

АКАДЕМИЯ НАУК РОССИИ
ИНСТИТУТ ПРИКЛАДНОЙ ФИЗИКИ

На правах рукописи

Челноков Евгений Владимирович

« УФ-ЛАЗЕРНАЯ АГРЕГАЦИЯ ВОДОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ »

01.04.21 - лазерная физика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научные руководители:

Битюрин Н. М., к.ф.-м.н.
Соустов Л. В., к.ф.-м.н.

Нижний Новгород
2009

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|-----------|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 3 |
| Цель диссертационной работы: | 9 |
| Научная новизна работы: | 9 |
| Научно-практическая значимость | 11 |
| ГЛАВА 1. Экспериментальное исследование агрегации водорастворимых белков при воздействии УФ-лазерного излучения различных длин волн | 19 |
| 1.1 Выбор исследуемой среды и длины волны излучения | 19 |
| 1.1.1 Материалы и методы | 20 |
| 1.1.2 Схемы экспериментов..... | 21 |
| 1.1.3 Результаты и их обсуждение..... | 22 |
| 1.1.4 Выводы | 31 |
| 1.2 Изучение УФ-индуцированной агрегации модельного белка карбоангидразы | 32 |
| 1.2.1 Материалы и методы | 32 |
| 1.2.2 Результаты и их обсуждение..... | 35 |
| 1.2.3 Выводы | 45 |
| ГЛАВА 2. Исследование УФ-индуцированной агрегации кристаллинов хрусталика глаза при воздействии излучения ХеСІ лазера | 46 |
| 2.1 Материалы и методы | 48 |
| 2.2 Результаты и их обсуждение..... | 49 |
| 2.2.1 Исследование УФ-индуцированной агрегации β L-кристаллина | 49 |
| 2.2.2 Исследование УФ-индуцированной агрегации смеси кристаллинов | 55 |
| 2.3 Выводы | 59 |
| ГЛАВА 3. Построение модели фотоагрегации водорастворимых белков и сравнение с экспериментом | 60 |

| | | |
|--|--|------------|
| 3.1 | Оценки..... | 60 |
| 3.2 | Физическая модель фотоагрегации | 61 |
| 3.2.1 | Режим непрерывного УФ-облучения..... | 64 |
| 3.2.2 | Воздействие на раствор белка импульсного УФ-излучения | 68 |
| 3.2.3 | Выводы..... | 73 |
| 3.3 | Исследование постагрегации. Самосогласование модели..... | 74 |
| 3.4 | Заключение | 77 |
| | | |
| ГЛАВА 4. Экспресс-метод исследования УФ-лазерной агрегации водорастворимых белков и некоторые его применения..... | | 78 |
| 4.1 | Исследование влияния короткоцепочечных пептидов на скорость УФ-индуцированной агрегации смеси кристаллинов | 79 |
| 4.1.1 | Материалы и методы | 80 |
| 4.1.2 | Результаты и их обсуждение..... | 80 |
| 4.2 | Обобщение модели на случай слабых интенсивностей | 83 |
| 4.3 | Подбор новых антикатарактальных добавок | 86 |
| 4.4 | Повышенная чувствительность β A3-кристаллина с измененным строением молекулы (укороченной аминокислотной цепочкой) к фотоагрегации, вызванной УФ-излучением..... | 93 |
| 4.4.1 | Материалы и методы | 95 |
| 4.4.2 | Результаты | 97 |
| 4.4.2.1 | Кинетика фотоагрегации, вызванной УФ-облучением..... | 97 |
| 4.4.2.2 | Исследование физико-химическими методами | 102 |
| 4.4.2.3 | Влияние концентрации раствора..... | 104 |
| 4.4.3 | Выводы | 106 |
| 4.5 | Заключение | 106 |
| | | |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | | 107 |
| | | |
| СПИСОК РАБОТ ПО ДИССЕРТАЦИИ | | 108 |
| | | |
| ЛИТЕРАТУРА | | 111 |

ВВЕДЕНИЕ

За почти полувековой срок, прошедший с момента создания первого оптического квантового генератора, лазерное излучение получило применение в самых различных областях промышленности, техники, медицины. В настоящее время в связи с развитием лазерных технологий большое внимание уделяется исследованию взаимодействия лазерного излучения с веществом (см. например монографии [1-3]). Одним из важных направлений этих исследований является изучение взаимодействия лазерного излучения с полимерными средами [4 - 5]. Поглощение материалом лазерного излучения вызывает нагрев полимерного вещества, что, в свою очередь, может приводить к разрыву полимерных цепей, их сшиванию, выделению газообразных продуктов, и связанным с этим механическим эффектам. При воздействии излучения УФ лазеров важную роль могут играть также фотохимические реакции, которые не связаны с общим нагревом вещества.

Изучение воздействия лазерного излучения на биологические среды важно для применения в медицинских целях [6-9]. Особенностью воздействия на эти среды является то, что мягкие биологические ткани в значительной степени состоят из воды, что приводит к специфической реакции вещества на лазерный нагрев [10-13], а также то, что белки, составляющие основу тканей, являются молекулами со сложной пространственной структурой. Лазерное воздействие может приводить к значительному изменению этой структуры - к денатурации, которая существенно изменяет свойства этих молекул [14, 15].

Тепловая денатурация белков часто сопровождается агрегацией молекул [16 - 17]. Разворачивание водорастворимых белковых молекул (*unfolding*) приводит к "обнажению" гидрофобных остатков, и движущей силой агрегации являются гидрофобные взаимодействия между развернутыми молекулами [18-20]. Важно подчеркнуть различие между процессами ассоциации и агрегации. Ассоциацией (или самосборкой; *self-*

assembly) называют взаимодействие белковых молекул, приводящее к образованию стехиометрически строго детерминированных олигомерных структур. Агрегацией называют взаимодействие развернутых белковых молекул, которое приводит к образованию олигомеров "неправильной" формы вследствие "ошибочных" межмолекулярных взаимодействий [21]. В данной работе значительное внимание уделяется исследованию процессов агрегации водорастворимых белков при воздействии лазерного излучения.

Впервые теоретические работы по агрегации молекулярных систем были опубликованы М. Смолуховским в 1916 году [22]. В них записывались уравнения для необратимой агрегации и вводилась вероятность необратимого слипания кластеров, которая может зависеть, например, от пространственного строения кластера [23]. В связи с большим практическим интересом широкое распространение получили теоретические и экспериментальные работы по диффузионно-ограниченной агрегации [24-26], и по реакционно-ограниченной агрегации, образующимся в результате агрегации фракталам, их размерностям и свойствам [24, 26-28]. В настоящее время опубликованы многочисленные математические модели, обобщающие уравнения М. Смолуховского на случай обратимой агрегации и агрегации с фрагментацией [24, 29-31]. Уравнения, написанные в общем виде М. Смолуховским, применяются для оценки правильности полученных решений, например, в работе по математическому моделированию молекулярной динамики коллоидной суспензии с учетом как коллоидных частиц так и «частиц» раствора [32]. Процесс образования и агрегации кластеров лежит в области интересов биологии, иммунологии, полимерной и коллоидной химии, металлургии. Прикладные исследования агрегации актуальны также и в социальных науках. Так, например, в работах [33, 34] модель необратимой агрегации применена к исследованию миграционных и демографических процессов.

Наряду с многочисленными исследованиями, посвященными агрегации большого количества частиц, лишь малая доля внимания уделяется изучению

бимолекулярных механизмов взаимодействия [35, 36]. В работе [37], показано, что в растворах белка возможно образование равновесных кластеров, содержащих до двух десятков молекул, причем равновесие определяется не специфическим взаимодействием белковых молекул, а выравниванием сил электростатического отталкивания и ближнепольного притяжения. В этой работе продемонстрирована зависимость размера агрегатов от концентрации белка в растворе. При этом концентрация белка в эксперименте была всего в несколько раз ниже, чем концентрация этого же белка в яичном белке [38].

Представляется уместным упомянуть другие процессы, в которых, как и при агрегации, сложные молекулярные образования получаются из более простых.

Молекула белка является полимером биологического происхождения (биополимером), в которой аминокислоты играют роль мономеров. В этой связи следует отметить некоторое сходство процесса агрегации с такими химическими процессами в полимерной химии, как полимеризация и поликонденсация, кинетика которых изучалась в нашей группе [39-42].

При полимеризации мономер может реагировать только с микрорадикалом и растущей полимерной цепью, макрорадикалом [43, 44]. Интересно отметить, что белковые агрегаты, состоящие из небольшого числа исходных белковых молекул, называются олигомерами аналогично синтетическим полимерам с малой длиной цепи. При поликонденсации могут вступать в химическую реакцию любые две частицы, находящиеся в системе [45]. Поликонденсация может приводить к образованию трехмерных сеток, гелей. При полимеризации полифункциональных мономеров также возможно образование трехмерных структур. Такие гигантские трехмерные фракталоподобные образования возможны и на поздних стадиях агрегации белковых молекул.

При фазовых переходах процесс агрегации зачастую лежит в основе процесса формирования новой фазы [28]. В настоящее время одной из

стандартных методик получения металлических наночастиц в растворе является преципитация, осаждение частиц, возникающая при пересыщении раствора [46]. Этот процесс может быть рассмотрен как фазовый переход первого рода. Если в твердых растворах агрегация образующихся частиц, зародышей новой фазы, затруднена [47, 48], то в жидкости управление агрегацией и ростом частиц, выпадающих в осадок, является одной из основных задач этой методики [49-52]. Сходство термодинамики самоорганизации белков с фазовыми переходами первого рода экспериментально установлено в работах П. Л. Привалова [53], а сходство кинетических аспектов этих явлений - в компьютерных экспериментах Е. И. Шахновича и А. М. Гутина [54]. При определенных условиях (степень пересыщения раствора, уровень температуры, величина рН) белок как в физиологическом растворе *in vitro*, так и *in vivo*, например, в хрусталике глаза, способен кристаллизоваться [55, 56]. Такие фазовые переходы белка изучаются белковой кристаллографией [57, 58].

Агрегация белков является причиной многих заболеваний [59-63]. Одно из них - катаракта, являющаяся по данным Всемирной Организации Здравоохранения основной причиной потери зрения во всем мире [64, 65]. Катаракта является клиническим результатом увеличения рассеяния света хрусталиком глаза. Это светорассеяние может возникать из-за потери клеточного порядка в хрусталике в результате нарушения процесса его развития или бесконтрольного деления клеток, а также из-за потери прозрачности отдельных клеток хрусталика. Последнее, в частности, может произойти из-за фотоповреждения основных белков хрусталика - кристаллинов, вызывающего их агрегацию. Причиной появления наследственной катаракты могут стать мутированные кристаллины из-за изменения стабильности связи (ассоциации) или растворимости. Вызванная воздействием на хрусталик ультрафиолетовым излучением катаракта активно изучается *in vivo* [66-68] и *in vitro* [69-72].

Из литературы известно, что в организме развитию процессов денатурации препятствуют специальные белки - шапероны [73-75], механизм действия которых частично раскрыт в [76, 77]. Многие молекулярные шапероны известны как белки теплового шока (*heat-shock proteins, Hsp*), которые синтезируются в клетках всех организмов в ответ на повышение температуры выше допустимой. Белки теплового шока необходимы для защиты клеток от теплового повреждения и для нормализации функций клеток после прекращения теплового воздействия [78 - 84]. В то время как одни шапероны способствуют сворачиванию полипептидной цепи в нативную (исходную) структуру, другие - способны замедлять процесс агрегации белковых субстратов, но не могут обеспечить полный переход белка в нативное состояние [78, 80, 85 - 92]. Большой интерес к изучению свойств белков теплового шока и процессов агрегации привело к тому, что в последнее время появилось большое количество экспериментальных и теоретических работ по тепловой агрегации белков [21-38, 73 - 101].

