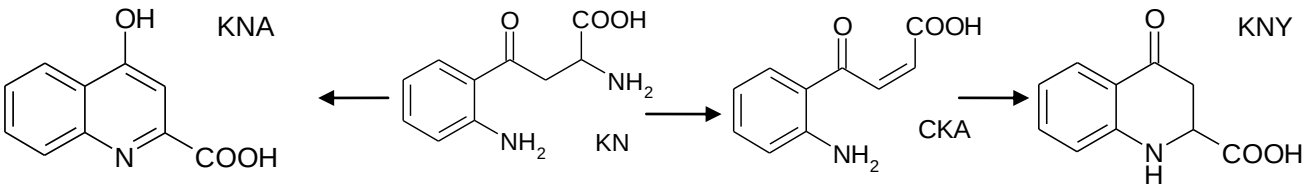

Схема 2. Схема образования желтого кинуренина (KNY) и кинуреновой кислоты (KNA).

KNY и KNA (Схема 2) впервые были обнаружены в составе пигмента крыльев бабочек. KNY легко может превращаться в KNA и γ-хинолон под воздействием солнечного света или тепла **[38]**. В работе, посвященной исследованию связывания кинуренинов с белками хрусталика, показано, что KNY образуется в результате внутримолекулярной циклизации дезаминированного кинуренина **[39]**. Позднее KNY был обнаружен при исследовании продуктов термолиза кинуренина **[29].** Однако в хрусталиках человека его обнаружить не удалось, возможно, потому, что соединение термически нестабильно.

Связь KNA с катарактогенезом впервые была установлена на модельных животных. В работе по сравнению двух линий крыс (линии контрольных и диабетных крыс с катарактой на разных стадиях развития) было выявлено, что концентрация KNA в катарактальных хрусталиках диабетных крыс выше, чем в здоровых хрусталиках контрольной линии. На основании этого были сделаны первые выводы о возможной причастности этого вещества к развитию катаракты **[40]**. В другом исследовании этой группы ученых было показано, что концентрация KNA увеличивается с развитием ядерной катарактой у человека: концентрация KNA в катарактальном хрусталике выше, чем в здоровом (примерно в 10 раз). В работе представлена линейная корреляция концентрации KNA от степени развития катаракты, в то время как в здоровом хрусталике независимо от возраста человека концентрация KNA остается постоянной и составляет порядка 1-4 пмоль / мг **[41].**

В исследовании фотохимических свойств KNA **[42,43]** было показано, что в результате фотолиза KNA образуется триплетное состояние, которое способно приводить к окислению аминокислот и других субстратов. Способность KNA выступать в роли фотосенсибилизатора была показана в работе **[20]**, где был обнаружен значительный выход синглетного кислорода в ходе ультрафиолетового облучения растворов KNA. С другой стороны, способность KNA захватывать свободные радикалы и препятствовать формированию активных форм кислорода так же была описана в статье **[44]**. Таким образом, роль KNA в тканях хрусталика неоднозначна, и механизмы фотолиза KNA требуют более детального изучения.

К настоящему времени в литературе не представлено работ по исследованию фотохимических свойств KNY, о возможной роли данного соединения в хрусталике ничего не известно.

1.3.2 Антиоксиданты

Свободные радикалы – соединения, имеющие один или несколько неспаренных электронов на внешних орбиталях. Они образуются в процессе нормального метаболизма клеток или благодаря внешним воздействиям, например, ионизирующего излучения. Наиболее часто встречаемым радикалом в организме является свободный радикал кислорода, который относятся к Активным Формам Кислорода (АФК), включающим не только свободные радикалы, но и синглетный кислород, перекиси и другие реакционно активные формы и соединения [45,46]. АФК могут взаимодействовать с различными клеточными компонентами и вызывать повреждение клеток и модификации белков.

Антиоксидантами называют класс соединений, которые ингибируют окислительные процессы в организме. Их недостаток в тканях приводит к развитию окислительного стресса – причине многих последующих заболеваний. Антиоксиданты делятся на два больших подкласса – гидрофильные и липофильные. Первые выступают ингибиторами окисления в цитоплазме и межклеточном пространстве, вторые – защищают липидный бислой мембраны. Отличаются антиоксиданты и источником их поступления: одни антиоксиданты синтезируются организмом, другие поступают только из пищи [46].

Для тканей хрусталика антиоксиданты имеют особое значение – благодаря отсутствию процесса возобновления клеток негативное воздействие окислительного стресса имеет накопительный характер, и, таким образом, дает еще больший вклад в развитие патогенных процессов и заболеваний. Помимо прочих негативных факторов среды, хрусталик подвергается воздействию УФ-излучения. Белки хрусталика – кристаллины – имеют в составе большое число ароматических аминокислотных остатков (триптофан, тирозин, фенилаланин, гистидин, метионин и цистеин), что делает их особенно уязвимыми для воздействия свободных радикалов. Ферментативная активность в тканях хрусталика крайне низкая (за исключением эпителиального слоя), поэтому в роли антиоксидантов в основном выступают низкомолекулярные вещества. Самыми распространенными антиоксидантами у животных и человека являются аскорбиновая кислота (Asc), витамин Е, витамин А и восстановленный глутатион (GSH). В хрусталика человека основными антиоксидантами являются Asc и GSH (Рисунок 5), присутствующие в ткани хрусталика в милимолярных концентрациях.

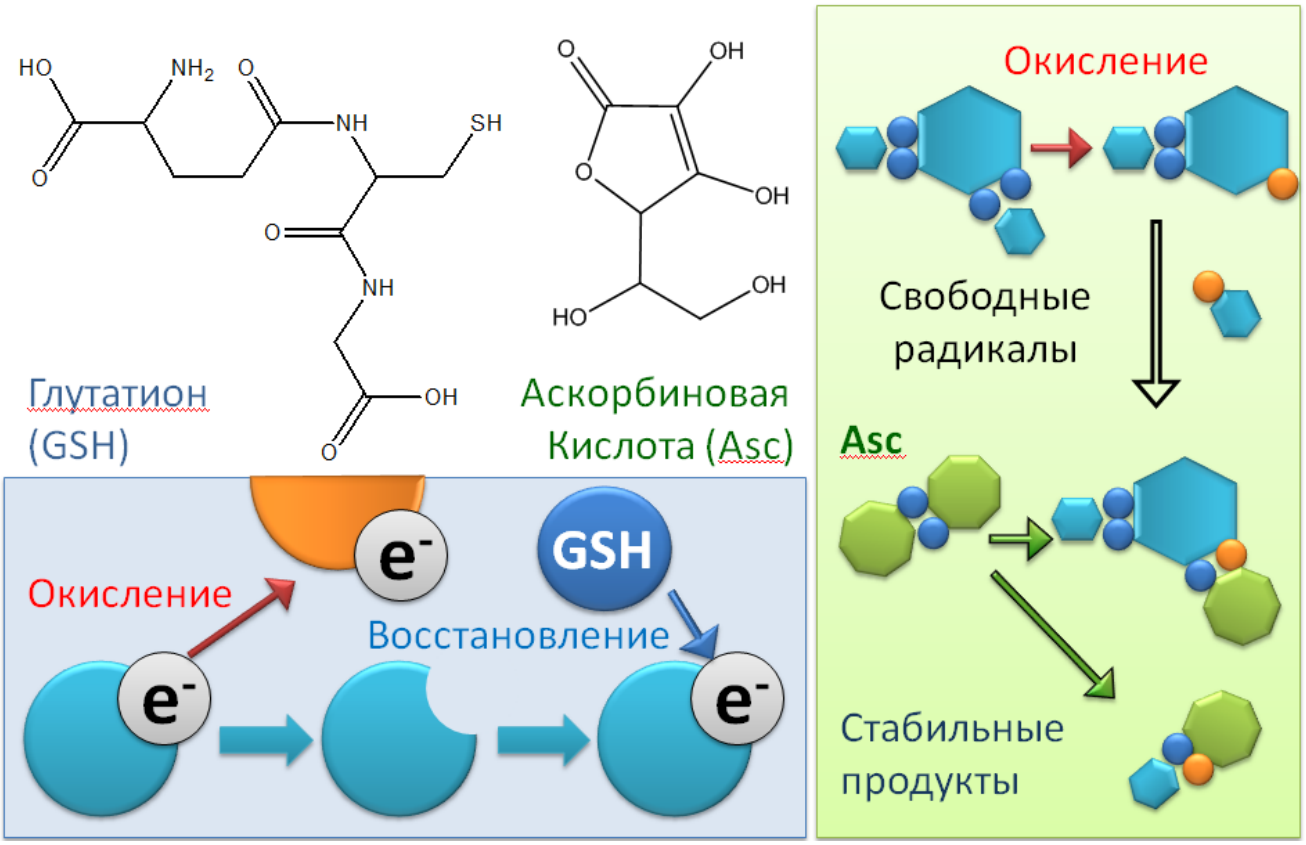

Рисунок 5. Структурные формулы основных антиоксидантов хрусталика: аскорбиновой кислоты и восстановленного глутатиона. Механизмы взаимодействия со свободными радикалами.

GSH присутствует в хрусталике в крайне высокой концентрации (порядка 5 мМ), что говорит о важной роли данного соединения в защите тканей хрусталика. GSH синтезируется в эпителиальном слое хрусталика и его распределение в ткани неравномерно (содержание в эпителии и в коре значительно выше, чем в ядре хрусталика). Это обусловлено особенностью транспорта в хрусталике: метаболиты проникают вглубь хрусталика за счет щелевых контактов между волокнами, которые при приближении в центру становятся все меньше и меньше [47]. Глутатион в восстановленном состоянии – трипептид (γ-L-глутамил-L-цистеинил-L-глицин) с группой –SH, способен легко отдавать электрон и образовывать с другим окисленным глутатионом реакционно неактивный продукт GSSG. Далее происходит регенерация исходного глутатиона из продукта GSSG при помощи фермента глутатион редуктазы [48]. Благодаря этому свойству GSH ингибирует образование S-S мостиков между молекулами кристаллинов, препятствуя образованию высокомолекулярных агрегатов. С возрастом концентрация этого соединения в хрусталике падает, и особенно существенно это изменение для ядра хрусталика [14,49]. С уменьшением концентрации GSH в хрусталике происходит и уменьшение количества немодифицированных аминокислотных остатков триптофана и тирозина в составе белков хрусталика, что также говорит о существенном вкладе данного антиоксиданта в защиту белков

хрусталика [50]. Кроме того, обнаружена отрицательная зависимость концентрации GSH в хрусталике от дозы облучения УФ-излучением и от степени развития катаракты (чем больше УФ-излучения и чем выше степень катаракты, тем меньше восстановленного глутатиона) [51]. Концентрация продукта GSSG с возрастом растет, а примерно к 40 годам выходит на постоянное значение [50].

Asc (L-аскорбат) был обнаружен в роговице в 1948 году [52], после чего метаболизм и функции Asc в тканях глаза человека широко изучались многими исследователями на протяжении нескольких десятилетий [53–60]. Для Asc характерен наиболее распространенный для низкомолекулярных антиоксидантов механизм деактивации радикалов: реагировать с активными радикалами с образованием малоактивных радикалов. В данном случае этот процесс двухстадийный с выходом конечного продукта дигидроаскорбата, который в дальнейшем может вновь восстановиться до Asc при помощи GSH-зависимых ферментов или низкомолекулярных восстановителей (таких как GSH или цистеин). При отсутствии естественных восстановителей продукты также могут повреждать белки и приводить к их агрегации [61,62]. Asc поступает в организм человека только из пищи, поскольку у приматов и некоторых других животных ген, отвечающий за синтез необходимого фермента (L-глюконолактон оксидазы), подвергся мутации. У человека уровень Asc в хрусталике и в водянистой влаге существенно выше, чем в крови. Это обеспечивается «накачкой» данного соединения в ткани глаза специфичными Na-зависимыми насосами (SVCT-насосы). Продукт деактивации свободных радикалов – дигидроаскорбат – также имеет специфичные насосы для откачки его из тканей хрусталика для ферментативного восстановления (GLUT-насосы) в эпителии. Кроме того, для человека уровень концентрации Asc в хрусталике выше, чем у многих других животных. При сравнении эпителия цилиарного тела человека (дневного животного, не способного вырабатывать Asc) и мыши (ночного животного, способного синтезировать Asc) были обнаружены существенные различия в экспрессии и распределении SCVT- и GLUT-насосов [63]. Такие различия обусловлены, по-видимому, существенным воздействием на ткани глаза УФ-излучения и продолжительностью жизни индивида, требующим активной защиты антиоксидантами. Концентрация Asc в хрусталике также имеет отрицательную зависимость от дозы УФ-излучения [64].

Другим важным свойством Asc является его способность тушить реакционно-активные триплетные состояния. Для GSH тушение триплетных состояний обнаружено не было [27]. Как было сказано выше, именно через образование триплетных состояний фотовозбужденными УФ-фильтрами может происходить значительное повреждение белков хрусталика, приводящее в конечном итоге к развитию катаракты. Механизм тушения триплетного состояния УФ-фильтра заключается в переносе электрона от молекулы антиоксиданта к молекуле УФ-

фильтра. Таким образом, комплексная защита, осуществляемая антиоксидантом Asc, имеет крайнее важное значение для здоровья тканей хрусталика.

В хрусталике присутствуют и другие антиоксиданты, такие как каротиноиды, свободный цистеин, ретиноиды и токоферолы, но их концентрация значительно ниже, чем у описанных выше Asc и GSH (микро- и наномоли) [65,66]. Кроме того, при анализе зависимости концентрации данных соединений от степени развития катаракты для этих групп антиоксидантов прямой зависимости обнаружено не было [65]. Для антиоксиданта альфа-токоферола был проведен сравнительный анализ содержания не только в тканях хрусталика больных и здоровых пациентов, но и в крови и сыворотке крови. Это исследование показало, что концентрация альфа-токоферола в хрусталике при развитии катаракты значительно увеличивается, но на уровень данного антиоксиданта в крови это не влияет. Поэтому альфа-токоферол не может выступать в роли маркера риска развития катаракты [67].

Таким образом, основными антиоксидантами хрусталика являются только GSH и Asc: при исследовании возможных моделей фотоиндуцированных повреждений хрусталика необходимо учитывать наличие этих ингибиторов окислительного стресса в ткани хрусталика.

1.4 Белки хрусталика и их модификации

1.4.1 Белки хрусталика

Хрусталик на 60-65% состоит из воды, оставшаяся массовая доля хрусталика представлена белками. 90% белков хрусталика – кристаллины. Помимо кристаллинов, в хрусталике содержатся и другие типы белков, например, мембранные белки и ферменты, с участием которых происходит метаболизм в эпителиальном слое хрусталика [68–70]. В эпителии хрусталика осуществляется и синтез кристаллинов [71]. В ядре хрусталика синтез кристаллинов не возможен – там отсутствуют органеллы и ферменты. Таким образом, белки в ядре хрусталика не обновляются в течении всей жизни. С этим связаны многие особенности и функции кристаллинов, о которых будет сказано далее.

Деление кристаллинов на три класса – альфа, бета и гамма – обусловлено их нативными четвертичными структурами в водном буферном растворе. Именно благодаря этим различиям возможно простое и эффективное разделение белков при помощи гель-хроматографии, которое и легло в основу классификации кристаллинов. Первый пик на хроматограмме дает класс гамма кристаллинов, которые присутствуют в водном буферном растворе в мономерной форме. Второй и третий пик дают бета-кристаллины, существующие в комплексах от двух до 8 молекул. И последний пик дают альфа-кристаллины, чьи комплексы насчитывают порядка 30-40 субъединиц.

Каждый тип кристаллина представлен несколькими разными белками.

Тип бета-кристаллины для человеческого хрусталика представлен следующими белками: : бетаА1, бетаА2, бетаА3, бетаА4 – кислотные; бетаВ1, бетаВ2, бетаВ3 – основные белки. Молекулярный вес одной субединицы составляет от 22 до 28 кДа. В зависимости от их способности образовывать комплексы разного размера, бета-кристаллины принято делить на два подтипа: бетаН и бетаL. Первые присутсвуют в водном буферном растворе в виде гексамеров и октамеров (комплексы по 6-8 субъединиц с молекулярной массой порядка 150-200 кДа), вторые – в виде димеров (молекудярная масса порядка 50 кДа) [72].

Второй тип - это гамма-кристаллины, молекулярная масса которых составляет около 20 кДа. Их нативное состояние в водном буферном растворе не подразумевает образования межмолекулярных комплексов [73–75]. Обнаружено семь различных гамма-кристаллинов: гаммаА-F и гаммаS, шесть из которых гаммаА-F обладают высокой гомологией [76]. Ген, кодирующий последовательность белка гаммаS, расположен на другой хромосоме, поэтому аминокислотная последовательность белка сильно отличается от остальных кристаллинов этого типа.

Класс альфа-кристаллины состоит из двух белков: альфаА и альфаБ, причем первый белок имеет кислотную природу, а второй основную. Их аминокислотные последовательности совпадают примерно на 60%. Молекулярный вес данных белков составляет порядка 20 кДа. Но, как было сказано ранее, в водном буферном растворе они формируют нековалентные связи и существуют в форме комплексов с массой порядка 800 кДа. В здоровых хрусталиках от молодых пациентов соотношение альфаА/альфаБ кристаллинов находится в пропорции 2/1, но в процессе старения это соотношение меняется примерно до 3/2. Для человеческого хрусталика альфа кристаллин является основным структурным белком, так как он составляет примерно 50% от массы всех водорастворимых белков хрусталика. Кроме того, альфа-кристаллины выполняют шаперонную функцию [77], что напрямую связано с фактом необновляемости белков в процессе жизнедеятельности. Они способны взаимодействовать с развернутыми или неправильно свернутыми белками, препятствуя выпадению этих белков в водонерастворимый осадок. Для такой специфичной ткани, как хрусталик, данный процесс несет огромный вклад в сохранение прозрачности хрусталика и препятствие развитию заболеваний [72,76,78–80]. АльфаА-кристаллин синтезируется в хрусталике, и только следовые количества этого белка были обнаружены в других тканях млекопитающих, АльфаБ-кристаллин был обнаружен в тканях мозга и мышцах [81,82].

1.4.2 Посттрансляционные модификации белков хрусталика

В процессе жизнедеятельности белки подвергаются различным негативным воздействиям: окислительному стрессу, УФ-облучению, влиянию окружающей среды и др.

Отличительной особенностью кристаллинов является их невозобновляемость в ходе этих изменений. Кристаллины подвергаются модификациям и накапливают их, меняя тем самым свои нативные свойства. В клетках хрусталика нет механизмов выведения старых белков и доставки новых. С возрастом накопление модификаций приводит к окрашиванию тканей хрусталика и агрегации белков, но механизмы этих процессов еще мало изучены.

Сравнительный анализ состава водорастворимых белков молодого и возрастного хрусталика показал, что в ходе жизнедеятельности кристаллины претерпевают множество модификаций, часть из которых существенно меняет их молекулярную массу: усечение C- и N-концов кристаллинов; фосфорелирование, гликирование, дезаминирование, окисление и многие другие [76,83–85].

Отдельно стоит рассмотреть модификации кристаллинов, связанные с развитием катаракты. Группа Харрингтона провела целый ряд исследований, направленных на сравнение посттрансляционных модификаций кристаллинов нормальных и катарактальных хрусталиков человека. В первой работе был произведен сравнительный анализ фрагментов белков (пептидов с массой до 10 кДа), присутствующих в нормальных, возрастных и катарактальных хрусталиках (водорастворимой и водонерастворимой фракции). Было обнаружено, что во всех рассмотренных группах присутствует фрагмент альфаБ-кристаллина (фрагмент 130-175), однако для катарактальных хрусталиков этот фрагмент присутствовал только в дезаминированной форме, в то время как для возрастных хрусталиков обнаружены обе формы (и нативная, и дезаминированная) [86]. Дезаминированые фрагменты альфаБ-кристаллина могут вступать в межмолекулярные взаимодействия с белками хрусталика и приводить к их выпадению в осадок, именно фрагменты альфаБ-кристаллина были обнаружены в окрашенных комплексах хрусталиков с ядерной катарактой [87].

На примере дезаминирования можно рассмотреть возможные последствия распространенный посттрансляционных модификаций:

1. Существует гипотеза об изменении стабильности дезаминированного белка в связи с увеличением заряда [88], и увеличение концентрации дезаменированных кристаллинов наблюдается как в процессе старения, так и при развитии катаракты [89–91].

2. Шаперонная активность альфа-кристаллинов зависит от межмолекулярных взаимодействий субъединиц альфаА- и альфаБ-кристаллинов в олигомере [87], а дезаминирование может повлиять на образование этих комплексов. Подобное влияние было показано на димерах бетаВ1-кристаллина, которые становились при дезаминировании менее компактными [92].

3. Дезаминирование может быть сигналом к деградации белка при регуляции его внутриклеточного уровня [93].

В следующих работах группы был проведен сравнительный анализ водорастворимых олигомеров для описанных ранее трех групп хрусталиков [94]. Для катарактальных хрусталиков в водорастворимые комплексы вошли гаммаC-, гаммаD-, и гаммаS-кристаллин и альдегид дегидрогеназа, которых не было обнаружено для нормальных и возрастных хрусталиков. Помимо этого, комплексы возрастных и катарактальных хрусталиков не имели в составе белков цитоскелета. Это наблюдение подтверждается ранними работами о деградации данного класса белков на ранних стадиях развития катаракты [95]. Исследование белковых комплексов методами электронной микроскопии показало увеличение их размеров в процессе старения и еще более существенно в процесса катарактогенезиса [94].

Водорастворимые и водонерастворимые белки возрастных и катарактальных хрусталиков отличаются и с точки зрения усечения белков: в нормальных молодых хрусталиках для альфа-кристаллинов характерно усечение только С-конца, однако с возрастом может происходить усечение и N-конца альфа-кристаллина [96]. Для катарактальных хрусталиков было обнаружено усечение сразу двух концов, такие белки более склонны к образованию агрегатов и теряют свою шаперонную активность. Кроме того, для катарактальных хрусталиков были обнаружены модификации альфаB-кристаллинов: дезаминирование (Asn78, Asn146), окисление (Trp60). Эти модификации могут быть причиной потери белками водорастворимости [85,97].

Окисление кристаллинов является также крайне значимой посттрансляционной модификацией. Основными аминокислотными остатками белка, подвергающимися окислению, являются гистидин, метионин и триптофан. Окисленные белки приобретают окраску, то есть начинают поглощать свет в видимом диапазоне. Было обнаружено, что в катарактальных хрусталиках пожилых людей (70 лет) примерно 50 % всех метиониновых остатков претерпевают окисление, в то время как в молодых хрусталиках (34 года) окислено около 40% метионинов. Количество окисленных аминокислотных остатков триптофана в составе белков катарактальных хрусталиков увеличивается вдвое по сравнению с белками молодых здоровых хрусталиков [98]. Подверженность кристаллинов окислению особенно ярко проявляется в случае ядерной катаракты, и причина может заключаться в диффузионном барьере, который препятствует проникновению антиоксидантов вглубь хрусталика [99].

Механизмы образования водонерастворимых агрегатов в тканях хрусталика также активно изучаются, но для этой задачи пока рано говорить об установлении точного механизма сшивки белков [97,100,101]. Установление возможных причин агрегации кристаллинов, а также изучение способов ингибирования этих процессов является перспективным и значимым направлением исследований.

1.5 Реакции фотовозбужденных хромофоров с белками и аминокислотами

Ранее, в нашей лаборатории было исследовано ковалентное присоединение УФ-фильтров к аминокислотам и белкам. Было установлено, что один из основных УФ-фильтров человеческого хрусталика, кинуренин, будучи связанным с белком, существенно меняет свои фотохимические свойства: квантовый выход флуоресценции увеличивается в 7 раз, выход триплетного состояния также растет [102]. Эти изменения связаны с существенным уменьшением скорости дезактивации возбужденного синглетного состояния через внутреннюю конверсию в основное состояние. Таким образом, УФ-фильтры, ковалентно связанные с белками, увеличивают свою фотоактивность и способны давать вклад в развитие патогенных процессов. Траскотом и коллегами опубликован ряд работ, в который исследовано уменьшение с возрастом исходной свободной формы УФ-фильтров и увеличение их аддуктов с белками хрусталика [103–106]. Кроме того, авторы показывают, что переход УФ-фильтров в связанное состояние возникают только с возрастом (после 50 лет) и значительно более выражен в ядре хрусталика, где затруднен транспорт и не происходит синтеза новых УФ-фильтров. В преклонном возрасте для основных УФ-фильтров содержание свободной и связанной с белками форм становятся приблизительно равными, а так как связанные УФ-фильтры дают вклад в окислительные процессы под действием света, то возрастные хрусталики более подвержены окислительному стрессу [106–108].

Третий по концентрации в хрусталике человека УФ-фильтр – 3OHKN; это соединение также может давать вклад в окислительный стресс в хрусталике. При инкубации альфа-кристаллинов с присутствием 3OHKN были обнаружены окисленные аминокислотные остатки метионина как для альфаА-, так и для альфаБ-кристаллинов. Кроме того, этот УФ-фильтр ковалентно связывается с цистеиновыми аминокислотными остатками альфаА кристаллина. Поиск данных модификаций в возрастном хрусталике не дал результатов, но в катарактальных хрусталиках были обнаружены окисленные аминокислотные остатки метионина как для альфаА-, так и для альфаБ-кристаллинов в тех же положениях, что и при модельном эксперименте по инкубации данных белков [109].

1.6 Катаракта. Перспективы. Методы диагностики и лечения

Как уже было сказано ранее, катарактой называют помутнение хрусталика, которое препятствует проникновению света к сетчатке (Рисунок 6).

Рисунок 6. Искажение восприятия изображения из-за помутнения хрусталика – катаракты.

Катаракта является наиболее распространенной причиной потери зрения в мире. И по прогнозам [110] доля людей, потерявших зрение из-за катаракты, будет только расти. Причины этого объясняются демографическими тенденциями на ближайшие десятилетия: численность населения неуклонно растет, продолжительность жизни увеличивается. Будучи в большинстве случаев возрастным недугом, катаракта станет недугом существенного процента населения планеты. Только в 2010 году из 32,4 млн слепых и 191 млн слабовидящих 10,8 млн и 35,1 млн приходились на больных катарактой (33,4% от всех случаев слепоты и 18,4% от всех слабовидящих в мире). Эти цифры еще выше для регионов Южной и Юго-Восточной Азии и Океании. [111–113]. Катаракта была и остается серьезной проблемой общественного здравоохранения во всем мире.

Причины возникновения катаракты всегда были предметом споров и дискуссий, однако влияние УФ-излучения бесспорно остается одним из основных факторов развития данного заболевания [114,115]. Наряду с демографическими изменениями в мире, вклад в ухудшение статистики катаракты вносят и климатические проблемы: истощение озонового слоя приводит к увеличению процента проходящего через атмосферу УФ-излучения. Это делает проблему влияния УФ-излучения на здоровье человечка еще более острой [116].

Единственный способ лечения – хирургическая замена катарактального хрусталика на синтетический. Это дорогостоящая операция, которая не возвращает полноценного зрения [117]. Кроме того, она часто вызывает ряд осложнений. Например, пространство между капсулой хрусталика, которую оставляют при удалении, и синтетическим хрусталиком часто

подвергается микробным инфекциям и зарастает проникшими в питательную среду микроорганизмами. Это приводит к необходимости долгосрочного лечения инфекции и операции по замене заросшего синтетического хрусталика на новый. В некоторых случаях после операции может повыситься внутриглазное давление и развиться глаукома (атрофия зрительного нерва) [118]. Другое возможное осложнение – смещение интраокулярной линзы, для лечения которого требуется повторная операция. Возникают и другие послеоперационные проблемы, например, разрыв или помутнение задней капсулы хрусталика, за счет которой удерживается на месте искусственный хрусталик. Еще одно серьезное осложнение – эндофтальмит, распространенное воспаление тканей полости глаза, которое может даже привести к необратимой потере зрения [119–121]. На данный момент это лечение совершенствуют и роботизируют производимые процедуры [122], но риски по-прежнему велики.

Другой проблемой является проблема ранней диагностики процесса катарактообразования. Диагностика катаракты зачастую происходит уже на поздних стадиях ее развития по наличию рассеивающего пятна в хрусталике. Нехирургическое лечение катаракты в такой стадии уже практически бесполезно. Образованию крупных агрегатов предшествует накопление модификаций хрусталика, которое существенно меняет его оптические свойства, включая флуоресцентные [123]. Флуоресцентные свойства хрусталика также изменяются с возрастом. Было установлено, что квантовый выход флуоресценции увеличивается с 0.002 (для хрусталиков от пациентов в возрасте 30 лет) до 0.017 (для 60 лет) и до 0.121 (для 80 лет) [124]. Основным флуорофором хрусталика является аминокислотный остаток триптофана [125], входящий в состав кристаллинов и характеризующийся максимумами поглощения и эмиссии на 280 и 340 нм соответственно. Флуоресценция триптофана чувствительна к окружению, что позволяет использовать ее для очень ранней неинвазивной диагностики патогенных изменений в структуре хрусталика [126–128]. Помимо триптофановой флуоресценции, в хрусталике наблюдается эмиссия в более длинноволновой области (400-550 нм), доля нетриптофановой флуоресценции существенно увеличивается с возрастом (возрастной порог изменений составляет 40-50 лет) [129]. Одной из причин роста нетриптофановой флуоресценции является накопление посттрансляционных модификаций кристаллинов из-за необновляемости клеток хрусталика: потеря водорастворимости белков, образование ковалентных сшивок, агрегация и другие модификации, о которых говорилось ранее.

ГЛАВА 2 Объекты и методы исследований

2.1 Материалы, реактивы и приготовление образцов

2.1.1 Материалы

Вода для всех экспериментов была дистиллирована и деионизирована (18 МОм).

Для приготовления буферных водных растворов использовались следующие соединения: мочевина и Tris приобретены у Bio-Rad Laboratories (Hercules, США), фосфатные соли, NaOH, HCl и AmC («х.ч.», ДИА-М, Россия) после разведения подвергались дополнительной чистке бумажными и стеклянными фильтрами. Все реагенты для гель-электрофореза приобретены у Bio-Rad Laboratories (Hercules, США).

В работе были использованы коммерчески доступные соединения без дополнительной очистки: D,L-KN, KNA, 4HQN, аминокислоты (триптофан, тирозин, цистеин, фенилаланин, метионин, гистидин), Asc, GSH, хинин бисульфат (Sigma/Aldrich, США), 2-аминопиридин (Acros, Франция), дейтерированная вода (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., США), растворители глицерин, ацетон и ацетонитрил («Panreac», Испания)

2.1.2 Приготовление экстрактов хрусталика человека

Все исследования проводились под контролем и сопровождением Локального этического комитета Института «Международный томографический центр» Сибирского отделения РАН и отвечали этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной Медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» [130].

В этом исследовании использовались три типа хрусталиков – здоровые хрусталики от пациентов среднего возраста, возрастные хрусталики и катарактальные хрусталики. Возрастная классификация Всемирной организации здравоохранения выделяет следующие возрастные группы: 25-44 – молодой возраст; 44-60 – средний возраст; 60-75 – пожилой возраст; 75-90 – старческий возраст; после 90 – долгожители. В данной работе, в связи со спецификой получения материала, были введены две возрастные группы: хрусталики от пациентов среднего возраста (34-40 лет, средний возраст 37 лет, всего 6 хрусталиков) и возрастные хрусталики (57-81 год, средний возраст 65 лет, всего 6 хрусталиков). Образцы были получены из Новосибирского областного клинического бюро судебно-медицинской экспертизы от посмертных доноров. Хрусталики извлекались не позднее 10-14 часов после вскрытия во избежание посмертных изменений в тканях глаза [131]. Катарактальные хрусталики человека (69-84 лет, средний возраст 78 лет, возрастная катаракта 4-5 типа, всего 6 хрусталиков) были

получены из Новосибирской областной больницы после хирургического удаления для замены на синтетические. До процедуры гомогенизации все хрусталики хранились при температуре -70 ° C.

Замороженные хрусталики человека (три хрусталика каждого типа) механически гомогенизировались в трисовом буфере (50 мМ, pH 7.4, 1.5 мл) в присутствии смеси ингибиторов протеаз (Sigma / Aldrich в соотношении 1 мл на 20 г ткани) при помощи пестиковых стеклянных гомогенизаторов. Полученный гомогенный раствор центрифугировали в течение 30 мин (13 200 g , 4 °C), водорастворимая фракция собиралась. Оставшийся осадок подвергался описанной процедуре с теми же условиями осаждения еще три раза для полноты экстракции. Отбираемые водорастворимые фракции объединялись. Оставшийся водонерастворимый осадок подвергался процедуре экстрагирования водным раствором мочевины (6 М, 5 мл) и последующего центрифугирования (13 200 g, 4 °C, 50 мин). Полученный раствор мочевинорастворимых белков (МРБ) собирался для дальнейшего анализа, а оставшийся осадок отбрасывался.

Далее водорастворимая фракция разделялась на метаболомную (МЕТ) фракцию и фракцию водорастворимых белков (ВРБ) при помощи фильтров Millipore Amicon Ultra (Tullagreen, Ireland), которые пропускают соединения с молекулярной массой ниже 3 кДа (10 000 g, 7-8 мин, 4 ° C). Концентрированная ВРБ фракция дважды промывалась буферным раствором (1.5 мл) для удаления всех малых молекул. Все полученные при этом растворы метаболитов объединялись в единую метаболомную фракцию для дальнейшего анализа.

Три хрусталика каждого типа были использованы для определения массовой доли водорастворимых и водонерастворимых белков в хрусталике. Для этого хрусталики проходили процедуру гомогенизации и разделения на водорастворимую и водонерастворимую фракции (все условия описаны выше), после чего полученные фракции подвергались вакуумной сушке и взвешиванию. Из полученных в ходе измерения масс сухих остатков растворов вычитались массы буферных солей и рассчитывался усредненный процент содержания водорастворимых и водонерастворимых белков в хрусталике для всех трех групп пациентов.

2.1.3 Синтез KNY

Для синтеза KNY был приготовлен водный раствор KN (10 мМ, 15 мл, pH доведен до 8.5 добавлением NaOH). Образец был помещен в стеклянную колбу, насыщен аргоном, запечатан парафилмом и инкубирован при температуре 70°C в течение 40 часов. Полученный раствор грязно-желтого цвета был профильтрован через бумажный и стеклянный фильтры для удаления водонерастворимого осадка. После фильтрации производилось ВЭЖХ разделение продуктов термолиза KN на полупрепаративной колонке Диасорб-130-С16-Т (7 мкм, 16×250 мм, ЗАО

«БиоХимМак СТ») с градиентом ацетонитрил / H_2O с 0.05 % TFA: (0 % (0-3 мин); 0-30 % (3-5 мин); 30-45 % (5-35 мин); 45-100 % (35-37 мин); 100 % (37-38 мин); 100-0 % (38-40 мин) с оптическим детектированием на длинах волн 300, 320, 360 и 380 нм. Поток составлял 4 мл/мин. Ввод разделяемого образца объемом 1 мл производили вручную.

Структура синтезированного соединения KNY подтверждена двумя методами: ЯМР-спектроскопией и масс-спектрометрией. Спектр H^1 ЯМР исследуемого образца был записан с использованием ЯМР-спектрометра Avance 300 (Bruker, Германия). H^1 ЯМР данные (300 МГц, D_2O): алифатические: δ = 3.07 (m, 2 H, CH2), δ = 4.46 (dd, J = 7.3 Hz, J = 6.0 Hz, 1 H, CH); ароматические: δ = 6.88 (t, J = 8.0 Hz, 1 H), δ = 6.99 (d, J = 8.1 Hz, 1 H), δ = 7.52 (td, J = 7.8 Hz, J = 1.6 Hz, 1 H), δ = 7.76 (dd, J = 8.0 Hz, J = 1.6 Hz, 1 H).

Масс-спектрометрическое подтверждение синтезированного KNY и основных продуктов его фоторазложения производилось с использованием системы, стоящей из хроматографа Agilent 1100 Series с фотодиодной матрицей и масс-детектором (модель G1946). Система оснащена блоком для мягкой электроспрейной ионизации, сканирование производилось в области положительных ионов с соотношением массы к заряду в диапазоне от 50 до 1000. Хроматографическое разделение проводили на колонке ZORBAX Rx-C18 (4.6×150 мм) в системе ацетонитрил/вода с 0.1 % TFA, градиент ацетонитрила: (0-5 мин) 2 %, (5-33 мин) 2-60 %, (33-37 мин) 60-95 %, (37-42 мин) 95 %, (42-43 мин) 95-2 %, (43-55 мин) 2 %. Поток составлял 50 мкл/мин, скорость осушающего газа (T=250 °C) – 6 л/мин. Напряжение на капилляре – 4000 В. Анализ полученных данных, регистрация и обработка хроматограмм выполнены с помощью программы Agilent ChemStation для Windows. В процессе MS измерений (положительная мода) были обнаружены следующие ионы: молекулярный ион m/z = 192, фрагменты m/z = 174 (потеря H_2O), m/z = 164 (потеря CO-группы), m/z = 146 (потеря $CO+H_2O$).