Как показали ранее проведенные исследования, воздействие на организм УФ излучения является стрессом, в результате которого в организме также выделяются шапероны [102, 103]. Однако, например, в хрусталике глаза изначально присутствует белок α -кристаллин, который замедляет агрегацию β - и γ - кристаллинов, при воздействии высокой температуры [104, 105] или УФ излучения [106]. Шаперонная активность α -кристаллина была открыта сравнительно недавно [107 - 113] и похожа на хорошо известную шаперонную активность белков теплового шока. Несмотря на защитные свойства α -кристаллина с возрастом в хрусталике накапливаются необратимые изменения, приводящие к его помутнению, то есть к развитию катаракты.

В работах [69-72] исследовались фотоповреждения хрусталика глаза при воздействии излучения УФ лампы. Установлено образование агрегатов полипептидов [70], изменение зарядов кристаллинов хрусталика [71], повреждения структуры глаза под действием света [72] и наличие процессов

комплексообразования в растворах кристаллинов [101]. В этих работах использовалось широкополосное излучение с коротковолновой границей ~ 260 нм, где существенны процессы фотолиза. Роль процессов фотолиза в кристаллинах существенно уменьшается при воздействии на них более длинноволнового монохроматического лазерного излучения с длинами волн 295 и 308 нм. Однако до работы над диссертацией в литературе были опубликованы лишь единичные статьи по УФ лазерной агрегации белков [106, 114-116].

Подчеркивая принципиальное отличие лампового и лазерного ультрафиолетового излучения, отметим, что результаты, полученные при воздействии монохроматическим излучением проще трактовать, нежели следствия облучения широкополосным спектром мощных УФ ламп. При вырезании же узкого диапазона из спектра излучения УФ лампы существенно уменьшается интенсивность и, соответственно, увеличивается время проведения экспериментов. Некоторые процессы агрегации белков при лазерном воздействии связаны именно с большими плотностями энергии лазерных импульсов.

Задачей данной работы является исследование биофизических процессов УФ-индуцированной агрегации при использовании интенсивностей, достаточных для возникновения нелинейных эффектов при агрегации, но не приводящих к нагреву и нелинейному поглощению УФ излучения в растворах белков. В данной работе мы не будем различать термины *доза* и *экспозиция* УФ облучения. Другая задача - использование результатов исследования агрегации при поиске веществ, способных защитить белки от денатурирующих воздействий.

Эффективным методом исследования агрегации частиц в водном растворе является измерение мощности рассеянного излучения пробного лазерного пучка [117-120]. Этот метод, получивший широкое применение в экспериментальных работах [121, 122], будет использован и в настоящей работе.

Цель диссертационной работы:

- экспериментальное исследование воздействия лазерного излучения ультрафиолетового диапазона, не сводящегося к нагреву вещества излучением, на биологические среды и, в частности, на водные растворы белков;
- построение модели фотоагрегации водорастворимых белков, объясняющей выявленные закономерности;
- создание на основе экспериментальной методики и теоретической модели нового физического метода исследования процессов агрегации водорастворимых белков при воздействии на них импульсного лазерного УФ излучения;
- исследование возможности применения нового метода для сравнения способности белков к фотоагрегации и отбора добавок, ее замедляющих, в частности, для поиска новых антикатарактальных препаратов.

Научная новизна работы:

В работе экспериментально исследована зависимость УФ лазерной фотоагрегации белков в растворе от экспозиции облучения D и выявлен эффект зависимости степени агрегации (наведенного рассеяния) не только от экспозиции, но и от интенсивности облучения.

Предложен новый физический механизм агрегации через бимолекулярное взаимодействие фотоактивированных молекул белка. Этот механизм позволяет не только качественно, но и количественно описать полученные экспериментальные результаты.

В работе предложен новый экспресс-метод исследования агрегации белковых растворов, который применен для сравнения чувствительности растворов различных белков к воздействию УФ излучения. Данный метод может быть использован для экспресс-тестирования добавок, замедляющих агрегацию основных белков хрусталика глаза человека - кристаллинов. Такие добавки могут быть использованы при создании препарата для профилактики развития и, возможно, для лечения начальной стадии катаракты.

На основе исследования с помощью экспресс-метода влияния на скорость УФ–индуцированной агрегации кристаллинов различных пептидов, используемых при создании антикатарактальных препаратов, предложена новая комбинация короткоцепочечных пептидов, применение которой дало существенное (в несколько раз) замедление развития УФ-индуцированной катаракты у экспериментальных животных (крыс).

На защиту выносятся следующие положения:

Экспозиция УФ излучения ($D = w \cdot F \cdot t$), необходимая для агрегации водорастворимых белков, вызванной мягким УФ излучением ХеСІ лазера, зависит от значений плотности энергии лазерных импульсов w и частоты их следования F . При фиксировании одного из этих параметров (w или F) уменьшение второго приводит к увеличению экспозиции необходимой для агрегации, при увеличении же этого параметра необходимая для агрегации экспозиция стремится к константе.

Начальная стадия УФ-лазерной фотоагрегации происходит при взаимодействии двух активированных светом молекул с конечным временем жизни фотоактивированного состояния. Такая модель качественно и количественно описывает экспериментальные результаты.

Созданный экспресс-метод позволяет сравнить чувствительности растворов различных белков к воздействию УФ излучения и для исследования влияния различных веществ на скорость фотоагрегации белков хрусталика глаза.

Мутантные β -кристаллины А3tr обладают повышенной предрасположенностью к фотоагрегации по сравнению с нормальными β -кристаллинами А3. Исследованные структурные изменения этих белков могут способствовать более раннему развитию катаракты у людей с соответствующими приобретенными или генетически унаследованными изменениями.

Созданная комбинация короткоцепочечных пептидов замедляет фотоагрегацию основных белков хрусталика глаза – кристаллинов.

Композиция была апробирована в ГУ Научно-исследовательском институте глазных болезней РАМН. Получено существенное замедление развития УФ-индуцированной катаракты у экспериментальных животных.

Научно-практическая значимость

Предложен новый механизм фотоагрегации водорастворимых белков.

Созданный в работе тестовый экспресс-метод может быть использован при отборе веществ, защищающих кристаллины хрусталика глаза от повреждающего воздействия УФ излучения, на основе которых могут быть созданы принципиально новые антикатарактальные препараты.

Работа проводилась в рамках исследований, поддержанных Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 00-02-16411-а, № 01-02-06492-мас, № 02-04-49342-а, № 03-04-06233-мас, № 04-04-08150-офи_а, № 05-04-48749-а, № 08-02-01157-а, № 08-04-97108-р_поволжье_а) и программой Президиума РАН «Фундаментальные Науки - Медицине» с 2002 по 2008 годы.

В рамках проекта РФФИ № 04-04-08150-офи_а в ГУ Научно-исследовательский институт глазных болезней РАМН проведены испытания предложенной нами комбинации короткоцепочечных пептидов. Получено существенное замедление развития УФ-индуцированной катаракты у экспериментальных животных. Получено решение Роспатента о выдаче патента на изобретение «Фармацевтическая композиция для профилактики развития и лечения начальной стадии возрастной катаракты (варианты)».

Достоверность и обоснованность положений и выводов, полученных в диссертации, обеспечена применением современной стандартизованной измерительной аппаратуры, метрологической поверкой измерительного оборудования, использованием стандартных экспериментальных оптических и биохимических методов, обработкой данных с помощью современного программного обеспечения, воспроизводимостью экспериментальных результатов и согласованием некоторых выводов с результатами других

авторов. Система менеджмента и качества соответствует требованиям ГОСТ РВ 15.002-2003 и ГОСТ Р ИСО 9001-2001.

Публикации и апробация результатов. Основные результаты диссертации докладывались как на российских конференциях:

- отчетные конференции по Программе Президиума РАН “Фундаментальные науки – медицине”: 25-26 ноября 2002; 10-11 декабря 2003; 2-3 декабря 2004; 14-16 декабря 2005; 27-29 ноября 2006; 3-4 декабря 2007, Москва;

- 11-я Нижегородская сессия молодых ученых (естественнонаучные дисциплины), 16-21 апреля 2006, д. Татинец, Нижегородская область;

- II и III Троицкая Конференция по Медицинской Физике (ТКМФ-2), 16-19 мая 2006, (ТКМФ-3) 3-6 июня 2008, г. Троицк Московская область;

так и на международных:

- X International Conference Nonresonant Laser-Matter Interaction (NLMI-10), 21-23 august 2000, Saint-Petersburg, Russia;

- European Biomedical Optics Week - EBIOS 2000, 4-8 July 2000, Amsterdam, Netherlands;

- International Quantum Electronics Conference 2002 / Conference on Lasers, Applications, and Technologies 2002 (IQEC/LAT 2002), 22–27 June 2002, Moscow, Russia;

- XI International Conference Laser Matter Interaction (LMI-XI), 30 June -2 July 2003, St.-Petersburg-Pushkin, Russia;

- Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO 2003), 4 May 2003, Fort Lauderdale, Florida, USA;

- Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO 2005), 1-5 May 2005, Fort Lauderdale, Florida, USA;

- International Conference on Coherent and Nonlinear Optics / International Conference on Lasers, Applications, and Technologies (ICONO/LAT-2005), 11-15 May 2005, Saint-Petersburg, Russia;

- International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics and Biophysics, Saratov Fall Meeting`05, 27-30 September 2005, Saratov, Russia;
- International Conference on Coherent and Nonlinear Optics / International Conference on Lasers, Applications, and Technologies (ICONO/LAT-2007) Fundamentals of laser chemistry and photobiology, May 28 – June 1, Minsk, Belarus, 2007;
- Laser Applications in Life Sciences (LALS-2007), June 11-14, Moscow, Russia, 2007;
- International Conference “Fundamentals of Laser Assisted Micro– and Nanotechnologies” (FLAMN-07), June 25-28, 2007, St. Petersburg - Pushkin, Russia.

По материалам диссертации опубликовано семь статей в рецензируемых научных журналах, включая препринт ИПФ РАН [1*], четыре статьи из перечня ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени кандидата наук [2*-5*], и две статьи из списка зарубежных научных журналов и изданий, в которых могут быть опубликованы основные научные результаты диссертации [6*, 7*], определяемых Высшей аттестационной комиссией. Кроме того, опубликованы семь статей в сборниках научных трудов международных [8*-11*] и российских [12*-14*] конференций и одиннадцать тезисов докладов на международных и российских научных конференциях [15*].

Результаты, представленные в диссертации, вошли в отчет о научной и научно-организационной деятельности ИПФ РАН за 2004, 2005 и 2008 годы по разделу "Основные результаты в области естественных, технических, гуманитарных и общественных наук" [16*-18*]. Получено решение Роспатента о выдаче патента на изобретение «Фармацевтическая композиция для профилактики развития и лечения начальной стадии возрастной катаракты (варианты)» [19*].

Личный вклад автора в работах, выполненных в соавторстве с сотрудниками лаборатории 332 отдела 330 отделения Нелинейной Динамики и Оптики Института прикладной физики РАН, заключается в участии постановки задачи, в проведении экспериментальных исследований и построении теоретической модели, в обработке, обсуждении, подготовке к публикации и представлению на конференциях полученных результатов, а также в оформлении проектов и отчетов по грантам РФФИ и по Программе фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».

Содержание работы. Во введении рассматривается современное состояние проблемы и обзор литературы по тематике исследования, обоснована актуальность темы диссертации, формулируется цель исследования, дается общая характеристика работы, включающая научную новизну, практическую значимость и основные положения, выносимые на защиту.