2.1.4 Экстракция кристаллинов бычьего хрусталика

Используемые в экспериментах по фотолизу кристаллины были получены из свежих тканей бычьего хрусталика. Бычьи глаза были получены на фермерских хозяйствах Новосибирской области. Отказ от использования промышленных белков обоснован фактом накопления белками хрусталика в ходе жизнедеятельности естественных пост-трансляционных модификаций, поэтому применение химически чистых препаратов является плохой моделью для описания процессов в тканях хрусталика. Хрусталик извлекался из свежего бычьего глаза и гомогенизировался при помощи стеклянного механического гомогенизатора с растворением в натрий-фосфатном буферном растворе (150 мМ), из расчета 450 мкл/50 мкг ткани с добавлением смеси ингибиторов протеаз (Sigma / Aldrich в соотношении 1 мл на 20 г ткани). Полученный гомогенный раствор центрифугировался (30 мин, 4°C, 13 000 g), водорастворимая

часть сохранялась. Дальнейшее разделение производилось с помощью хроматографической системы ÄKTA purifier 100 (колонка Superdex 200 10/300 GL) с использованием натрий-фосфатного буфера в качестве растворителя (150 мМ) на потоке 0.5 мл/мин; время разделения 48 мин. Образец (объемом 200 мкл) вводился через петлю вручную, детектирование оптического поглощения производилось на длине волны 280 нм. Сбор осуществлялся при помощи автоматического коллектора фракций. Данный метод позволял получать 3 фракции нативных кристаллинов: альфа-кристаллины, бета-кристаллины и гамма-кристаллины – каждая из которых собиралась отдельно. Чистота получаемых белков проверялась при помощи масс-спектрометрических измерений целых белков и наборов пептидов, полученных при помощи ферментативного гидролиза трипсином, на масс-спектрометре MALDI-TOF/TOF.

2.2 Стационарные методы

2.2.1 Оптическая спектроскопия

Стационарные спектры поглощения и эмиссии были зарегистрированы на спектрофотометре Agilent 8453 («Hewlett-Packard», США) и спектрофлуориметре FLSP920 («Edinburgh Instruments», Великобритания), соответственно. Квантовые выходы флуоресценции KNA и KNY были определены относительно стандартов: водных растворов 2-аминоперидина (0.1 N H_2SO_4, Φ_F = 0.60) [132] и хинина бисульфата (1 N H_2SO_4, Φ_F=0.56) [133], соответственно. Все спектры флуоресценции были скорректированы в соответствии с чувствительностью детектора. Для измерения pH раствора использовали pH-метр Sartorius PP-15. Измерения поглощения и флуоресценции производили в прямоугольной оптической кювете с сечением 10 мм × 10 мм. Для флуоресцентных измерений оптическая плотность приготовленных образцов в максимуме полосы поглощения составляла около 0,15 (при расчете квантового выхода производилась нормировка на оптическую плотность каждого образца).

2.2.2 Стационарный фотолиз

Растворы для стационарного фотолиза были приготовлены в фосфатном буфере (pH 6.8), концентрации облучаемых соединений (около 1 мМ) были выбраны из расчета, что поглощение образцов в максимуме будет одинаковое (A = 3 для оптического пути в 1 см). Растворы помещали в кварцевые ЯМР-ампулы (с наружным диаметром 5 мм) и облучали ртутной лампой ДРШ-1000 (Схема 3). Объем образца составлял 1 мл. В процессе засветки был использован водный фильтр для отсечения инфракрасной области излучения. Диапазон 300-400 нм был выбран при помощи набора цветных стекол. Растворы барботировали аргоном или кислородом в течение 15 мин до и во время облучения. В процессе фотолиза с помощью шприца

периодически отбирались пробы в объеме 15 мкл и хранились при температуре 4° С до дальнейшего анализа. Далее эти пробы были разбавлены водой до 200 мкл и проанализированы с помощью ВЭЖХ с оптическим детектированием.

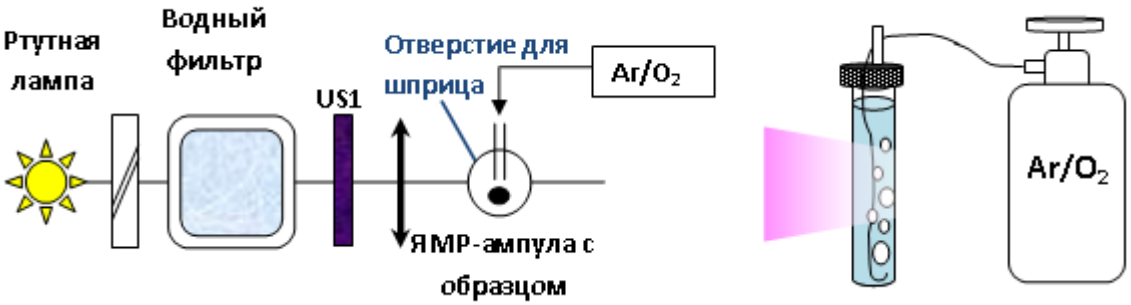

Схема 3. Схема экспериментальной установки для стационарного фотолиза.

Актинометрия была произведена с использованием водного раствора ферриоксилата калия в соответствии со стандартным методом [134]. В результате была определена интенсивность излучения в области 300-400 нм; она составляла $(1{,}1 \pm 0{,}1)\times10^{18}$ квантов в секунду.

ВЭЖХ-анализ облученных образцов проводился на аналитической колонке 4.6×150 мм, 5 мкм, ZORBAX Eclipse XBD-C18 с использованием градиента ацетонитрил / H_2O с 0.05 % TFA. Процент ацетонитрила в используемом градиенте имел следующую динамику: 0 % (0-5 мин) , 0-20 % (5-5.1 мин) , 20-80% (5.1-25 мин) , 80-100% (25-26 мин), 100 % (26-30 мин) , 100-0 % (30-31 мин) , 0% (31-45 мин). Скорость потока составляла 1 мл/мин, образцы (объем 50 мкл) вводили с использованием термостатированного автосэмплера при 4 °С, детектирование оптического поглощения производилось одновременно на четырех длинах волн - 320, 332, 360 и 380 нм. Обработка полученных данных проводилась с использованием программного обеспечения Agilent ChemStation.

2.3 Кинетические измерения

2.3.1 Флуоресцентные измерения

Динамика гибели флуоресценции была зарегистрирована методом единичного счета фотонов на установке FLSP920 (Edinburgh Instruments). Для возбуждения образцов KNA был использован импульсный источник света на основе лазерного диода (EPLED-330, длина волны 330 нм, длительность импульса ≈ 800 пс), для образцов KNY – импульсный источник на основе лазерного диода (EPL-375, длина волны 375 нм, длительность импульса ≈ 80 пс). Все измерения производились в кварцевой кювете размерами 10 мм ×10 мм, оптическое поглощение растворов

на длине волны облучения не превышало 0.1. Время-разрешенная эволюция гибели сигнала была записана в максимуме полосы эмиссии. Полученные кривые аппроксимировались при помощи свертки функции отклика прибора и экспоненциальных функций.

2.3.2 Лазерный импульсный фотолиз

Схема 4 иллюстрирует установку лазерного импульсного фотолиза, используемую в данных экспериментах. В зависимости от необходимой длины волны, источником возбуждения может быть эксимерный XeCl лазер (Lambda Physik EMG 101, длина волны 308 нм, энергия импульса до 120 мДж; длительность импульса 15 нс), либо твердотельный Nd3+:YAG лазер (Quanta-Ray LAB-130-10, длины волн 266, 355 и 532 нм; энергия импульса до 70, 150 и 300 мДж для каждой длины волны, соответственно, длительность импульса 8 нс). На пути лазерного луча располагается кварцевая пластинка, которая отражает часть возбуждающего импульса на фотодиод, запускающий осциллограф, и на измеритель мощности (Newport Power Meter, Model 1918-C). Сигнал с измерителя мощности, поступающий в компьютер, позволяет отслеживать реальную энергию лазера во время проведения эксперимента. Источником зондирующего излучения является ксеноновая лампа ДКсШ-150 (длительность импульса 2 мс). Возбуждающее и зондирующее излучения пересекаются под прямым углом. Система из сферических линз позволяет сконцентрировать луч лазера (поперечный размер 3×8 мм^2) и лампы (поперечный размер 1×3 мм^2) на поверхность кварцевой кюветы. Таким образом, во всех экспериментах длина пути оптического возбуждения составляла 1 мм, а регистрирующего излучения – 8 мм. После прохождения через образец, зондирующее излучение попадает на монохроматор (Newport, Model 78025, 200-1000 нм, 1нм/дел) и его интенсивность измеряется с помощью ФЭУ (Electron Tubes Ltd. 9794B), сигнал от которого оцифровывается 11-битным АЦП двухканального цифрового осциллографа LeCroy 104MXi (1 ГГц). Установка полностью управляется персональным компьютером. Все растворы барботировались аргоном или кислородом в течение 10 минут до и в процессе облучения.

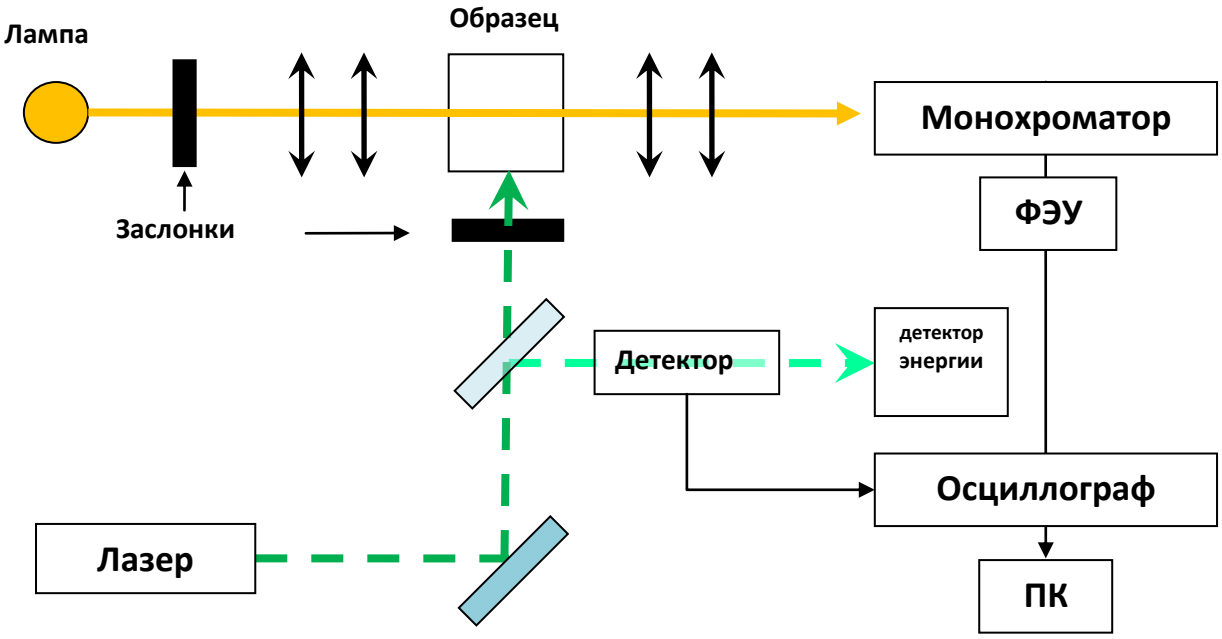

Схема 4. Установка лазерного импульсного фотолиза.

2.4 Фотолиз α-кристаллинов в присутствии KNA и антиоксидантов

Для фотолиза кристаллинов был приготовлен водный раствор объемом 2.5 мл (150 мМ PBS, 6 М мочевины, 2.1×10^{-4} М бычьего кристаллина, 3.1×10^{-4} М KNA), который облучался лазером на длине волны 355 нм (Quanta-Ray LAB-130-10, 1 мДж/импульс, 10 Гц) в течение 20 минут. Влияние антиоксидантов исследовалось в тех же условиях в присутствии 2×10^{-3} М Asc или GSH. Образцы барбатировались аргоном 15 минут до и в процессе облучения. В ходе эксперимента отбирались пробы (50 мкл), которые в дальнейшем подвергались диализу на мембранных фильтрах (размер задерживаемых частиц выше 3 кДа) с переводом в аммоний-бикарбонатный буфер (15 мМ, AmB). Полученные образцы анализировались следующими методами: оптические измерения, масс-спектрометрические измерения целых белков, гель-электрофорез с последующей идентификацией пятен, гидролиз ферментом трипсин и масс-спектрометрический анализ полученных пептидов.

2.5 Электрофорез

Для определения размера исследуемых белков был проведен одномерный электрофорез в полиакриламидном геле (15%-ПААГ и 10%-ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) по методу Лэммли. Перед электрофорезом ко всем образцам добавлялся раствор 31 мМ Трис-HCl, содержащего 1% SDS, 2,5% β-меркаптоэтанола, и затем образцы находились в течение 5 минут при 95 °C. После электрофореза гели окрашивали красителем Coomassie Blue

R-250 в 10% уксусной кислоте. Изображения гелей были получены с использованием VersaDoc 4000 MP Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA). Приблизительные молекулярные массы изучаемых белков были определены с использованием белковых маркеров (Fermentas, Литва) [135].

2.6 Очистка и ферментативный гидролиз модифицированных белков хрусталика

Пробы смеси белка и KNA (и антиоксидантов для ряда экспериментов), отбираемые в процессе фотолиза, подвергались очищению от мочевины и малых молекул при помощи фильтров Millipore Amicon Ultra (Tullagreen, Ireland) с отсечением молекул массой до 3 кДа. Процедура очистки несущественно отличалась от процедуры разделения гомогенного раствора хрусталика на фракции, описанной ранее.

Ферметативный гидролиз модифицированных и очищенных от малых молекул белков проводился с использованием фермента трипсина по стандартной схеме [136].

2.7 Масс-спектроскопические измерения

2.7.1 Масс-спектрометрический анализ с использованием электроспрейной ионизации в сопряжении с ВЭЖХ

Анализ белков и пептидов производился методом масс-спектрометрии с электроспрейной ионизацией и квадрупольным время-пролетным детектором (UHPLC-ESI-q-TOF, Ultra High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization quadrupole Time-Of-Flight). Для этого был использован масс-спектрометр Maxis 4G (Bruker Daltonics, Германия) в сочетании с системой ВЭЖХ UltiMate 3000RS (Dionex, Германия) с оптическим детектированием.

Система UltiMate 3000RS оснащена тройным насосом, термостатированными автосемплером и отделением для колонки и проточной ячейкой для оптических измерений в диапазоне 190-800 нм. Разделение проводили на аналитической колонке Agilent Zorbax XDB-C18 (4.6 × 150 мм, 80 Å, 5 мкм) в градиенте ацетонитрил с 0,1% TFA /H2O с 0,1% TFA: 5% (0-10 мин), 5-60% (10-35 мин), 60-95% (35-36 мин), 95% (36-40 мин), 95-5% (40-41 мин), 5% (41-55 мин); скорость потока составляла 200 мкл/мин. Температура в автосемплере поддерживалась на уровне 4°C.

Разделенные образцы поступали на вход гибридного масс-спектрометра Maxis 4G ESI-q-TOF высокого разрешения. Для работы использовались следующие параметры прибора: напряжение на капилляре -4200 В; давление 1 бар; поток осушающего газа 8 л/мин; температура осушающего газа 200 °C. В каждом спектре производилась MS-калибровка, для этого в начале каждого эксперимента на вход спектрометра в автоматическом режиме из

шприца поступал раствор калибранта (формиат натрия, поток 0.2 мл/мин), который после ионизации детектировался в виде кластеров Na(NaCOOH)n, где n=1, 2, …, создавая тем самым шкалу для калибровки.

2.7.2 Масс-спектрометрический анализ с использованием матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией

Белки из гелей идентифицировали двумя методами: описанным выше UHPLC-ESI-q-TOF-MS и масс-спектрометрией с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF/TOF, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight). Для этого окрашенные белковые пятна вырезались из геля и отмывались от красителя (Coomassie Brilliant Blue G-250) двукратной промывкой кусочков геля при 37°C в 0,2 М AmC буфере, содержащем 50% ацетонитрила. Кусочки геля после отмывки обезвоживали в 100% ацетонитриле и подвергали протеолизу согласно методу Сиерла [137]. Анализ белковых протеолизов проводили на масс-спектрометре Ultraflex III TOF/TOF (Bruker Daltonics, Germany). Масс-спектры пептидных фрагментов получали в отражательном режиме положительных ионов прибора и в диапазоне m/z от 500 до 5000 Да. Параметры измерения включали также частоту импульсов - 25 Гц, ускоряющее напряжение – 25.0 кВ и время задержки экстракции ионов – 120 нс. Образцы наносили на мишень приборной пластины с дезоксибензойной кислотой (DHB) или синапиновой кислотой (SA), используемых в качестве фотоионизирующих матриц. Итоговый масс-спектр получался суммированием 8 одиночных спектров по 100 импульсов лазера на точку. Калибровку прибора проводили с использованием калибровочных стандартов смеси пептидов фирмы Bruker. Полученные спектры анализировали в программе FlexAnalysis 3.0 с формированием масс-листа в автоматическом режиме, используя единые стандартные условия отбора пиков: 1) центроидный алгоритм поиска (80% высоты пика); 2) отношение сигнал/шум – 6,0; 3) пороговое значение относительной интенсивности – 10%; 4) максимальное число пиков – 300. Идентификацию белков проводили путем поиска соответствующих кандидатов в базах данных поисковой системы Mascot. При идентификации белков по пептидным картам в программе использовали общедоступную базу данных SwissProt (июнь 2013, 539 616 АА-последовательностей, 191 569 450 АА-остатков).

Для идентификации белков в программе Mascot задавали следующие параметры поиска: таксономическая единица – “млекопитающие”; фермент – трипсин; количество пропущенных сайтов рестрикции – 2; допустимое отклонение массы заряженного пептида допускалось не более 50 м.д. (миллионных долей); положительный заряд пептидов; моноизотопное распределение пиков. Тандемные масс-спектры пептидов анализировали в программе Biotools 3.2 (BrukerDaltonics, Германия, http://www.bdal.de), кооперированной с поисковой программой

Mascot. Достоверность предполагаемых программой последовательностей проверяли путем сравнения экспериментально полученных молекулярных масс фрагментов с теоретически рассчитанными (расчета масс фрагментов последовательностей и сравнения их с масс-листом спектра) при помощи функции Sequence Editor.

ГЛАВА 3 Оптические и флуоресцентные свойства составляющих хрусталика человека

Как уже было сказано выше, основными хромофорами хрусталика в УФА-диапазоне являются молекулярные УФ-фильтры и продукты их термического разложения. Исходные УФ-фильтры, имея полосу поглощения в диапазоне 320-400 нм и низкие квантовые выходы фоторазложения и образования реакционно активных форм, обеспечивают защиту хрусталика от негативного воздействия на ткани УФ-излучения [22]. Однако с возрастом или при развитии патогенных процессов содержание УФ-фильтров и их продуктов в тканях хрусталика существенно изменяется: концентрация «первичных» УФ-фильтров в хрусталике с возрастом падает, в то время как для «вторичных» УФ-фильтров, напротив, наблюдается рост [16]. Стоит отметить, что «вторичные» УФ-фильтры проявляют более слабые защитные свойства, чем «первичные» [138].

Существенные изменения происходят и с белками хрусталика: исходные кристаллины не поглощают в УФА-диапазоне; однако кристаллины, выделенные из возрастных хрусталиков, имеют желтую окраску и поглощают в области 320-400 нм из-за возрастных посттрансляционных модификаций, накопленных в процессе жизнедеятельности [139,140]. Модификации, приводящие к окрашиванию белков, включают ковалентное присоединение УФ-фильтров к белковым цепочкам, окисление ароматических аминокислотных остатков и другие. Важно отметить, что при включении в белковую цепь, УФ-фильтры могут значительно усиливать свои фотосенсибилизирующие свойства по сравнению со свободной формой [102]. Например, квантовый выход триплетного состояния для связанного с белком кинуренина значительно выше, чем для свободного, а окисленные аминокислотные остатки могут эффективно формировать активные формы [141]. Таким образом, можно предполагать, что с возрастом увеличение доли поглощения УФ-излучения белками может существенно ослаблять защиту хрусталика.

Флуоресцентные свойства хрусталика также изменяются с возрастом. Было установлено, что квантовый выход флуоресценции увеличивается с 0.002 (для хрусталиков от пациентов в возрасте 30 лет) до 0.017 (для 60 лет) и до 0.121 (для 80 лет) [124]. Основным флуорофором хрусталика является аминокислотный остаток триптофана [125], входящий в состав кристаллинов и характеризующийся максимумами поглощения и эмиссии на 280 и 340 нм, соответственно. Флуоресценция триптофана чувствительна к окружению, что позволяет использовать ее для ранней неинвазивной диагностики патогенных изменений в структуре хрусталика [126–128]. Помимо триптофановой флуоресценции, в хрусталике наблюдается эмиссия в более длинноволновой области (400-550 нм), доля нетриптофановой флуоресценции

существенно увеличивается с возрастом (возрастной порог изменений составляет 40-50 лет) [129]. Одной из причин роста нетриптофановой флуоресценции хрусталика является накопление модификаций кристаллинов из-за необновляемости клеток: потеря белками водорастворимости, образование ковалентных сшивок между белками, агрегация и др. Исследование флуоресценции как целого хрусталика, так и отдельных фракций позволяют получать огромное количество информации о возрастных и патогенных процессах в хрусталике.

Диагностика катаракты, как правило, происходит уже на поздних стадиях ее развития по наличию рассеивающего пятна в хрусталике. Нехирургическое лечение катаракты на такой стадии уже практически бесполезно. Исследование изменений оптических и флуоресцентных свойств тканей хрусталика в процессе развития катаракты позволит выявить те параметры, изменение которых станет маркером зарождающейся катаракты до образования значительных рассеивающих центров. Таким образом, оптические и флуоресцентные методы исследования хрусталика могут служить для ранней диагностики развития катаракты. Катаракта является заболеванием возрастного характера, поэтому наблюдаемые изменения необходимо сравнивать с возрастными изменениями (использование в качестве нормы здорового молодого хрусталика неправомерно).

Данная работа направлена на определение вклада малых молекул (метаболитов, МЕТ), водорастворимых (ВР) и мочевинорастворимых (МР) белков в общее поглощение и флуоресценцию хрусталика. Все измерения производились для трех типов хрусталиков: здоровых хрусталиков от пациентов среднего возраста, здоровых возрастных хрусталиков и катарактальных. Целью данной работы является определение изменений в оптических и флуоресцентных свойствах отдельных фракций хрусталика, которые связанны с возрастными процессами и развитием катаракты и могут существенно ослабить защиту хрусталика от УФ-излучения.

3.1. Оптические свойства белковых и метаболомной фракций хрусталика

Все измерения, производимые для водорастворимых и мочевинорастворимых белков и метаболитов хрусталика, осуществлялись для трех хрусталиков из каждой категории: хрусталики от пациентов среднего возраста, возрастные и катарактальные хрусталики (Рисунок 7).

Рисунок 7. Три типа хрусталиков человека: здоровые от пациентов среднего возраста (1 фото), здоровые возрастные (2 фото), возрастные хрусталики с катарактой (3 фото).

Для всех трех типов хрусталиков было произведено измерение массовой доли ВР и водонерастворимых (ВНР) белков. Результаты представлены в таблице 3. Как и ожидалось, процент содержания ВР белков в хрусталике уменьшается с возрастом и при развитии катаракты, в то время как доля ВНР белков увеличивается. Следует отметить, что у всех катарактальных хрусталиков отсутствовала значительная часть капсулы (в основном из экваториальной и задней областей хрусталика). Такая особенность обусловлена хирургическим извлечением хрусталиков в процессе операции по замене катарактального хрусталика на синтетический. Поэтому массы катарактальных хрусталиков почти в два раза ниже масс других типов хрусталиков.

Таблица 3. Вес хрусталиков (г) и доля ВР и ВНР белков в хрусталиках разных типов [142].

Хрусталики	Вес хрусталика, мг	ВР белки		ВНР белки	
		Вес, мг	%	Вес, мг	%
Средний возраст	234 ± 33	60 ± 7	25.9 ± 0.9	10 ± 3	4.6 ± 1.8
Возрастные	224 ± 55	44 ± 5	20.0 ± 2.9	24 ± 7	10.6 ± 0.3
Катарактальные	127 ± 14	11 ± 2	8.9 ± 1.3	31 ± 3	24.2 ±1.8

Типичные спектры поглощения для белковых и метаболомных фракций представлены на рисунке 8. Для всех фракций было произведено сравнение поглощения на трех длинах волн: 280 нм (максимум поглощения аминокислотных остатков в составе белка), 300 нм (плечо поглощения триптофанового аминикислотного остатка, дающего основной вклад в

коэффициент экстинкции белка) и 360 нм (максимум полосы поглощения, характерной для УФ-фильтров) [143].

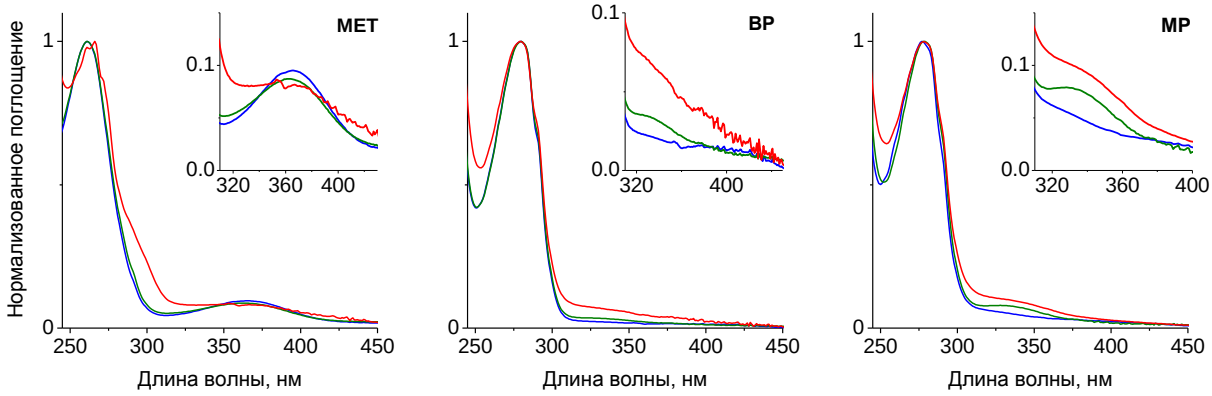

Рисунок 8. Спектры оптического поглощения метаболомной фракции (1 сегмент рисунка), фракции водорастворимых белков (2 сегмент рисунка) и фракции мочевинорасторимых белков хрусталика (3 сегмент): голубые линии – спектры для здоровых хрусталиков от пациентов среднего возраста, зеленые линии – спектры для возрастных хрусталиков, красные линии – спектры для катарактальных хрусталиков. Во вкладках показано поглощение каждой фракции в УФА-диапазоне.

Для количественного сравнения вклада от каждой фракции в общее поглощение УФ-излучения хрусталиком были учтены: фактические объемы каждой фракции; разбавление полученных фракций для получения корректных спектров оптического поглощения и флуоресценции (сравнение интенсивности флуоресценции справедливо только при условии близких оптических плотностей растворов в диапазоне возбуждения); исходные массы хрусталиков до гомогенизации. Таким образом, в работе была введена величина удельного поглощения фракции (УП), позволяющая оценить поглощение каждой фракции в кубическом сантиметре ткани хрусталика:

$$\text{УП} = \frac{OD_{\text{фр}} \times V_{\text{фр}} \times \text{КР}_{\text{фр}}}{M_{\text{хр}}}, \quad (1)$$

где $OD_{\text{фр}}$ – поглощение фракции, $V_{\text{фр}}$ – объем фракции (в мл), $\text{КР}_{\text{фр}}$ – коэффициент разбавления, а $M_{\text{хр}}$ – масса хрусталика (в г). Результаты расчетов представлены в таблице 4, которая также содержит вклад каждой фракции в общее поглощение хрусталиков на 280, 300 и 360 нм, выраженный в процентах (ВП).

$$ВП_{MET} = \frac{УП_{MET}}{УП_{MET} + УП_{ВР} + УП_{МР}}, \quad (2)$$

$$ВП_{ВР} = \frac{УП_{ВР}}{УП_{MET} + УП_{ВР} + УП_{МР}}, \quad (3)$$

$$ВП_{МР} = \frac{УП_{МР}}{УП_{MET} + УП_{ВР} + УП_{МР}}, \quad (4)$$

Таблица 4. Величина удельного поглощения фракции (УП) и процент поглощения света на указанной длине волны каждой из фракций (МЕТ, ВР и МР) для здоровых хрусталиков от пациентов среднего возраста, возрастных и катарактальных хрусталиков [142].

Хрусталики	Длина волны, нм	МЕТ		ВР		МР	
		УП, мл/г	ВП, %	УП, мл/г	ВП, %	УП, мл/г	ВП, %
Средний возраст	280	22 ± 1	6	330 ± 40	89	19,9 ± 0,2	5
Возрастные		15 ± 1	4	260 ± 40	71	92 ± 9	25
Катарактальные		2,4 ± 0,6	1	70 ± 20	35	123 ± 8	64
Средний возраст	300	2,5 ± 0,2	5	44 ± 5	89	2,8 ± 0,1	6
Возрастные		2,2 ± 0,6	4	41 ± 7	68	18 ± 4	29
Катарактальные		0,95 ± 0,07	3	12 ± 3	33	23 ± 7	65
Средний возраст	360	5 ± 1	63	2,3 ± 0,7	29	0,7 ± 0,5	8
Возрастные		2,5 ± 0,5	25	3,3 ± 0,8	34	4 ± 1	41
Катарактальные		0,22 ± 0,05	3	2,5 ± 0,3	34	4,6 ± 0,3	63

Как и ожидалось, поглощение на длинах волн 280 и 300 нм обеспечивается белками хрусталика. Суммарное удельное поглощение белковых фракций на 280 нм для средневозрастных и возрастных хрусталиков составляет примерно 350 мл/г, что свидетельствует о поглощении 90% света в слое хрусталика толщиной около 30 мкм.

Поглощение фракции метаболитов на коротких длинах волн минимум на порядок меньше, чем для белковых фракций. Удельное поглощение фракции водорастворимых белков для средневозрастных хрусталиков несколько больше, чем для этой же фракции, полученной из возрастных хрусталиков, и намного больше, чем эта величина для хрусталиков с катарактой.

Наблюдаемые изменения обусловлены уменьшением доли водорастворимых белков с возрастом и в процессе катарактогенеза.

Суммарное удельное поглощение белковых фракций на 280 нм для катарактальных хрусталиков составляет примерно 200 мл/г, что почти в 2 раза ниже этой же величины для здоровых хрусталиков. Этот факт следует отнести к последствиям образования в процессе катарактогенеза существенного количества мочевинонерастворимых белков (устойчивые белковые водонерастворимые комплексы), которые в данной работе отбрасывались после центрифугирования фракции мочевинорастворимых белков и их вклад в поглощение не был учтен.

Сравнение количества ВР белков и их поглощения для разных типов хрусталиков показало, что коэффициент экстинкции ВР белковой фракции на 280 и 300 нм не изменяется, а уменьшение с возрастом и в процессе катарактогенеза величины удельного поглощения ВР белков обусловлено уменьшением их концентрации.

В молодых здоровых хрусталиках поглощение в УФА-диапазоне (320-400 нм) в основном обеспечивается УФ-фильтрами, относящимися к метаболомной фракции. На 360 нм удельное поглощение метаболомной фракции более чем в два раза превышает эту же величину для водорастворимых белков (таблица 4). Поглощение метаболомной фракции на 360 нм для возрастных и катарактальных хрусталиков примерно в 2 и 12 раз ниже, чем для нормальных хрусталиков, соответственно. Это говорит о постепенной уменьшении количества УФ-фильтров с возрастом и резком падении их концентрации при развитии катаракты. Суммарное удельное поглощение на 360 нм для водо- и мочевинорастворимых белков нормального хрусталика составляет примерно 3 мл/г, в то время как для возрастных хрусталиков – 7.3 мл/г, а для катарактальных – 7.1 мл/г. При сравнении этих величин следует учитывать, что катарактальные хрусталики содержат существенное количество мочевинонерастворимых белков, которые были отброшены в процессе эксперимента и их вклад не учтен. Таким образов, можно предполагать, что полное поглощение белковых фракций для катарактального хрусталика значительно выше.

3.2 Флуоресценция белковых и метаболомной фракций хрусталика

Для получения спектров флуоресценции использовалось возбуждение на 280 и 360 нм (Рисунок 9). Спектры эмиссии для водорастворимых белков нормальных и возрастных хрусталиков при возбуждении на 280 нм имеют максимум на 330 нм и практически совпадают по форме, в то время как ВР фракция катарактальных хрусталиков демонстрирует сдвиг в красную область с максимум флуоресценции на 340 нм. Это означает, что в катарактальном хрусталике водорастворимые белки более подвержены потере своей нативной структуры и

значительное число аминокислотных остатков триптофана в составе белка оказывается подвергнутыми воздействию растворителя, что и обуславливает сдвиг флуоресценции [143].

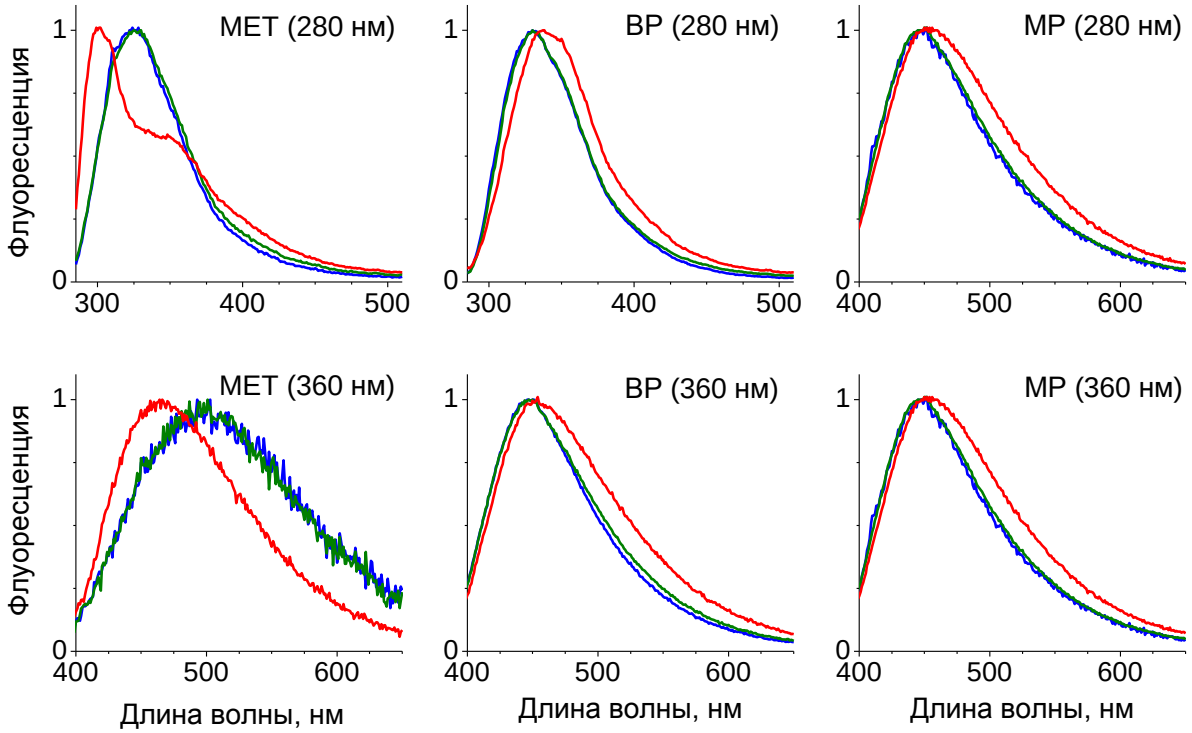

Рисунок 9. Спектры флуоресценции фракции метаболитов (первый столбец), водорастворимых (второй столбец) и мочевинорастворимых белков (третий столбец), полученные при возбуждении на 280 нм (верхние спектры) и 360 нм (нижние спектры) для здоровых (синие линии), возрастных (зеленые линии) и катарактальных (красные линии) хрусталиков.

Спектры флуоресценции метаболомной фракции при возбуждении на 280 нм также подобны (максимум эмиссии на 325 нм и плечо на 350 нм), в то время как спектр флуоресценции для метаболитов катарактального хрусталика имеет два максимума на 300 и 350 нм. Это свидетельствует о том, что метаболомный состав катарактальных хрусталиков значительно отличается от состава нормальных хрусталиков. Этот вывод подтверждается и для спектров эмиссии при возбуждении на 360 нм, которые также демонстрируют существенные различия для метаболитов нормальных и катарактальных хрусталиков.

Для каждой фракции была рассчитана величина относительной эффективности флуоресценции (ОЭФ), которая выражалась как отношение эффективности флуоресценции (ЭФ) фракции к ЭФ метаболитов нормального хрусталика (MET-норм):

$$ОЭФ_{фр} = ЭФ_{фр}/ЭФ_{MET-норм}, \quad (5)$$

$$ЭФ_{фр} = I_{фр}/OD_{обр}, \quad (6)$$

где $I_{\text{фр}}$ – интеграл от спектра флуоресценции, $OD_{обр}$ – оптическая плотность образца, используемая для флуоресцентных измерений. Измерения производились для двух длин волн возбуждения (280 и 360 нм), полученные результаты представлены в таблице 5. Кроме того был рассчитан вклад каждой фракции в общую флуоресценцию хрусталика с учетом доли фракции в его общем поглощении.

$$\text{ВФ}_{MET} = \frac{\text{ОЭФ}_{MET} \times \text{УП}_{MET}}{\text{ОЭФ}_{MET} \times \text{УП}_{MET} + \text{ОЭФ}_{\text{ВР}} \times \text{УП}_{\text{ВР}} + \text{ОЭФ}_{\text{МР}} \times \text{УП}_{\text{МР}}}, \quad (7)$$

$$\text{ВФ}_{\text{ВР}} = \frac{\text{ОЭФ}_{\text{ВР}} \times \text{УП}_{\text{ВР}}}{\text{ОЭФ}_{MET} \times \text{УП}_{MET} + \text{ОЭФ}_{\text{ВР}} \times \text{УП}_{\text{ВР}} + \text{ОЭФ}_{\text{МР}} \times \text{УП}_{\text{МР}}}, \quad (8)$$

$$\text{ВФ}_{\text{МР}} = \frac{\text{ОЭФ}_{\text{МР}} \times \text{УП}_{\text{МР}}}{\text{ОЭФ}_{MET} \times \text{УП}_{MET} + \text{ОЭФ}_{\text{ВР}} \times \text{УП}_{\text{ВР}} + \text{ОЭФ}_{\text{МР}} \times \text{УП}_{\text{МР}}}, \quad (9)$$

Таблица 5. Величина относительной эффективности флуоресценции (ОЭФ) и процент вклада каждой из фракций (МЕТ, ВР и МР) в общую флуоресценцию хрусталика на указанной длине волны для здоровых хрусталиков от пациентов среднего возраста, возрастных и катарактальных хрусталиков [142].

Хрусталики	Длина волны, нм	МЕТ		ВР		МР	
		ОЭФ	ВФ, %	ОЭФ	ВФ, %	ОЭФ	ВФ, %
Средний возраст	280	1	1	7,2 ± 0,4	93	8,4 ± 0,8	6
Возрастные		1,5 ± 0,8	1	6,4 ± 0,4	70	7,5 ± 0,1	29
Катарактальные		2,8 ± 0,3	0,5	7,4 ± 0,5	33	8,0 ±0,4	67
Средний возраст	360	1	6	33 ± 13	81	32 ± 12	13
Возрастные		1,8 ± 0,5	2	28 ± 2	44	27 ± 1	54
Катарактальные		12 ± 7	2	13 ± 2	21	25 ± 2	77

Полученные данные демонстрируют, что при возбуждении на 280 нм белки являются гораздо более флуоресцентными компонентами хрусталика, чем метаболиты: ОЭФ для белков существенно выше, чем для МЕТ фракции. А учитывая тот факт, что поглощение белками на длине волны 280 нм значительно превышает поглощение метаболитами, можно сделать вывод, что белки ответственны за 99% флуоресценции хрусталика при возбуждении на 280 нм. Следует также отметить, что величины ОЭФ и спектры эмиссии при возбуждении на 280 нм для всех белковых фракций (ВР и МР для нормальных, возрастных и катарактальных хрусталиков) подобны, что говорит о высокой концентрации аминокислотных остатков

триптофана в белках хрусталика, дающих основной вклад как в поглощение тканями хрусталика на длине волны 280 нм, так и в соответствующую флуоресценцию.

Метаболомная фракция дает незначительный вклад во флуоресценцию при возбуждении на 280 нм (около 1%). Однако стоит отметить рост этого вклада в случаях с возрастными и катарактальными хрусталиками до 1.5 % и 2.8 % соответственно.

Эффективность флуоресценции при возбуждении на 360 нм значительно выше у белков, чем у метаболитов. При рассмотрении вкладов разных фракций в общую флуоресценцию хрусталика установлено, что для здоровых и возрастных хрусталиков на долю белков приходится 94% и 98%, и только 2% и 6% на метаболиты, соответственно, хотя поглощение этих фракций на 360 нм сравнимо (таблица 5). Эффективность флуоресценции белковых фракций при возбуждении на 360 нм отличается незначительно: почти для всех типов величина ОЭФ находится в диапазоне 25-35. Однако ВР фракция для катарактальных хрусталиков является исключением и величина ОЭФ для нее составляет 13 ± 2. Совсем другая ситуация наблюдается для метаболомных фракций: величина ОЭФ изменяется от 1 для здоровых хрусталиков до 1.8 и 12 для возрастных и для катарактальных, соответственно.

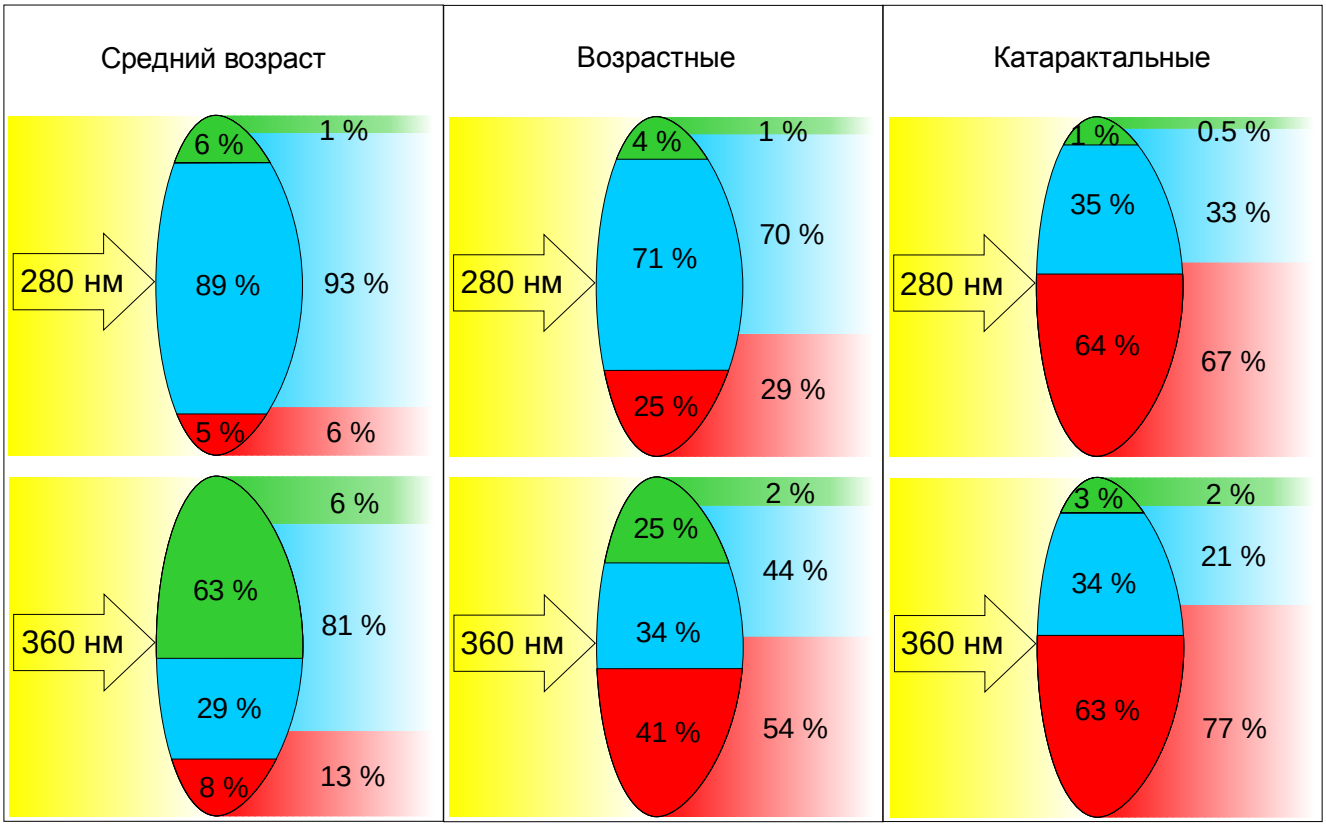

Рисунок 10. Вклад каждой фракции (зеленый – метаболомной, голубой – водорастворимых белков, красный – мочевинорастворимых белков) в полное поглощение (проценты внутри изображения хрусталика) и в полную флуоресценцию хрусталика (проценты за изображением хрусталика) для разных типов хрусталика.

Одной из важных функций хрусталика является защита сетчатки от воздействия УФ-излучения [26,144,145]. Результаты данного исследования демонстрируют, что все типы хрусталиков – нормальные, возрастные и катарактальные – успешно выполняют эту задачу. С биологической точки зрения поглощение хрусталиков в диапазоне УФА-излучения (320-400 нм) играет наиболее важную роль: более 95% солнечного излучения приходится на этот диапазон. Несмотря на то, что УФВ-излучения (280-320 нм) значительно более опасно для биологических тканей, оно эффективно поглощается роговицей глаза [146], в то время как УФА-излучение беспрепятственно проникает до хрусталика. Суммарное ВП всех фракций хрусталика на 360 нм составляет примерно от 8 мл/г и выше (Таблица 4). Принимая во внимание длину оптического пути в хрусталике взрослого человека (примерно 5 мм), можно сделать вывод, что только 0.01% падающего УФА-излучения достигает сетчатки глаза. Тем не менее, разные типы хрусталиков выполняют свои защитные функции разными способами. В хрусталиках молодых пациентов и пациентов среднего возраста основными хромофорами в УФА-диапазоне являются кинуренин и его производные, синтезируемые в хрусталике из триптофана. Эти соединения являются превосходными УФ-фильтрами, демонстрирующими высокую светостабильность и крайне низкие квантовые выходы образования реакционно активных интермедиатов [26,29,147]. С возрастом концентрация УФ-фильтров в хрусталике падает. В настоящей работе было отмечено двукратное уменьшение поглощения на 360 нм метаболомной фракции при сравнении хрусталиков от пациентов со средним возрастом 36 и 69 лет соответственно. Отношение поглощения МЕТ фракции на 360 нм для катарактальных хрусталиков в 20 раз ниже, чем для нормальных хрусталиков от пациентов среднего возраста, и в 10 раз ниже, чем для возрастных хрусталиков. Эти наблюдения подтверждают предыдущие выводы о резком падении концентрации УФ-фильтров в процессе катарактогенеза [148]. Значительное увеличение флуоресценции метаболомной фракции при возбуждении на 360 нм для катарактальных хрусталиков (более чем в 10 раз по сравнению с хрусталиками среднего возраста) указывает на то, что основное поглощение метаболитами в данном диапазоне происходит не за счет естественных УФ-фильтров, а благодаря другим соединениям, которые могут проявлять существенно более сильные сенсибилизирующие свойства, чем УФ-фильтры. В частности, продукты разложения УФ-фильтров демонстрируют высокую фотохимическую активность, и даже низкие концентрации подобных соединений в тканях хрустаика за счет высокого коэффициента экстинкции и фотохимической активности в УФА-диапазоне могут приводить к развитию окислительного стресса.

Уменьшение концентрации УФ-фильтров в хрусталике с возрастом сопровождается окрашиванием белков хрусталика (Рисунок 10). Поглощение белковых фракций из возрастных и катарактальных хрусталиков на 360 нм по меньшей мере в два раза выше, чем из нормальных

хрусталиков среднего возраста. В результате вклад в общее поглощение на 360 нм для белковых фракций возрастает от 37% для нормальных хрусталиков до 75% и 97% для возрастных и катарактальных хрусталиков соответственно.

Флуоресцентные измерения показывают, что спектральные изменения составляющих хрусталика, связанные с возрастными процессами и катарактогенезом, делают ткани хрусталика более уязвимыми к воздействию УФА-излучения. Поглощение квантов света приводит к населению фотовозбужденного синглетного состояния, гибель которого осуществляется по одному из следующих каналов: флюоресценция, внутренняя конверсия в основное состояние и интеркомбинационная конверсия в триплетное состояние. Для УФ-фильтры константа скорости внутренней конверсии значительно превышает скорости других каналов гибели S^1, а квантовый выход ВК превышает 99% [26]. Замедление внутренней конверсии приводит к увеличению времени жизни фотовозбужденного синглетного состояния, а значит и к уменьшению квантового выхода ВК и к увеличению квантовых выходов флуоресценции и интеркомбинационной конверсии. Эффективность флуоресценции белков значительно выше, чем УФ-фильтров (Таблица 5), а значит и квантовый выход триплетного состояния тоже гораздо выше. Кроме того, эффективность флуоресценции метаболитов катарактальных и возрастных хрусталиков значительно выше, чем для нормальных хрусталиков молодых пациентов, что указывает на то, что низкомолекулярные хромофоры в этих хрусталиках являются более сильными флюорофорами, чем УФ-фильтры. Вероятно, что и квантовые выходы триплетного состояния для катарактальных и возрастных метаболомных хромофоров тоже значительно выше, чем для УФ-фильтров. Молекулы в триплетном состоянии являются реакционно-активными и способны вступать в реакции с аминокислотными остатками белков, нанося тем самым окислительные повреждения. Таким образом, поглощение УФА-излучения модифицированными кристаллинами в возрастных и катарактальных хрусталиках и метаболомными соединениями, не относящимися к УФ-фильтрам, является более опасным, чем поглощение света данного диапазона УФ-фильтрами в нормальных хрусталиках.

В научном сообществе существует гипотеза о том, что введение естественных или синтетических антиоксидантов в ткани хрусталика на ранних стадиях развития катаракты может задержать развитие данного заболевания [149,150]. Но для своевременного лечения необходимо выявить развитие катаракты на самых ранних стадиях еще до возникновения существенных светорассеивающих центров, которые, как правило, и являются мишенью при диагностике. Перспективные методы ранней диагностики катаракты основаны на детектировании изменений оптических и флуоресцентных свойств ткани хрусталика [127,128]. Наши результаты подтверждают наличие ряда ярких отличий между оптическими и

флуоресцентными свойствами тканей здоровых, возрастных и катарактальных хрусталиков, особенно при воздействии в области УФА-излучения (360 нм). В нормальных хрусталиках большая часть УФА-излучения поглощается УФ-фильтрами, которые, как уже было сказано ранее, обладают низким квантовым выходом флуоресценции [26]. С возрастом концентрация УФ-фильтров падает, а белки благодаря модификациям получают окраску в данном диапазоне, что смещает вклад в поглощение УФ-излучения в пользу белков. Квантовый выход флуоресценции для белков значительно выше, чем для УФ-фильтров, что ведет к увеличению флуоресценции ткани хрусталика. Однако эти процессы свойственны и для нормальных возрастных хрусталиков, и для катарактальных. Поэтому использование метода измерения величины флуоресценции тканей хрусталика представляется не перспективным для ранней диагностики развития катаракты. Но результаты нашей работы показывают, что при относительно близких уровнях флуоресценции для возрастных и катарактальных хрусталиков наблюдается заметный сдвиг полосы флуоресценции катарактальных хрусталиков в красную область. Данное смещение наблюдается как при возбуждении на 360 нм, так и при облучении на 280 нм (флуоресценция триптофана) для всех беловых фракций. Использование данных наблюдений позволит отличать возрастные изменения от ранних стадий развития катаракты при диагностике *in vivo*. Корректный учет возрастных процессов крайне важен, поскольку именно старшая возрастная группа особенно подвержена этому заболеванию.

3.3 Заключение главы

Полученные результаты показывают, что спектральные свойства составляющих человеческого хрусталика – белков и метаболитов – с возрастом претерпевают значительные изменения. Белки приобретают окраску в УФА-диапазоне в связи с накоплением посттрансляционных модификаций, в то время как поглощение метаболомной фракции на данном диапазоне длин волн падает за счет уменьшения концентрации УФ-фильтров. Эти изменения становятся гораздо более выраженными для катарактальных хрусталиков: резкое падение концентрации УФ-фильтров ведет к десятикратному уменьшению поглощения метаболомной фракцией на 360 нм. Значительно уменьшается доля водорастворимых белков и наблюдается красное смещение их флуоресценции, что указывает на частичную потерю нативной структуры с высвобождением триптофановых аминокислотных остатков для взаимодействия с растворителем [142]. Наблюдаемые изменения в поглощении фракций хрусталика вызывают увеличение флуоресценции в его тканях: выход флуоресценции для хромофоров, связанных с белками, значительно выше, чем для свободных УФ-фильтров. Увеличение квантового выхода флуоресценции говорит о росте времени жизни фотовозбужденного синглетного состояния и, соответственно, росте квантового выхода

реакционно-активного триплетного состояния. Поэтому возрастные и в особенности катарактальные хрусталики более уязвимы к воздействию УФА-излучения. Глаза пожилых людей в большей степени, чем молодых, требуют защиты от солнечного излучения, например, использования солнцезащитных очков в солнечную погоду.

ГЛАВА 4 Фотохимические свойства продуктов термолиза кинуренина, кинуреновой кислоты и желтого кинуренина

В прошлой главе было показано, что фотохимические свойства метаболомной фракции хрусталика существенно изменяются с возрастом и при развитии катаракты, а именно: хромофоры хрусталика в УФА-диапазоне гораздо меньше проявляют «защитные» свойства, чем УФ-фильтры [142]. Эти изменения могут быть обусловлены тем, что с возрастом и при развитии катаракты концентрация исходных УФ-фильтров в тканях хрусталика падает, в то время как продукты их термического разложения могут накапливаться и давать все более значительный вклад в развитие окислительного стресса и фотоповреждение белков хрусталика. Для ответа на вопрос о возможной роли продуктов термолиза кинуренинов в развитии окислительного стресса в хрусталике необходимо детально изучить их фотохимические свойства. Ранее в нашей лаборатории исследовались фотохимические свойства основных УФ-фильтров хрусталика человека [26]. При анализе фотохимических свойств продуктов распада УФ-фильтров целесообразно использовать сравнение с фотохимическими свойствами исходных соединений. Это позволит установить изменение роли хромофоров в хрусталике человека с возрастом и при развитии катаракты.

Ранее в нашей лаборатории были также исследованы свойства двух продуктов распада KN: 4-гидрооксихинолина (4HQN) и ксантуреновой кислоты (XAN) [36,37]. Оба соединения показали себя как существенно более активные фотосенсибилизаторы, чем исходные УФ-фильтры. Основными короткоживущими промежуточными состояниями, образующимися в процессе фотовозбуждения, были триплетное состояние для 4HQN и енольная форма для XAN. Триплетное состояние является реакционно-активным и способно вступать в реакции с белками хрусталика, приводя к образованию посттрансляционных модификаций. Из-за необновляемости клеток хрусталика с возрастом образующиеся модификации накапливаются и меняют оптические свойства хрусталика, а также способны приводить к развитию заболеваний.

В этой части работы мы исследовали механизмы гибели фотовозбужденных продуктов термолиза кинуренина: кинуреновой кислоты (KNA) и желтого кинуренина (KNY).

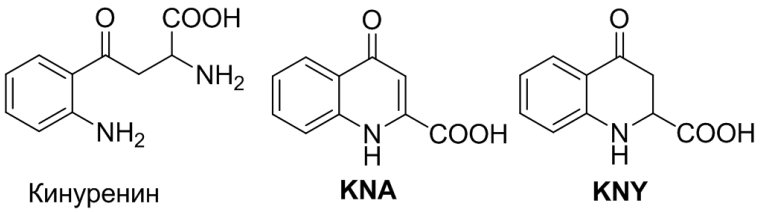

Схема 5. Химические структуры KN, KNA и KNY

4.1 Результаты стационарных измерения для KNA и KNY

4.1.1 Спектры оптического поглощения

Оба продукта термолиза KN имеют полосы поглощения в УФА-диапазоне, как и исходный УФ-фильтр кинуренин. Для каждого соединения было проведено титрование в водных растворах для определения констант pKa и форм, в которых присутствует соединение при условиях нейтрального pH, соответствующего среде хрусталика.

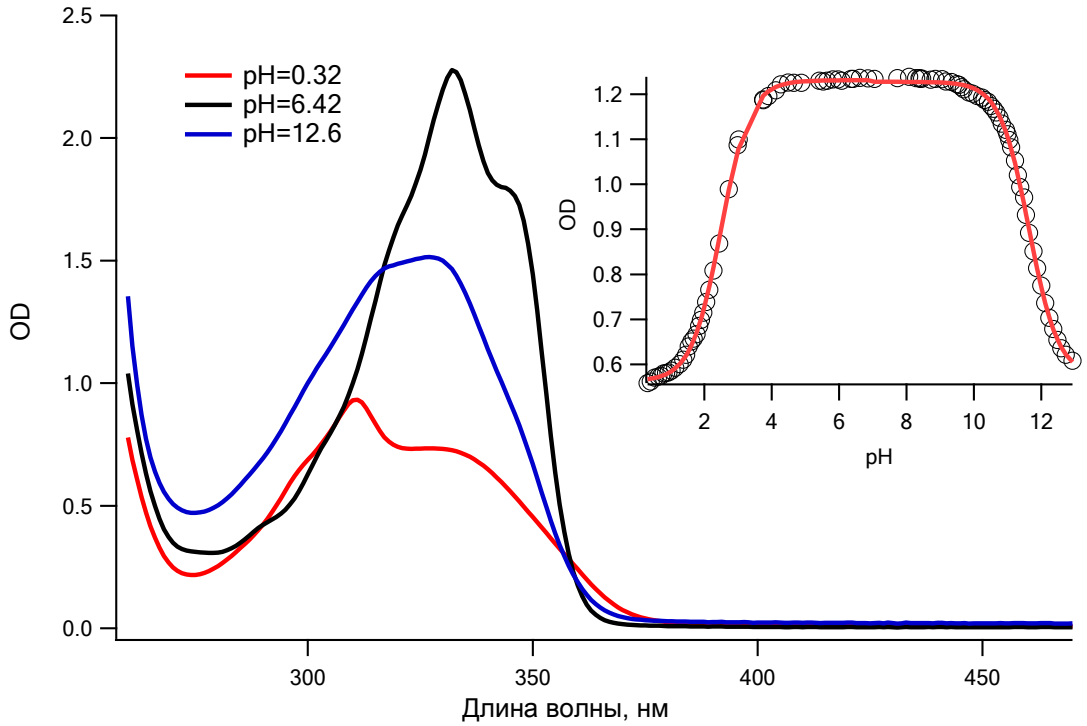

Рисунок 11. Спектры поглощения KNA в водном растворе при pH 12.6, 6.4 и 0.3. Вставка: Кривая титрования для KNA, полученная на длине волны 345 нм.

Спектр оптического поглощения KNA в нейтральном водном растворе имеет максимум на длине волны 332 нм и плечи на 320 и 345 нм (Рисунок 11). Форма спектра значительно изменяется в кислых и щелочных растворах за счет протонирования кислотной группы и депротонирования гидроксильной группы, соответственно. Для KNA было проведено титрование на длине волны 345 нм, где изменения в спектре поглощения наиболее ярко выражены (Рисунок 11, вставка). Полученные константы pK_{a1} = 2.5 и pK_{a2} = 11.6 находятся в хорошем согласии с предыдущими исследованиями [42]. Растворение KNA в нейтральном водном растворе проводит к подкислению раствора, из чего можно сделать вывод, что при физиологических условиях KNA присутствует в анионной форме, для которой и производились все последующие эксперименты [151].

Спектр оптического поглощения KNY в нейтральном водном растворе имеет полосы поглощения с максимумами на длинах волн 235 нм, 260 нм и 380 нм (Рисунок 14), подобно KN и другим УФ-фильтрам, содержащимся в хрусталике человеческого глаза [22].

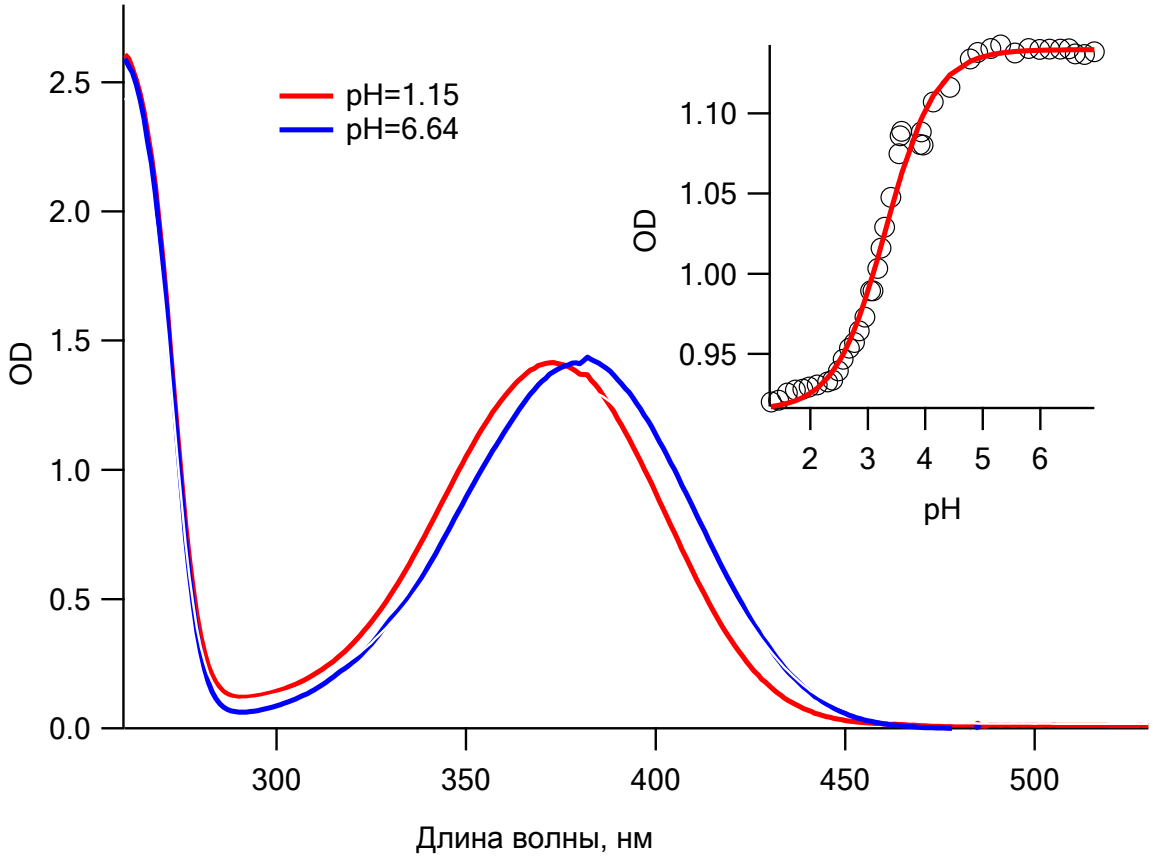

Рисунок 12. Спектры поглощения KNY в водном растворе при pH 6.64 и 1.15. Вставка: кривая титрования для KNY, полученная на длине воны 400 нм.

Для KNY также было проведено титрование (на длине волны 400 нм), которое показало наличие только одного участка протонирования (COO-группа), влияющего на спектр поглощения (Рисунок 12, вставка). В кислом растворе происходит незначительное смещение максимумов полос поглощения (до 240, 258 и 373 нм соответственно), константа pKa = 3.7. Такое различие значений pKa для COO-группы KNA и KNY, вероятно, обусловлено более сильным сопряжением этой группы с ароматической частью молекулы для KNA, чем для KNY [151].

4.1.2 Стационарные спектры флуоресценции

Спектры флуоресценции для KNA и KNY в нейтральных водных растворах показаны на рисунке 13. Для обоих соединений спектры излучения не зависят от длины волны возбуждения, а спектры возбуждения практически совпадают со спектрами поглощения (Рисунок 14), что свидетельствует о том, что в нейтральных водных растворах KNA и KNY присутствуют в

одной таутомерной форме. Спектры флуоресценции KNA похожи на спектры 4HQN [36], который существует в нейтральном водном растворе только в кето-форме [152]. Химические структуры 4HQN и KNA также схожи, поэтому можно предположить, что KNA в нейтральном водном растворе также находится в кето-форме. В работе были измерены квантовые выходы флуоресценции: $\Phi_F = (1.4\pm0.2)\times10^{-2}$ для KNA и $\Phi_F = (7.5\pm1.0)\times10^{-3}$ для KNY, соответственно [151].

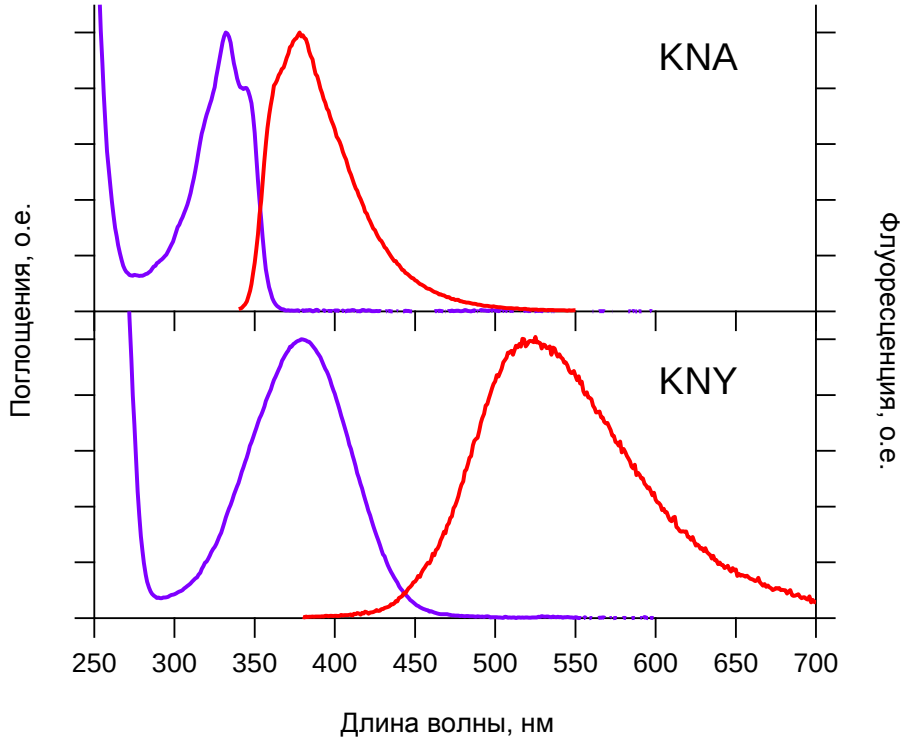

Рисунок 13. Спектры поглощения (фиолетовая линия) и флуоресценции (красная линия) для KNA (верхний) и KNY (нижний) в нейтральных водных растворах.

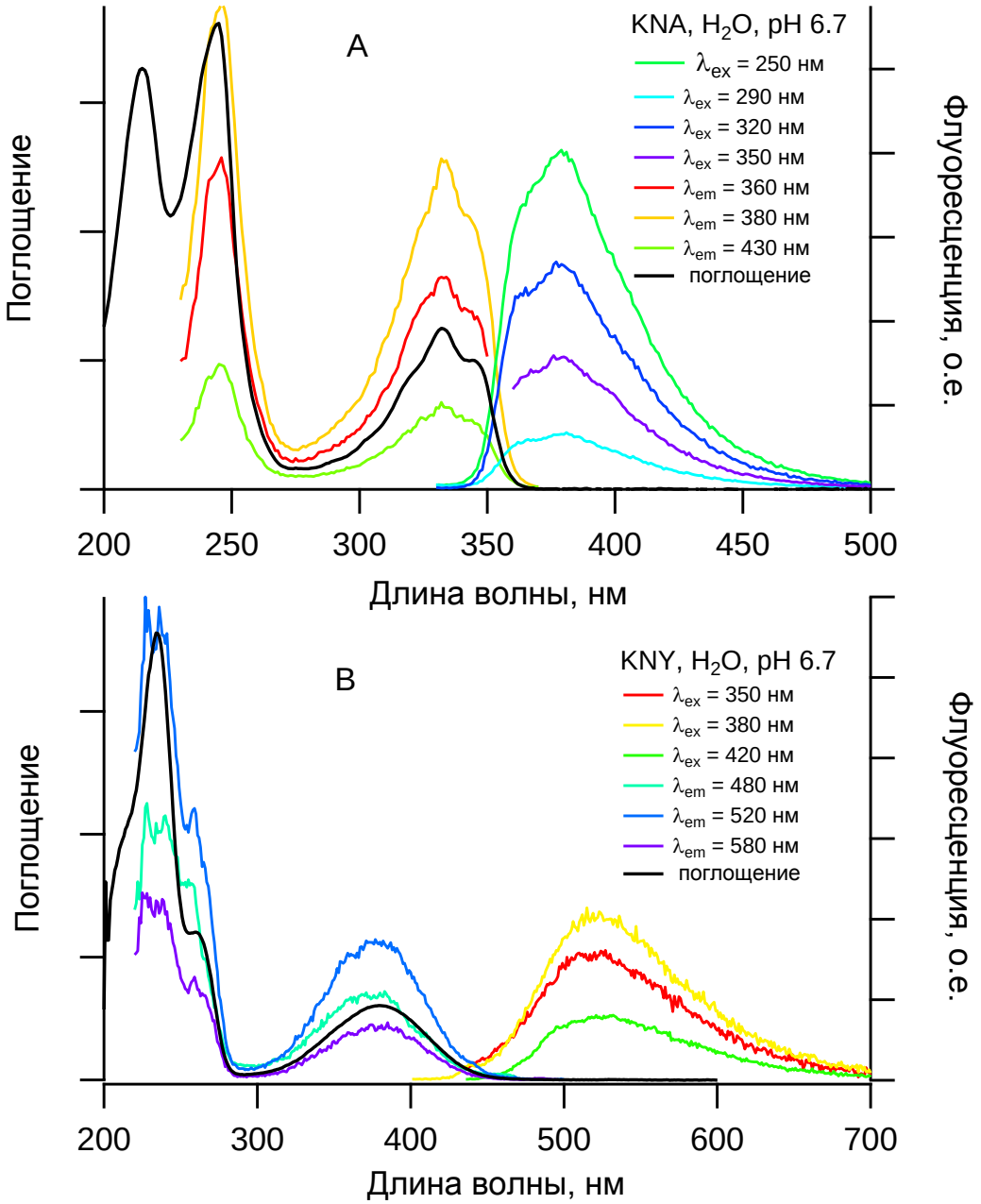

Рисунок 14. Спектры поглощения и флуоресценции для KNA (A) и KNY (B) в нейтральном водном растворе (pH 6.7), записанные для разных длин волн возбуждения и эмиссии.

4.1.3 Стационарный фотолиз

Стационарный фотолиз KNA и KNY проводился в нейтральных водных растворах в аэробных и анаэробных условиях. Поскольку фоторазложение KNY происходит гораздо быстрее, чем KNA, то облучение KNY проводили с использованием 5% фильтра нейтральной плотности. На рисунке 15 показаны кривые фоторазложения исходных соединений в процессе стационарного УФ-облучения. Оба соединения разлагаются быстрее в анаэробных условиях по сравнению с разложением в аэробной среде, и эта разница значительнее для KNY.