Первая глава посвящена экспериментальному исследованию индуцированной импульсным излучением УФ лазера агрегации яичного белка, хрусталика глаза свиньи и модельного белка карбоангидразы. Впервые такие исследования проведены в широком диапазоне изменения плотности энергии лазерных импульсов и частот их повторения. Важной задачей, решаемой в первой главе, является исследование воздействия на белки излучения ультрафиолетового диапазона различных длин волн. В первой части главы описаны эксперименты, проделанные с яичным белком и хрусталиком глаза свиньи, и направленные на определение диапазонов УФ излучения, в которых доминируют либо процессы агрегации, либо процессы фотолиза и фотоокисления, а также на определение температурного режима в процессе облучения. Определены соответствующие источники лазерного излучения, оптические методы регистрации и геометрия экспериментальных схем. Кроме того, выявлены характеристики этих естественных сред, в частности, большая внутренняя неоднородность образцов и отсутствие

требуемой повторяемости свойств от образца к образцу, что потребовало проведения серии экспериментов для получения статистически достоверных данных. В результате был сделан вывод о целесообразности проведения экспериментов с отдельными компонентами биологических сред – растворами входящих в их состав белков.

Обнаружено, что при воздействии на белковые среды излучения ХеСІ лазера (308 нм) в отличие от воздействия лазера с $\lambda = 270$ нм наблюдается зависимость наведенного рассеяния не только от дозы облучения, но и от плотности энергии в импульсе.

Во второй части главы приведены результаты, полученные при воздействии излучения ХеСІ лазера (308 нм) на карбоангидразу. Выбор этого белка в качестве модельного был обусловлен следующими обстоятельствами. Во-первых, по таким биофизическим свойствам как характерный размер и молекулярная масса он близок к γ -кристаллину и некоторым формам β -кристаллина, являющимися основными белками хрусталика глаза. Во-вторых, зависимость степени его агрегации от дозы УФ облучения близка к соответствующей зависимости для β L-кристаллина.

Для исследованных белков выявлена нелинейная зависимость степени их агрегации от режимов УФ облучения – от плотности энергии лазерных импульсов и частоты их повторения.

Эксперименты с карбоангидразой позволили последовательность действий при приготовлении и очистке растворов белков, а также температурные режимы их облучения и хранения.

Во второй главе, основываясь на выработанной в предыдущей части работы методике исследования, осуществляется изучение кинетики УФ (308 нм) индуцированной агрегации основных белков хрусталика глаза α -, β - и γ -кристаллинов как по отдельности так и в смеси. Наиболее подробно была исследована УФ-индуцированная агрегация β L-кристаллина. По экспозиционным зависимостям для β L-кристаллина, как и для карбоангидразы, выявлена зависимость степени их агрегации не только от

дозы, но и от режимов УФ облучения – от плотности энергии лазерных импульсов и частоты их повторения. Полная смесь трех кристаллинов рассматривается как некоторая модель хрусталика глаза, наиболее близкая к нему по физико-химическим свойствам, нежели раствор каждого кристаллина в отдельности.

Основываясь на экспериментальных результатах для β L-кристаллина и карбоангидразы, были сделаны основные предположения, использованные при построении физической теории фотоагрегации, подробно изложенной в третьей главе.

Третья глава посвящена созданию физической модели начальной стадии агрегации белков при воздействии на них мягким УФ излучением, которая описывает образование агрегатов, а также оценкам температурных эффектов в образце при импульсном лазерном воздействии. В модели рассматривается как случай непрерывного излучения, моделирующий солнечный УФ, так и более соответствующий эксперименту импульсный режим. Как следует из экспериментальных результатов первой и второй главы, такие характеристики излучения, как частота следования и плотность энергии лазерных импульсов, являются ключевыми факторами, определяющими кинетику агрегации. Установлено, что доза УФ облучения, необходимая для агрегации белков (критическая доза), нелинейно зависит от частоты и плотности энергии лазерных импульсов (XeCl-лазер) таким образом, что эта доза сильно падает с увеличением интенсивности, выходя на константу при их увеличении. Для объяснения этого эффекта принято, что первый этап фотоагрегации состоит в объединении двух активированных светом молекул белка. При этом фотоактивированное состояние обладает конечным временем жизни. Конкуренция процессов парного взаимодействия активированных молекул и релаксации активированного состояния при малой концентрации фотоактивированных состояний приводит к резкой зависимости дозы УФ облучения, необходимой для агрегации белков, от интенсивности излучения $I = w \times F$. Напротив, при большой концентрации

фотоактивированных состояний конкуренции нет - все молекулы, активированные светом, агрегируют в парных процессах и зависимость критической дозы УФ-облучения от интенсивности исчезает.

Наложение теоретических кривых на экспериментальные данные позволили с помощью построенной модели не только качественно объяснить механизмы фотоагрегации, но и количественно, по порядку величины, оценить важные параметры задачи, основным из которых является время темновой дезактивации фотоактивированного состояния, от величины которого существенно зависит скорость фотоагрегации белков.

Для самосогласования нового физического механизма начальной стадии УФ индуцированной агрегации были проведены дополнительные эксперименты, в результате которых было обнаружено и исследовано явление продолжения агрегации уже без действия света (эффект постагрегации).

В четвертой главе обосновывается создание экспериментального экспресс-метода изучения агрегации белковых молекул при воздействии излучения ХеСІ лазера на водные растворы белков, а также возможность трактовки результатов, полученных с его помощью, на случай слабых интенсивностей, в частности, солнечного ультрафиолета. Этот метод использован для сравнения чувствительности к УФ излучению нормального и модифицированного β -кристаллина. Исследование влияния генетических изменений в строении молекулы кристаллина на восприимчивость к ультрафиолетовому излучению осуществлялось на искусственно полученных β -кристаллинах. Основным результатом этого исследования заключается в том, что изменение в строении белковой молекулы, в частности, купирование у нее аминокислотных остатков, приводит к увеличению чувствительности к УФ. Такие приобретенные или унаследованные генетические изменения могут являться причиной ускоренного развития катаракты.

Особое внимание в четвертой главе уделяется исследованию действия веществ, замедляющих фотоагрегацию белков хрусталика глаза. При этом в

качестве добавок рассматривались не только уже используемые в медицине антикатарактальные препараты и их составляющие. На основе сравнения влияния на агрегацию белков известных пептидов, использующихся в антикатарактальных препаратах, предложена новая комбинация короткоцепочечных пептидов, обладающих лучшими защитными свойствами. Фактически действие этих пептидов эквивалентно действию α -кристаллина на агрегацию других белков. Использование нашего метода еще раз продемонстрировало тот факт, что α -кристаллин обладает свойствами шаперона, то есть вещества, защищающего белковые молекулы в организме человека от разрушения при воздействии различных денатурирующих факторов.

В конце главы приведено количественное подтверждение того, что добавление в раствор исследуемого белка некоторых короткоцепочечных пептидов оказывает влияние на время темновой дезактивации и другие параметры системы. Делается заключение о том, что такие эксперименты совместно с привлечением для трактовки их результатов построенной модели позволяют производить экспресс-отбор добавок, которые могут рассматриваться как потенциальные антикатарактальные препараты. Приведены первые результаты экспериментов на лабораторных животных.

В заключении сформулированы основные результаты диссертационной работы.

ГЛАВА 1. Экспериментальное исследование агрегации водорастворимых белков при воздействии УФ-лазерного излучения различных длин волн

Сложность строения биологических объектов, значительное разнообразие процессов, проявляющихся при воздействии на них света, вызывают необходимость использования различных типов лазеров в прикладных задачах медицины. Выбор конкретного лазерного воздействия должен основываться на знании теории взаимодействия разных типов лазерного излучения с различными биологическими объектами. Например, лазерное излучение УФ диапазона используется для шлифовки роговицы глаза [123], при фотодинамическом воздействии на раковые опухоли [7]. В данной главе будет предложена новая методика комплексного экспериментального исследования закономерностей агрегации белковых сред под воздействием импульсного УФ излучения.

1.1 Выбор исследуемой среды и длины волны излучения

В настоящем разделе будет рассмотрено воздействие лазерного ультрафиолетового излучения на прозрачные биологические объекты и на раствор модельного белка карбоангидразы. Будет показано различное влияние на них ультрафиолетового излучения разных длин волн. На основе этих исследований будут отобраны среды, в которых исследования обнаруженных закономерностей удовлетворяет требованию воспроизводимости результатов.

В качестве исследуемых сред в первой серии экспериментов были выбраны яичный белок и хрусталик глаза свиньи (*in vitro*). Реакция этих сред может существенно меняться в зависимости от длины волны воздействующего излучения. При воздействии излучения видимого диапазона их структура не меняется, в то время как воздействие УФ

излучения может вызывать денатурацию составляющих их белковых молекул.

1.1.1 Материалы и методы

Для получения биологического материала использовались свежие яйца одной категории, приобретаемые в одном и том же магазине города. Хрусталики выделялись из свиных глаз, полученных на мясокомбинате.

В настоящее время существуют белки, выделенные из этих материалов в чистом виде. Из яичного белка выделяют яичный альбумин, а из хрусталика глаза получают основные составляющие его белки α -, β -, и γ -кристаллины. Следует отметить, что коммерческая стоимость кристаллинов достаточно велика и во много раз превышает стоимость исходной среды.

Исследуемые объекты помещались в кювету, состоящую из двух кварцевых пластин марки КУ1 (входное и выходное окна). Толщина белковой среды выбиралась в соответствии с условиями эксперимента и составляла 100, 50 или 10 мкм, что обеспечивалось толщиной тефлонового кольца, помещавшегося между окнами кюветы.

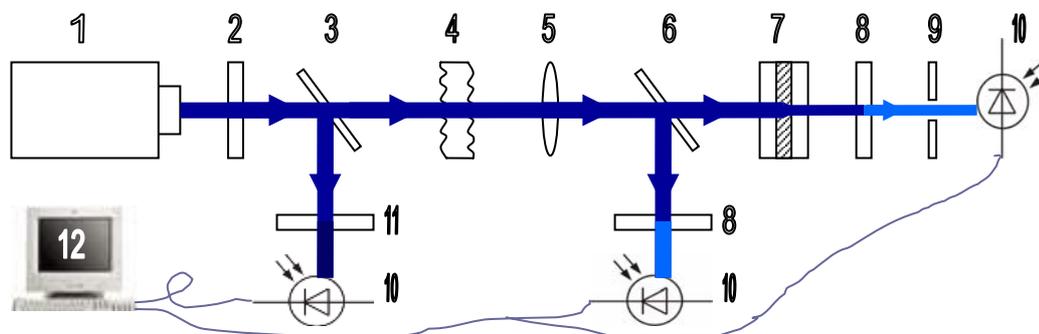
Перед проведением УФ облучения исследуемых сред измерялись их спектры поглощения на спектрофотометрах SPECORD M 40 и СФ – 26 в диапазоне длин волн 200 – 800 нм.

В качестве источников УФ излучения использовались 4-я и 5-я гармоники импульсного твердотельного лазера на кристалле Nd:YAP, что соответствует длинам волн $\lambda = 270$ нм и $\lambda = 216$ нм и импульсный эксимерный лазер LPX - 200 (XeCl) с $\lambda = 308$ нм.

Изменения, происходящие в исследуемых средах при УФ облучении, диагностировались по изменению мощности рассеянного в них излучения пробного пучка. В качестве пробного пучка использовалось либо излучение 4-ой гармоники YAP:Nd лазера малой интенсивности с $\lambda = 270$ нм, либо не поглощающееся в образцах излучение гелий-неонового лазера с $\lambda = 633$ нм.