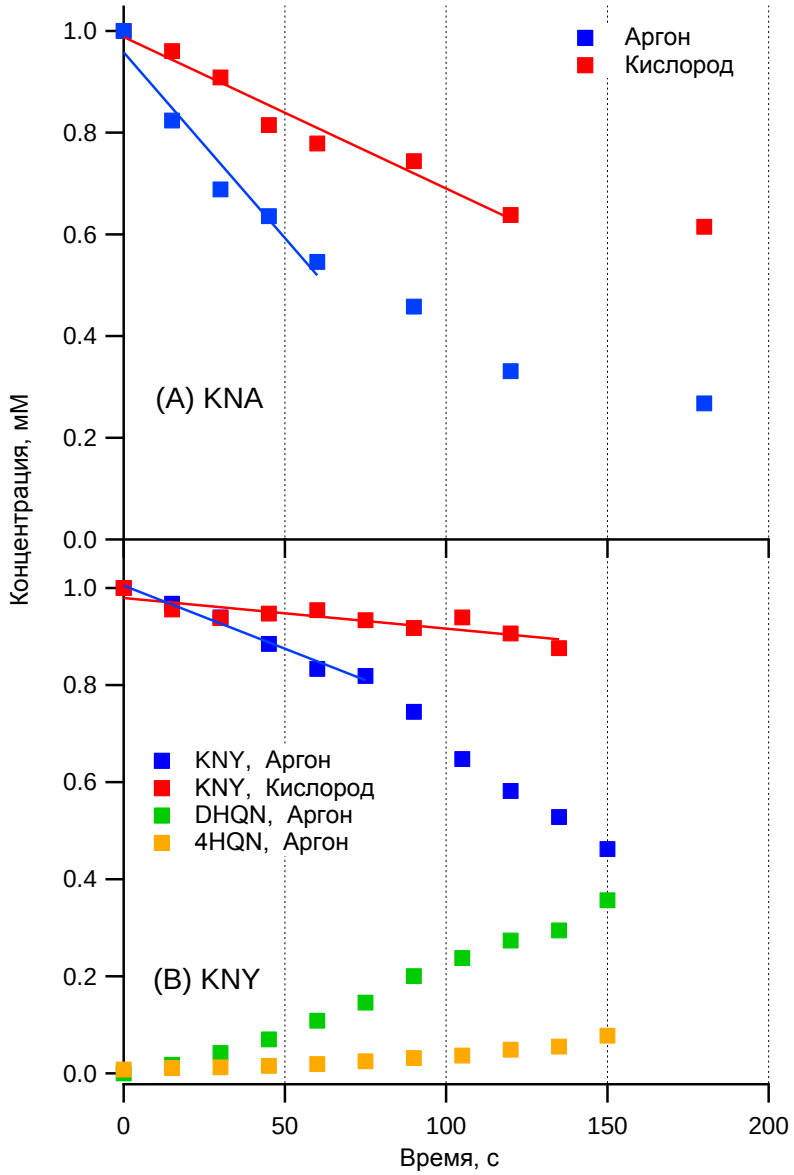

Рисунок 15. Кинетические кривые анаэробного (синие квадраты) и аэробного (красные квардаты) фоторазложения KNA (A) и KNY (B) в водных буферных растворах, pH 7.4. Желтые и зеленые квадраты показывают кинетики формирования 4HQN и DHQN, соответственно. Данные были получены интегрированием данных ВЭЖХ облученных образцов. Линии показывают линейные аппроксимации.

Для расчета квантовых выходов фоторазложения использовались только начальная область кривых разложения, где аппроксимация может быть произведена линейной функцией. В результате мы получили следующие значения квантовых выходов фоторазложения: для KNA $\Phi_{фр}(KNA,Ar) = (6.0\pm1.5)\times10^{-3}$, $\Phi_{фр}(KNA,O_2) = (2.6\pm0.6)\times10^{-3}$ и для KNY $\Phi_{фр}(KNY,Ar) = (3.0\pm0.8)\times10^{-2}$, $\Phi_{фр}(KNY,O_2) = (8\pm2)\times10^{-3}$ [151]. Это наблюдение свидетельствует о том, что тушение возбужденных состояний KNA и KNY кислородом снижает выход образования продуктов. Та же тенденция к снижению скорости разложения в присутствии кислорода наблюдалось для KNA и в работе Пилени и коллег [43], хотя измеренные нами выходы фоторазложения несколько выше, чем сообщалось в данной работе.

Помимо расчета квантовых выходов фоторазложения, был произведен анализ продуктов исследуемых соединений. В случае KNY мы наблюдаем формирование двух основных продуктов. На рисунке 16 представлена оптическая хроматограмма (320 нм) облученного образца KNY в фосфатном буфере (pH 7.4). Первый пик имеет характерные для 4HQN время элюирования (9.8 мин) и спектр оптического поглощения. Масс-спектрометрический анализ показал наличие в этом пике молекулярного иона с m/z=146 (родительский ион) и фрагмента с m/z=128 (характеризует потерю H_2O). Пик со временем элюирования 11.4 мин и спектром оптического поглощения, близким к спектру KNY, содержал молекулярный ион с m/z=146 и фрагмент с m/z=128 (потеря H_2O). Этот пик был отнесен нами к 2,3-дигидро-4-гидроксихинолину (DHQN), структура которого представлена на вставке рисунка 16. Зеленые и желтые квадраты на рисунке 15 иллюстрируют формирование 4HQN и DHQN в анаэробных условиях в зависимости от времени облучения. Важно отметить, что наличие кислорода почти полностью препятствует формированию DHQN, в то время как образование 4HQN в аэробных условиях и насыщенных аргоном растворах практически не отличается (данные не приведены).

ВЭЖХ анализ облученных образцов KNA показал наличие многочисленных продуктов фоторазложения, дальнейшая идентификация которых не производилась.

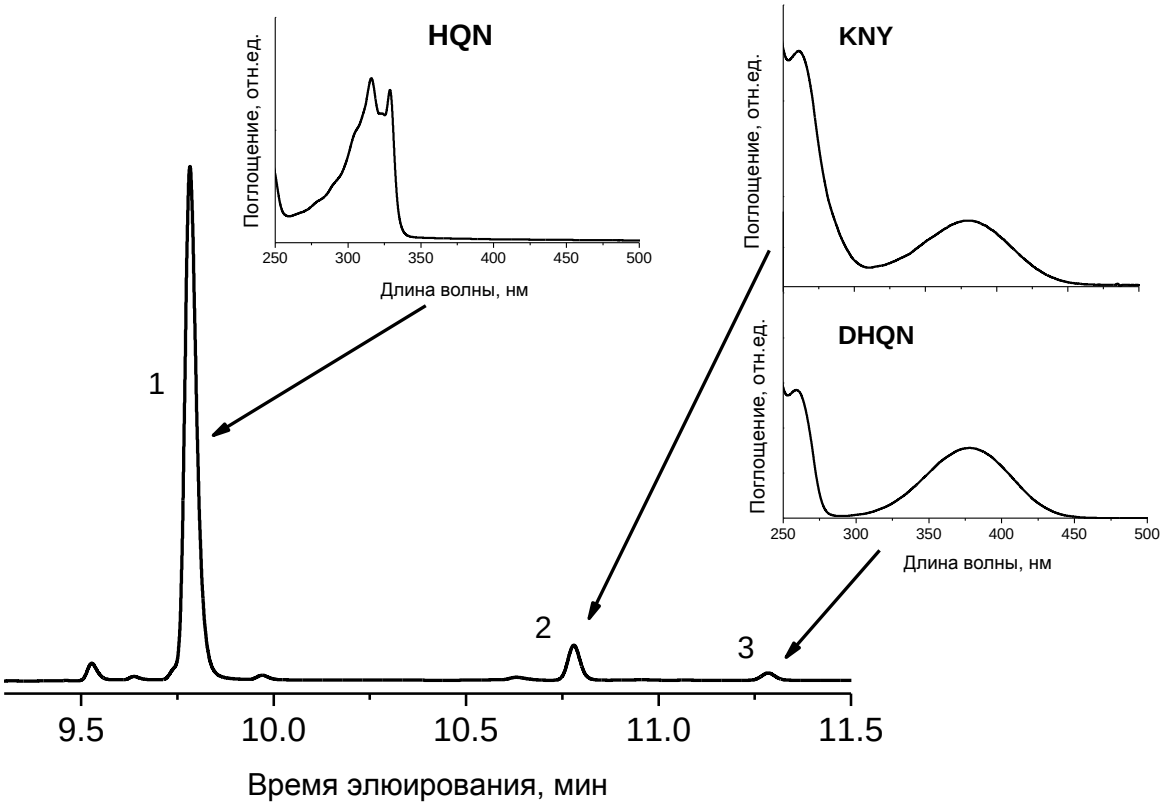

Рисунок 16. Оптическая хроматограмма облученного раствора KNY в водном буферном растворе, зарегистрированная на 320 нм. Наблюдаемые пики: 1 - 4HQN (9.8 мин), 2 - KNY (10.8 мин), 3 - DHQN (11.4 мин).

4.2 Результаты кинетических измерения для KNA и KNY

4.2.1 Флуоресцентные измерения

Характерная кинетика флуоресценции для водного раствора KNY (pH 6.7, возбуждение на 375 нм, измерение на 510 нм) показана на рисунке 17. Аппроксимация полученной кривой производилась суммой двух экспонент (с временными константами τ_1 и τ_2, и соответствующими амплитудами A_1 и A_2), свернутой с функцией отклика прибора. Полученные результаты (τ_1 = 0.35 нс, A_1 = 0.994, τ_2 = 3.1 нс, A_2 = 0.006) говорят о том, что гибель флуоресценции KNY происходит практически по моноэкспоненциальной зависимости с характерным временем жизни 350 пс. Минорный вклад второй компоненты со временем жизни τ_2 = 3.1 был отнесен к вкладу от примеси, присутствующей в растворе. Аналогичные кинетики флуоресценции наблюдались в кислом (pH 1.3, τ_1 = 0.38 нс) и щелочном растворах (pH 13, τ_1 = 0.37 нс), что свидетельствует об отсутствии существенного влияния pH среды на время жизни флуоресценции KNY. Кроме того, присутствие буферных солей так же не сказывается на

времени жизни флуоресценции. С другой стороны, в дейтерированной воде время жизни флуоресценции почти вдвое больше, чем в обычной воде (620 пс), что свидетельствует об участии межмолекулярных водородных связей в процессе дезактивации возбужденного S_1 состояния KNY [151].

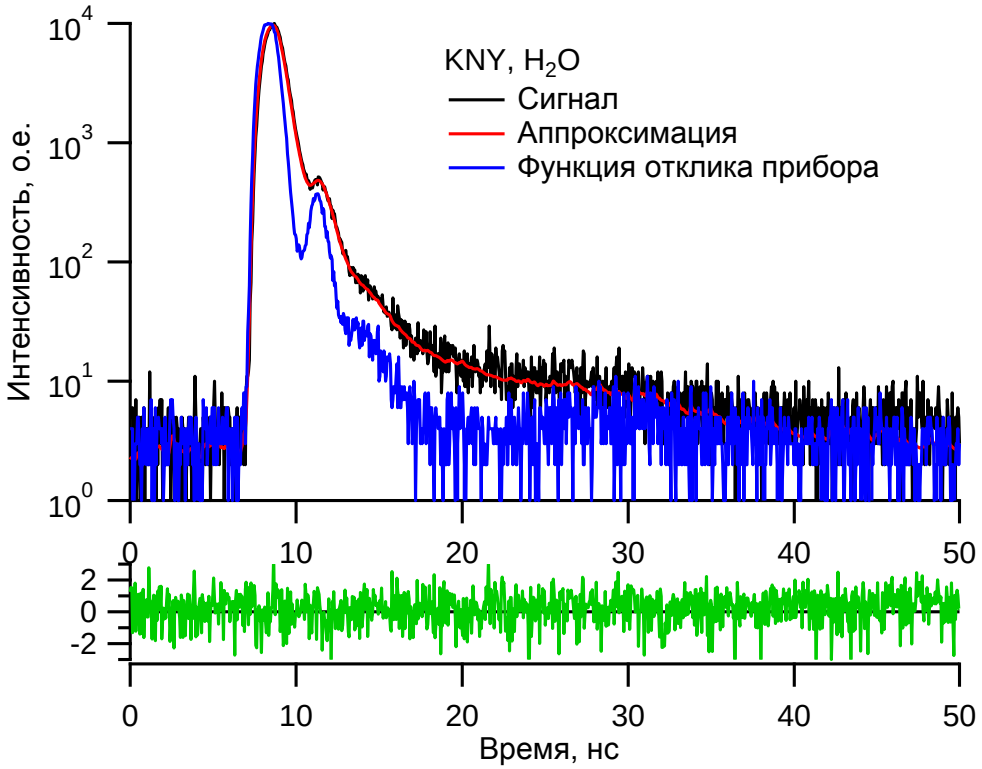

Рисунок 17. Динамика гибели флуоресценции для нейтрального водного раствора KNY (pH 6.7). Возбуждение на 375 нм, детекция на 510 нм. Нижняя вставка – нормированная разница между наблюдаемым сигналом и аппроксимацией.

Аналогичные измерения были проведены для KNA (pH 6.8, возбуждение на 330 нм, регистрация на 380 нм), кинетика представлена на рисунке 18. Полученное значение времени жизни флуоресценции τ_1 = 150 пс следует считать оценочным, так как оно лежит на пределе возможностей установки при использовании имеющегося источника возбуждения. Ранее время жизни флуоресценции KNA оценивалось, как величина меньше 200 пс [42]. Анализ зависимости времени жизни флуоресценции от pH раствора и измерения в дейтерированной воде показали отсутствие значительного влияния межмолекулярных водородных связей на процесс дезактивации фотовозбужденного S_1 состояния KNA [151].

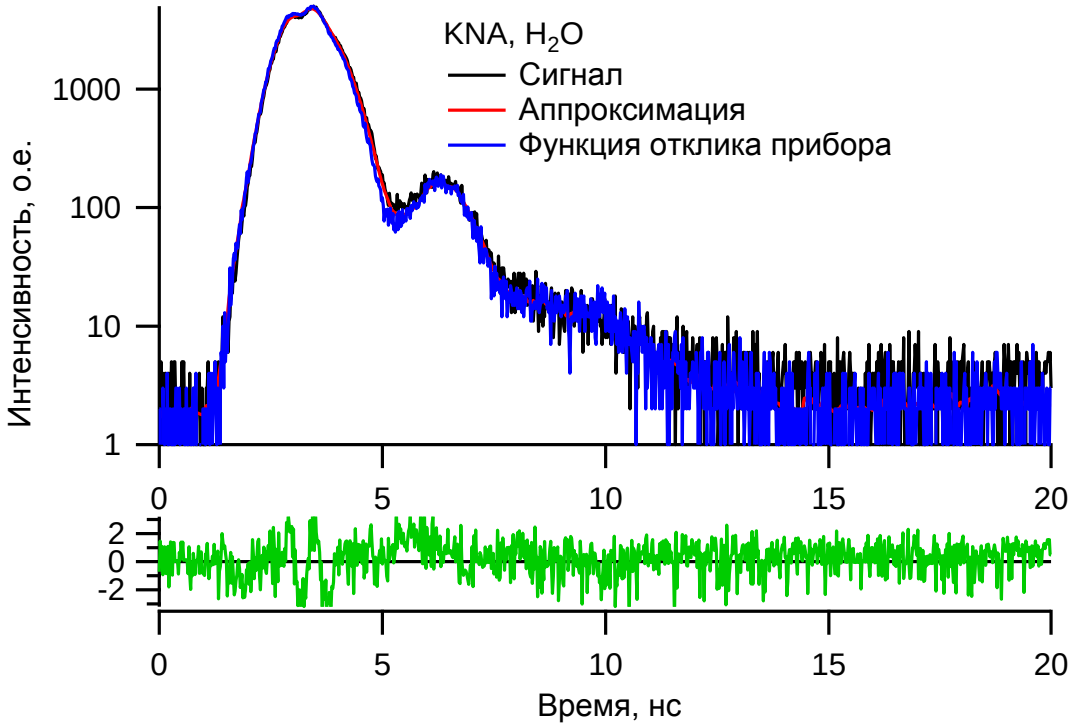

Рисунок 18. Динамика флуоресценции для нейтрального водного раствора KNA (pH 6.7). Возбуждение на 330 нм, регистрация на 380 нм. Нижняя вставка – нормированная разница между наблюдаемым сигналом и аппроксимацией.

4.2.2 Наносекундный лазерный импульсный фотолиз

На рисунке 19 изображены спектры промежуточного поглощения, полученные при фотолизе буферного водного раствора KNA (1×10^{-4} M, pH 7.2) через 20 мкс после лазерного импульса (308 нм) в анаэробных и аэробных условиях.

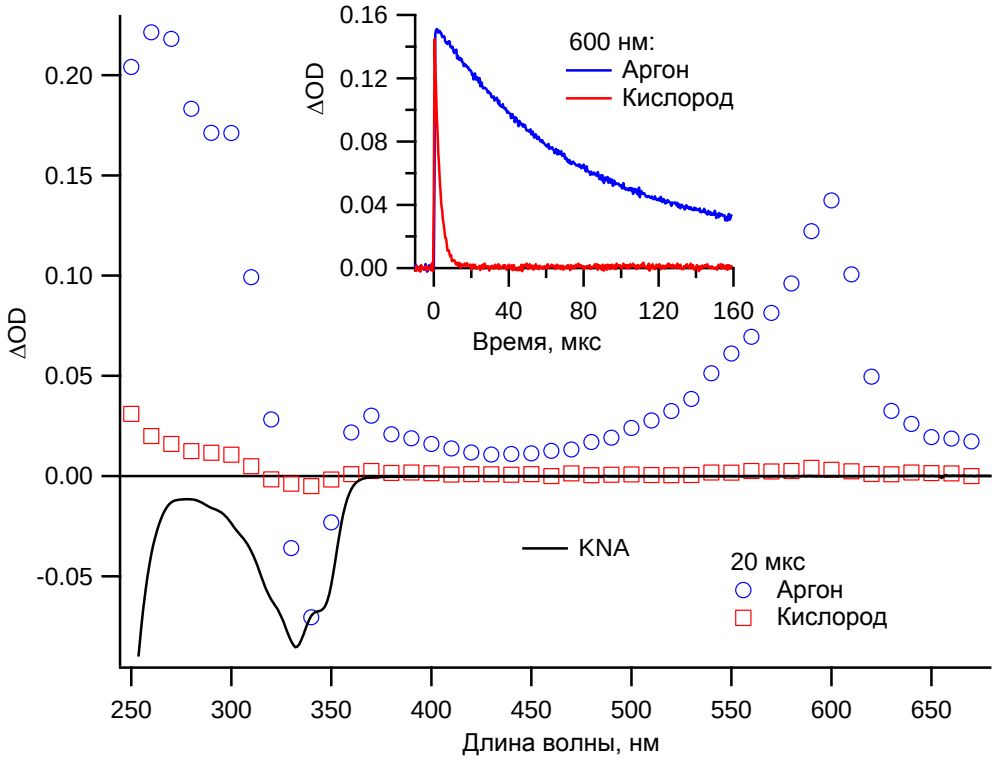

Рисунок 19. Спектры промежуточного поглощения KNA в буферном водном растворе (pH 7.2), полученные через 20 мкс после лазерного импульса (308 нм) в анаэробных (синие кружки) и аэробных (красные квадраты) условиях. Сплошная линия: стационарный спектр поглощения KNA. Вставка: кинетики гибели сигнала на 600 нм в анаэробных (синяя линия) и аэробных (красная линия) условиях.

Полосы поглощения с максимумами около 260 нм и 600 нм эффективно тушатся кислородом (вставка на рисунке 19) с константой скорости 2.9×10^{9} $M^{-1}c^{-1}$, что позволяет отнести их к поглощению триплетного состояния KNA. В анаэробных условиях сигнал спадает по кинетической кривой второго порядка с соотношением $k_2/\varepsilon_{600} = 4.6\times10^{5}$ см/с для 600 нм и $k_2/\varepsilon_{290} = 2.7\times10^{5}$ см/с для 290 нм, где ε_{600} и ε_{290} – коэффициенты экстинкции на соответствующих длинах волн, а k_2 – константа скорости.

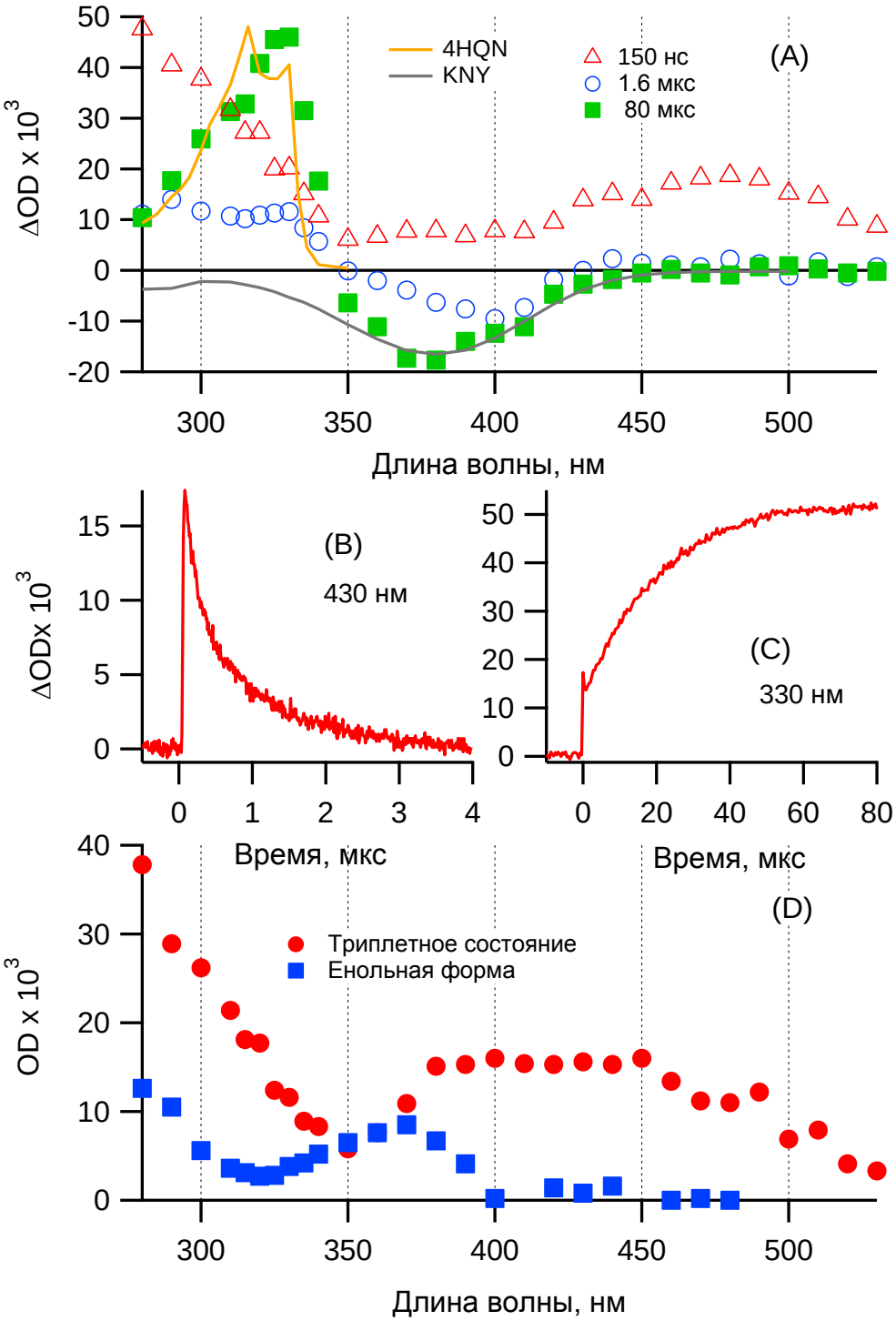

Рисунок 20. (A) Спектры промежуточного поглощения KNY в буферном водном растворе (pH 7.2) через 150 нс (красные треугольники), 1.6 мкс (синие круги) и 80 мкс (зеленые квадраты) после лазерного импульса (355 нм) в анаэробных условиях. Сплошная черная линия – стационарный спектр поглощения KNY (отражен в отрицательную область), оранжевая – спектр поглощения 4HQN. (B) и (C) Кинетики гибели сигнала на 430 и 330 нм, соответственно. (D) Спектры поглощения триплетного состояния (красные круги) и енольной формы (синие квадраты) KNY.

Формирование других продуктов или промежуточных интермедиатов не наблюдалось. Это означает, что в отсутствии тушителей основным каналом гибели триплетного состояния является триплет-триплетная аннигиляция. Подобное поведение триплетного состояния наблюдалось для родственного соединения 4HQN [36].

Для буферных водных растворов KNY (2.4×10^{-4} M, pH 7.2) также были зарегистрированы спектры промежуточного поглощения (Рисунок 20). Полученные спектры имеют несколько полос поглощения, эволюция которых протекает с разными константами скорости. Широкая полоса поглощения с максимумом около 470 нм и полоса с максимумом примерно 280 нм экспоненциально затухают с константой скорости 1.0×10^{6} c^{-1}. Эти полосы эффективно тушатся кислородом, поэтому данное поглощение было отнесено к сигналу от триплетного состояния KNY. Для проверки этого вывода мы провели сенсибилизированный ацетоном (Ac) фотолиз KNY (1.2 M Ac и 4.1×10^{-4} M KNY) на длине волны возбуждения 308 нм:

$$Ac \xrightarrow{h\nu} {}^{T}Ac + KNY \rightarrow Ac + {}^{T}KNY$$

Полученные спектры (данные не приведены) практически аналогичны спектрам, соответствующим прямому фотолизу (Рисунок 20), что подтверждает наш вывод о принадлежности наблюдаемой полосы с максимумом на 470 нм к поглощению триплетного состояния KNY в случае прямого фотолиза. Спектр поглощения этого промежуточного интермедиата после соответствующей коррекции (вычитание поглощения основного состояния KNY) представлен на рисунке 20 D.

Другим процессом, наблюдаемым в ходе фотолиза, является экспоненциальный рост сигнала с максимумом на длине волны 340 нм с константой скорости 4.7×10^{4} c^{-1}. На рисунке 20 A показаны спектры промежуточного поглощения, полученные через 1.6 мкс после лазерного импульса, когда гибель триплетного состояния уже завершена, и через 80 мкс после лазерного импульса. Спектр промежуточного поглощения, полученный через 80 мкс, обладает максимумом около 330 нм, что хорошо согласуется со спектром поглощения 4HQN (оранжевая линия на рисунке 20 A). Как было показано выше, 4HQN является одним из двух основных продуктов фоторазложения KNY, таким образом, наблюдаемая полоса промежуточного поглощения около 330 нм была отнесена к 4HQN.

Насыщение образца кислородом не влияет ни на кинетику роста сигнала на 330 нм, ни на форму спектра промежуточного поглощения. Это говорит о том, что триплетное состояние не является предшественником образования 4HQN. Спектр поглощения интермедиата, через который идет процесс образования 4HQN, может быть получен из спектра промежуточного поглощения через 1.6 мкс после лазерного импульса после корректировки на расходование исходного соединения (черная линия на рисунке 20 A) и незначительное образование 4HQN. Полученный спектр представлен на рисунке 20 D синими квадратами и, предположительно,

был отнесен к спектру поглощения енольной формы KNY. Необходимо отметить, что строгих доказательств этого отнесения у нас нет.

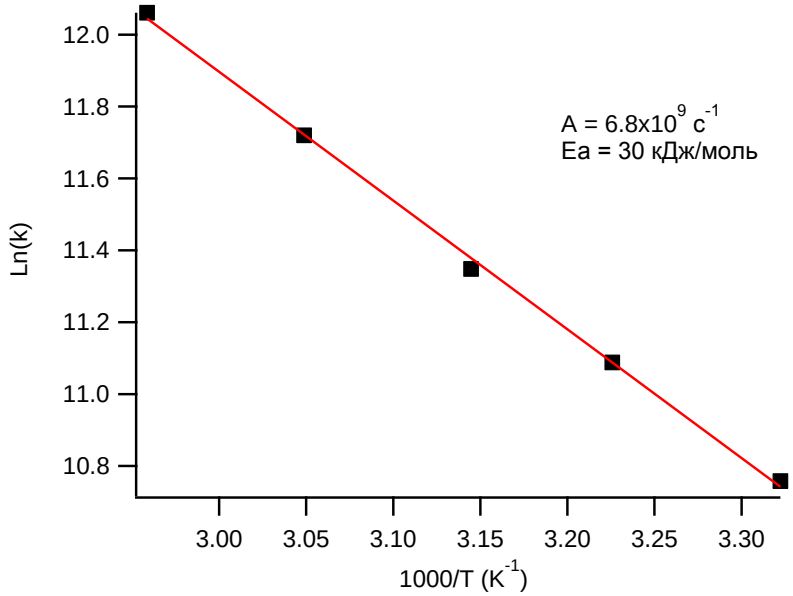

Рисунок 21. Зависимость скорости образования 4HQN в процессе фотолиза KNY от температуры раствора.

Кроме того, нами была исследована температурная зависимость константы скорости образования 4HQN и определены аррениусовские параметры: $A = 6.8\times10^{9}$ c^{-1} и E_a = 30 кДж/моль (Рисунок 21). Для доказательства механизма образования 4HQN был проведен стационарный сенсибилизированный фотолиз KNY с добавлением ацетона (1.4 M), кинетики распада исходного KNY и образования продуктов представлены на рисунке 22.

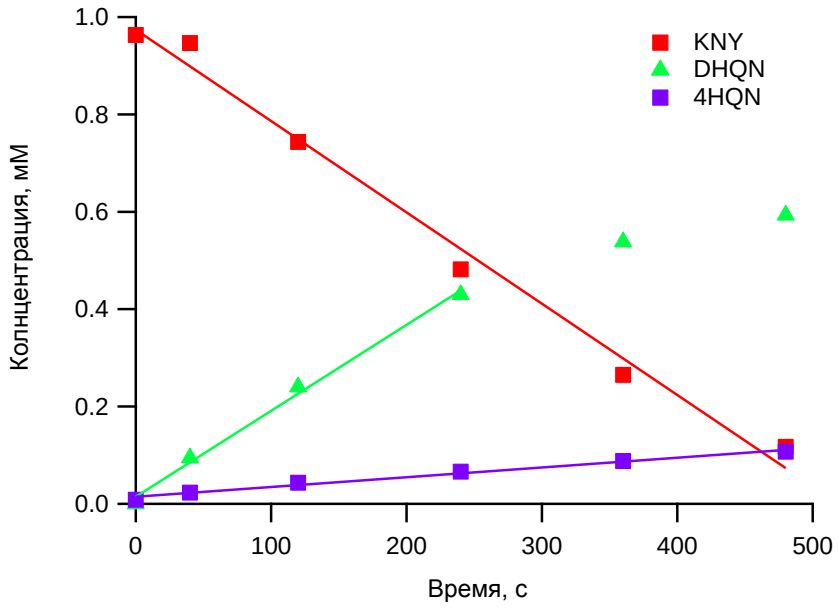

Рисунок 22. Временные зависимости разложения KNY (красные квадраты), образования DHQN (зеленые треугольники) и 4HQN (фиолетовые квадраты) при фотолизе на 308 нм в присутствии ацетона (1.4 M) в буферном растворе (pH 7.2) (0.5 мДж/импульс, частота 5 Гц).

Для определения квантового выхода триплетного состояния KNA был использован метод сравнения прямого и сенсибилизированного ацетоном фотолизов. Характерные кинетические кривые, наблюдаемые на 600 нм в процессе фотолиза (308 нм) KNA (1.7×10^{-4} М) в отсутствии сенсибилизатора (красная линия) и в присутствии 1.7 М ацетона (голубая линия) представлены на рисунке 23. Концентрации KNA и Ac были выбраны из условия равенства оптической плотности на длине волны возбуждения 308 нм: $OD_{KYN}= OD_{Ac}= 0.68$. Полученные кривые были аппроксимированы суммой экспонент:

$$\Delta OD = A\times\exp(-k_1t) + B\times(\exp(-k_1t) - \exp(-k_2t)) \quad (10)$$

В этой формуле коэффициент A характеризует вклад от триплетного состояния KNA, образующегося в процессе прямого фотолиза, а B – сенсибилизированного. В ходе расчета принималось, что эффективность сенсибилизированного фотолиза близка к 100% [26]. Линейность зависимости различных вкладов триплетного состояния от энергии лазерного импульса теряется при энергии выше 0.5 мДж/импульс. Квантовый выход триплетного состояния KNA был рассчитан как отношение интенсивностей прямого и сенсибилизированного фотолизов (Φ_T = A / B × 100%), для расчета использовалась только линейная часть зависимости (Рисунок 23, вставка). Квантовый выход для KNA составил 0.82±0.15, что на два порядка выше, чем для исходного KN.

Аналогичные измерения были произведены для KNY. В ходе эксперимента оказалось, что скорость распада триплетного состояния KNY сравнима со скоростью образования этого интермедиата в ходе сенсибилизированного ацетоном фотолиза, что приводит к большой ошибке при сравнении вкладов прямого и сенсибилизированного фотолиза. Поэтому мы можем сделать только приблизительную оценку квантового выхода триплетного состояния KNY в диапазоне 0.01-0.05.

Полученные значения времени жизни флуоресценции ($\tau_{фл}$) и квантовых выходов флуоресценции, триплетного состояния и енольной формы ($\Phi_{фл}$, Φ_T и $\Phi_{енол}$) были использованы для оценки соответствующих констант скорости флуоресценции, интеркомбинационной (ИКК) и внутренней конверсий (ВК) и таутомеризации для KNA и KNY в нейтральных водных растворах. Для расчета использовалось предположение, что $\Phi_{вк} = 1 - \Phi_{фл} - \Phi_T - \Phi_{енол}$. Полученные значения представлены в таблице 6.

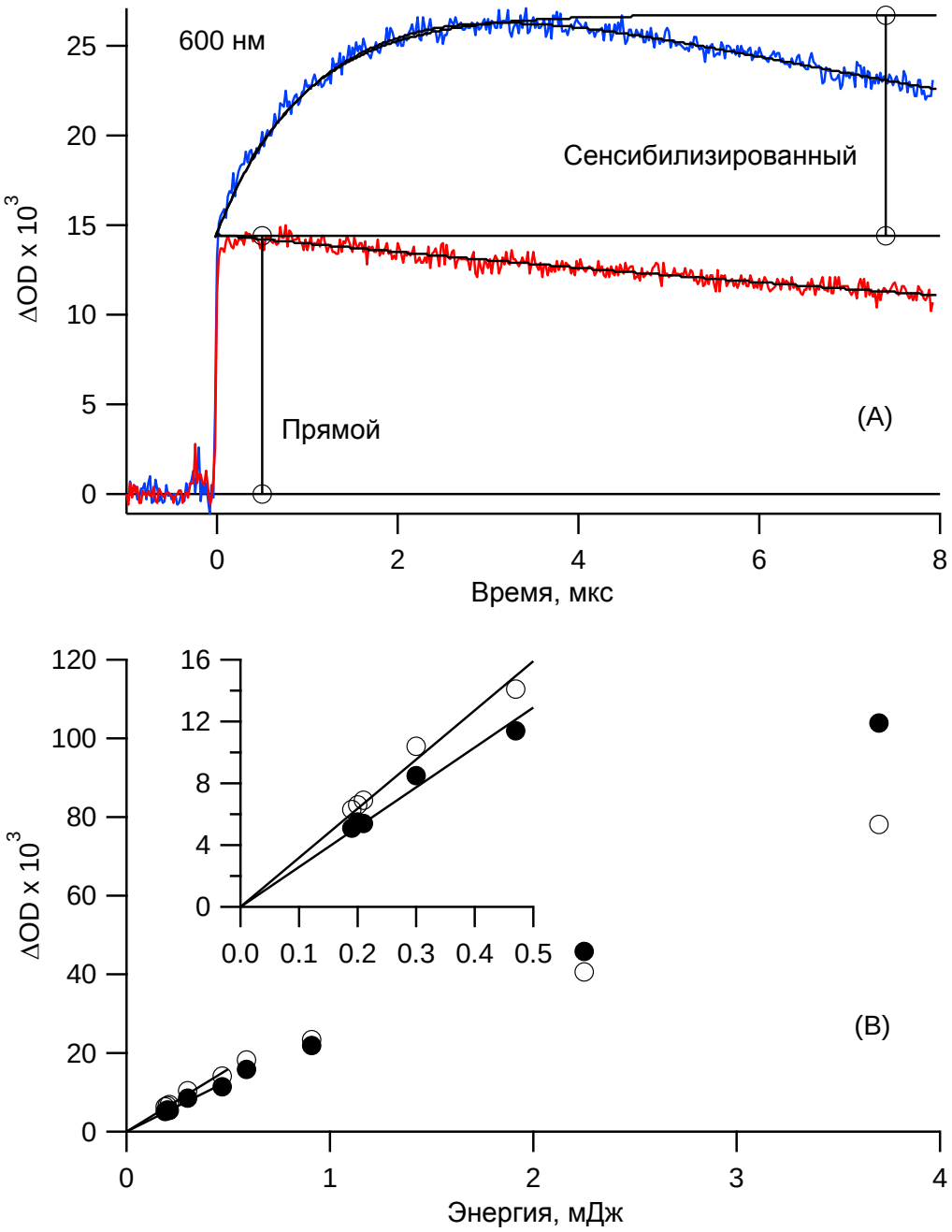

Рисунок 23. (A) Кинетики промежуточного поглощения, зарегистрированные на 600 нм при анаэробном фотолизе на 308 нм водного раствора KNA (1.7×10^{-4} M) в отсутствии Ac (красная линия) и в присутствии 1.7 M Ac (синяя линия). (B) Зависимость интенсивности образования триплетного состояния от энергии лазерного импульса для прямого (черные круги) и сенсибилизированного ацетоном (белые круги) фотолизов. Вставка: диапазон энергий, использованный для линейной аппроксимации.