1.1.2 Схемы экспериментов

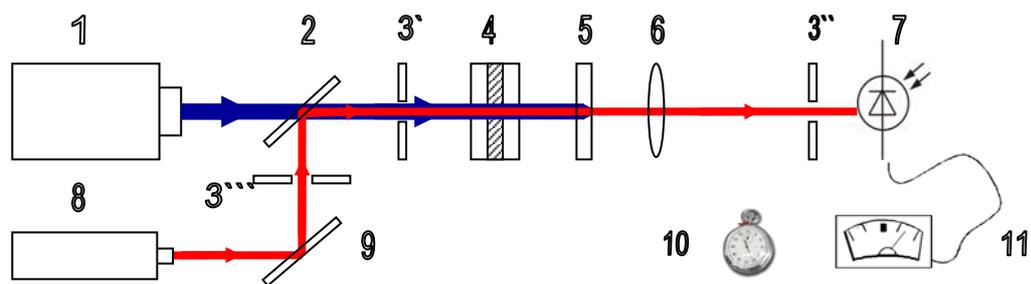
Для выполнения данной работы были выбраны, собраны и отработаны следующие схемы экспериментов:



- | | |
|--|--|
| 1 - лазер Nd:YAP (4 ^{ая} и 5 ^{ая} гармоники) | 7 - кювета образцом |
| 2 - аттенюатор | 8 - фильтр на 5 ^{ую} гармонику |
| 3 - плоскопараллельная пластинка | 9 - диафрагма |
| 4 - матовая пластинка | 10 - фотодиод |
| 5 - линза | 11 - фильтр на 4 ^{ую} гармонику |
| 6 - плоскопараллельная пластинка | 12 - система автоматизации |

Схема 1 для измерения поглощения 4-й и 5-й гармоник YAP:Nd лазера в исследуемых образцах в процессе и после УФ облучения.

Для ослабления 4-ой гармоники при использовании в качестве пробного пучка излучения 270 нм применялся калиброванный ослабитель (2). Плоскопараллельные пластинки (3) и (6) использовались для отвода части мощности пучка при калибровке системы и измерении мощностей 5-ой и 4-ой гармоник после прохождения через фильтры (11) и (8) соответственно. Матовая пластинка (4) использовалась для создания однородного пучка с целью получения равномерной засветки образца. Линза (5) фокусировала пучок на кювету с образцом, а расстоянием между линзой и образцом определялась площадь засветки. У кюветы с образцом (7) можно было менять толщину среды с помощью набора прокладок. Фотодиоды (10) использовались для измерения энергии лазерных импульсов. Диафрагма (9), являлась входным отверстием измерителя (10), и определяла телесный угол, из которого принимался сигнал. Программа автоматизации позволяла сохранять и визуализировать результаты измерений в процессе проведения эксперимента.



- | | |
|--|---------------------------------------|
| 1 - лазер Nd:YAP (5 ^{ая} гармоника) или лазер LPX-200 (XeCl $\lambda = 308$ нм) | 6 - линза |
| 2 - кварцевая пластинка | 7 - фотодиод |
| 3 - диафрагма | 8 - лазер He-Ne ($\lambda = 633$ нм) |
| 4 - кювета с образцом | 9 - зеркало |
| 5 - УФ фильтр (стеклянная пластинка) | 10 - секундомер |
| | 11 - измеритель мощности |

Схема 2 для измерения интенсивности рассеяния в процессе облучения различными длинами волн в УФ диапазоне.

Лазер (1) - источник излучения УФ диапазона. Зеркало (9) и пластинка (2) служат для введения в схему пробного пучка He-Ne лазера. Диафрагма (3') формирует область облучения; (3'') - телесный угол, из которого принимается сигнал в соответствии с фокусным расстоянием линзы (6); (3''') использована для вырезания узкого пучка из луча He-Ne лазера (8). Кювета с образцом (4) обладает возможностью смены толщины благодаря набору прокладок. Стеклопластиковая пластинка (5) отсекает УФ излучение, не допуская его попадания в фотодиод (7), измеряющий мощность прошедшего пробного пучка в непрерывном режиме. Стрелочный измеритель мощности (11) визуализирует сигнал с фотодиода (7). Для снятия временной зависимости используется секундомер (10).

1.1.3 Результаты и их обсуждение

Результаты измерения спектров пропускания кюветы с образцами необлученной биологической среды толщиной 50 и 10 мкм приведены на рис. 1.1 и 1.2. Из этих спектров по закону Бугера-Ламберта-Бера (1.1) получаем коэффициенты поглощения исследуемых сред (таблица 1).

$$I = I_0 \exp(-\alpha L); \quad \alpha = \frac{1}{L} \cdot \ln(I_0/I) \quad (1.1)$$

Таблица 1. Коэффициенты поглощения исследуемых сред для используемых длин волн*.

| Вещ-во \ λ | 216 нм | 270 нм | 308 нм |
|--------------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| яичный белок | $> 5000 \pm 50 \text{ см}^{-1}$ | $172 \pm 6 \text{ см}^{-1}$ | $28 \pm 1 \text{ см}^{-1}$ |
| хрусталик глаза | — | $> 800 \pm 10 \text{ см}^{-1}$ | $46 \pm 3 \text{ см}^{-1}$ |

В эксперименте по исследованию изменения пропускания биологической среды после воздействия УФ излучения использовалась схема № 1. Излучение YAP:Nd лазера на длине волны 216 нм (5-я гармоника) поглощалось в кювете, заполненной слоем яичного белка толщиной 100 и 50 мкм. После облучения снова прописывался спектр кюветы и сравнивался со спектром исходного вещества - рис. 1.1.

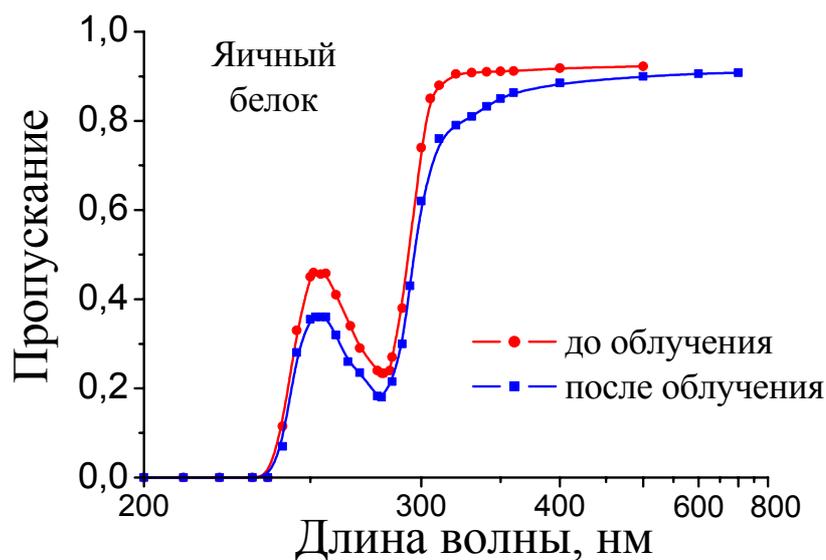


Рис. 1.1. Зависимости пропускания кюветы с образцом яичного белка толщиной 50 мкм до и после облучения 5-й гармоникой Nd:YAP лазера.

* Погрешность измерений длины волны ($\pm 0,05 \text{ нм}$) и фотометрическая погрешность соответствуют техническим характеристикам спектрофотометра.

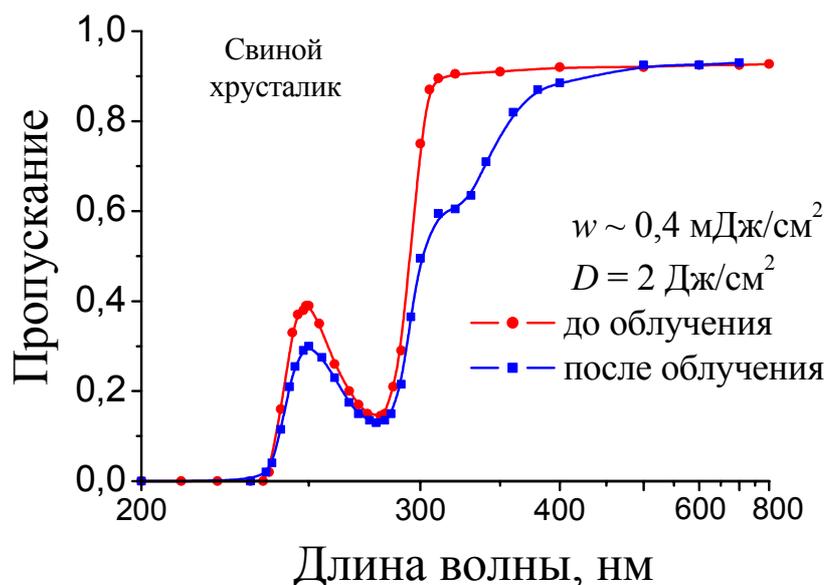


Рис. 1.2. Зависимости пропускания кюветы с образцом свиного хрусталика толщиной 10 мкм до и после облучения 4-й гармоникой Nd:YAP лазера.

Было исследовано также изменение спектра пропускания хрусталика глаза свиньи после облучения на длине волны 270 нм (4-я гармоника) рис. 1.2. Толщина среды выбиралась 50 и 10 мкм, что объясняется большими коэффициентами поглощения среды. Облучение проводилось в режиме модулированной добротности, характеризующимся следующими параметрами: продолжительность импульса $\tau_u = 10$ нс, частота повторения импульсов $F = 10$ Гц.

Одним из результатов воздействия является изменение спектра пропускания сред во всем наблюдаемом на спектрофотометре диапазоне, что представлено на рис. 1.1 и 1.2. А именно, наблюдалось уменьшение пропускания, которое может являться как следствием увеличения рассеяния среды, так и изменения ее поглощения.

На языке оптической плотности такое изменение пропускания означает, что среда стала оптически более плотной. Зависимость оптической плотности среды от длины волны пересчитывается из закона Бугера-Ламберта-Бера.

$$A = \int_0^L \alpha(x) dx; \quad I = I_0 \times \exp(-A); \quad A_{(\lambda)} = \ln(I_0 / I_{(\lambda)}) \quad (1.2)$$

где, A – оптическая плотность среды $\times \ln(10)$.

В видимом диапазоне спектра изменение пропускания связано лишь с изменением рассеяния среды. Поэтому, выбрав длину волны (например, 500 нм), и учитывая, что интенсивность рассеянного излучения обратно пропорциональна λ^4 , найдем константу пропорциональности, которая будет применима для других длин волн. Эта процедура позволяет пересчитать рассеяние из видимого в другие диапазоны спектра.

$$A_{\lambda}^{after} - A_{\lambda}^{before} = \frac{const}{\lambda^4} \quad (1.3)$$

Результаты эксперимента представлены на рис. 1.3 зависимостями оптических плотностей сред до и после облучения от длины волны, кроме того приведена оптическая плотность среды после облучения с учетом поправки на рассеяние. Из рисунка видно, что учет рассеяния с использованием зависимости интенсивности рассеянного излучения как $const / \lambda^4$ дает хорошее согласование с зависимостью оптической плотности среды от длины волны после облучения почти во всем диапазоне длин волн. Отличие наблюдается лишь в узком диапазоне длин волн вблизи 255 нм. В этом диапазоне длин волн поглощают –S–S– связи в белковой молекуле [124]. Различие поглощения до и после облучения говорит об изменениях, возникающих при воздействии УФ излучения. Вероятнее всего это разрыв –S–S– связей, что подтверждается появляющимся характерным запахом сероводорода H_2S . Заметим, что на длине волны 280 нм, соответствующей максимуму поглощения триптофана [125], наведенного поглощения не наблюдается, что свидетельствует о сохранении этой аминокислоты при фотохимической реакции.