4.3 Фотохимические свойства KNA

Фотохимические свойства KNA схожи со свойствами родственного соединения 4HQN [36] (таблица 6). Главное отличие заключается в меньшем значении константы скорости

внутренней конверсии, что приводит к существенно большему квантовому выходу триплетного состояния KNA (0.35 для 4HQN и 0.82 для KNA, таблица 6). Схема реакций, протекающих в результате фотолиза KNA, представлена ниже:

$$KNA \xrightarrow{h\nu} {}^{S1}KNA \rightarrow {}^{T}KNA \rightarrow {}^{S0}KNA$$

Таким образом, триплетное состояние является единственным короткоживущим интермедиатом, образующимся в процессе фотолиза KNA. Оно характеризуется интенсивной и узкой полосой поглощения с максимумом на 600 нм. Даже при низких значениях энергии лазерного импульса (около 2 мДж/импульс) основным каналом гибели триплетного состояния KNA является триплет-триплетная аннигиляция с соотношением констант $k_{T\text{-}T}/\varepsilon_T \approx 5\times10^5$ $с^{-1}см$, где $k_{T\text{-}T}$ константа скорости триплет-триплетной аннигиляции, а ε_T коэффициент экстинкции триплетного состояния KNA на длине волны 600 нм. Это говорит о том, что время жизни триплетного состояния KNA превышает 10 мкс [151].

4.4 Фотохимические свойства KNY

В процессе лазерного импульсного фотолиза водных растворов KNY мы наблюдаем образование двух промежуточных интермедиатов – енольной формы KNY в основном состоянии и триплетного состояния KNY, а также двух конечных продуктов – 4HQN и DHQN (Схема 6). Однозначно показано, что 4HQN является продуктом термического разложения интермедиата, отнесенного к енольной форме KNY. Это подтверждается одинаковыми скоростями формирования 4HQN и распада енольной формы KNY, а также отсутствием зависимости этого процесса от присутствия кислорода в растворе.

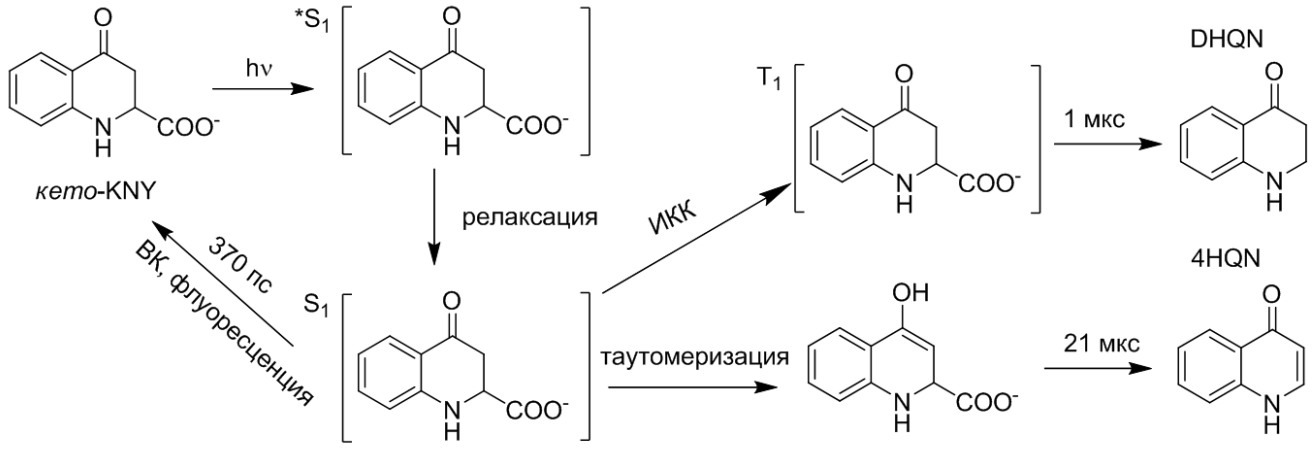

Схема 6. Схема фотоиндуцированных реакций KNY.

Определить механизм гибели триплетного состояния KNY из экспериментов по лазерному импульсному фотолизу оказалось невозможным, так как спектр поглощения DHQN в диапазоне 300-400 нм практически совпадает со спектром KNY. Возможны два пути реакции:

либо происходит восстановление основного состояния через внутреннюю конверсию, либо происходит химическая реакция с выходом продукта DHQN.

Результаты стационарного фотолиза свидетельствуют в пользу второго варианта, так как эффективное формирование DHQN происходит только в анаэробных условиях, в то время как тушение триплетного состояния этот процесс блокирует. Другим подтверждением этого вывода служит приблизительно одинаковые квантовые выходы образования триплетного состояния KNY и основного состояния DHQN. Для подтверждения этого механизма был произведен эксперимент по сенсибилизированному ацетоном фотолизу водного раствора KNY. Для этого образец, содержащий 3.4×10^{-4} M KNY и 1.4 M ацетона (pH 7.2), был облучен XeCl лазером (0.5 мДж/ импульс, 308 нм). В процессе облучения отбирались пробы в размере 15 мкл; концентрации KNY и DHQN определялись при помощи ВЭЖХ. Квантовые выходы разложения исходного соединения и образования продукта были рассчитаны как соотношения числа разложившихся/образовавшихся молекул к числу поглотившихся квантов света. В проведенном эксперименте эти величины составили значения 0.30 и 0.26 соответственно. Эти значения выше, чем значения, полученный в результате прямого фотолиза KNY, что еще раз подтверждает наше предположение о том, что предшественником образования DHQN является триплетное состояние KNY [151].

Таким образом, мы получаем полную картину процессов, происходящих в результате фотолиза KNY (Схема 6). Основными каналами деактивации возбужденного S_1 состояния KNY являются внутренняя конверсия, интеркомбинационная конверсия, флуоресценция и химические реакции (например, такие, как перенос электрона, разрыв связи, внутримолекулярная перегруппировка, фотоионизация). Поскольку мы не наблюдаем образования радикалов, то разрыв связей и перенос электрона можно исключить. Единственной химической реакцией, происходящей с S_1 состоянием KNY, является таутомеризация в енольную форму. Анализ полученных нами констант скорости деактивации S_1 состояния (а именно $k_{вк}$, $k_{икк}$, $k_{фл}$ и $k_{енол}$, представленных в таблице 6) позволяет сделать следующие выводы. Основным каналом гибели S_1 состояния KNY является внутренняя конверсия в основное состояние с квантовым выходом $\Phi_{вк} \approx 0.96$ и константой скорости $k_{вк} = 2.6\times10^{9}$ c^{-1}. Другие каналы, а именно флуоресценция ($\Phi_{фл} = 0.0075$, $k_{фл} = 2.0\times10^{7}$ c^{-1}), интеркомбинационная конверсия в триплетное состояние ($\Phi_{икк} = 0.022$, $k_{икк} = 5.9\times10^{7}$ c^{-1}) и таутомеризация в енольную форму ($\Phi_{енол} = 0.012$, $k_{енол} = 3.2\times10^{7}$ c^{-1}) дают заметно меньший вклад в общую деактивацию S_1 состояния KNY. Основным каналом гибели триплетного состояния KNY является декарбоксилирование ($k = 1.0\times10^{6}$ c^{-1}) с образованием DHQN, тогда как декарбоксилирование енольной формы приводит к образованию 4HQN. Была исследована температурная зависимость

этого процесса и, помимо константы скорости $k_{(300\ K)} = 4.7\times10^4\ c^{-1}$, были получены следующие Аррениусовские параметры: $A = 6.8\times10^9\ c^{-1}$, $E_a = 30$ кДж/моль.

Таблица 6 суммирует основные фотохимические свойства KN и продуктов его разложения: KNA и KNY, исследованных в этой работе и KN, 4HQN и XAN, фотохимические свойства которых были изучены ранее [26,36,37]. Из таблицы видно, что продукты разложения являются лучшими фотосенсибилизаторами, чем исходный KN. KNA, KNY и 4HQN обладают существенно большими временами жизни синглетного возбужденного состояния и квантовыми выходами триплетного состояния и фоторазложения. Эти отличия обусловлены различными механизмами внутренней конверсии для KN и других УФ-фильтров с одной стороны, и продуктов его термолиза с другой. Возбуждение KN приводит к локализации электронной плотности на карбонильном кислороде, что в свою очередь приводит к повышению способности молекулы образовывать водородные связи.

В образованной связи между молекулой KN и растворителем валентные колебания водородных связей выступают в роли акцепторных мод для безизлучательного перехода $S_1\rightarrow S_0$, то есть энергия электронного возбуждения переходит в энергию колебательного возбуждения водородных связей [138]. В KNY этот механизм, по всей видимости, менее эффективен. В случае с KNA и 4HQN растворитель не оказывает сколь либо существенного влияния на скорость внутренней конверсии. Это можно объяснить ароматическим сопряжением, что значительно уменьшает перенос заряда от атома азота на карбонильную группу после возбуждения. Это подтверждается также значительно меньшим Стоксовским сдвигом флуоресценции у KNA по сравнению с KNY ($\Delta\nu = 3.8\times10^3$ см$^{-1}$ для KNA и $\Delta\nu = 7.1\times10^3$ см$^{-1}$ для KNY, Рисунок 13). С другой стороны, известно, что присутствие атома азота в ароматической системе приводит к увеличению спин-орбитального взаимодействия, что ускоряет интеркомбинационную конверсию [153–156]. Подводя итог, можно сказать, что значение k_{BK} для этих соединений на порядок ниже, чем для KN, поэтому интеркомбинационная конверсия в триплетное состояние начинает играть важную роль в процессе деактивации возбужденного синглетного состояния, особенно для KNA и 4HQN.

XAN является исключением среди продуктов деградации KN: время жизни его синглетного состояния еще меньше, чем у KN (таблица 6), триплетное состояние в процессе фотолиза не наблюдалось [37], а фотостабильность в анаэробных условиях очень велика. Основным каналом дезактивации синглетного возбужденного состояния XAN является таутомеризация в енольную форму, которая в дальнейшем переходит обратно в кето форму в наносекундной шкале (и енольная, и кето формы в основном состоянии). Короткоживущая енольная форма может быть гораздо более реакционно активной, чем кето форма XAN, что может приводить к повреждению окружающих молекул. Известно, что облучение белков

хрусталика УФ-излучением в присутствии XAN приводит к окислению белков и их полимеризации [157,158]. В настоящей работе было обнаружено образование енольной формы KNY. Хотя скорость формирования и квантовый выход енольной формы KNY значительно ниже, чем в случае XAN, но, по-видимому, енольная форма KNY является более реакционно способной. Об этом свидетельствует тот факт, что енольная форма XAN эффективно восстанавливается в кето форму, в то время как енольная форма KNY, подвергаясь декарбоксилированию, образует продукт 4HQN. Нестабильность триплетного состояния и енольной формы KNY являются основными причинами фотохимической нестабильности этого соединения и, возможно, главной причиной, почему KNY не был обнаружен в хрусталике человека или животного. Вероятно, скорость образования KNY в хрусталике существенно ниже, чем скорость его распада, поэтому концентрация этого соединения в хрусталике крайне низкая.

Таблица 6. Времена жизни флуоресценции ($\tau_{фл}$); квантовые выходы флуоресценции ($\Phi_{фл}$), триплетного состояния ($\Phi_Т$), внутренней конверсии ($\Phi_{вк}$), таутомеризации ($\Phi_{енол}$), анаэробного ($\Phi_{фр}^{анаэр}$) и аэробного фоторазложения ($\Phi_{ФР}^{аэр}$); константы скорости флуоресценции ($k_{фл}$), интеркомбинационной конверсии ($k_{икк}$), внутренней конверсии ($k_{вк}$), таутомеризации ($k_{енол}$) для KN, KNA , KNY, 4HQN и XAN [151].

	$\tau_{фл}$, пс	$\Phi_{фл}$	$\Phi_Т$	$\Phi_{вк}$	$\Phi_{енол}$	$K_{фл}$, $с^{-1}$	$K_{икк}$, $с^{-1}$	$K_{вк}$, $с^{-1}$	$K_{енол}$	$\Phi_{фр}^{анаэр}$	$\Phi_{фр}^{аэр}$
KN	26.9±0.8	$(9.2±1.0)\cdot10^{-4}$	$(7.0±1.7)\cdot10^{-3}$	0.99	НО	$3.4\cdot10^{7}$	$2.6\cdot10^{8}$	$3.7\cdot10^{10}$	НИ	$(1.5±0.2)\cdot10^{-5}$	$(3.8±0.4)\cdot10^{-5}$
KNA	150±30	$(1.4±0.2)\cdot10^{-2}$	0.82±0.15	0.17	НО	$9.1\cdot10^{7}$	$5.5\cdot10^{9}$	$1.1\cdot10^{9}$	НИ	$(6.0±1.5)\cdot10^{-3}$	$(2.6±0.6)\cdot10^{-3}$
KNY	370±30	$(7.5±1.0)\cdot10^{-3}$	$(2.2±0.6)\cdot10^{-2}$	0.96	$(1.2±0.4)\cdot10^{-2}$	$2.0\cdot10^{7}$	$5.9\cdot10^{7}$	$2.6\cdot10^{9}$	$3.2\cdot10^{7}$	$(3.0±0.8)\cdot10^{-2}$	$(8±2)\cdot10^{-3}$
4HQN	110±11	$(1.1±0.1)\cdot10^{-2}$	0.35±0.07	0.64	НО	$1.0\cdot10^{8}$	$3.2\cdot10^{9}$	$5.8\cdot10^{9}$	НИ	НИ	НИ
XAN	11±1	$(1.0±0.1)\cdot10^{-3}$	НО	НИ	≈1	$9.1\cdot10^{7}$	НИ	НИ	$9.1\cdot10^{10}$	$<10^{-5}$	$(8.2±1.8)\cdot10^{-5}$

НО – не обнаружено;

НИ – не измерено;

4.5 Заключение главы

В данной главе представлены результаты исследования фотохимических свойств двух продуктов термического распада кинуренина: KNA и KNY. В отличии от УФ-фильтров, оба продукта проявляют себя гораздо более фотоактивными, чем исходный KN:

1) KNA эффективно образует триплетное состояние (≈ 80 %), которое характеризуется высокой реакционной активностью и способно вступать в реакции с белками хрусталика, модифицируя их и повреждая нативную структуру. Учитывая накопительный характер возрастных посттрансляционных модификаций белков, характерный для специфичных тканей хрусталика, можно предполагать, что присутствие KNA в хрусталике дает существенный вклад в образование и развитие катаракты. Такой высокий выход триплетного состояния делает данное соединение перспективным модельным сенсибилизатором для дальнейшего изучения реакций фотовозбужденных хромофоров хрусталика с белками, поскольку позволяет минимизировать вклад вторичной фотохимии в наблюдаемые эффекты.
2) Основным каналов гибели фотовозбужденного состояния KNY является внутренняя конверсия в основное состояние. KNY также образует как триплетное состояние (≈ 2%), так и енольную форму (≈ 1%). Оба промежуточных продукта нестабильны и быстро гибнут с образованием конечных продуктов DHQN и 4HQN, соответственно. Наличие в хрусталике как KNY, так и продуктов его фотолиза, может также вносить вклад в накопление посттрансляционных модификаций кристаллинов и образование патологий хрусталика.

Ранее присутствие в хрусталике такого класса низкомолекулярных соединений как УФ-фильтры рассматривалось только с точки зрения защиты тканей глаза (хрусталика и сетчатки) от негативного воздействия ультрафиолетового света: эффективно поглощая УФА-излучение, кинуренины переводят полученную энергию в тепловую без инициации дальнейших реакций с белками или другими низкомолекулярными соединениями в тканях хрусталика. Однако исследование продуктов распада УФ-фильтров показывает двойственную роль кинуренинов в фотоиндуцированных процессах в тканях глаза.

Исследование фотохимических свойств данных продуктов термического разложения кинуренина было произведено для водных буферных растворов KNA и KNY. Однако стоит отметить, что каналы и скорости гибели фотовозбужденного состояния могут существенно зависеть от свойств окружения фотовозбужденных молекул Среда хрусталика, помимо нейтрального значения pH и низкой концентрации кислорода, которые были учтены в данном

исследовании, характеризуется высоким коэффициентом вязкости за счет плотно упакованных белков хрусталика. Поэтому для установления более достоверной роли данных соединений в фотоиндуцированных процессах в тканях хрусталика необходимо исследовать влияние вязкости раствора на фотохимические свойства KNA и KNY.

Глава 5 Влияние вязкости среды на фотохимические свойства УФ-фильтров и их продуктов

Ранее в работе уже упоминалось, что особенностью УФ-фильтров является высокая скорость внутренней конверсии из фотовозбужденного S^1 состояния в основное S^0 состояние, которая в водном растворе протекает в пикосекундном временном диапазоне [102,138]. В результате происходит эффективная трансформация поглощенной хромофорами световой энергии в тепло с квантовым выходом более 99% [138,147]. Термический и/или фотохимический распад УФ-фильтров приводит к образованию целого ряд продуктов, таких как KNA, KNY, XAN, 4HQN [29–31,159,160]. В предыдущих главах данной работы и в ряде статей было показано, что фотохимическая активность этих соединений значительно выше, чем у исходных УФ-фильтров, а фотохимическая стабильность намного ниже [37,147,151,161]. Химические структуры УФ-фильтра KN и продуктов его распада KNA и KNY приведены в прошлой главе (Схема 5).

Напомним, что фотофизические процессы, протекающие при поглощении кванта света органической молекулой, включают в себя следующие каналы гибели синглетного возбужденного состояния S^1: внутреннюю конверсию, интеркомбинационную конверсию и флуоресценцию, вклады которых определяются величиной константы скорости этого процесса. Так, для KN и KNY в водном растворе основным каналом гибели S^1 состояния является внутренняя конверсия, для KNA –интеркомбинационная конверсия, а для 4HQN вклады этих двух процессов сопоставимы. С биологической точки зрения, наибольшую опасность для ткани хрусталика представляет формирование триплетных состояний, способных вступать в реакции с белками хрусталика и вызывать в них окислительные модификации. Важно заметить, что в цитоплазме клеток хрусталика за счет высокой концентрации плотно упакованных кристаллинов вязкость среды заметно выше, чем в водном растворе [162]. Повышенная вязкость окружающей среды может оказать существенное влияние на скорости вышеперечисленных процессов гибели S^1 состояния и привести к значительному изменению квантовых выходов внутренней конверсии, интеркомбинационной конверсии и флуоресценции.

В этой главе представлены результаты исследования влияния вязкости среды на фотофизические процессы, протекающие при УФ-облучении двух ранее исследованных нами продуктов термолиза KN, KNA и KNY [151]. Изменение вязкости среды осуществлялось путем варьирования доли глицерина в бинарных водно-глицериновых смесях, используемых в качестве растворителя. Целью работы являлось установление влияния вязкости среды на квантовые выходы основных каналов гибели фотовозбужденных синглетных состояний этих соединений.

5.1. Фотолиз KNA

Как было показано ранее, в нейтральном водном растворе спектр возбуждения флуоресценции KNA практически совпадает со спектром поглощения, а спектр эмиссии не зависит от длины волны возбуждения [151]. Аналогичная ситуация наблюдается и при облучении KNA в водно-глицериновых смесях: при облучении образца различными длинами волн и при различных соотношениях вода/глицерин в спектре эмиссии наблюдается полоса с максимумом на 380 нм. Это свидетельствует о том, что в водно-глицериновых смесях KNA присутствует в единственной таутомерной форме (предположительно – кето-форме). Измерения зависимости квантового выхода флуоресценции KNA от объемной доли глицерина в водно-глицериновых смесях проводилось при длине волны возбуждения 330 нм. Результаты измерений показаны на рисунке 24 А. Видно, что при повышении доли глицерина вплоть до 65% квантовый выход флуоресценции практически не меняется, и только при доле глицерина выше 70% наблюдается небольшое повышение выхода флуоресценции (примерно в 1.5 раза). Заметим, что вязкость 65% смеси глицерин/вода составляет более 7 сПз, т.е. почти на порядок больше, чем вязкость водного раствора; вязкость 86% смеси достигает 78 сПз. Таким образом, квантовый выход флуоресценции KNA очень слабо зависит от вязкости раствора [163].

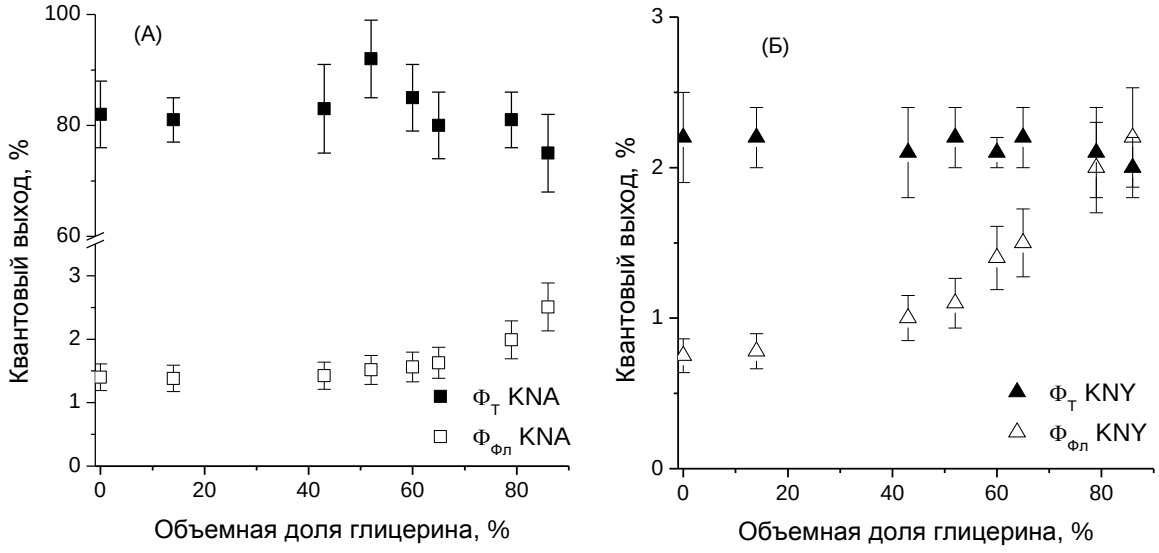

Рисунок 24. Зависимость квантовых выходов флуоресценции ($\Phi_{фл}$, открытые символы) и триплетных состояний (Φ_T, сплошные символы) от объемной доли глицерина для KNA (А, квадраты) и KNY (Б, треугольники), измеренных при комнатной температуре (25°C).

Зависимость квантового выхода триплетного состояния KNA от объемной доли глицерина в водно-глицериновых смесях проводилась на установке лазерного импульсного фотолиза. При лазерном облучении (355 нм) образца с раствором KNA наблюдается

мгновенное формирование триплетного состояния с максимумом поглощения на 600 нм, которое гибнет в микросекундном временном диапазоне по бимолекулярному закону в реакции триплет-триплетной аннигиляции. В настоящей работе для каждой водно-глицериновой смеси измерения проводились при четырех интенсивностях лазерного импульса в диапазоне от 0.15 до 0.8 мДж, для каждой интенсивности определялось отношение начального промежуточного поглощения на длине волны 600 нм к интенсивности лазерного импульса; полученные данные усреднялись. На основании полученных результатов рассчитывался квантовый выход триплетного состояния для каждой водно-глицериновой смеси относительно квантового выхода триплетов в водном растворе, принятого равным Φ_T = 82% на основании данных 4 главы. Рисунок 24 А демонстрирует, что выход триплетных состояний KNA не зависит от вязкости раствора: при изменении вязкости от 0.84 сПз (водный раствор) до 78 сПз (86% глицерина) квантовый выход триплетов остается на уровне Φ_T = 80±10% [163].

Полученные зависимости выходов флуоресценции и триплетных состояний от доли глицерина в смеси (рисунок 24 А) хорошо объясняются в рамках предложенной ранее схемы фотохимических превращений для данного соединения. Основным каналом гибели фотовозбужденного синглетного состояния является интеркомбинационная конверсия, скорость которой для KNA слабо зависит от вязкости раствора. Наиболее зависимый от вязкости канал – внутренняя конверсия – вносит незначительный вклад в гибель S^1 состояния KNA.

5.2 Фотолиз KNY

Ранее нами было установлено, что гибель синглетного возбужденного состояния S^1 KNY в водном растворе происходит за счет внутренней конверсии ($\Phi_{ВК}$ = 96%), интеркомбинационной конверсии (Φ_T = 2.2%), таутомеризации в енольную форму ($\Phi_{енол}$ = 1.2%), а также флуоресценции ($\Phi_{фл}$ = 0.75%). Гибель триплетного состояния KNY приводит к образованию DHQN, а енольной формы – к образованию 4HQN [151]. При фотолизе KNY в водно-глицериновых смесях (длина волны возбуждения 375 нм) обнаружено значительное увеличение интенсивности флуоресценции при увеличении доли глицерина в смеси (рисунок 25). Также наблюдается сдвиг полосы эмиссии в синюю область видимого спектра (с 535 нм до 515 нм, вставка на рисунке 25), сопровождаемый небольшим сдвигом полосы поглощения в красную область (с 380 до 385 нм, данные не приведены). Похожие изменения в спектрах поглощения и эмиссии наблюдались для кинуренина при переходе от водного раствора к органическому растворителю [138]. Сдвиг полосы эмиссии следует связать с уменьшением эффективности сольватации S^1 состояния в присутствии глицерина за счет ослабления межмолекулярных водородных связей [163].

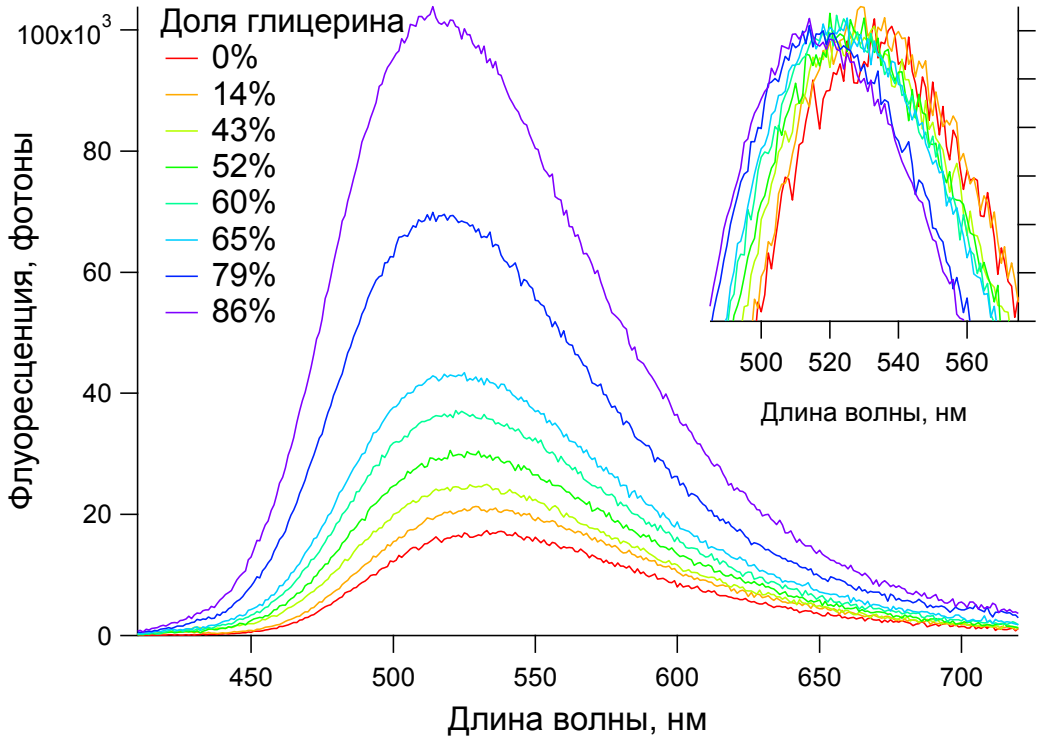

Рисунок 25. Спектры эмиссии, зарегистрированные при возбуждении на 375 нм KNY в бинарных смесях вода-глицерин при комнатной температуре (25°C). Интенсивность спектров скорректирована на поглощение образцов на длине волны возбуждения. Вставка: те же спектры после нормализации.

Анализ кинетики флуоресценции (рисунок 26 А) показывает, что в чистом буфере излучение фотовозбужденного KNY спадает моноэкспоненциально с временной константой 0.34 нс. Наблюдается также более медленная компонента с временной константой 3.0 нс, однако интенсивность этой компоненты примерно в 500 раз меньше. Эта компонента была отнесена к флуоресцентной примеси, образующейся в растворе в результате разложения исходного соединения: интенсивность этой компоненты заметно увеличивается со временем стояния раствора KNY при комнатной температуре, а также под действием света.

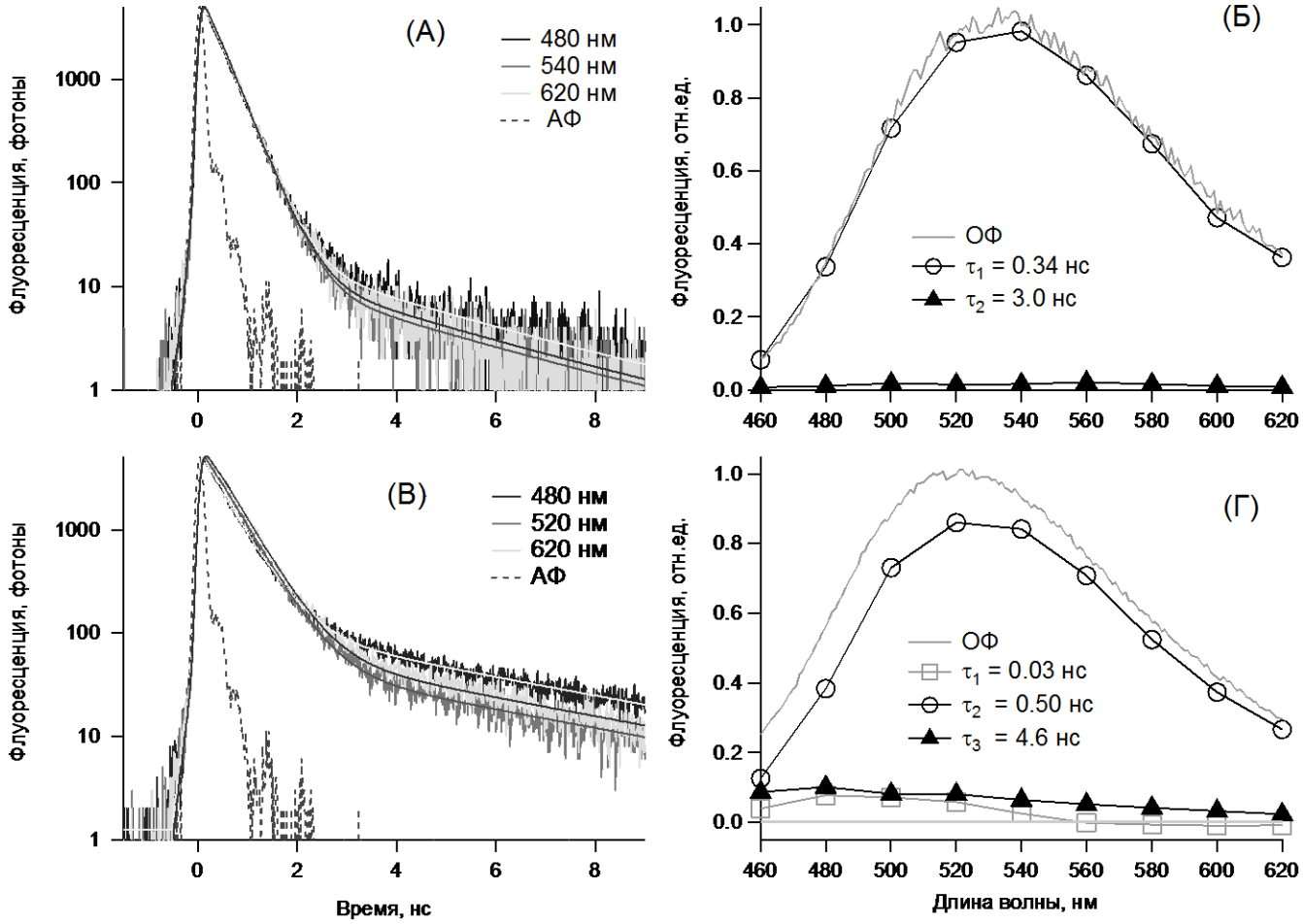

Рисунок 26. (А, В) Кинетические кривые и (Б, Г) спектры фракционных долей различных компонент гибели флуоресценции KNY в водно-глицериновых бинарных смесях с содержанием (А, Б) 0% и (В, Г) 65% глицерина, зарегистрированные на различных длинах волн при возбуждении на 375 нм при комнатной температуре (25°C). (А, В): Плавными линиями представлены расчетные кривые, пунктирными линиями – аппаратная функция (АФ) прибора. (Б, Г): Сплошными линиями представлены спектры общей флуоресценции (ОФ).

При повышении доли глицерина в смеси происходят следующие изменения в спектрально-кинетических параметрах флуоресценции: временные константы обеих компонент увеличиваются вплоть до соответственно 1.0 нс и 4.6 нс (доля глицерина 86%); начальная интенсивность первой компоненты с ростом доли глицерина в смеси практически не меняется, в то время как интенсивность второй компоненты значительно возрастает (данные не приведены). В качестве примера, несколько кинетических кривых гибели флуоресценции KNY в смеси с объемным содержанием 65% приведены на рисунке 26 В. Следует отметить, что скорость образования флуоресцентных продуктов заметно увеличивается в присутствии глицерина, что объясняет существенное увеличение доли компоненты с более длинным временем жизни. Кроме того, при высокой доле глицерина наблюдается очень быстрая гибель сигнала на синем краю полосы эмиссии KNY и соответствующий ей рост сигнала на красном

краю полосы эмиссии с характерными временами 30, 50 и 85 пс при объемных долях глицерина 65, 79 и 86%, соответственно. Такие спектральные изменения характерны для релаксации возбужденного S^1 состояния окружающим растворителем [138], поэтому эту компоненту следует отнести к релаксации возбужденного S^{1*} состояния KNY к S^1 состоянию. В менее вязких смесях эта релаксация происходит со скоростью, превышающей временное разрешение нашей установки (около 30 пс), и только при повышении вязкости раствора свыше 10 сПз скорость релаксации снижается настолько, что она становится заметной. Полученные результаты показывают трехкратное увеличение значения времени жизни флуоресценции ($\tau_{фл}$) KNY при изменении объемной доли глицерина в смеси от 0 до 86% (таблица 7), причем основные изменения в значении $\tau_{фл}$ наблюдаются при содержании глицерина от 60 до 86%.

Время-разрешенные измерения гибели флуоресценции KNY дают возможность определить вклады различных компонент в общую флуоресценцию, наблюдаемую при стационарном измерении. В качестве примера на рисунках 26 Б и Г приведены спектральные зависимости долей различных компонент для KNY в общую флуоресценцию для смесей с содержанием 0 и 65% глицерина. Используя интегральные значения этих долей, а также известное значение квантового выхода флуоресценции KNY в нейтральном водном растворе из четвертой главы ($Ф_{фл}$ = 0.75%), были определены значения $Ф_{фл}$ для KNY в водно-глицериновых смесях (рисунок 24 Б и таблица 7). Из полученных результатов следует, что хотя общий выход флуоресценции в смеси с 86% глицерина по сравнению с водным раствором возрастает в пять раз, значительная часть флуоресценции в вязких растворах относится к примеси. Значение квантового флуоресценции $Ф_{фл}$ самого KNY при увеличении объемной доли глицерина до 86% увеличивается примерно в три раза за счет трехкратного увеличения времени $\tau_{фл}$.

Таблица 7. Значения времени жизни флуоресценции ($\tau_{фл}$), квантового выхода флуоресценции ($\Phi_{фл}$), триплетного состояния (Φ_T), таутомеризации ($\Phi_{енол}$), внутренней конверсии ($\Phi_{вк}$) и констант скорости флуоресценции ($k_{фл}$), интеркомбинационной конверсии ($k_{икк}$), таутомеризации ($k_{тау}$) и внутренней конверсии ($k_{вк}$) для KNY в бинарных смесях вода-глицерин при комнатной температуре (25°C) [163].

Доля глицерина, %	Вязкость*, сПз	$\tau_{фл}$, нс	$\Phi_{фл}$	Φ_T	$\Phi_{енол}$	$\Phi_{вк}$	$k_{фл}$, 10^7 $с^{-1}$	$K_{икк}$, 10^7 $с^{-1}$	$k_{тау}$, 10^7 $с^{-1}$	$K_{вк}$, 10^9 $с^{-1}$
0	0.8	0.34	0.75*	2.2*	1.2**	95.8	2.2	6.4	3.5	2.8
14	1.1	0.35	0.78	2.2	–***	96.2	2.2	6.2	–***	2.7
43	3.1	0.36	1.0	2.2	0.4	96.4	2.8	6.1	1.1	2.7
52	4.7	0.38	1.1	2.2	–***	96.3	3.0	5.9	–***	2.6
60	7.3	0.43	1.4	2.2	–***	96.0	3.3	5.2	–***	2.3
65	10	0.48	1.5	2.2	–***	95.9	3.2	4.6	–***	2.0
79	31.6	0.82	2.0	2.2	–***	95.4	2.5	2.7	–***	1.2
86	68.1	1.05	2.2	2.2	0.4	95.2	2.1	2.1	0.4	0.9

* табличные значения [164]

** значения установлены ранее (см. глава 4) [151]

*** значения не были определены

Квантовый выход триплетных состояний KNY измерялся с использованием установки лазерного импульсного фотолиза по промежуточному поглощению на длине волны 450 нм – максимуме спектра поглощения ^{T}KNY. Измерения проводились по той же схеме, как и при фотолизе KNA, однако при более высоких энергиях лазерного импульса (в диапазоне от 15 до 50 мДж). Было установлено, что значение Φ_T при фотолизе KNY не зависит от доли глицерина в смеси в диапазоне от 0 до 86% (рисунок 24 Б).

Для исследования влияния глицерина на выход продуктов фотолиза были проведены эксперименты по анаэробному фоторазложению KNY с последующим хроматографическим анализом продуктов. Эксперименты были выполнены для смесей с содержанием глицерина 0, 43 и 86%. Как и в случае с водным раствором, в присутствии глицерина основными продуктами распада являются DHQN, образующийся из енольной формы KNY, и 4HQN, образующийся из триплетного состояния KNY. Скорость образования 4HQN не зависит от доли глицерина, что хорошо согласуется с независимостью величины Φ_T от присутствия трехатомного спирта (рисунок 24 Б). В то же время скорость образования DHQN в присутствии 86% глицерина

уменьшается в три раза по сравнению с водным раствором (данные не приведены). Этот результат указывает на то, что скорость таутомеризации KNY в возбужденном состоянии существенно замедляется в вязком растворе.

На основании полученных результатов были рассчитаны константы скорости излучательной гибели S^1 KNY ($k_{фл} = Ф_{фл}/\tau_{фл}$), интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние ($k_{икк} = Ф_{Т}/\tau_{фл}$), таутомеризации в енольную форму ($k_{тау} = Ф_{енол}/\tau_{фл}$) и внутренней конверсии в основное состояние ($k_{вк} = Ф_{вк}/\tau_{фл} = (1 - Ф_{фл} - Ф_{Т} - Ф_{енол})/\tau_{фл}$) для KNY в водно-глицериновых смесях; полученные значения представлены в таблице 7. Можно видеть, что величина $k_{фл}$ практически не зависит от содержания глицерина, тогда как значения $k_{икк}$ и $k_{вк}$ уменьшаются в три раза, а $k_{тау}$ в десять раз при увеличении доли глицерина от 0 до 86% [163].

Ранее заметное (на порядок и более) уменьшение значения $k_{вк}$ было обнаружено для кинуренина при переходе от водного раствора к спиртам [138]. В фотовозбужденной молекуле кинуренина основным каналом дезактивации является внутренняя конверсия, обусловленная водородными связями с молекулами растворителя. Поэтому для кинуренина наблюдаемый эффект был отнесен к ослаблению межмолекулярных водородных связей в спиртах по сравнению с водным раствором. Весьма вероятно, что этот механизм играет важную роль и для KNY, и наблюдаемые изменения спектральных и фотофизических свойств KNY в водно-глицериновых смесях относятся как к изменению свойств растворителя (прежде всего, его способности быть донором водородной связи), так и к увеличению вязкости раствора.

5.3 Заключение главы

Таким образом, проведенное исследование показало, что для соединения KNA, для которого основным каналом дезактивации S^1 состояния является интеркомбинационная конверсия, изменение вязкости растворителя незначительно влияет на физические процессы в фотовозбужденном состоянии. Основным каналом гибели S^1 состояния KNY является внутренняя конверсия, скорость которой существенно зависит от параметров среды. Поэтому для KNY с ростом доли глицерина в водно-глицериновой смеси наблюдаются заметные изменения как в квантовом выходе флуоресценции, так и в выходе продуктов реакций. Наблюдаемые явления свидетельствуют в пользу недооценки возможной негативной роли УФ-фильтров и продуктов их разложения в тканях хрусталика. Потенциальным источником фотоповреждения белков хрусталика является триплетное состояние, квантовый выход которого для УФ-фильтров определялся только в водном растворе, но в вязкой среде может быть значительно выше.

ГЛАВА 6 KNA-сенсибилизированный фотолиз альфа-кристаллина в анаэробных условиях

В предыдущих частях данной работы было показано, что продукты термолиза УФ-фильтров в процессе фотовозбуждения эффективно образуют реакционно-активное триплетное состояние [151]. Кроме того, сами УФ-фильтры, хоть и с низким квантовым выходом, но также могут образовывать триплетное состояние. В пятой главе нами было установлено, что в условиях вязкой среды, как, например, плотное белковое наполнение клеток хрусталика, квантовый выход триплетного состояния может существенно возрастать за счет уменьшения скорости внутренней конверсии [163]. Опасность образования триплетного состояния обусловлена тем, что, находясь в нем, хромофоры могут реагировать непосредственно с белками хрусталика (фотосенсибилизация 1 типа), либо модифицировать белки через образование активных форм кислорода (фотосенсибилизация 2 типа) [165,166]. Подавляющее большинство исследований, посвященных фотоиндуцированному окислению белков в присутствии хромофоров, проводилось в аэробных условиях [104,105,167–170], что плохо соответствует среде хрусталика с обедненным содержанием кислорода (< 2 мкМ) [171].

Для дальнейшего анализа роли УФ-фильтров в образовании катаракты целесообразно исследование механизма взаимодействия УФ-фильтров в триплетном состоянии с белками хрусталика в анаэробных условиях. Использование естественных УФ-фильтров затруднено низкими выходами триплетного состояния, что ведет к осложнению наблюдаемых эффектов вкладом от вторичной фотохимии. Поэтому в данной главе будут представлены результаты исследования фотохимических реакций с участием изученного нами продукта распада кинуренина – KNA. Данное соединение эффективно образует триплетное состояние с квантовым выходом ≈ 80% (см. главу 4). Структурные особенности кристаллинов незначительно меняются в пределах класса млекопитающих; для данного этапа исследования использовались альфа-кристаллины бычьего хрусталика. При этом важно отметить использование белков, выделенных из живого организма, а не синтезированных – это позволяет работать с моделью, содержащей все естественные посттрансляционные модификации.

6.1 Фотолиз альфа-кристаллинов с присутствием KNA

Как было установлено ранее, при фотолизе KNA эффективно образует триплетное состояние с максимумом поглощения на 600 нм (Рисунок 19), основным каналом гибели которого в отсутствии тушителей является триплетная аннигиляция (данные представлены в главе 4). Однако при наличии тушителей триплетное состояние KNA гибнет экспоненциально с константой скорости псевдопервого порядка (k_{obs}):

$$k_{obs} = k_0 + k_т \times C_т, \quad (11)$$

где $k_т$ – константа тушения, а $C_т$ – концентрация тушителя.

Сотрудником нашей лаборатории, Сормачевой Екатериной Дмитриевной, были проведены эксперименты по тушению триплетного состояния KNA набором аминокислот (Trp, Tyr, Cys), антиоксидантов (Asc, GSH), кислородом и основным структурным белком хрусталика – альфа-кристаллином (бычьим), в ходе которого были измерены соответствующие константы скорости тушения ^{T}KNA [172]. В качестве растворителя были использованы фосфатный буфер (150 мМ) и фосфатный буфер с добавлением мочевины (6 М). Предварительные эксперименты по фотолизу KNA с альфа-кристаллином проводились в буферном растворе, но заметного тушения триплетного состояния KNA не наблюдалось даже при концентрации белка около 12 мг/мл. Данный эффект объясняется тем, что в водных буферных растворах мономеры альфа-кристаллина образуют мультимеры с молекулярной массой от 800 до 1200 кДа. Каждый такой мультимер содержит порядка 50 молекул белка, что, соответственно, приводит к падению концентрации тушителей в 50 раз и объясняет отсутствие тушения триплетного состояния KNA – в таких условиях основными каналами гибели ^{T}KNA является тушение остаточным кислородом и триплетная аннигиляция. Увеличение концентрации альфа-кристаллина возможно только до некоторого предела, обусловленного техническими возможностями проведения эксперимента, и недостаточно для наблюдения заметного тушения. Поэтому данные эксперименты проводились в присутствии денатурирующего агента (6 М мочевины), который не позволял альфа-кристаллину переходить в мультимерную форму, сохраняя тем самым высокую концентрацию потенциальных тушителей. При использовании раствора мочевины все константы примерно в 1,5-2 раза ниже, чем аналогичные для водного буферного раствора. Этот эффект следует отнести к увеличению вязкости раствора за счет очень высокой концентрации мочевины [173]. Полученные данные приведены в таблице 8.

Таблица 8. Константы скорости тушения триплетного KNA аминокислотами, антиоксидантами и альфа-кристаллином, измеренные для растворов фосфатного буфера и фосфатного буфера с добавлением 6М мочевины [172].

Тушитель	$k_т$ / 10^8 $M^{-1}c^{-1}$	
	Фосфатный буфер	Фосфатный буфер + 6 М мочевины
Триптофан	25.3 ± 3.0	16.0 ± 2.2
Тирозин	5.2 ± 1.0	2.2 ± 0.4
Цистеин	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.2
Метионин	< 0.01	< 0.01
Фенилаланин	< 0.01	< 0.01
Гистидин	< 0.01	< 0.01
Аскорбиновая кислота	14.0 ± 1.4	11.0 ± 1.1
Глутатион	0.11 ± 0.02	0.05 ± 0.01
Кислород	23.0 ± 2.3	13.0 ± 1.3
Альфа-кристаллин	–	9.4 ± 0.9

На рисунке 27 показаны промежуточные спектры поглощения, полученные при фотолизе KNA с тушителями через 37 мкс после лазерного импульса. При сравнении спектров видно, что фотолиз альфа-кристаллина с KNA приводит к образованию радикалов аминокислотных остатков в составе белка: триптофанового (максимум поглощения на 510 нм) [174] и тирозинового (максимум поглощения на 410 нм) [175]. Наиболее вероятным механизмом реакции тушения триплетного состояния KNA ароматическими аминокислотами является перенос электрона с последующим депротонированием образовавшихся катион-радикалов. Однако мы не можем исключить возможность переноса атома водорода.

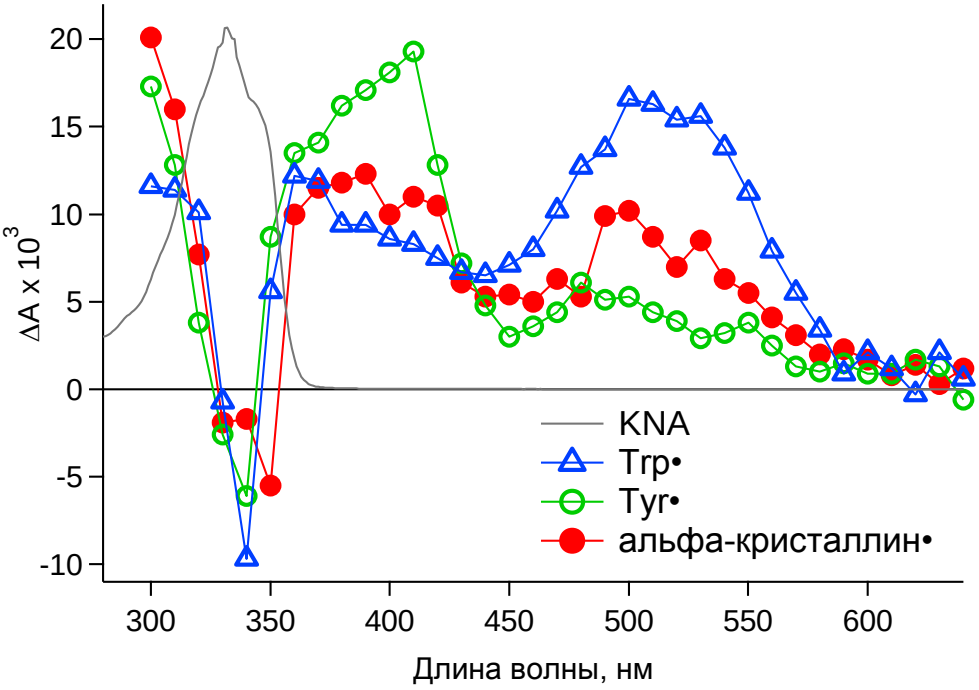

Рисунок 27. Промежуточные спектры поглощения, полученные при анаэробном фотолизе (355 нм) раствора KNA ($3{,}3\times10^{-4}$ М, фосфатный буфер 150 мМ, 6 М мочевины) через 37 мкс после возбуждения: синие треугольники – в присутствии $1{,}0 \times 10^{-3}$ М триптофана; зеленые круги – в присутствии $1{,}0 \times 10^{-3}$ М тирозина; красные кружки – в присутствии 2,8 мг/мл альфа-кристаллина. Серой линией показан спектр поглощения буферного раствора KNA с 6 М мочевины.

Важно отметить, что последующая гибель радикалов, образовавшихся при фотолизе KNA с аминокислотами Trp и Tyr, а также с альфа-кристалллином, не приводит к появлению новых полос поглощения. Это свидетельствует о том, что основным каналом гибели образовавшихся радикалов является обратный перенос электронов, приводящий к восстановлению исходных соединений [172].

6.2 Фотоиндуцированные модификации альфа-кристаллинов

6.2.1 Спектры поглощения и флуоресценции модифицированных белков

Эксперименты по сенсибилизированному фотолизу альфа-кристаллина проводились совместно с Шериным Петром Сергеевичем. Буферные растворы, содержащие 6 мг/мл альфа-кристаллина и 3×10^{-4} М KNA подвергались анаэробному стационарному фотолизу ртутной лампой в течение 20 минут. В ходе облучения отбирались аликвоты смеси, которые в дальнейшем подвергались анализу как в исходной форме, так и после процесса очистки от малых молекул для разделения вкладов модифицированных белков и продуктов фотолиза KNA в оптическое поглощение растворов.

На рисунке 28 А показаны нормированные спектры поглощения облученного с KNA альфа-кристаллина на разных стадиях облучения. С ростом дозы облучения наблюдается рост полосы поглощения с максимумом на 355 нм. Исходный альфа-кристаллин в данном диапазоне длин волн не поглощает, что говорит об образовании фотоиндуцированной модификации кристаллина. Концентрация модифицированного белка растет с дозой облучения. Аналогичные оптические измерения были произведены для серии экспериментов по фотолизу альфа-кристаллина и KNA с добавлением в раствор естественных антиоксидантов хрусталика в концентрациях, близких к значениям для здорового хрусталика человека (2 мМ Asc или 2 мМ GSH). При сравнении с первым экспериментом (Рисунок 28, Б, оранжевая линия), при равных дозах облучения в растворах с присутствием антиоксидантов наблюдается существенное снижение интенсивности поглощения полосы с максимумом на 355 нм (Рисунок 28, Б, зеленая и синяя линии). Кроме того, был проведен контрольный эксперимент без облучения образцов, но с полным повторением процедур барботирования раствора аргоном и всей системы пробоподготовки аликвот (Рисунок 28 А-Б, красная линия) для исключения влияния условий эксперимента на наблюдаемый процесс. Для контрольного образца появления полосы поглощения с максимумом на 355 нм не наблюдается, что говорит о фотоиндуцированной природе данной модификации [172].

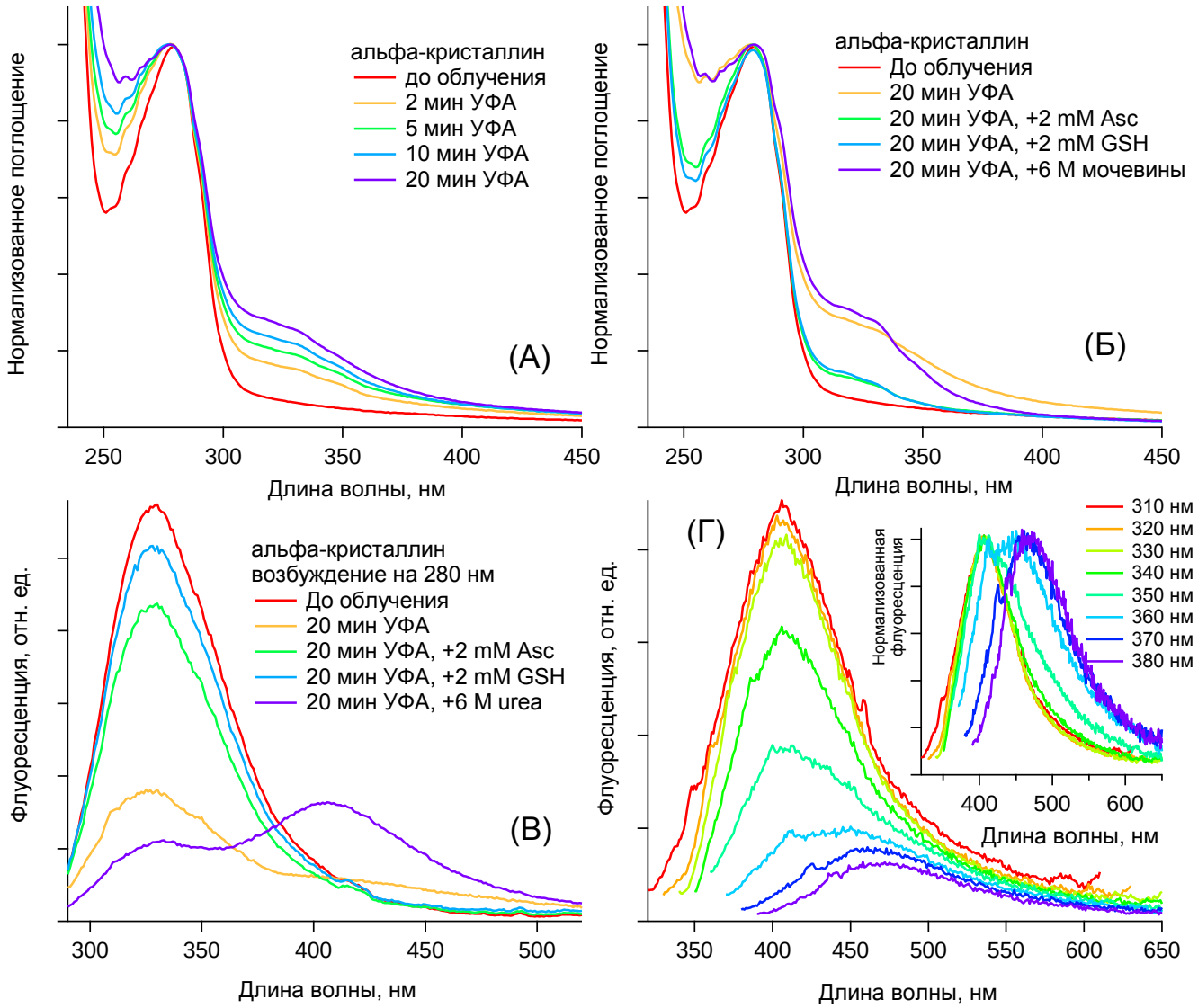

Рисунок 28. Нормализованные спектры оптического поглощение облученного альфа-кристаллина после очистки от низкомолекулярной фракции: (А) альфа-кристаллин с разными временами облучения; (Б) через 20 минут облучения с KNA в присутствии антиоксидантов или мочевины. (В) Спектры флуоресценции облученного в течение 20 минут альфа-кристаллина (с очисткой от малых молекул) в присутствии антиоксидантов или мочевины (возбуждение на 280 нм). (Г) Спектры флуоресценции облученного с KNA в течение 20 минут альфа-кристаллина, возбужденного на разных длинах волн (нормированные спектры во вставке).

Фотолиз альфа-кристаллинов с KNA также проводился с добавлением денатурирующего агента (6 М мочевины) для сравнения эффекта от взаимодействий фотовозбужденной KNA с мономерами и мультимерами альфа-кристаллина. Из рисунка 28 Б видно, что спектры облученных белков в обеих формах имеют схожие полосы поглощения в УФ-диапазоне, хоть и несколько отличающиеся по форме (фиолетовая линия – с мочевиной, оранжевая – нативные условия).

Кроме того, очищенные от малых молекул облученные белки были исследованы на флуориметре. В ходе работы были получены спектры флуоресценции альфа-кристаллина до и после облучения с KNA, в нативных и денатурирующих условиях, а также при добавлении антиоксидантов с использованием возбуждения на 280 нм (Рисунок 28 В). При возбуждении на 280 нм необлученного белка наблюдается полоса флуоресценции с максимум около 330 нм (флуоресценция триптофановых аминокислотных остатков в составе белка). Для облученного образца спектр флуоресценции, снятый в таких же условиях, существенно меняется: падает вклад от флуоресценции триптофановых аминокислотных остатков (при практически равном поглощении на 280 нм, вклад снижается примерно в 4 раза) и образуется новая полоса с максимумом на 405 нм. Из этого можно сделать вывод, что фотоиндуцированные модификации триптофановых аминокислотных остатков незначительно изменяют оптические свойства белка, но существенно меняют его флуоресцентные свойства. Данный эффект ослабевает при добавлении Asc или GSH, но существенно более выражен для мономерной формы альфа-кристаллина (6 М мочевины) (Рисунок 28 В) [172].

Как было замечено ранее, фотоиндуцированные модификации приводят к появлению новой полосы поглощения с максимумом около 355 нм. На рисунке 28 Г представлены спектры флуоресценции облученного с KNA альфа-кристаллина, полученные при возбуждении в диапазоне новой полосы поглощения. Из нормализации полученных спектров (Рисунко 28 Г, вставка) можно сделать вывод о наличии двух полос излучения с максимумами около 405 нм и 470 нм, что говорит об образовании в ходе фотолиза двух разных модификаций с окрашиванием в УФ-диапазоне и с разными флуоресцентными свойствами.

Естественными хромофорами белков, дающими наибольший вклад в поглощение в УФ-диапазоне, являются аминокислотные остатки Trp и Tyr. Они же дают основной вклад в естественную флуоресценцию белков хрусталика. Наблюдаемые нами флуоресцентные свойства модифицированных белков существенно отличаются от свойств нативных белков, что говорит в пользу модификаций триптифановых и тирозиновых аминокислотных остатков в составе альфа-кристаллинов.

6.2.2 Анализ изображений полиакриламидных гелей

На рисунке 29 представлены результаты гель-электрофореза в полиакриламидном геле: (А) первая дорожка – смесь стандартов (PageRuler, Fermentas) для определения размера белка; дорожки с 2 по 6 – раствор альфа-кристаллина с KNA в фосфатном буфере; дорожка 7 – с добавлением 6 М мочевины. Дорожка 2 содержит раствор без каких-либо стадий пробоподготовки, дорожка 3 – раствор подвергался барботированию аргоном в течение 20 минут. Дорожки с 4 по 6 содержат облученные растворы, которые также барботировались до

облучения и в ходе эксперимента. В образец, содержащийся в дорожке 5, была добавлена Asc (2 мМ), а в образце из 6-ой дорожки – GSH (2 мМ). Образец из 7 дорожки облучался в денатурирующих условиях без добавления антиоксидантов. Дорожки 2 и 3 практически идентичны, что говорит об отсутствии влияния барботирования раствора аргоном на целостность альфа-кристаллина. Контрольный эксперимент по фотолизу альфа-кристаллина без добавления сенсибилизатора KNA также не ведет к изменению целостности белка (Рисунок 30).

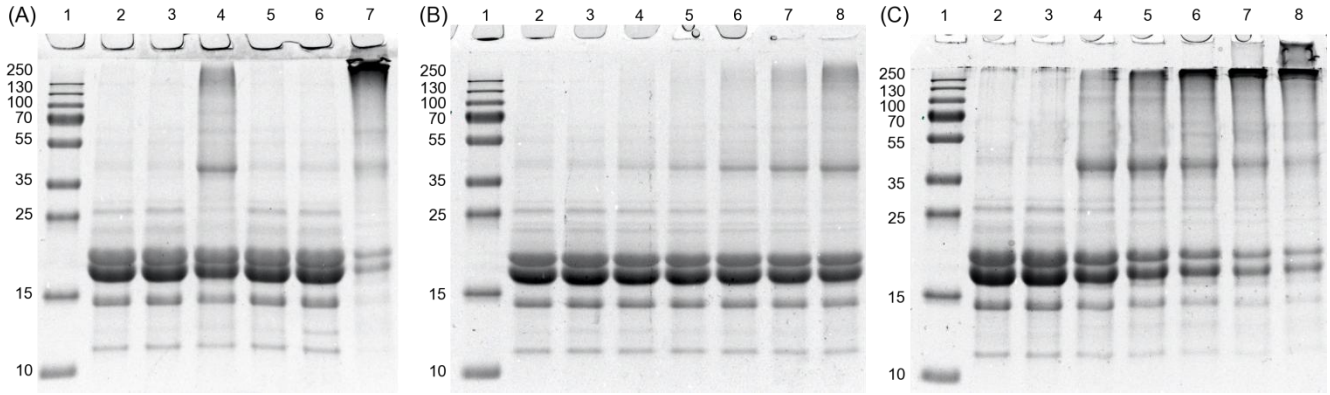

Рисунок 29. 15%-ДСН-ПАА гель, содержащий в дорожках: (A-C) 1 – смесь стандартов (PageRuler, Fermentas) для определения размера белка; 2- альфа-кристаллин без обработки; 3 – 20 минут барботирования аргоном. (A) нативные условия облучения, 4 – 20 минут фотолиза с KNA; 5 – с добавлением 2 мМ Asc; 6 – с добавлением GSH; 7 – в денатурирующих условиях (6 М мочевины). (B) 4-8: 1, 2, 5, 10 и 20 минут фотолиза в нативных условиях. (C) 4-8: 1, 2, 5, 10 и 20 минут фотолиза в денатурирующих условиях (6 М мочевины).

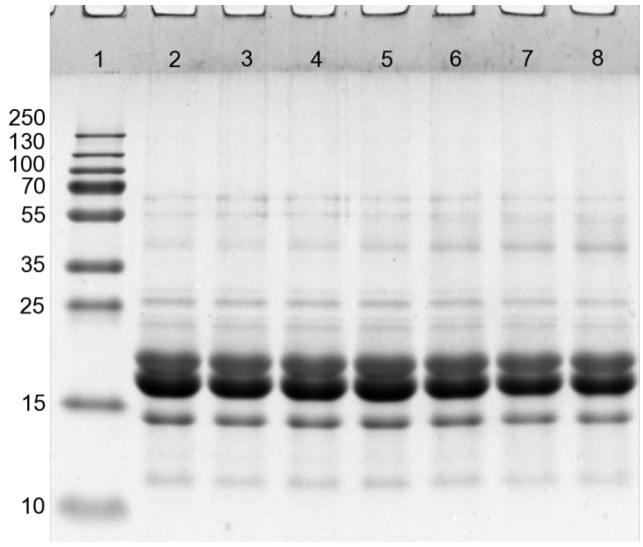

Рисунок 30.15%-ДСН-ПАА гель, содержащий в дорожках образцы, аналогичные гелю (B) на Рисунке 29, но без KNA в растворе.

Образование стабильных белковых агрегатов с высокой молекулярной массой (> 200 кДа) является основным изменением структуры белка, наблюдаемым через 20 минут УФ-облучения в присутствии KNA (Рисунок 29, A, 4 дорожка). В присутствии мочевины наблюдаемый эффект агрегации приводит к образованию еще больших мультимеров и практически полному исчезновению мономеров альфа-кристаллинов (Рисунок 29, A, 7 дорожка). Присутствие в растворе антиоксидантов полностью ингибирует наблюдаемый процесс формирования белковых агрегатов (Рисунок 29, A, 5-6 дорожки).

Перед нанесением на дорожки геля, в образцы добавлялась мочевина для денатурации белков и распада макромолекулярных комплексов, образованных за счет водородных связей. Кроме того, все образцы проходили стандартную обработку бета-меркаптоэтанолом и иодацетомидом для разрыва S-S связей. Образовавшиеся в процессе фотолиза агрегаты устойчивы к воздействию на них бета-меркаптоэтанола, что свидетельствует о том, что связи между мономерами не являются дисульфидными мостиками. Кроме того, белки семейства альфа-кристаллинов имеют только один цистеиновый аминокислотный остаток в своем составе (Cys131, альфаA-кристаллин), поэтому эффективная агрегация через сульфидные мостики не представляется возможной. В нативном состоянии альфа-кристаллины могут образовывать димеры через формирование S-S связи, они видны на изображении геля (Рисунок 29), однако их количество не увеличивается в ходе облучения.

На рисунке 29 B и C показаны образцы с разными временами облучения (0, 1, 2, 5, 10 и 20 минут) для раствора альфа-кристаллина с KNA в буфере и с добавлением мочевины, соответственно. На этих гелях наглядно показано постепенное формирование высокомолекулярных агрегатов через последовательное образование димеров, триммеров и тетрамеров альфа-кристаллинов. Значительное ускорение агрегации альфа-кристаллинов в присутствии мочевины можно объяснить потерей белками их естественной самоорганизации в мультимерные комплексы, что ведет к увеличению доступности триптофановых и тирозиновых аминокислотных остатков для реакций с фотовозбужденной KNA.

Таким образом, основным эффектом облучения альфа-кристаллинов в присутствии KNA является образование стабильных высокомолекулярных агрегатов (> 200 кДа) и практически полное исчезновение мономерной формы белков после 20 минут облучении.

Разделенные на полиакриламидных гелях белки подвергались дальнейшему анализу. Для этого каждое «пятно» было вырезано из геля, обработано ферментом трипсином для селективного гидролиза, а полученные пептиды выделены из геля. Для идентификации белков использовались два масс-спектрометрических метода: MALDI-TOF и UHPLC-ESI-q-TOF. Данные представлены на рисунке 31 и в таблице 9.

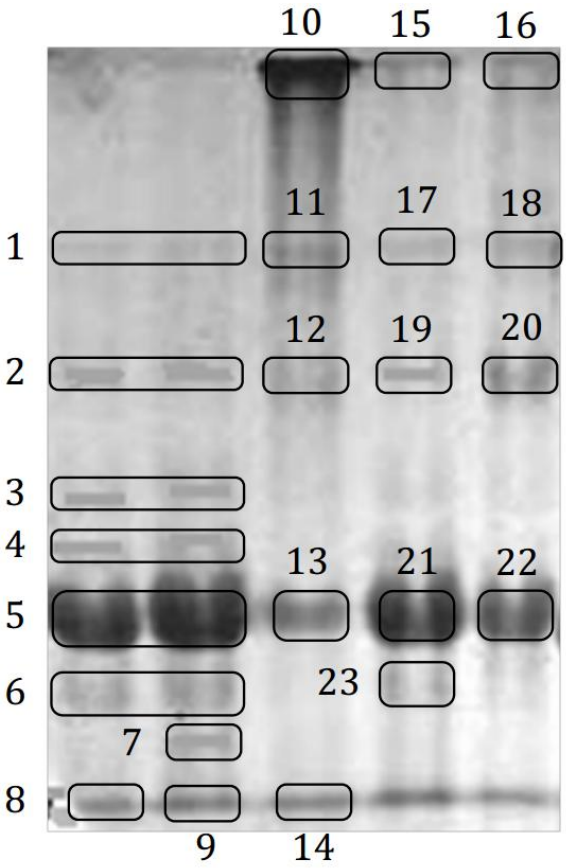

Рисунок 31. 15%-ДСН-ПАА гель с нумерацией пятен: дорожка 1 содержит необлученный без пробоподготовки; дорожка 2 – необлученный образец после 20 минут барботирования аргоном; дорожка 3 – образец после 20 минут анаэробного фотолиза на 355 нм; дорожка 4 – с добавлением Asc; дорожка 5 – с добавлением GSH. Данные по идентификации отмеченных «пятен» представлены в таблице 9.

Для большинства «пятен» оба метода показали хорошее согласие, однако в некоторых случаях идентификация была возможна только с использованием МС/МС-анализа, доступного для метода UHPLC-ESI-q-TOF (предположительно, идентификация белка затруднялась из-за малоэффективного ферментативного гидролиза геле). С другой стороны, метод MALDI-TOF показал себя более чувствительным благодаря эффекту концентрирования белка в «горячих» точках кристаллизации матрицы. Таким образом, использование двух методов позволило эффективно и достоверно произвести идентификацию всех «пятен» в полиакриамидном геле, а также обнаружить следовые количества бета-кристаллинов (Таблица 9), которые, вероятно, остались в растворе после гель-хроматографического разделения белковой фракции хрусталика.

Таблица 9. Идентификация белков из ДСН-ПАА геля (Рисунок 31), проведенная двумя методами: MALDI-TOF и UHPLC-ESI-q-TOF.

№ пятна	**MALDI-MS**		**LC-ESI-MS**	
	Кристаллин	Число пептидов	Кристаллин	Число пептидов
1	альфаА бетаБ1	10 12	–	–
2	альфаА бетаБ1 альфаБ	20 14 6	–	–
3	бетаБ1	13	бетаБ1	3
4	бетаБ1 бетаБ2 бетаБ3	14 21 11	бетаБ2	5
5	альфаА альфаБ	20 6	альфаА альфаБ бетаА4	9 10 3
6	альфаА альфаБ	23 6	альфаА*	4*
7	альфаА альфаБ	13 5	альфаА*	4*
8	альфаА	9	альфаА*	4*
9	альфаА альфаБ	17 3	альфаА*	4*
10	альфаА альфаБ бетаБ1	12 5 10	альфаА альфаБ бетаБ1	6 5 3
11	альфаА альфаБ бетаБ3	16 8 6	альфаА	4
12	альфаА альфаБ	11 12	альфаА	5
13	альфаА альфаБ	9 8	альфаА альфаБ	6 7
14	альфаА альфаБ	10 9	альфаА*	2*
15	–	–	альфаА*	1*
16	–	–	альфаА*	1*
17	–	–	альфаА*	1*
18	–	–	альфаА*	3*

№ пятна	MALDI-MS		LC-ESI-MS	
	Кристаллин	Число пептидов	Кристаллин	Число пептидов
19	альфаА альфаБ	15 17	альфаА	3
20	альфаА альфаБ	14 18	альфаА	5
21	альфаА альфаБ	11 13	альфаА альфаБ	6 6
22	альфаА альфаБ	10 10	альфаБ альфаА	5 7
23	–	–	–	–

*- по причине низкого покрытия АА-последовательности производилась дополнительная проверка МС/МС фрагментацией обнаруженных пептидов.

6.3 Масс-спектрометрический анализ пептидов

6.3.1 Деградация альфа-кристаллина в процессе облучения с KNA

Очищенные от низкомолекулярной фракции аликвоты облученного белка подвергались ферментативному гидролизу и анализировались с помощью UHPLC-ESI-q-TOF. Хроматографичекая система содержит в себе блок оптического детектирования, что позволило проанализировать общее количество пептидов облученных и не облученных образцов сразу по двум параметрам: сравнивались оптические хроматограммы на 220 нм, а также анализировались хроматограммы общего ионного тока на МС-датчике. Данные значения для всех образцов оказались близкими, из чего можно сделать вывод об успешности ферментативного гидролиза как для нативной формы альфа-кристаллина, так и для образовавшихся в ходе фотолиза агрегатов. Этот вывод позволяет говорить о достоверности количественного анализа содержания в образце конкретных пептидов от времени облучения.

Количественный анализ был проведен для 34 пептидов (18 являются пептидами альфаА, 18 – пептидами альфаБ, 2 из них неуникальные). Содержание каждого пептида в аликвотах определялось путем интегрирования пика выделенной ионной хроматограммы для массы данного пептида (±0,01 Да)). Стандартное отклонение для анализируемых величин не превышает 10%. Для 18 пептидов (8 пептидов альфаА и 10 пептидов альфаБ кристаллинов) содержание в аликвоте не зависит от времени облучения. Из этой группы пептидов 4 мажорных (55-65 альфаА, 79-88 альфаА, 89-99 альфаА и 93-103 альфаБ) были выбраны в качестве внутренних стандартов. Для пептидов, содержащих триптофановые и тирозиновые аминокислотные остатки, наблюдается уменьшение концентрации с увеличением дозы

облучения. На рисунке 32 А, Б показаны зависимости концентраций пептидов альфаА-кристаллина, содержащих Trp9 (пептид 1-11) и Tyr109 (пептид 104-112), от времени УФ-облучения. Для каждой точки на графиках показано значение, усредненное по трем независимым экспериментам по сенсибилизированному фотолизу альфа-кристаллина в присутствии KNA.