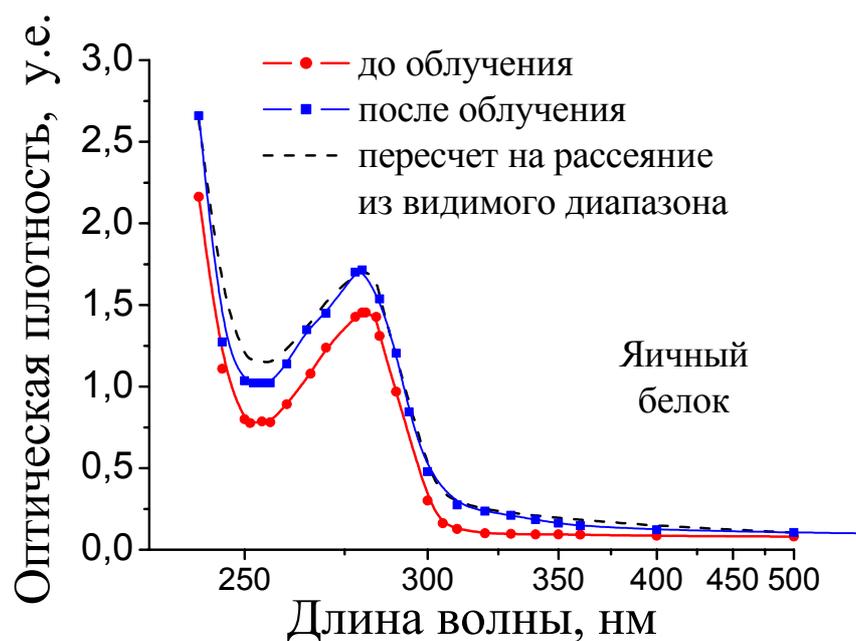


Рис. 1.3. Оптическая плотность яичного белка до и после облучения 216 нм. Пунктиром показана оптическая плотность, если бы ее изменение при облучении определялось бы только рассеянием (см. текст). Толщина образца 50 мкм.

Интересно отметить, что если изменение рассеяния приводит к увеличению оптической плотности среды (то есть к уменьшению ее пропускания), то, как видно из рисунка, указанное выше изменение поглощения в узком диапазоне длин волн просветляет среду, уменьшая ее оптическую плотность.

После смены фильтров в схеме 1 были проведены измерения, подтверждающие чисто фотохимическую (дозовую) природу изменения пропускания белковой среды после облучения. Облучение производилось плотностями энергии в импульсе (флуенсами) w , которые по теоретическим оценкам (см. п. 3.1) не вызывают тепловых изменений.

В первом эксперименте реализовывалась схема [121], в которой в качестве пробного пучка была выбрана маломощная 4-ая гармоника YAP:Nd лазера с длиной волны 270 нм и малым, по сравнению с силовым пучком, коэффициентом поглощения в белке (таблица 1). В качестве

модифицирующего излучения использовалась 5-ая гармоника того же лазера с $\lambda = 216$ нм.

Проведены измерения зависимости пропускания пробного пучка (4-ая гармоника) от дозы облучения 5-ой гармоникой для двух значений плотности энергии импульсов модифицирующего излучения. На рис. 1.4 представлен пересчет этих зависимостей в изменение оптической плотности среды.

Наложение зависимостей для двух плотностей энергий облучения с учетом погрешности измерений демонстрирует чисто фотохимическую природу изменения вещества. То есть изменение оптической плотности, вызванное модификацией вещества излучением, зависит только от числа поглощенных фотонов и не зависит от режима облучения.

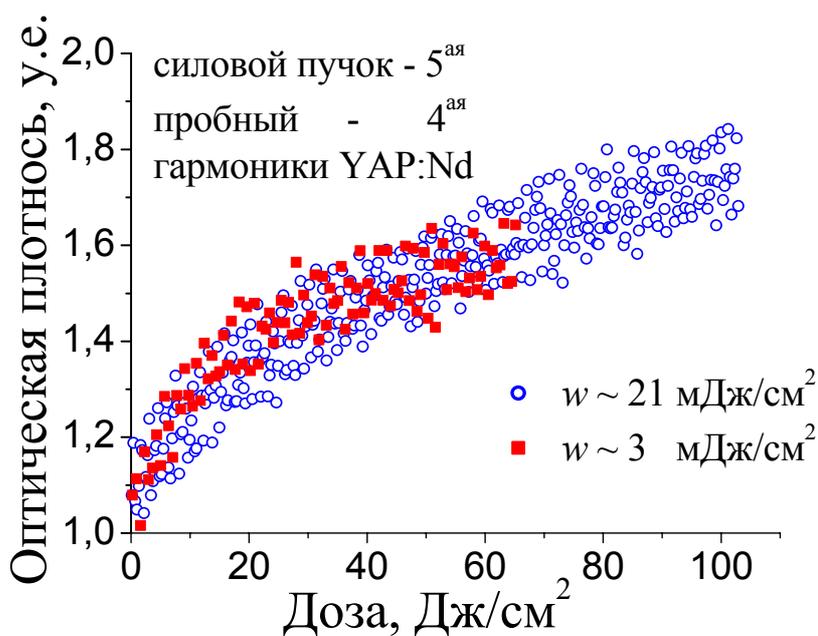


Рис. 1.4. Зависимость оптической плотности среды яичного белка, пересчитываемой из падения пропускания пробного пучка 4-ой гармоникой, от дозы облучения 5-ой гармоникой. Частота следования импульсов $F = 10$ Гц.

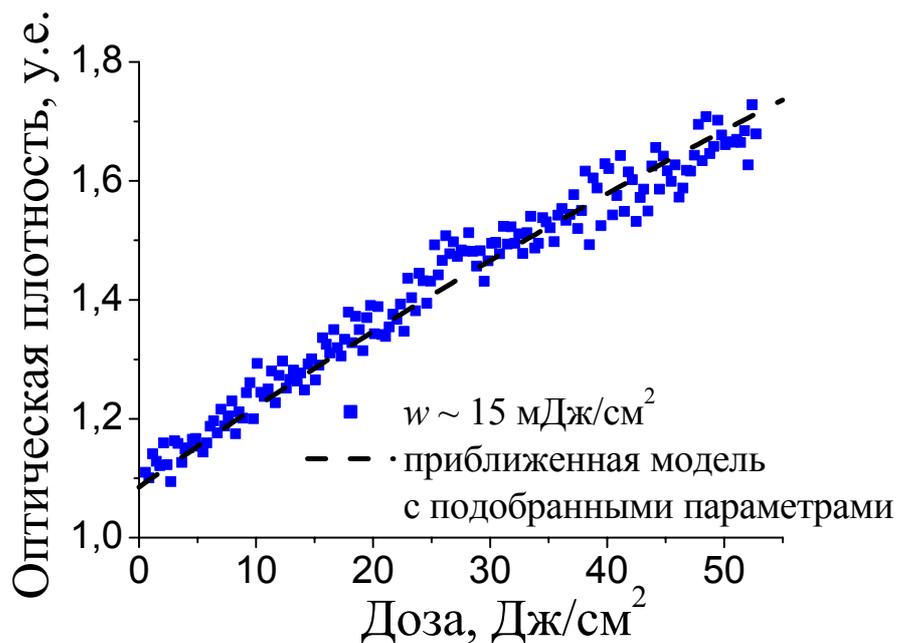


Рис. 1.5. Зависимость оптической плотности среды яичного белка от дозы УФ облучения, полученная из изменения пропускания силового пучка 4-ой гармоники. Частота следования импульсов $F = 10$ Гц.

Во втором случае нами не использовалась методика пробного пучка, а снималась зависимость пропускания силового (модифицирующего) излучения 4-ой гармоники Nd лазера с длиной волны 270 нм. Это излучение производило изменения в биологической среде яичного белка, одновременно претерпевая изменение пропускания.

В данном эксперименте наблюдалось уменьшение пропускания, что соответствовало увеличению оптической плотности среды. Изменение оптической плотности среды в зависимости от дозы облучения представлено на рис. 1.5. На экспериментальные данные легко наложить результат простейшей модели, учитывающей превращение вещества A в вещество B [4], что сопровождается изменением оптической плотности среды во времени. Эта зависимость при известной частоте и флуенсе излучения может быть пересчитана в зависимость от экспозиции по формуле: $D = (w \cdot F \cdot t)$.

В описанных выше измерениях мощность прошедшего излучения собиралась из большого телесного угла. Так как потери на рассеяние

определяются только рассеянием под большими углами и рассеянием назад, такая схема в большей степени позволяла учитывать изменение поглощения среды, чем схема с меньшим телесным углом.

В схеме 2 для диагностики УФ модификации хрусталика глаза свиньи использовалось пробное непрерывное одномодовое излучение He-Ne лазера с длиной волны $\lambda = 633$ нм. В качестве силового модифицирующего излучения в разных экспериментах использовались два источника: излучение 4-й гармоники лазера Nd:YAP на длине волны $\lambda = 270$ нм или излучение эксимерного лазера LPX - 200 на XeCl с длиной волны $\lambda = 308$ нм. Толщина свиного хрусталика в кювете составляла 100 мкм. Изменения в среде фиксировались по изменению рассеянной мощности пробного излучения, прошедшей через диафрагму, расположенную в перетяжке фокусирующей линзы. Поглощение в среде пробного излучения было пренебрежимо мало.

При измерении интенсивности прошедшего излучения реализовывался случай малого телесного угла, что давало возможность наблюдать изменение рассеяния под малыми углами и делало схему более чувствительной.

На рис. 1.6 и 1.7 изображены результаты измерения зависимости рассеяния от дозы облучения на обеих длинах волн.

Для длины волны 270 нм видна чисто фотохимическая природа изменения рассеяния, так как графики, полученные при разных плотностях энергии лазерных импульсов, совпадают с точностью погрешности измерений. Это соответствует представлениям о механизме фотомодификации на данной длине волны, сводящейся к разрыву ковалентных связей, то есть к фотолизу белка.

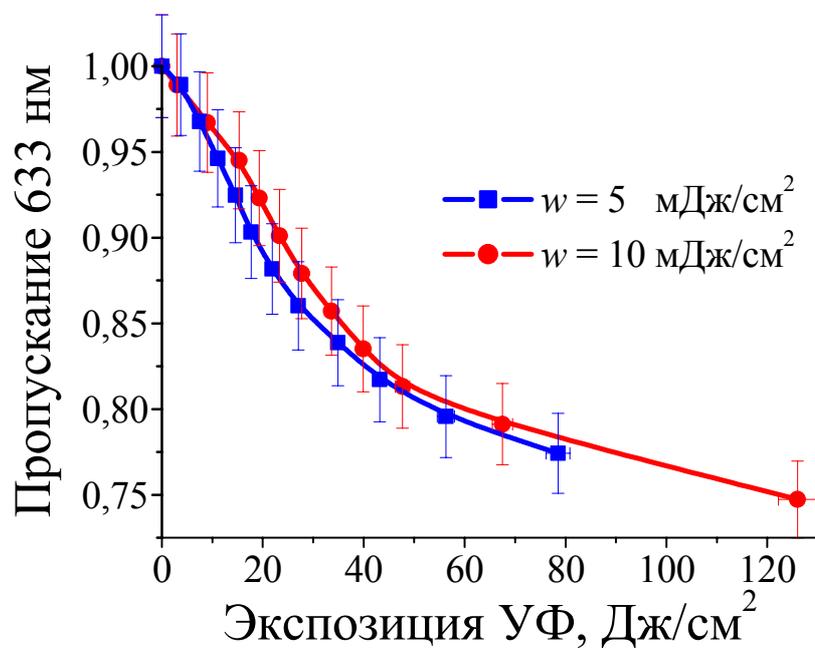


Рис. 1.6. Изменение пропускания 633 нм из-за наведенного рассеяния в свином хрусталике в процессе воздействия излучением 270 нм от экспозиции облучения при двух значениях плотности энергии лазерных импульсов при частоте следования импульсов $F = 10$ Гц.