При наличии в растворе антиоксидантов Asc и GSH деградация пептидов не происходит (Рисунок 32, А-Б). Наблюдаемые эффекты находятся в хорошем согласии с данными оптических измерений и анализом изображений гель-электрофореза (см. выше). Для других пептидов альфа-кристаллина, имеющих в составе триптофановые или тирозиновые аминокислотные остатки, динамика концентрации от дозы облучения при наличии или отсутствии антиоксидантов выглядит аналогично [172].

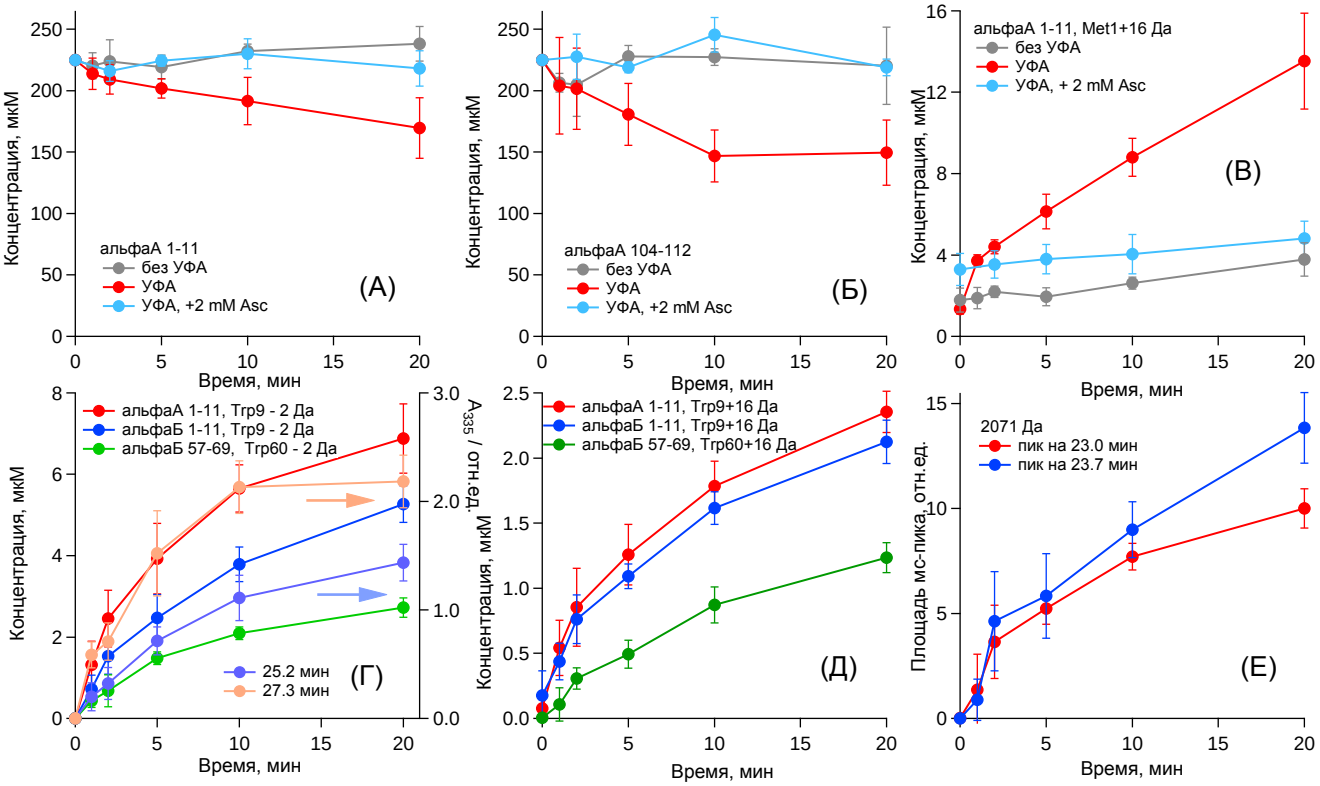

Рисунок 32. (А-В) Зависимость концентрации пептидов альфаА-кристаллина от времени УФ-облучения: (А) пептид 1-11 (Trp9; (Б) пептид 104-112 (Tyr109); (В) пептид 1-11 с окисленным аминокислотным остатком Met1. Серые точки – необлученный образец для контроля; красные точки – облученные с KNA альфа-кристаллин; синие точки – облученный с KNA альфа-кристаллин с присутствием Asc. (Г-Е) Зависимость концентрации модифицированных пептидов от времени облучения: (Г) – неидентифицированная модификация триптофановых аминокислотных остатков с изменение молекулярной массы на 2,017 Да; (Д) – окисление триптофановых аминокислотных остатков в составе белка. Светло-голубая и розовая линии на (Г) соответствуют поглощению на 355 нм пиков с временем элюирования 25,2 и 27,3 мин, соответственно. (Е) Зависимость площади пиков с временами элюирования 32,0 и 23,7 выделенной ионной хроматограммы с массой 2071,46 Да.

6.3.2 Анализ продуктов сенсибилизированного KNA фотолиза альфа-кристаллинов

МС и МС/МС анализ образцов позволили установить основные изменения в аминокислотных последовательностях облученных альфа-кристаллинов:

1) Изменение массы (+15,995 Да) метионин-содержащих пептидов альфаА-кристаллина (положение Met1) и альфаБ-кристаллина (положение Met68) было отнесено к окислению метиониновых аминокислотных остатков в составе белков;

2) Изменение массы (-2,017 Да) триптофан-содержащих пептидов альфаА и альфаБ кристаллинов (положение Trp9) и альфаБ кристаллина (положение Trp60) отнесено к неизвестной модификации;
3) Изменение массы (+15,995 Да) триптофан-содержащих пептидов альфаА и альфаБ кристаллинов (положение Trp9) и альфаБ кристаллина (положение Trp60) отнесено к окислению триптофановых аминокислотных групп в составе белков;
4) Изменение массы (+31,988Да) триптофан-содержащих пептидов альфаА кристаллина (положение Trp9) было отнесено к двойному окислению аминокислоты в составе белков.

Каждая модификация была подтверждена МС/МС анализом пептидов (Рисунок 33, остальные данные не представлены). Для всех вышеперечисленный модификаций наблюдалась зависимость от дозы облучения (Рисунок 32).

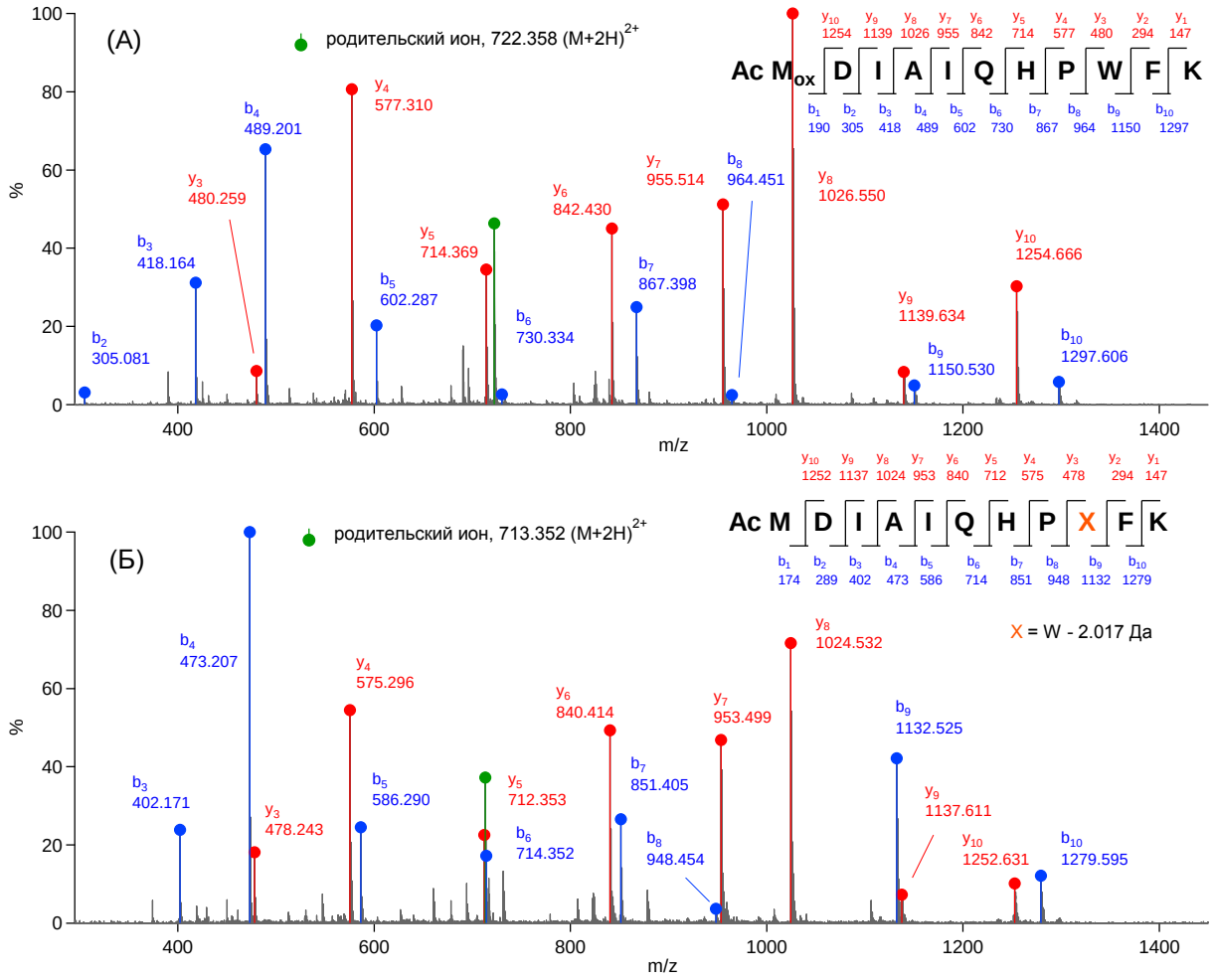

Рисунок 33. МС/МС спектры модифицированных пептидов альфаА-кристаллина: пептид 1-11 с окисленным Met1; пептид 1-11 с неидентифицированной модификацией -2,017 Да на аминокислотном остатке триптофана (Trp9).

Окисление метионина является одной из наиболее распространенных пост-трансляционных модификаций кристаллинов, аккумулируемых в тканях хрусталика с возрастом [99]. Стоит заметить, что окисление метионина может произойти также во время пробоподготовки. Было обнаружено, что необлученные белки действительно содержат некоторое количество окисленных метиониновых остатков, однако концентрация этих пептидов монотонно растет с увеличением дозы УФ-облучения, что говорит в пользу фотосенсибилизированной природы данной модификации (Рисунок 32, В).

В состав альфа-кристаллинов входит три аминокислотных остатка триптофана: Trp9 в составе альфаА и Trp9 и Trp60 в составе альфаБ. Для всех Trp-содержащих пептидов наблюдается изменение молекулярной массы на -2,017 Да и появление полосы поглощения с максимумом на 355 нм (поглощение конкретных пептидов измерено при помощи проточной ячейки в системе ВЭЖХ) (Рисунок 34). Интенсивности пиков выделенных ионных хроматограмм и соответствующие оптические хроматограммы демонстрируют монотонный рост интенсивностей с дозой облучения. Кроме того, было обнаружено присутствие пептидов (1-11 альфаА и 57-69 альфа Б со временем элюирования 25,2 и 27,3 мин соответственно) с изменением массы на +13,979 Да. Интенсивность содержания данных модифицированных пептидов также растет с дозой облучения. Такую разницу в массах ионов можно объяснить совокупностью модификаций -2,017 на Trp и окислением (+15,995 Да, предположительно на Met). Однако интенсивности этих сигналов крайне низкие и не позволяют достоверно подтвердить их при помощи МС/МС анализа.

Для обеих модификаций (-2,017 Да, +13,979 Да) наблюдается замедление роста концентрации модифицированных белков при длительном облучении, что, учитывая их оптические свойства (полоса поглощения с максимумом около 355 нм), может говорить об дальнейшем участии данных модифицированных белков не только в сенсибилизированном KNA, но и в прямом фотолизе.

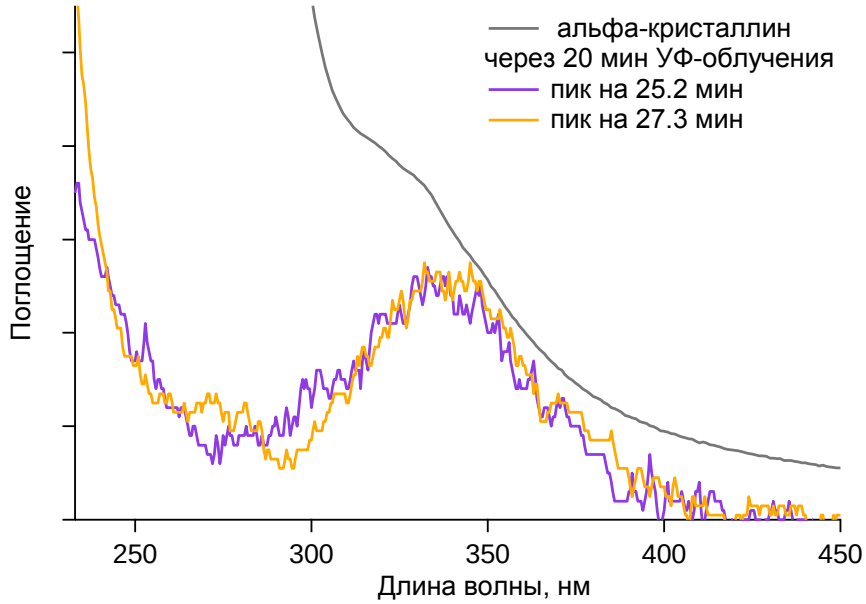

Рисунок 34. Спектры поглощения альфа-кристаллина (серая линия) через 20 минут УФ-облучения с KNA; пептидов облученного альфа-кристаллина с временем элюирования 25,2 мин (фиолетовая линия) и 27,3 мин (оранжевая линия).

Однократное окисление триптофановых аминокислотных остатков является фотоиндуцированной модификацией, природа и положение в пептидной цепи которой доказаны зависимостью от дозы облучения (Рисунок 32, Д) и МС/МС анализом модифицированных пептидов (данные не представлены). Каждый окисленный по Trp пептид элюирует с колонки двумя пиками (данные на Рисунке 32 Д соответствуют сумме интегралов двух пиков на выделенной ионной хроматограмме), что можно объяснить окислением индольного кольца в разных положениях. Двойное окисление триптофанового остатка наблюдалось только для Trp9 альфаА-кристаллина, причем в незначительной концентрации.

В ходе масс-спектрометрического анализа пептидов облученного альфа-кристаллина было подтверждено ковалентное связывание белков в ходе фотолиза: обнаружен димер пептида 13-21 альфаА-кристаллина с массой 2071,046 Да. Данный пептид также выходит двумя пиками, и сумма интегралов этих пиков монотонно растет с дозой облучения (Рисунок 32, Е). Фотолиз альфа-кристаллина с KNA в денатурирующих условиях (6 М мочевины) дает в 5 раз более интенсивный рост концентрации модицицированного белка, чем в фосфатном буферном растворе. Пептид 13-21 альфа-кристаллина содержит в своем составе тирозиновый остаток (Tyr18), что позволяет предположить образование межмолекулярной связи Tyr-Tyr. Данное предположение оказалось невозможно подтвердить МС/МС анализом ввиду низкой интенсивности сигнала, но стоит отметить, что дитирозиновая связь является хорошо известным механизмом сшивания белков [166].

Фотолиз альфа-кристаллина в присутствии и в отсутствии мочевины (6 М) приводит к образованию одних и тех же модификаций, однако в присутствии мочевины скорость их образования увеличивается: для неидентифицированной модификации -2,017 Да на Trp примерно в 5 раз, а для окисления пептидов примерно в 1,5 раза. Скорее всего, различия во влиянии денатурирующего агента на формирование продуктов объясняются разной доступностью аминокислотных остатков в нативном состоянии альфа-кристаллина для фотовозбужденной KNA и ее радикалов.

Наличие в растворе антиоксидантов (Asc и GSH) предотвращают образование всех вышеперечисленных модификаций. Таким образом, можно сделать вывод, что естественные антиоксиданты способны ингибировать негативное воздействие на белки хрусталика фотовозбужденных УФ-фильтров и их продуктов [172].

6.4 Механизм взаимодействия фотовозбужденной KNA с альфа-кристаллином

Негативное воздействие УФВ-излучения (280-315 нм) на ткани глаза известно уже многие годы. Эксперименты с модельными животными показывают, что интенсивное воздействие УФВ-излучения на ткани глаза приводит к существенным изменениям в составе метаболитов и белков хрусталика, ведущим к развитию катаракты [176,177]. Недавние исследования показали, что УФА-излучение (315-400 нм) также приводит к окислению и агрегации белков хрусталика [104,169,170,178–182]. В работе Варма [183] приводятся наглядные карты Земного шара с отображение корреляции между уровнем УФ-излучения и частотой случаев развития катаракты у населения, которые доказывают влияние чрезмерного солнечного облучения на развитие данного заболевания.

Эксперименты по фотолизу кристаллинов *in vitro* проводились и ранее, но в аэробных условиях, при которых происходит образование АФК, которые далее участвуют в повреждении белков (механизмы 2 типа) [167–169,184]. В хрусталике концентрация кислорода очень низкая [61], поэтому аэробные эксперименты дают недостоверную информацию о фотоиндуцированных процессах в его тканях: вероятность прямой реакции фотовозбужденных хромофоров с белками гораздо выше, чем с молекулярным кислородом с образованием АФК. Данная работа является первым детальным описанием фотоиндуцированный агрегации альфа-кристаллинов в анаэробных условиях (механизм 1 типа).

Как отмечалось ранее, в хрусталике большая часть УФА-излучения поглощается УФ-фильтрами – кинуренином и его производными. Основным каналом деактивации фотовозбужденного KN является внутренняя конверсия в основное состояние (около 99%), интеркомбинационная конверсия в триплетное состояние имеет квантовый выход ниже 1% [26]. Использование в экспериментах KN затруднено именно низким выходом триплетного

состояния: для получения заметного эффекта необходимо использовать длительное время облучения, что приводит к высокому вкладу вторичной фотохимии в наблюдаемые изменения. KN может разлагаться как термически, так и в результате фотохимических реакций. Продукты его разложения будут также поглощать УФ-излучение и давать, возможно, даже более существенный вклад в модификации белков хрусталика. Из-за невозможности достоверно вычленить вклады от первичных и вторичных фотохимических процессов при фотолизе кристаллинов в присутствии KN, в наших экспериментах мы использовали в качестве фотосенсибилизатора KNA. Данное соединение имеет высокий квантовый выход триплетного состояния (около 80%), а также более высокие, чем KN, константы скорости тушения триплетного состояния KNA аминокислотами и антиоксидантами. Кроме того, использование KNA позволяет обходиться малыми дозами облучения и исходное вещество не успевает разложиться термически, что обеспечивает минимальный вклад вторичной фотохимии. Таким образом, можно заключить, что фотолиз альфа-кристаллина с KNA позволит ответить на основной вопрос – какие фотоиндуцированные модификации белков могут привносить в хрусталик фотовозбужденные УФ-фильтры.

Исследование производилось с привлечением широкого спектра методов, что позволяет готовить о всестороннем и полном рассмотрении наблюдаемых явлений. Полученные результаты позволяют предположить наиболее вероятный механизм взаимодействия альфа-кристаллина с фотовозбужденной KNA в анаэробных условиях фотолиза (Схема 7):

- фотовозбужденная KNA эффективно образует триплетное состояние;

- поскольку константы скорости тушения ^{T}KNA для Trp и Tyr существенно выше, чем для других аминокислот, то ^{T}KNA реагирует с альфа-кристаллином через триптофановые и тирозиновые аминокислотные остатки с последующим образованием их радикалов (Рисунок 27);

- неспаренный электрон может мигрировать вдоль пептидной цепи [185], но в отсутствие радикальных ловушек единственным возможным каналом гибели радикалов является реакция рекомбинации или диспропорционирования с другим радикалами. Такие реакции приводят к сшиванию белков или образованию окрашенных (в УФ-диапазоне) модификаций. Процесс сшивания может повторяться, приводя тем самым к формированию устойчивых ковалентно связанных олигомеров с высокими молекулярными массами, которые способны выступать в роли центов рассеивания видимого света.

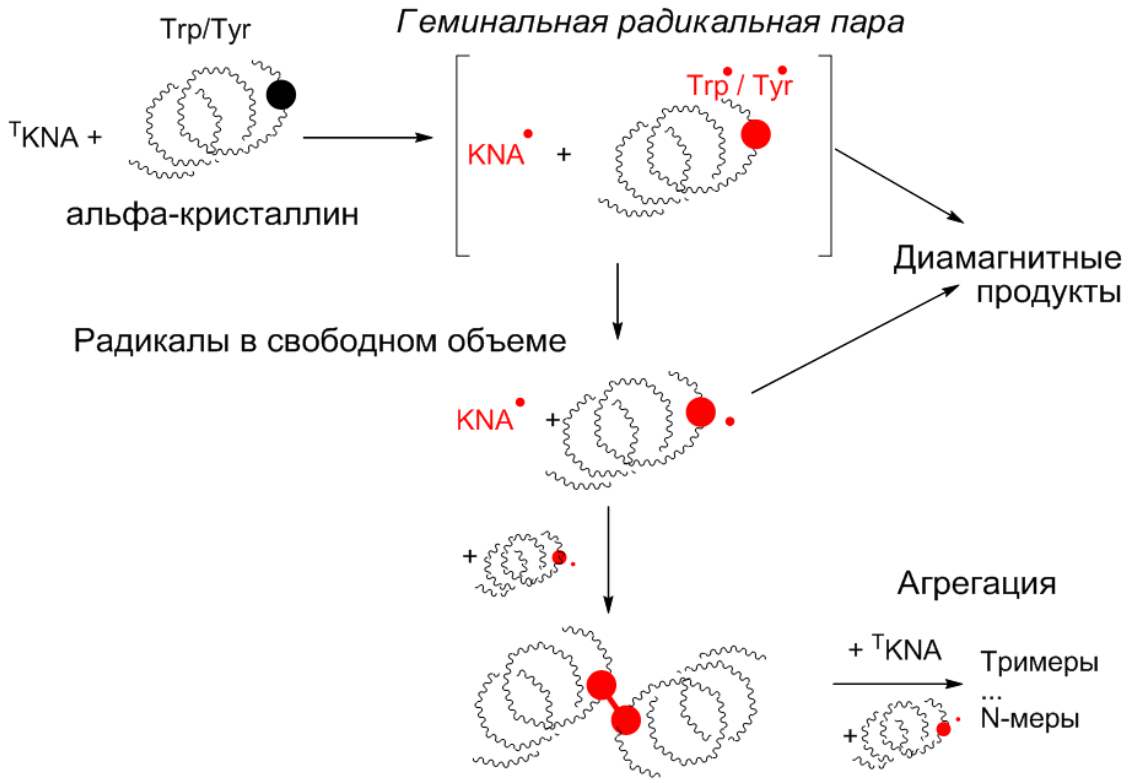

Схема 7. Механизм KNA-сенсибилизированного фотолиза альфа-кристаллина в анаэробных условиях.

Окисление триптофановых и метиониновых аминокислотных остатков в составе белка может происходить по двум механизмам: реакция между $KNA^{\bullet}$ и радикалами аминокислотных остатков, приводящая к переносу кислорода от KNA к аминокислотному остатку; или через реакции фотосенсибилизированного окисления второго типа благодаря наличию остаточного кислорода в растворе. Во втором случае формирование синглетного кислорода или других типов АФК будет конкурировать с прямой реакцией между фотовозбужденной ^{T}KNA с Trp и Tyr. Из этого можно сделать вывод, что в денатурирующих условиях, приводящих к потере белками их нативной мультимерной структуры и, следовательно, увеличению числа потенциальных тушителей триплетного состояния, вклад от реакций второго типа будет существенно уменьшаться (концентрация остаточного кислорода не меняется). Однако в работе наблюдалось как минимум сопоставимое образование окисленных продуктов альфа-кристаллина, что говорит в пользу образования окисленных Trp и Tyr остатков через прямые реакции с $KNA^{\bullet}$.

По итогам данной работы можно сделать грубую оценку эффективности расхода альфа-кристаллина в анаэробном KNA-сенсибилизированном фотолизе. В эксперименте образец объемом 2,5 мл, содержащий $1{,}7\times10^{-4}$ М альфа-кристаллина, облучался лазерными импульсами с энергией 1 мДж и частотой 10 Гц, что соответствует потоку света порядка 10^{18} квантов в минуту. Из данных, представленных на рисунке 32, можно сделать вывод, что квантовый выход

расходования пептидов альфа-кристаллина не превышает 2-3 % даже для альфаА-кристалиина, который расходуется быстрее, чем альфаБ-кристаллин. Такой низкий квантовый выход расходование белка подтверждает, что основным каналом гибели образовавшихся в процессе облучения радикалов является восстановление исходных соединений за счет реакции обратного переноса электрона.

Основным последствием сенсибилизированного KNA фотолиза кристаллинов является образование ковалентных сшивок белков. Однако в работе удалось обнаружить только один дипептид, соответствующий межмолекулярной ковалентной связи. Скорее всего, ковалентное сшивание происходит по нескольким положениям. В таком случае концентрации сшитых пептидов, полученные после ферментативного гидролиза, для каждого такого варианта положения связи будут низкими, и их идентификация окажется крайне сложной. Установление положения образования ковалентной связи между белками является задачей для отдельной работы.

Аскорбиновая кислота является эффективным тушителем триплетного состояния [27]: вступая в реакции с триплетным состоянием KNA, она образует радикал $Asc^{\bullet}$, который является значительно менее реакционно активным, чем радикалы KNA и KN. Это подтверждается и в данной работе: в присутствии Asc не происходит агрегации белков и накопления других фотоиндуцированных модификаций.

Механизм ингибирования фотоповреждения кристаллинов антиоксидантом GSH существенно отличается от механизма для Asc: константа скорости тушения триплетного состояния для GSH по крайней мере на два порядка ниже, чем для Asc, что было показано в работе. Однако GSH является отличным донором электронов, и восстанавливает образующиеся в процессе облучения радикалы до гораздо более безопасных для белков диамагнитных продуктов. Образующиеся при этом радикалы GS• рекомбинируют друг с другом с образованием устойчивого и реакционно неактивного продукта GSSG. Наблюдаемое в работе ингибирование процесса агрегации белков антиоксидантом GSH подтверждает радикальный механизм ковалентного сшивания кристаллинов и демонстрирует важность присутствия данного соединения в хрусталике человеческого глаза [172].

6.5 Заключение главы

В последней главе диссертационной работы были использованы результаты и выводы прошлых глав для построения достоверной модели фотоиндуцированного повреждения белков хрусталика за счет взаимодействия с фотовозбужденными УФ-фильтрами. При постановке экспериментов и при формировании выводов учитывались все особенности специфичной ткани хрусталика: значение pH, высокая концентрация белков, крайне низкая концентрация

кислорода, высокая вязкость среды, наличие антиоксидантов и др. Все это позволяет говорить о высоком уровне достоверности предложенных механизмов образования фотоиндуцированных модификаций и методов их ингибирования. Наблюдаемое в ходе экспериментов формирование высокомолекулярных агрегатов белков иллюстрирует образование центров рассеяния света в процессе развития катаракты хрусталика. Результаты, представленные в данной главе, подтверждают вероятный вклад в патогенные процессы естественных «защитников» хрусталика – УФ-фильтров. Данное исследование позволяет существенно продвинуться в понимании процессов старения и катарактогенеза в тканях хрусталика. Именно через понимание причин возникновения заболевания возможна разработка метода профилактики или неинвазивного лечения.

Заключение

Данная работа включает: мониторинг изменений оптических и флуоресцентных свойств протеомной и метаболомных фракций хрусталика с возрастом и при развитии катаракты; установление фотохимических свойств продуктов термического распада одного из основных УФ-фильтров человека KN – KNY и KNA; исследование влияния вязкой среды хрусталика на фотохимию продуктов кинуренина с использованием бинарной смеси воды и глицерина; модельные эксперименты по фотолизу белков хрусталика в присутствии фотосенсибилизатора KNA и естественных антиоксидантов хрусталика – Asc и GSH – с последующим детальным анализом продуктов реакций. Полученные в ходе работы результаты позволяют расширить представление о молекулярных механизмах катарактогенеза. Понимание причин возникновения помутнения хрусталика позволит в будущем разрабатывать превентивные меры воздействия и нехирургические способы лечения катаракты. Полнота исследования подтверждается использованием в работе объектов изучения с разным уровнем организации: от целого хрусталика до молекулярных фракции (белковых и метаболомных) ткани хрусталика и отдельных компонент этих фракций (белков и хромофоров) с изучением их свойств и молекулярных реакции между нами.

В работе был использован широкий диапазон биохимических и оптических методов, был проанализирован большой объем литературы по теме диссертации. Результаты, полученные в ходе диссертационной работы, хорошо согласуются с другими работами в этой области и существенно дополняют имеющиеся представления о роли УФ-фильтров в патогенных процессах в тканях хрусталика. Данное исследование является продолжением цикла работ о фотохимических свойствах кинуренинов и их продуктов, начатых в группе протеомики и метаболомики.

Выводы

1) С возрастом поглощение белков в УФА-диапазоне заметно увеличивается в связи с накоплением возрастных посттрансляционных модификаций, в то время как поглощение метаболомной фракции в этом диапазоне длин волн падает за счет уменьшения концентрации УФ-фильтров. При развитии катаракты эффекты гораздо более выражены.

2) С возрастом наблюдается увеличение общей флуоресценции хрусталика за счет возрастных посттрансляционных модификаций кристаллинов. Для катарактальных хрусталиков эти эффекты гораздо более выражены. Кроме того, для катарактальных хрусталиков наблюдается красное смещение флуоресценции белков, что указывает на частичную потерю нативной структуры белков.

3) При циклизации УФ-фильтра KN образуются фотоактивные продукты: KNA и KNY. KNA эффективно образует триплетное состояние (≈ 80%), способное вступать в реакции с белками хрусталика, модифицируя их и повреждая нативную структуру. KNY образует как триплетное состояние (≈ 2%), так и енольную форму (≈ 1%). Оба промежуточных продукта нестабильны и быстро гибнут с образованием конечных продуктов DHQN и 4HQN, соответственно.

4) Для KNA основным каналом дезактивации S1 состояния является интеркомбинационная конверсия, и изменение вязкости растворителя незначительно влияет на физические процессы в фотовозбужденном состоянии. Основным каналом гибели S1 состояния KNY является внутренняя конверсия, скорость которой существенно зависит от параметров среды. Поэтому для KNY с ростом вязкости окружения наблюдаются заметные изменения как в квантовом выходе флуоресценции, так и в выходе продуктов реакций.

5) При анаэробном УФА-облучении альфа-кристаллинов в присутствии фотосенсибилизатора KNA происходит необратимая агрегация белков в стабильные высокомолекулярные (> 200 кДа) агрегаты. Механизм данного процесса основан на образовании радикалов триптофановых и тирозиновых аминокислотных остатков в составе кристаллинов.

6) Анаэробный УФА-фотолиз альфа-кристаллинов в присутствии KNA приводит к окислению метиониновых и триптофановых аминокислотных остатков в составе белков, а также модификации триптофановых остатков с изменением массы (-2,017 Да) и появлению полосы поглощения в УФА-диапазоне. Присутствующие в растворе природные антиоксиданты – Asc и GSH – ингибируют наблюдаемые эффекты за счет тушения триплетного состояния KNA и восстановления триптофановых и тирозиновых радикалов.

Результаты диссертационной работы опубликованы в следующих работах:

Статьи

1. E. A. Zelentsova, P. S. Sherin, O. A. Snytnikova, R. Kaptein, E. Vauthey and Yu. P. Tsentalovich, Photochemistry of aqueous solutions of kynurenic acid and kynurenine yellow, Photochem. Photobiol. Sci., 12 (2013), 546-558. Impact Factor: 2.235
2. P. S. Sherin, E. A. Zelentsova, E. D. Sormacheva, V. V. Yanshole, T. G. Duzhak, Yu. P. Tsentalovich, Aggregation of crystallins in kynurenic acid sensitized UVA photolysis under anaerobic conditions, Phys. Chem. Chem. Phys. 18 (2015), 8827-8839. Impact Factor: 4.449
3. Е.А. Зеленцова, П.С. Шерин, Ю.П. Центалович, Р.З. Сагдеев, Влияние вязкости среды на фотофизические свойства кинуреновоӥ кислоты и желтого кинуренина // Изв. Акад. Наук Хим., 66 (2017), 267-272. Impact Factor: 0.579
4. E. A. Zelentsova, L. V. Yanshole, A. Zh. Fursova, Y. P. Tsentalovich, Optical properties of the human lens constituents // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 173 (2017), 318-324. Impact Factor: 3.035

Тезисы

1. Зеленцова Е. А., Снытникова О. А., Центалович Ю. П. , Фотохимические свойства вторичных УФ-фильтров // Сборник тезисов Международной научной студенческой конференции (МНСК-50), 13-19 апреля 2012г., Новосибирск, Россия, с. 85. (диплом III степени за устный доклад)
2. Зеленцова Е. А., Шерин П.С., Снытникова О. А., Центалович Ю. П., Фотохимические свойства желтого кинуренина и кинуреновой кислоты // Сборник тезисов Международной научной студенческой конференции (МНСК-51), 12-18 апреля 2013г., Новосибирск, Россия, с. 72. (диплом II степени за устный доклад)
3. Зеленцова Е. А., Фотоиндуцированные реакции белков хрусталика // Сборник тезисов Международной научной студенческой конференции (МНСК-52), 11-18 апреля 2014г., Новосибирск, Россия, с. 54. (диплом I степени за устный доклад)
4. Zelentsova E.A., Snytnikova O.A., Sherin P.S., Tsentalovich Yu.P., Photochemical properties of kynurenine derivatives – kynurenine yellow and kynurenic acid // Сборник тезисов Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием Менделеев - 2012, 3-6 апреля 2012г., Санкт-Петербург, Россия, с. 308-309.
5. Ekaterina A. Zelentsova, Peter S. Sherin, Olga A. Snytnikova, Eric Vauthey and Yuri P. Tsentalovich, Photochemistry of kynurenic acid and kynurenine yellow – products of decomposition of eye lens UV filters // Book of abstracts of the International Conference on Photochemistry, 21st-26th of July 2013, Leuven, Belgium, p. 132. (oral presentation)

6. Ekaterina A. Zelentsova, Peter S. Sherin, Tatyana G. Duzhak, Yuri P. Tsentalovich, Photosensitized modifications of the eye lens proteins under anaerobic conditions, // Book of abstracts of the 8th Asian Photochemistry Conference (APC-2014), November 6-19, 2014, Thiruvananthapuram, India , p.154

7. E. A. Zelentsova, P. S. Sherin, Yu. P. Tsentalovich, O. A. Snytnikova, E. D. Sormacheva, V. V. Yanshole, T. G. Duzhak, Natural sensitizers of the eye lens: mechanisms of the lens protein photo-aggregation, // Book of abstracts of the Central European Conference on Photochemistry (CEPC-2016), February 14-18, 2016, Bad Hofgastein, Austria, p. 19. (oral presentation).

8. Е. А. Зеленцова, П. С. Шерин, Е. Д. Сормачева, Т. Г. Дужак, В. В. Яньшоле, Ю. П. Центалович, Механизмы фотосенсибилизированной агрегации белков хрусталика, // Материалы международной конференции «Химическая биология – 2016», посвященной 90-летию академика Д. Г. Кнорре, 24-28 июля, 2016 г., Новосибирск, Россия, стр. 122 (устный доклад)

Список используемых сокращений

4HQN – 4-гидрооксихинолин

Asc – аскорбиновая кислота

Cys – цистеин

DHB – дезоксибензойная кислота

DHQN – 2,3-дигидрооксихинолин

ESI – электроспрейная ионизация

GSH –глутатион

GSSG – окисленный глутатион

KN – кинуренин

KNA – кинуреновая кислота

KNY – желтый кинуренин

MALDI – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

Met – метионин

SA – синапиновая кислота

TFA – фторуксусная кислота

Trp – триптофан

Tyr – тирозин

XAN – ксантуреновая кислота

АФК – активные формы кислорода

ВК – внутренняя конверсия

ВП – вклад фракции в поглощение ткани

ВР – фракция водорастворимых белков

ВФ – вклад фракции в флуоресценцию ткани

ВЭЖХ (HPLC) – высокоэффективная жидкостная хроматография

ИКК – интеркомбинационная конверсия

МЕТ – метаболомная фракция

МР – фракция мочевинорастворимых белков

ОЭФ – относительная эффективность флуоресценции

ФЛ – флуоресценция

ФР – фоторазложение

УП – удельное поглощение

УФ – ультрафиолетовый

УФА – ультрафиолетовое излучение в диапазоне 315-380 нм

УФВ – ультрафиолетовое излучение в диапазоне 280-315 нм

УФС – ультрафиолетовое излучение в диапазоне 100-280 нм

Список литературы

1. Atchison D.A., Thibos L.N. Optical models of the human eye // Clin. Exp. Optom. 2016. Vol. 99, № 2. P. 99–106.

2. Kolb H. Gross Anatomy of the Eye // Webvision: The Organization of the Retina and Visual System / ed. Kolb H., Fernandez E., Nelson R. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center, 1995.

3. Light, Eyes, and Vision // Physics of the Human Body. Springer Berlin Heidelberg, 2007. P. 629–711.

4. Pierscionek B.K., Belaidi A., Bruun H.H. Refractive index distribution in the porcine eye lens for 532 nm and 633 nm light // Eye Lond. Engl. 2005. Vol. 19, № 4. P. 375–381.

5. Robinson N.E. et al. Quantitative measurement of young human eye lens crystallins by direct injection Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry // Mol. Vis. 2006. Vol. 12. P. 704–711.

6. Bernal A., Parel J.-M., Manns F. Evidence for posterior zonular fiber attachment on the anterior hyaloid membrane // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2006. Vol. 47, № 11. P. 4708–4713.

7. Burd H.J. et al. Equatorial wrinkles in the human lens capsule // Exp. Eye Res. 2017. Vol. 159. P. 77–86.

8. Bron A.J. et al. The ageing lens // Ophthalmol. J. Int. Ophtalmol. Int. J. Ophthalmol. Z. Augenheilkd. 2000. Vol. 214, № 1. P. 86–104.

9. DUNCAN G., WORMSTONE I., DAVIES P. The aging human lens: structure, growth, and physiological behaviour // Br. J. Ophthalmol. 1997. Vol. 81, № 10. P. 818–823.

10. Shaw G.E., Frölich C. The Variability and Absolute Magnitude of Solar Spectral Irradiance // Solar-Terrestrial Influences on Weather and Climate / ed. McCormac B.M., Seliga T.A. Springer Netherlands, 1979. P. 69–73.

11. Anderson R.M. Visual perceptions and observations of an aphakic surgeon // Percept. Mot. Skills. 1983. Vol. 57, № 3 Pt 2. P. 1211–1218.

12. Dillon J. The photophysics and photobiology of the eye // J. Photochem. Photobiol. B. 1991. Vol. 10, № 1–2. P. 23–40.

13. Moroni F. Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites // Eur. J. Pharmacol. 1999. Vol. 375, № 1–3. P. 87–100.

14. Sweeney M.H., Truscott R.J. An impediment to glutathione diffusion in older normal human lenses: a possible precondition for nuclear cataract // Exp. Eye Res. 1998. Vol. 67, № 5. P. 587–595.

15. Moffat B.A. et al. Age-related changes in the kinetics of water transport in normal human lenses // Exp. Eye Res. 1999. Vol. 69, № 6. P. 663–669.

16. Bova L.M. et al. Major changes in human ocular UV protection with age // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2001. Vol. 42, № 1. P. 200–205.

17. Walrant P., Santus R., Grossweiner L.I. Photosensitizing properties of N-formylkynurenine // Photochem. Photobiol. 1975. Vol. 22, № 1–2. P. 63–65.

18. Pileni M.P., Walrant P., Santus R. On a possible excited state proton transfer in N-formylkynurenine derivatives // Chem. Phys. Lett. 1976. Vol. 42, № 1. P. 89–92.

19. Pileni M.-P., Santus R., Land E.J. On the Photosensitizing Properties of N-Formylkynurenine and Related Compounds // Photochem. Photobiol. 1978. Vol. 28, № 4–5. P. 525–529.

20. Krishna C.M. et al. A study of the photodynamic efficiencies of some eye lens constituents // Photochem. Photobiol. 1991. Vol. 54, № 1. P. 51–58.

21. Dillon J., Atherton S.J. Time resolved spectroscopic studies on the intact human lens // Photochem. Photobiol. 1990. Vol. 51, № 4. P. 465–468.

22. Tsentalovich Y.P. et al. Photochemistry of Kynurenine, a Tryptophan Metabolite: Properties of the Triplet State // J. Phys. Chem. A. 2005. Vol. 109, № 16. P. 3565–3568.

23. Tomoda A. et al. Mechanism of coloration of human lenses induced by near-ultraviolet-photo-oxidized 3-hydroxykynurenine // Ophthalmic Res. 1990. Vol. 22, № 3. P. 152–159.

24. Ervin L.A., Dillon J., Gaillard E.R. Photochemically modified alpha-crystallin: a model system for aging in the primate lens // Photochem. Photobiol. 2001. Vol. 73, № 6. P. 685–691.

25. Reszka K.J. et al. Free radical reactions photosensitized by the human lens component, kynurenine: an EPR and spin trapping investigation // Free Radic. Biol. Med. 1996. Vol. 20, № 1. P. 23–34.

26. Tsentalovich Y.P. et al. Photochemical properties of UV Filter molecules of the human eye // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2011. Vol. 52, № 10. P. 7687–7696.

27. Snytnikova O.A. et al. Kinetics and mechanism of reactions of photoexcited kynurenine with molecules of some natural compounds // Russ. Chem. Bull. 2007. Vol. 56, № 4. P. 732–738.

28. Snytnikova O.A., Sherin P.S., Tsentalovich Y.P. Biphotonic ionization of kynurenine and 3-hydroxykynurenine // J. Photochem. Photobiol. Chem. 2007. Vol. 186, № 2–3. P. 364–368.

29. Tsentalovich Y.P., Snytnikova O.A., Sagdeev R.Z. Photochemical and thermal reactions of kynurenines // Russ. Chem. Rev. 2008. Vol. 77, № 9. P. 789–797.

30. Taylor L.M. et al. UV filter instability: consequences for the human lens // Exp. Eye Res. 2002. Vol. 75, № 2. P. 165–175.

31. Malina H.Z., Martin X.D. Deamination of 3-hydroxykynurenine in bovine lenses: a possible mechanism of cataract formation in general // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Albrecht Von Graefes Arch. Für Klin. Exp. Ophthalmol. 1995. Vol. 233, № 1. P. 38–44.

32. Mizdrak J. et al. Novel human lens metabolites from normal and cataractous human lenses // Tetrahedron. 2007. Vol. 63, № 23. P. 4990–4999.

33. Zarnowski T. et al. Content of kynurenic acid and activity of kynurenine aminotransferases in mammalian eyes // Ophthalmic Res. 2004. Vol. 36, № 2. P. 124–128.

34. Kopylova L.V. et al. UV filter decomposition. A study of reactions of 4-(2-aminophenyl)-4-oxocrotonic acid with amino acids and antioxidants present in the human lens // Exp. Eye Res. 2007. Vol. 85, № 2. P. 242–249.

35. Shirao E. et al. Identification of a novel fluorophore, xanthurenic acid 8- O -beta-D-glucoside in human brunescent cataract // Exp. Eye Res. 2001. Vol. 73, № 4. P. 421–431.

36. Sherin P.S., Gritsan N.P., Tsentalovich Y.P. Experimental and quantum chemical study of photochemical properties of 4-hydroxyquinoline // Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol. 2009. Vol. 8, № 11. P. 1550–1557.

37. Yanshole V.V. et al. Photoinduced tautomeric transformations of xanthurenic acid // Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP. 2010. Vol. 12, № 32. P. 9502–9515.

38. Tokuyama T. et al. The photoreduction of kynurenic acid to kynurenine yellow and the occurrence of 3-hydroxy-L-kynurenine in butterflies // J. Am. Chem. Soc. 1967. Vol. 89, № 4. P. 1017–1021.

39. Vazquez S. et al. Novel protein modification by kynurenine in human lenses // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277, № 7. P. 4867–4873.

40. Kanth V.R. et al. Elevated Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and accumulation of kynurenic acid in the pathogenesis of STZ-induced diabetic cataract in Wistar rats // Curr. Eye Res. 2009. Vol. 34, № 4. P. 274–281.

41. Zarnowski T. et al. Elevated concentrations of kynurenic acid, a tryptophan derivative, in dense nuclear cataracts // Curr. Eye Res. 2007. Vol. 32, № 1. P. 27–32.

42. Pileni M.P., Giraud M., Santus R. Kynurenic Acid — I. Spectroscopic Properties // Photochem. Photobiol. 1979. Vol. 30, № 2. P. 251–256.

43. Pileni M.P., Giraud M., Santus R. Kynurenic acid. 2. Photosensitizing properties // ResearchGate. 1979. Vol. 30, № 2. P. 257–261.

44. Lugo-Huitrón R. et al. On the antioxidant properties of kynurenic acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress // Neurotoxicol. Teratol. 2011. Vol. 33, № 5. P. 538–547.

45. Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1993. Vol. 90, № 17. P. 7915–7922.

46. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants // Exp. Physiol. 1997. Vol. 82, № 2. P. 291–295.

47. Goodenough D.A. The crystalline lens. A system networked by gap junctional intercellular communication // Semin. Cell Biol. 1992. Vol. 3, № 1. P. 49–58.

48. Yu B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species // Physiol. Rev. 1994. Vol. 74, № 1. P. 139–162.

49. Giblin F.J. Glutathione: a vital lens antioxidant // J. Ocul. Pharmacol. Ther. Off. J. Assoc. Ocul. Pharmacol. Ther. 2000. Vol. 16, № 2. P. 121–135.

50. Kamei A. Glutathione levels of the human crystalline lens in aging and its antioxidant effect against the oxidation of lens proteins // Biol. Pharm. Bull. 1993. Vol. 16, № 9. P. 870–875.

51. Sasaki H. et al. A protective role for glutathione-dependent reduction of dehydroascorbic acid in lens epithelium // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1995. Vol. 36, № 9. P. 1804–1817.

52. Herrmann H., Hickman F.H. Exploratory studies on corneal metabolism // Bull. Johns Hopkins Hosp. 1948. Vol. 82, № 2. P. 225–250.

53. Varma S.D., Kumar S., Richards R.D. Light-induced damage to ocular lens cation pump: prevention by vitamin C // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1979. Vol. 76, № 7. P. 3504–3506.

54. Anderson E.I., Spector A. Oxidation-Reduction Reactions Involving Ascorbic Acid and the Hexosemonophosphate Shunt in Corneal Epithelium // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1971. Vol. 10, № 1. P. 41–53.

55. Rose R.C., Bode A.M. Ocular ascorbate transport and metabolism // Comp. Biochem. Physiol. A Physiol. 1991. Vol. 100, № 2. P. 273–285.

56. Giblin F.J. et al. A direct correlation between the levels of ascorbic acid and H2O2 in aqueous humor // Exp. Eye Res. 1984. Vol. 38, № 1. P. 87–93.

57. RINGVOLD A. The Significance of Ascorbate in the Aqueous Humour Protection Against UV-A and UV-B // Exp. Eye Res. 1996. Vol. 62, № 3. P. 261–264.

58. Woodford B.J., Tso M.O., Lam K.W. Reduced and oxidized ascorbates in guinea pig retina under normal and light-exposed conditions // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1983. Vol. 24, № 7. P. 862–867.

59. Kern H.L., Zolot S.L. Transport of vitamin C in the lens // Curr. Eye Res. 1987. Vol. 6, № 7. P. 885–896.

60. Khatami M. et al. Ascorbate regeneration in bovine ocular tissues by NADH-dependent semidehydroascorbate reductase // Exp. Eye Res. 1986. Vol. 43, № 2. P. 167–175.

61. Linetsky M. et al. UVA light-excited kynurenines oxidize ascorbate and modify lens proteins through the formation of advanced glycation end products: implications for human lens aging and cataract formation // J. Biol. Chem. 2014. Vol. 289, № 24. P. 17111–17123.

62. Fan X. et al. Vitamin C mediates chemical aging of lens crystallins by the Maillard reaction in a humanized mouse model // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006. Vol. 103, № 45. P. 16912–16917.

63. Ma N. et al. Expression Profiling of Ascorbic Acid-Related Transporters in Human and Mouse Eyes // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2016. Vol. 57, № 7. P. 3440–3450.

64. Mody V.C. et al. Ultraviolet radiation-B-induced cataract in albino rats: maximum tolerable dose and ascorbate consumption // Acta Ophthalmol. Scand. 2006. Vol. 84, № 3. P. 390–395.

65. Yeum K.J. et al. Measurement of carotenoids, retinoids, and tocopherols in human lenses // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1995. Vol. 36, № 13. P. 2756–2761.

66. Dickerson J.E., Lou M.F. Free cysteine levels in normal human lenses // Exp. Eye Res. 1997. Vol. 65, № 3. P. 451–454.

67. Krepler K., Schmid R. Alpha-tocopherol in plasma, red blood cells and lenses with and without cataract // Am. J. Ophthalmol. 2005. Vol. 139, № 2. P. 266–270.

68. Bodurka J. et al. Investigation of water in normal and dehydrated rabbit lenses by 1H NMR and calorimetric measurements // Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 1996. Vol. 115. P. 55–62.

69. Fagerholm P.P., Philipson B.T., Lindström B. Normal human lens - the distribution of protein // Exp. Eye Res. 1981. Vol. 33, № 6. P. 615–620.

70. Harrington V., Srivastava O.P., Kirk M. Proteomic analysis of water insoluble proteins from normal and cataractous human lenses // Mol. Vis. 2007. Vol. 13. P. 1680–1694.

71. Vermorken A.J. et al. Lens differentiation. Crystallin synthesis in isolated epithelia from calf lenses. // J. Cell Biol. 1978. Vol. 76, № 1. P. 175–183.

72. Bloemendal H. et al. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2004. Vol. 86, № 3. P. 407–485.

73. Lampi K.J. et al. Age-related changes in human lens crystallins identified by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry // Exp. Eye Res. 1998. Vol. 67, № 1. P. 31–43.

74. Lampi K.J. et al. Sequence Analysis of βA3, βB3, and βA4 Crystallins Completes the Identification of the Major Proteins in Young Human Lens // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272, № 4. P. 2268–2275.

75. Vendra V.P.R. et al. Gamma crystallins of the human eye lens // Biochim. Biophys. Acta. 2016. Vol. 1860, № 1 Pt B. P. 333–343.

76. Sharma K.K., Santhoshkumar P. Lens Aging: Effects of Crystallins // Biochim. Biophys. Acta. 2009. Vol. 1790, № 10. P. 1095–1108.

77. Macario A.J.L., Conway de Macario E. Sick chaperones, cellular stress, and disease // N. Engl. J. Med. 2005. Vol. 353, № 14. P. 1489–1501.

78. Andley U.P. et al. Cloning, expression, and chaperone-like activity of human alphaA-crystallin // J. Biol. Chem. 1996. Vol. 271, № 50. P. 31973–31980.

79. Bova M.P. et al. Subunit exchange of alphaA-crystallin // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272, № 47. P. 29511–29517.

80. Horwitz J. et al. Lens alpha-crystallin: chaperone-like properties // Methods Enzymol. 1998. Vol. 290. P. 365–383.

81. Srinivasan A.N., Nagineni C.N., Bhat S.P. alpha A-crystallin is expressed in non-ocular tissues. // J. Biol. Chem. 1992. Vol. 267, № 32. P. 23337–23341.

82. Iwaki T., Kume-Iwaki A., Goldman J.E. Cellular distribution of alpha B-crystallin in non-lenticular tissues // J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc. 1990. Vol. 38, № 1. P. 31–39.

83. Smuda M. et al. Comprehensive analysis of maillard protein modifications in human lenses: effect of age and cataract // Biochemistry (Mosc.). 2015. Vol. 54, № 15. P. 2500–2507.

84. Han J., Schey K.L. MALDI tissue imaging of ocular lens alpha-crystallin // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2006. Vol. 47, № 7. P. 2990–2996.

85. Hanson S.R. et al. The major in vivo modifications of the human water-insoluble lens crystallins are disulfide bonds, deamidation, methionine oxidation and backbone cleavage // Exp. Eye Res. 2000. Vol. 71, № 2. P. 195–207.

86. Srivastava O.P., Srivastava K. Existence of deamidated alphaB-crystallin fragments in normal and cataractous human lenses // Mol. Vis. 2003. Vol. 9. P. 110–118.

87. Truscott R.J., Chen Y.C., Shaw D.C. Evidence for the participation of alpha B-crystallin in human age-related nuclear cataract // Int. J. Biol. Macromol. 1998. Vol. 22, № 3–4. P. 321–330.

88. Lindner H. et al. The microheterogeneity of the mammalian H1(0) histone. Evidence for an age-dependent deamidation // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273, № 21. P. 13324–13330.

89. Takemoto L., Boyle D. Increased deamidation of asparagine during human senile cataractogenesis // Mol. Vis. 2000. Vol. 6. P. 164–168.

90. Takemoto L., Boyle D. Specific glutamine and asparagine residues of gamma-S crystallin are resistant to in vivo deamidation // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275, № 34. P. 26109–26112.

91. Takemoto L., Boyle D. Deamidation of specific glutamine residues from alpha-A crystallin during aging of the human lens // Biochemistry (Mosc.). 1998. Vol. 37, № 39. P. 13681–13685.

92. Lampi K.J. et al. Deamidation of human beta B1 alters the elongated structure of the dimer // Exp. Eye Res. 2001. Vol. 72, № 3. P. 279–288.

93. Robinson N.E. Protein deamidation // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002. Vol. 99, № 8. P. 5283–5288.

94. Srivastava K. et al. Multi-crystallin complexes exist in the water-soluble high molecular weight protein fractions of aging normal and cataractous human lenses // Exp. Eye Res. 2008. Vol. 87, № 4. P. 356–366.

95. Matsushima H. et al. Loss of cytoskeletal proteins and lens cell opacification in the selenite cataract model // Exp. Eye Res. 1997. Vol. 64, № 3. P. 387–395.

96. Werten P.J., Vos E., De Jong W.W. Truncation of betaA3/A1-crystallin during aging of the bovine lens; possible implications for lens optical quality // Exp. Eye Res. 1999. Vol. 68, № 1. P. 99–103.

97. Lund A.L., Smith J.B., Smith D.L. Modifications of the water-insoluble human lens alpha-crystallins // Exp. Eye Res. 1996. Vol. 63, № 6. P. 661–672.

98. Hains P.G., Truscott R.J.W. Post-translational modifications in the nuclear region of young, aged, and cataract human lenses // J. Proteome Res. 2007. Vol. 6, № 10. P. 3935–3943.

99. Truscott R.J. Age-related nuclear cataract-oxidation is the key // Exp. Eye Res. 2005. Vol. 80, № 5. P. 709–725.

100. Padgaonkar V., Giblin F.J., Reddy V.N. Disulfide cross-linking of urea-insoluble proteins in rabbit lenses treated with hyperbaric oxygen // Exp. Eye Res. 1989. Vol. 49, № 5. P. 887–899.

101. Moreau K.L., King J.A. Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention // Trends Mol. Med. 2012. Vol. 18, № 5. P. 273–282.

102. Sherin P.S. et al. Photophysics and photochemistry of the UV filter kynurenine covalently attached to amino acids and to a model protein // J. Phys. Chem. B. 2010. Vol. 114, № 36. P. 11909–11919.

103. Hood B.D., Garner B., Truscott R.J. Human lens coloration and aging. Evidence for crystallin modification by the major ultraviolet filter, 3-hydroxy-kynurenine O-beta-D-glucoside // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274, № 46. P. 32547–32550.

104. Mizdrak J. et al. Tryptophan-derived ultraviolet filter compounds covalently bound to lens proteins are photosensitizers of oxidative damage // Free Radic. Biol. Med. 2008. Vol. 44, № 6. P. 1108–1119.

105. Parker N.R. et al. Protein-bound kynurenine is a photosensitizer of oxidative damage // Free Radic. Biol. Med. 2004. Vol. 37, № 9. P. 1479–1489.

106. Korlimbinis A., Aquilina J.A., Truscott R.J.W. Protein-bound and free UV filters in cataract lenses. The concentration of UV filters is much lower than in normal lenses // Exp. Eye Res. 2007. Vol. 85, № 2. P. 219–225.

107. Korlimbinis A., Aquilina J.A., Truscott R.J.W. Protein-bound UV filters in normal human lenses: the concentration of bound UV filters equals that of free UV filters in the center of older lenses // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2007. Vol. 48, № 4. P. 1718–1723.

108. Tweeddale H.J. et al. Cross-linking of lens crystallin proteins induced by tryptophan metabolites and metal ions: implications for cataract development // Free Radic. Res. 2016. Vol. 50, № 10. P. 1116–1130.

109. Korlimbinis A. et al. 3-Hydroxykynurenine oxidizes alpha-crystallin: potential role in cataractogenesis // Biochemistry (Mosc.). 2006. Vol. 45, № 6. P. 1852–1860.

110. VISION 2020: THE CATARACT CHALLENGE // Community Eye Health. 2000. Vol. 13, № 34. P. 17–19.

111. Khairallah M. et al. Number of People Blind or Visually Impaired by Cataract Worldwide and in World Regions, 1990 to 2010 // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2015. Vol. 56, № 11. P. 6762–6769.

112. Murthy G.V.S. et al. Current status of cataract blindness and Vision 2020: The right to sight initiative in India // Indian J. Ophthalmol. 2008. Vol. 56, № 6. P. 489–494.

113. Brian G., Taylor H. Cataract blindness--challenges for the 21st century // Bull. World Health Organ. 2001. Vol. 79, № 3. P. 249–256.

114. Roberts J.E. Ultraviolet radiation as a risk factor for cataract and macular degeneration // Eye Contact Lens. 2011. Vol. 37, № 4. P. 246–249.

115. Dillon J. UV-B as a pro-aging and pro-cataract factor // Doc. Ophthalmol. Adv. Ophthalmol. 1994. Vol. 88, № 3–4. P. 339–344.

116. Norval M. et al. The human health effects of ozone depletion and interactions with climate change // Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol. 2011. Vol. 10, № 2. P. 199–225.

117. David G., Pedrigi R.M., Humphrey J.D. Accommodation of the human lens capsule using a finite element model based on nonlinear regionally anisotropic biomembranes // Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin. 2017. Vol. 20, № 3. P. 302–307.

118. Karadag O. et al. Incidence of and risk factors for increased intraocular pressure after penetrating keratoplasty // Cornea. 2010. Vol. 29, № 3. P. 278–282.

119. Li L. et al. Surgical treatment and visual outcomes of cataract with persistent hyperplastic primary vitreous // Int. J. Ophthalmol. 2017. Vol. 10, № 3. P. 391–399.

120. Makri O.E. et al. Cystoid macular edema associated with preservative-free latanoprost after uncomplicated cataract surgery: case report and review of the literature // BMC Res. Notes. 2017. Vol. 10, № 1. P. 127.

121. Lee J.-S. et al. Time trends in cataract surgery and after-cataract laser capsulotomy in Taiwan: A population-based retrospective cohort study // Int. J. Surg. Lond. Engl. 2016. Vol. 36, № Pt A. P. 265–273.

122. Bourcier T. et al. Robot-assisted simulated cataract surgery // J. Cataract Refract. Surg. 2017. Vol. 43, № 4. P. 552–557.

123. Lerman S. Chemical and physical properties of the normal and aging lens: spectroscopic (UV, fluorescence, phosphorescence, and NMR) analyses // Am. J. Optom. Physiol. Opt. 1987. Vol. 64, № 1. P. 11–22.

124. Weale R.A. Human lenticular fluorescence and transmissivity, and their effects on vision // Exp. Eye Res. 1985. Vol. 41, № 4. P. 457–473.

125. Sato K., Bando M., Nakajima A. Fluorescence in human lens // Exp. Eye Res. 1973. Vol. 16, № 2. P. 167–172.

126. Kessel L. et al. Age-related changes in the transmission properties of the human lens and their relevance to circadian entrainment // J. Cataract Refract. Surg. 2010. Vol. 36, № 2. P. 308–312.

127. Gakamsky D.M. et al. Exploring the possibility of early cataract diagnostics based on tryptophan fluorescence // J. R. Soc. Interface. 2011. Vol. 8, № 64. P. 1616–1621.

128. Vladimirova E.S. et al. Fluorescence diagnosis of the status of the human lens in vivo // J. Appl. Spectrosc. 2012. Vol. 79, № 1. P. 126–130.

129. Ranjan M., Beedu S.R. Spectroscopic and biochemical correlations during the course of human lens aging // BMC Ophthalmol. 2006. Vol. 6. P. 10.

130. Tyebkhan G. Declaration of Helsinki: the ethical cornerstone of human clinical research // Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol. 2003. Vol. 69, № 3. P. 245–247.

131. Zelentsova E.A. et al. Post-mortem changes in the metabolomic compositions of rabbit blood, aqueous and vitreous humors // Metabolomics. 2016. Vol. 12, № 11. P. 172.

132. Rusakowicz R., Testa A.C. 2-Aminopyridine as a standard for low-wavelength spectrofluorimetry // J. Phys. Chem. 1968. Vol. 72, № 7. P. 2680–2681.

133. Gelernt B. et al. Absolute measurement of the quantum yield of quinine bisulphate // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2. 1974. Vol. 70. P. 939.

134. J.R. Calvert. Photochemistry. New-York: John Willey, 1969.

135. Ostapchenko L., Savchuk O., Burlova-Vasilieva N. Enzyme electrophoresis method in analysis of active components of haemostasis system // Adv. Biosci. Biotechnol. 2011. Vol. 02.

136. Medzihradszky K.F. In-solution digestion of proteins for mass spectrometry // Methods Enzymol. 2005. Vol. 405. P. 50–65.

137. Searle B.C. et al. Identification of protein modifications using MS/MS de novo sequencing and the OpenSea alignment algorithm // J. Proteome Res. 2005. Vol. 4, № 2. P. 546–554.

138. Sherin P.S. et al. Ultrafast Excited-State Dynamics of Kynurenine, a UV Filter of the Human Eye // J. Phys. Chem. B. 2009. Vol. 113, № 14. P. 4953–4962.

139. Gaillard E.R. et al. Age-related changes in the absorption characteristics of the primate lens // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2000. Vol. 41, № 6. P. 1454–1459.

140. Dillon J., Wang R.-H., Atherton S.J. PHOTOCHEMICAL AND PHOTOPHYSICAL STUDIES ON HUMAN LENS CONSTITUENTS // Photochem. Photobiol. 1990. Vol. 52, № 4. P. 849–854.

141. Avila F., Friguet B., Silva E. Photosensitizing Activity of Endogenous Eye Lens Chromophores: An Attempt to Unravel Their Contributions to Photo-Aging and Cataract Disease // Photochem. Photobiol. 2015. Vol. 91, № 4. P. 767–779.

142. Zelentsova E.A. et al. Optical properties of the human lens constituents // J. Photochem. Photobiol. B. 2017. Vol. 173. P. 318–324.

143. Lakowicz J.R. Fluorescence spectroscopic investigations of the dynamic properties of proteins, membranes and nucleic acids // J. Biochem. Biophys. Methods. 1980. Vol. 2, № 1. P. 91–119.

144. Wood A.M., Truscott R.J. UV filters in human lenses: tryptophan catabolism // Exp. Eye Res. 1993. Vol. 56, № 3. P. 317–325.

145. Bova L.M. et al. Major changes in human ocular UV protection with age // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2001. Vol. 42, № 1. P. 200–205.

146. Zigman S. Environmental near-UV radiation and cataracts // Optom. Vis. Sci. Off. Publ. Am. Acad. Optom. 1995. Vol. 72, № 12. P. 899–901.

147. Sherin P.S. et al. Photoactivity of kynurenine-derived UV filters // J. Photochem. Photobiol. B. 2008. Vol. 93, № 3. P. 127–132.

148. Tsentalovich Y.P. et al. Metabolomic composition of normal aged and cataractous human lenses // Exp. Eye Res. 2015. Vol. 134. P. 15–23.

149. Gritz D.C. et al. The Antioxidants in Prevention of Cataracts Study: effects of antioxidant supplements on cataract progression in South India // Br. J. Ophthalmol. 2006. Vol. 90, № 7. P. 847–851.

150. Neroev V.V. et al. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 4. Age-related eye disease. SkQ1 returns vision to blind animals // Biochem. Biokhimiia. 2008. Vol. 73, № 12. P. 1317–1328.

151. Zelentsova E.A. et al. Photochemistry of aqueous solutions of kynurenic acid and kynurenine yellow // Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol. 2013. Vol. 12, № 3. P. 546–558.

152. F. Mason S. 1002. The tautomerism of N-heteroaromatic hydroxy-compounds. Part II. Ultraviolet spectra // J. Chem. Soc. Resumed. 1957.

153. Lower S.K., El-Sayed M.A. The Triplet State and Molecular Electronic Processes in Organic Molecules // Chem. Rev. 1966. Vol. 66, № 2. P. 199–241.

154. El-Sayed M.A., Brewer R.G. Polarization of the $\pi^*\rightarrow\pi$ and $\pi^*\rightarrow$n Phosphorescence Spectra of N-Heterocyclics // J. Chem. Phys. 19631001.

155. Schmidt K. et al. Intersystem crossing processes in nonplanar aromatic heterocyclic molecules // J. Phys. Chem. A. 2007. Vol. 111, № 42. P. 10490–10499.

156. Lim E.C., Yu J.M.H. Vibronic Spin—Orbit Interactions in Heteroaromatic Molecules. I. Polycyclic Monoazines // J. Chem. Phys. 1967. Vol. 47, № 9. P. 3270–3275.

157. Malina H.Z. Xanthurenic acid provokes formation of unfolded proteins in endoplasmic reticulum of the lens epithelial cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999. Vol. 265, № 2. P. 600–605.

158. Roberts J.E. et al. Photooxidation of lens proteins with xanthurenic acid: a putative chromophore for cataractogenesis // Photochem. Photobiol. 2001. Vol. 74, № 5. P. 740–744.

159. Snytnikova O.A. et al. Deaminated UV filter 3-hydroxykynurenine O-beta-D-glucoside is found in cataractous human lenses // Exp. Eye Res. 2008. Vol. 86, № 6. P. 951–956.

160. Tsentalovich Y.P. et al. Photochemical and thermal reactivity of kynurenine // Exp. Eye Res. 2006. Vol. 83, № 6. P. 1439–1445.

161. Roberts J.E. et al. Photochemical Studies on Xanthurenic Acid¶ // Photochem. Photobiol. 2000. Vol. 72, № 4. P. 467–471.

162. Thao M.T. et al. Measuring the viscosity of whole bovine lens using a fiber optic oxygen sensing system // Mol. Vis. 2014. Vol. 20. P. 125–131.

163. Zelentsova E.A. et al. Influence of medium viscosity on photophysical properties of kynurenic acid and kynurenine yellow // Russ. Chem. Bull. 2017. Vol. 66, № 2. P. 267–272.

164. Takamura K., Fischer H., R. Morrow N. Physical properties of aqueous glycerol solutions // J Pet. Sci Eng. 2012. Vol. 98–99. P. 50–60.

165. Wondrak G.T., Jacobson M.K., Jacobson E.L. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection // Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol. 2006. Vol. 5, № 2. P. 215–237.

166. Pattison D.I., Rahmanto A.S., Davies M.J. Photo-oxidation of proteins // Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol. 2012. Vol. 11, № 1. P. 38–53.

167. Bando M., Mikuni I., Obazawa H. Acceleration of calcium-induced aggregation of rat lens soluble protein by photosensitization with 8-methoxypsoralen and 3-hydroxy-L-kynurenine O-beta-glucoside // Exp. Eye Res. 1982. Vol. 34, № 6. P. 953–960.

168. Linetsky M., James H.L., Ortwerth B.J. The generation of superoxide anion by the UVA irradiation of human lens proteins // Exp. Eye Res. 1996. Vol. 63, № 1. P. 67–74.

169. Dillon J. et al. The photochemical attachment of the O-glucoside of 3-hydroxykynurenine to alpha-crystallin: a model for lenticular aging // Photochem. Photobiol. 1999. Vol. 69, № 2. P. 248–253.

170. Varma S.D., Hegde K.R. Kynurenine-induced photo oxidative damage to lens in vitro: protective effect of caffeine // Mol. Cell. Biochem. 2010. Vol. 340, № 1–2. P. 49–54.

171. McNulty R. et al. Regulation of tissue oxygen levels in the mammalian lens // J. Physiol. 2004. Vol. 559, № Pt 3. P. 883–898.

172. Sherin P.S. et al. Aggregation of α-crystallins in kynurenic acid-sensitized UVA photolysis under anaerobic conditions // Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP. 2016. Vol. 18, № 13. P. 8827–8839.

173. Kawahara K., Tanford C. Viscosity and Density of Aqueous Solutions of Urea and Guanidine Hydrochloride // J. Biol. Chem. 1966. Vol. 241, № 13. P. 3228–3232.

174. Bent D.V., Hayon E. Excited state chemistry of aromatic amino acids and related peptides. III. Tryptophan // J. Am. Chem. Soc. 1975. Vol. 97, № 10. P. 2612–2619.

175. Bryant F.D., Santus R., Grossweiner L.I. Laser flash photolysis of aqueous tryptophan // J. Phys. Chem. 1975. Vol. 79, № 25. P. 2711–2716.

176. Galichanin K., Löfgren S., Söderberg P. Cataract after repeated daily in vivo exposure to ultraviolet radiation // Health Phys. 2014. Vol. 107, № 6. P. 523–529.

177. Ayala M.N., Michael R., Söderberg P.G. In vivo cataract after repeated exposure to ultraviolet radiation // Exp. Eye Res. 2000. Vol. 70, № 4. P. 451–456.

178. Giblin F.J. et al. UVA light in vivo reaches the nucleus of the guinea pig lens and produces deleterious, oxidative effects // Exp. Eye Res. 2002. Vol. 75, № 4. P. 445–458.

179. Simpanya M.F. et al. Measurement of Lens Protein Aggregation in Vivo Using Dynamic Light Scattering in a Guinea Pig/UVA Model for Nuclear Cataract // Photochem. Photobiol. 2008. Vol. 84, № 6. P. 1589–1595.

180. Giblin F.J. et al. A Class I UV-blocking (senofilcon A) soft contact lens prevents UVA-induced yellow fluorescence and NADH loss in the rabbit lens nucleus in vivo // Exp. Eye Res. 2012. Vol. 102. P. 17–27.

181. Ugarte R. et al. Riboflavin-photosensitized anaerobic modification of rat lens proteins. A correlation with age-related changes // J. Photochem. Photobiol. B. 1992. Vol. 13, № 2. P. 161–168.

182. Mafia K. et al. UV-A-induced structural and functional changes in human lens deamidated αB-crystallin // Mol. Vis. 2008. Vol. 14. P. 234–248.

183. Varma S.D., Kovtun S., Hegde K.R. Role of ultraviolet irradiation and oxidative stress in cataract formation-medical prevention by nutritional antioxidants and metabolic agonists // Eye Contact Lens. 2011. Vol. 37, № 4. P. 233–245.

184. Davies M.J., Truscott R.J. Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis // J. Photochem. Photobiol. B. 2001. Vol. 63, № 1–3. P. 114–125.

185. Stuart-Audette M. et al. Re-evaluation of intramolecular long-range electron transfer between tyrosine and tryptophan in lysozymes. Evidence for the participation of other residues // Eur. J. Biochem. 2003. Vol. 270, № 17. P. 3565–3571.

В заключение диссертационной работы хочу выразить огромную благодарность своим научным руководителям профессору д.х.н. Юрию Павловичу Центаловичу и к.ф.-м.н. Петру Сергеевичу Шерину за постановку интересных научных задач, советы в поиске их решения, внимательное руководство и всестороннее обучение. Юрию Павловичу отдельная благодарность за жизненные советы и наставления, а также своевременные контроль и стимулирование.

Также хочу поблагодарить весь коллектив группы протеомики и метаболомики Международного томографического центра – Яньшоле Людмилу Владимировну, Яньшоле Вадима Владимировича, Снытникову Ольгу Александровну, Сормачеву Екатерину Дмитриевну, Дужак Татьяну Григорьевну – за помощь и советы на всех этапах работы и теплую обстановку в коллективе лаборатории. Отдельная благодарность к.б.н Сергею Витальевичу Кулемзину за помощь в получении одного из объектов исследования.

Огромное спасибо хочется сказать всем сотрудникам Международного томографического центра, где была выполнена данная работа, в частности, академику д.х.н. Виктору Ивановичу Овчаренко, профессору д.ф.-м.н. Матвею Владимировичу Федину, к.х.н Алексею Сергеевичу Кирютину, к.ф.-м.н. Сергею Леонидовичу Веберу и др.