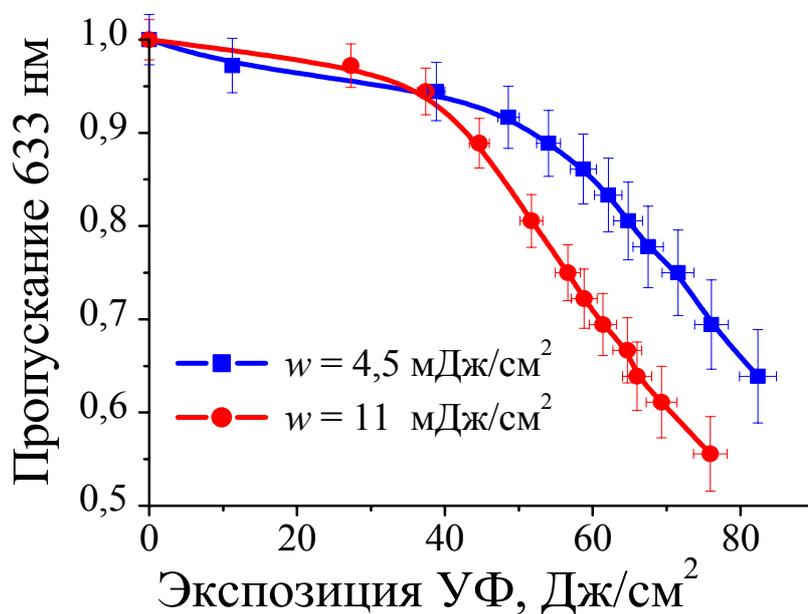


Рис. 1.7. Изменение пропускания 633 нм из-за наведенного рассеяния в свином хрусталике в процессе воздействия излучением эксимерного лазера (308 нм) от экспозиции облучения при двух значениях плотности энергии лазерных импульсов при частоте следования импульсов $F = 10$ Гц.

УФ излучение разных диапазонов по-разному взаимодействует с белком и считается, что $\lambda \cong 295$ нм – граничная длина волны в том смысле, что излучение с длинами волн короче приводит преимущественно к разрыву пептидных связей, а с большими длинами волн (примерно до 320 нм) вызывает агрегацию белка [106].

Результаты, приведенные на рис. 1.7, подтверждают иное поведение среды под влиянием модифицирующего излучения на длине волны 308 нм, по сравнению с результатами для 270 нм. Видно, что здесь изменение оптической плотности среды зависит не только от дозы облучения, но и от интенсивности лазерного излучения. Первые экспериментальные результаты по действию лазерного УФ с $\lambda = 308$ нм [106] дают основания считать, что и в нашем случае преобладает процесс агрегации.

1.1.4 Выводы

В данном разделе работы изучалась модификация исходно прозрачных биологических веществ (яичного белка и хрусталика глаза свиньи) при воздействии УФ лазерного излучения различных длин волн. Степень модификации определялась по изменению пропускания пробного излучения. Получены следующие результаты:

1. Из сравнения спектров пропускания до лазерного воздействия жестким УФ и после него удалось установить, что это изменение является следствием изменения рассеяния среды в диапазоне 200-800 нм за исключением узкой области в окрестности 255 нм, где изменение пропускания связано с изменением поглощения, вызванного разрывом –S–S– связей в молекуле белка.

2. Показана принципиальная разница между действием длинноволнового и коротковолнового ультрафиолета на биологическую среду, когда нагревом вещества можно пренебречь. В то время как при воздействии жесткого УФ ($\lambda < 295$ нм) кинетика рассеяния в биологической

среде зависит только от суммарной дозы облучения, для длинноволнового УФ (308 нм) кроме суммарной дозы определяющим фактором является также плотность энергии в лазерном импульсе w .

Для более подробного изучения этого эффекта необходимо использовать мягкий УФ ($\lambda > 295$ нм). Особый интерес может представлять длина волны излучения ХеСl эксимерного лазера (308 нм), которая находится на краю полосы поглощения аминокислоты триптофана [125] и слабо поглощается в хрусталике глаза [126].

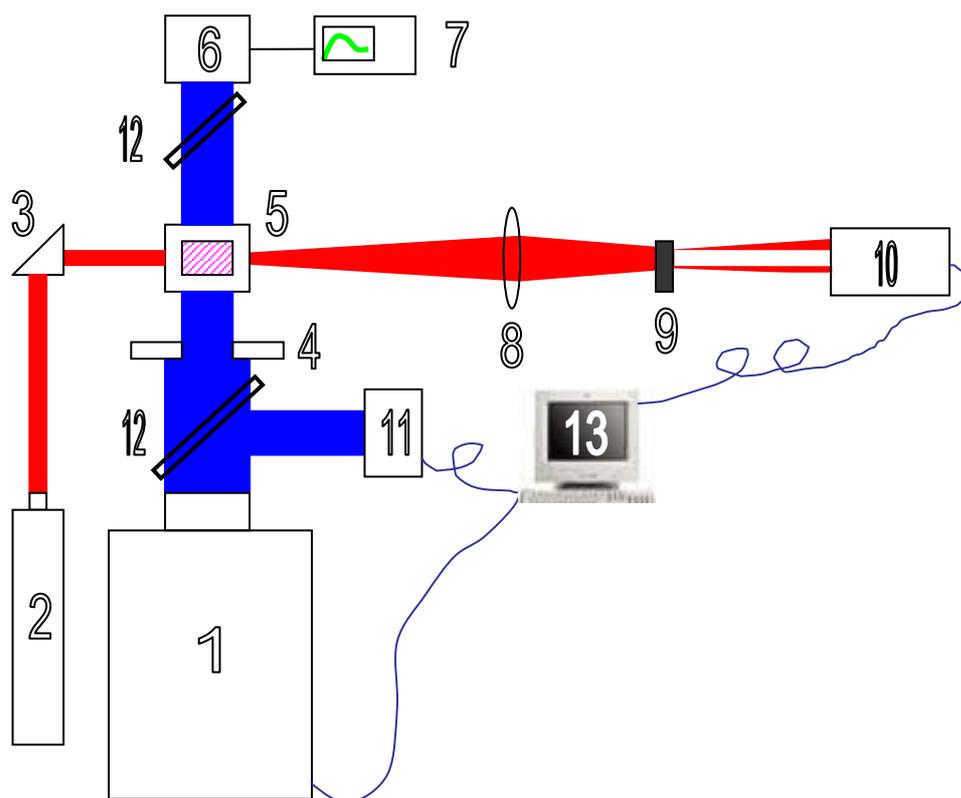
Как показали приведенные выше эксперименты, естественные среды оказались мало пригодными для исследования ввиду своей большой неоднородности как внутри образца, так и от образца к образцу. В дальнейшем в работе будут изучаться компоненты среды по отдельности, а также их комбинации. После, на основании этих исследований, будут сделаны заключения о свойствах исходной биологической среды.

1.2 Изучение УФ-индуцированной агрегации модельного белка карбоангидразы

1.2.1 Материалы и методы

Отработка экспериментальной методики для исследования водных растворов белков велась с использованием модельного белка – карбоангидразы (производства компании «Sigma», USA). Этот выбор обусловлен следующими обстоятельствами. Во-первых, молекула карбоангидразы представляет собой мономер с молекулярной массой (29 кДа), близкой по величине молекулярного веса к γ -кристаллину и некоторым формам β -кристаллина. Во-вторых, поведение ее экспозиционной зависимости при облучении ХеСl-лазером [106] близко к аналогичным зависимостям для β L-кристаллина [127].

Физиологический забуференный фосфатами раствор карбоангидразы с $\text{pH} = 7,2$ и концентрацией белка $0,5 \text{ мг/мл}$ пропускаться через мембранный фильтр с размерами пор $0,45 \text{ мкм}$ (фирма Sartorius). Перед УФ-облучением пробирка с белком выдерживалась один час при комнатной температуре, а затем центрифугировалась 15 минут при ускорении 5000 g для осаждения нерастворенных частиц. В качестве источника УФ-излучения использовался ХеСl-лазер LPX - 200 (фирма Lambda Physik) с энергией в одном импульсе до 450 мДж и частотой повторения импульсов до 80 Гц . В качестве пробного пучка использовалось излучение одномодового (TEM_0) HeNe-лазера ($\lambda = 633 \text{ нм}$) мощностью 10 мВт и расходимостью пучка $1,1 \times 10^{-3} \text{ рад}$. Оптическая схема отличалась от используемых в работах [106, 127] и приведена на схеме 3.



- | | |
|---|----------------------------|
| 1 - ХеСl-лазер 308 нм (LPX-200 Lambda Physik) | 7 - осциллограф |
| 2 - HeNe-лазер 633 нм (10 мВт) | 8 - линза |
| 3 - призма | 9 - непрозрачный экран |
| 4 - диафрагма | 10 - фотодиод (633 нм) |
| 5 - кварцевая кювета | 11 - фотодиод (308 нм) |
| 6 - измеритель энергии УФ (Gentec) | 12 - сапфировая пластина |
| | 13 - система автоматизации |

Схема 3. Эксперимент по наблюдению кинетики УФ-индуцированного рассеяния.

Измерение мощности рассеянного излучения пробного пучка проводилось методом темного поля [120]. Пробный пучок, проходящий через кварцевую кювету (размеры кюветы: длина вдоль пробного пучка 10 мм, вдоль УФ пучка 5 мм и высота 10 мм) с необлученным раствором белка (5), фокусировался линзой (8) на непрозрачный экран (9). В процессе УФ-облучения появляющееся рассеянное излучение приводило к увеличению расходимости пробного пучка, поэтому линза (8) фокусировала такой пучок в область, находящуюся за экраном (9). Мощность рассеянного излучения измерялась фотодиодом (10). Одновременно с измерением мощности рассеянного излучения 633 нм в процессе облучения проводились измерения и на длине волны 308 нм. Измерялась энергия прошедших через кювету с белком импульсов эксимерного лазера с помощью измерителя энергии Joulemeter ED-200 (фирма Gentec Inc., Canada) с диаметром апертуры 23 мм (6), который находился на расстоянии 15 см после кюветы. Такая схема позволила измерять непосредственно в процессе УФ облучения изменение пропускания белка на длине волны 308 нм.

После УФ облучения карбоангидразы различными дозами снимались оптические спектры пропускания на спектрофотометре Specord M40 (фирма Carl Zeiss).

Кроме оптических методов в данной работе использовался метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [128] с использованием аналитической колонки Superose 12HR 10/30 (Pharmacia Biotech). Хроматография проводилась в буфере: 25 мМ Трис-НСl, 200 мМ NaCl, 3 мМ NaN₃ (рН = 7,2) со скоростью протока 0,3 мл/мин. Колонка была прокалбрована молекулярно-массовыми стандартами: голубой декстран 2000, тиреоглобулин, ферритин, каталаза, альдолаза, альбумин, овальбумин, химотрипсиноген, рибонуклеаза А, цитохром С, аprotинин, витамин В₁₂ (Pharmacia Biotech, Sigma). Перед хроматографией образцы фильтровались через фильтр с минимальной сорбцией (PVDF) Millex[®]-GV с размерами пор 0,22 мкм.

Воздействие малых УФ доз регистрировалось по морфологической картине кристаллизации капли раствора карбоангидразы, позволяющей наблюдать образование надмолекулярных структур, образующих специфические кристаллические комплексы (дегидратационная самоорганизация) [129- 131]. Качественный анализ морфологии кристаллических структур, образующихся при высушивании капли раствора белка, выявлял изменение кристаллической структуры при малых дозах облучения ($D \sim 1$ Дж/см²).

На основании результатов этих исследований построена физическая модель начальной стадии агрегации водорастворимых белков при воздействии на них мягким УФ излучением, которая описывает образование агрегатов. Определены некоторые характерные параметры этого процесса п. 3.2.2.

1.2.2 Результаты и их обсуждение

Перед исследованием экспозиционных кривых был измерен коэффициент поглощения α раствора карбоангидразы с концентрацией 0,5 мг/мл в кювете длиной 5 см в диапазоне интенсивностей излучения ХеСл-лазера $w = (2-300)$ мДж/см². Величина α составила 6×10^{-2} см⁻¹ и оставалась постоянной во всем диапазоне изменений w , что свидетельствовало об отсутствии нелинейного, прежде всего двухфотонного поглощения. При такой величине α и при максимальном значении используемой в экспериментах величине $w = 300$ мДж/см² нагрев раствора белка за один импульс составлял $\Delta T_1 = 1,6 \times 10^{-3}$ градуса, а нагрев раствора в процессе облучения не превышал $\Delta T = 2$ градуса Цельсия (п. 3.1).

Зависимости интенсивности рассеянного излучения от величины экспозиции (дозы облучения), полученные при различных значениях w и F , приведены на рис. 1.8, а-в. Общим для всех кривых на этих рисунках, является то, что по кинетике рассеяния в растворе белка агрегацию при УФ

лазерном облучении можно разбить на два принципиально отличающихся этапа. На первом этапе не происходит изменения рассеяния, а второй характеризуется значительным ростом рассеяния пробного пучка. Доза облучения, при которой происходит излом экспозиционной зависимости, является дозой начала рассеяния и будет обозначаться параметром D^* , который является одним из показателей эффективности агрегации белка. Важным свойством эффективности агрегации и величины D^* , отличающей экспозиционные зависимости рассеяния, представленные на рис. 1.8 друг от друга, является ее зависимость от плотности энергии лазерных импульсов w и от частоты их повторения F . В таблице 2 приведены результаты обработки этих экспозиционных зависимостей.

Таблица 2. Обработка экспозиционных кривых с рисунка 1.8 а-в.

| Плотность энергии лазерных импульсов w (мДж/см ²) | Частота повторения лазерных импульсов F (Гц) | УФ доза, с которой начинается рассеяние пучка HeNe лазера D^* (Дж/см ²) | Крутизна экспозиционная зависимость рассеяния пробного пучка (мВт*см ² /Дж) |
|---|--|---|--|
| 40 | 3 | > 800 | 0 |
| | 4 | 500 | 0,002 |
| | 6÷16 | 350 | 0,006 |
| 84 | 1 | 600 | 0,002 |
| | 2 | 350 | 0,009 |
| | 4 | 300 | 0,009 |
| 300 | 0,15 | 300 | 0,0006 |
| | 0,25 | 275 | 0,0005 |
| | 0,5 | 200 | 0,0006 |
| | 1,0 | 200 | 0,0014 |

ошибка измерения плотности энергии лазерных импульсов $\pm 5\%$

На рис. 1.9 и 1.10 приведены зависимости $D^*(w)$ и $D^*(F)$. Видно, что значения D^* существенно уменьшаются с ростом w , что свидетельствует о нелинейной зависимости эффективности агрегации от плотности энергии в импульсе.

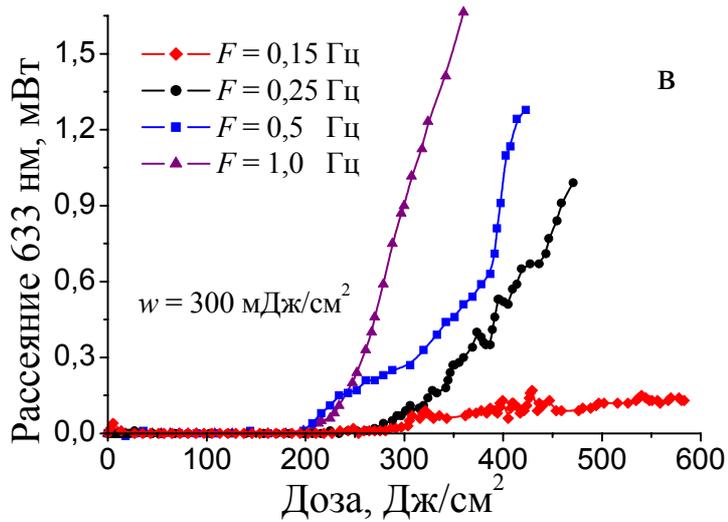
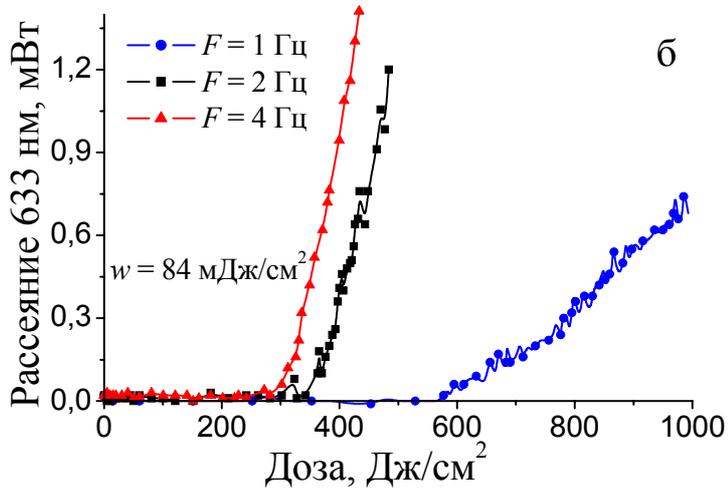
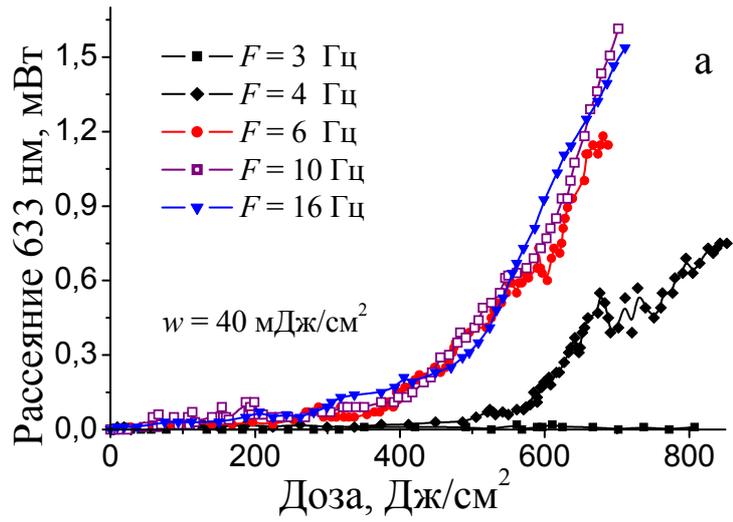


Рис. 1.8. Экспозиционные зависимости рассеяния при разных плотностях энергии лазерных импульсов w и частотах их повторения F .

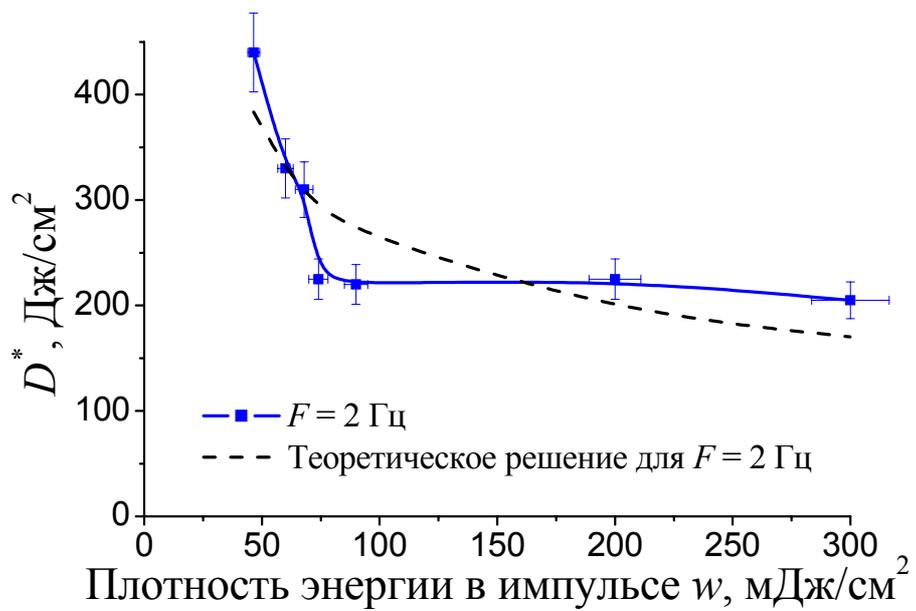


Рис. 1.9. Зависимость дозы D^* от плотности энергии лазерных импульсов.

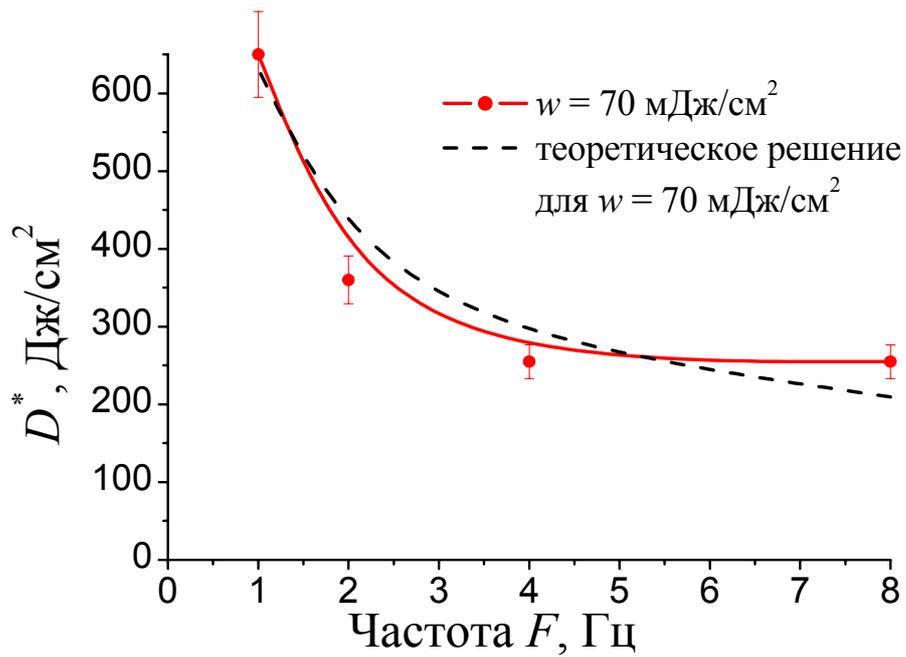


Рис. 1.10. Зависимость дозы D^* от частоты повторения лазерных импульсов.

Для объяснения такого поведения экспозиционных зависимостей рассеяния пробного пучка можно предположить, что начальная стадия фотоагрегации происходит при взаимодействии двух молекул белка, каждая из которых активирована при поглощении кванта падающего УФ излучения. Подробно эта модель рассмотрена в главе 3.

На рис. 1.11 приведены экспозиционные зависимости мощности рассеянного излучения 633 нм и зависимость амплитуды УФ импульсов, снимаемая с измерителя энергии 6 (схема 3). Учитывая, что молекула карбоангидразы имеет радиус 2,36 нм [132] можно считать, что, по крайней мере, на начальном этапе рассеяние излучения с $\lambda = 633$ нм в растворе белка является рэлеевским, то есть выполняется условие $d \ll \lambda$, где d – размер рассеивающих частиц.

При исследовании агрегации измерялась энергия лазерных импульсов, прошедших через кювету с растворами белков. В тех экспериментах, когда наблюдается рост рассеянного излучения пробного пучка, кривые пропускания имеют две характерные области. Начальный участок (при малых значениях D), как при агрегации карбоангидразы, так и бета-кристаллина хорошо аппроксимируется экспоненциальной функцией (рис. 1.11). Этот участок заканчивается при относительном уровне пропускания 0,7-0,8 и, по-видимому, обусловлен в основном ростом поглощения излучения 308 нм в растворах. Для карбоангидразы величина и дозовая зависимость этого поглощения соответствуют изменению оптических спектров пропускания, приведенных на рис. 1.13. С увеличением УФ дозы D появляется участок более резкого уменьшения УФ сигнала, на котором превалирует роль рассеяния УФ излучения. Теоретические оценки подтвердили сделанные предположения о причинах ослабления УФ сигнала при разных дозах облучения. В тех экспериментах, когда не наблюдалось роста мощности рассеянного излучения $P_p(D)$ на длине волны 633 нм, кривая пропускания имеет только монотонный участок без резкого излома. Это происходило при малых значениях w , F или C_0 . Поведение кривых

пропускания коррелирует как с соответствующими зависимостями $P_p(D)$, так и с результатами хроматографических измерений, то есть кривые пропускания могут быть использованы как дополнительный источник информации о процессах, происходящих при УФ-индуцированной агрегации белков.

Начиная с $D \sim 300$ Дж/см² рассеянное излучение начинает выходить за апертуру измерителя энергии, и крутизна спада кривой увеличивается. Практически одновременно с изломом кривой пропускания в эксперименте наблюдается начало роста рассеяния пробного пучка 633 нм, эти факты свидетельствуют о драматических изменениях в растворе. Теоретический аспект этого явления будет рассмотрен в главе 3.

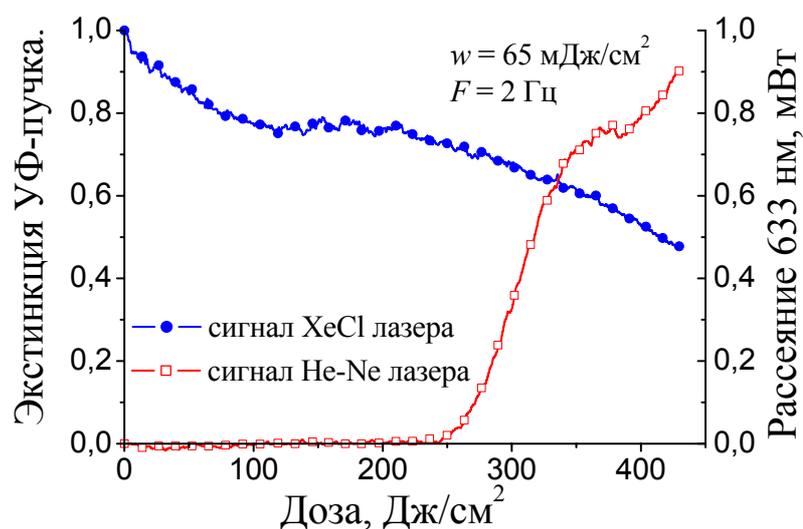


Рис. 1.11. Экспозиционная зависимость рассеяния излучения с длиной волны 633 нм и экстинкция УФ-пучка.

Агрегация белковых молекул в растворе при УФ облучении подтверждается не только физическими, но и биофизическими, и физико-химическими методами, такими как метод высыхающей капли и метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. В последнем методе с помощью аналитической колонки раствор разделяется на фракции разной массы и размера, которые выходят из колонки в разное время.

Для растворов белка, облученных различными УФ дозами при фиксированных значениях $w = 75$ мДж/см² и $F = 2$ Гц, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием аналитической колонки Superose 12HR 10/30 были получены хроматографические профили – рис. 1.12. Предварительно измерялись оптические спектры пропускания этих растворов – рис. 1.13. Хроматографические профили демонстрируют появление агрегированных форм с различными молекулярными массами. На хроматограмме исходного образца выявляется основная фракция мономерных молекул и небольшая доля димерных форм. При УФ облучении дозой $D = 0,1 \cdot D^*$ димерная фракция значительно вырастает, и появляются олигомерные формы. При увеличении дозы УФ облучения происходит дальнейший рост димерных и олигомерных форм и появляется фракция высокомолекулярных белковых агрегатов с молекулярной массой $M_m \geq 2000$ кДа в области максимально измеряемых масс используемой хроматографической колонки.

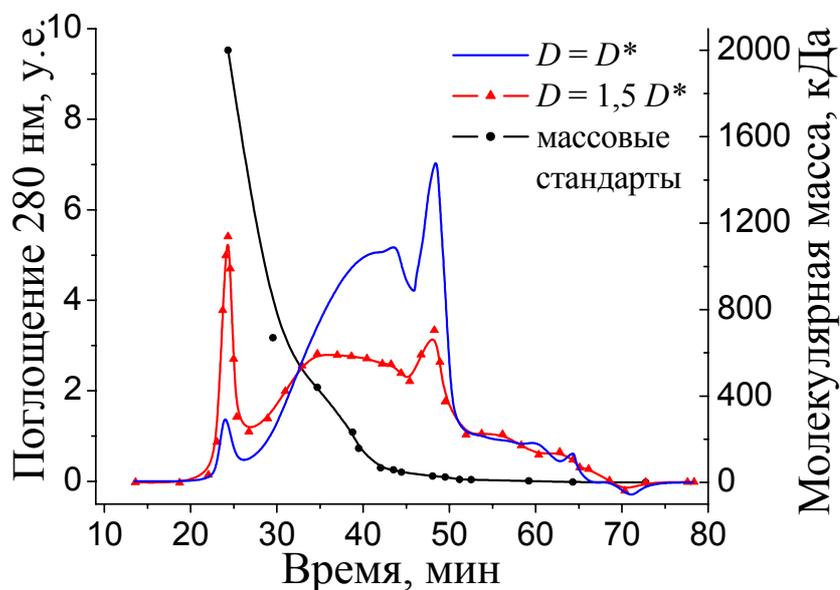
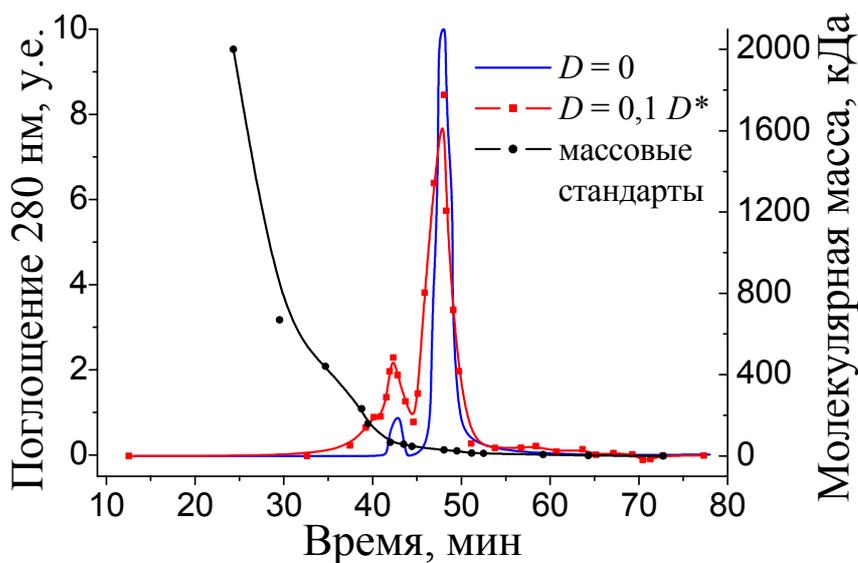


Рис. 1.12. Хроматографические профили для раствора карбоангидразы до и после облучения разными дозами и калибровочная кривая. Фракции раствора, различающие по размеру и массе агрегатов, выходят из аналитической колонки в разное время, количество белка в той или иной фракции определяется по поглощению на длине волны 280 нм. Колонка калибруется массовыми стандартами – глобулярными белками известной массы, в результате, время выхода агрегатов той или иной массы (размера) строго детерминировано. С помощью калибровочной кривой определяется молекулярная масса, соответствующая тому или иному пику.

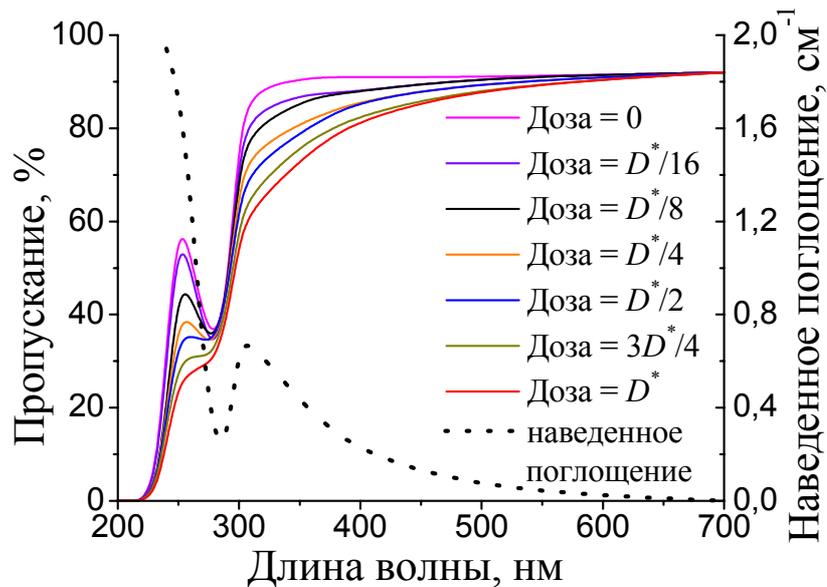


Рис. 1.13. Оптические спектры пропускания для нескольких экспозиций от 0 до D^* и спектр наведенного поглощения после облучения дозой D^* .

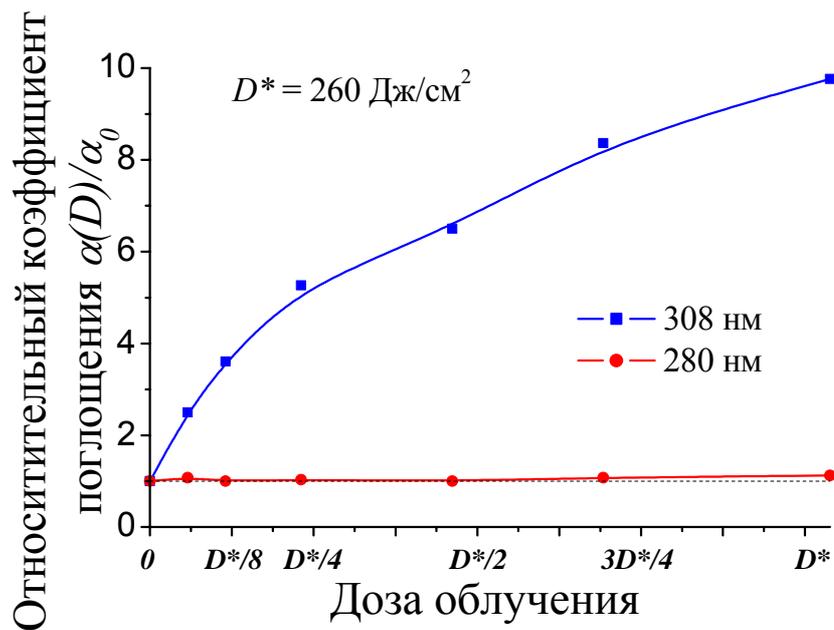


Рис. 1.14. Увеличение коэффициента поглощения $\alpha(D)/\alpha_0$ на длинах волн 308 нм и 280 нм при УФ облучении, α_0 – начальный коэффициент поглощения.

На рис. 1.13 приведено изменение оптического спектра пропускания белка с ростом дозы УФ-облучения. Видно, что с увеличением дозы пропускание монотонно уменьшается во всем измеренном спектральном диапазоне. Там же приведен спектр наведенного поглощения при $D = D^*$, вид которого аналогичен полученному в [69] для УФ-облученной

водорастворимой фракции хрусталика глаза быка. На рис. 1.14 показано изменение коэффициентов поглощения на длинах волн 308 нм и 280 нм в растворе карбоангидразы при УФ-облучении. Зависимость $\alpha(D)/\alpha_0$ для излучения с $\lambda = 308$ нм, выполненное по набору оптических спектров (рис. 1.13), совпадает с кривой пропускания излучения ХеС1 лазера (рис. 1.11) вплоть до дозы начала рассеяния.

Качественная оценка воздействия на карбоангидразу малых доз облучения проводилась по изменению морфологии кристаллических структур, образующихся при определенном режиме высушивания капли раствора белка на плоской прозрачной подложке. На рис. 1.15, а-в приведены фотографии типичных кристаллических структур в центральной зоне высохшей капли при 70-кратном увеличении. В необлученных образцах раствора карбоангидразы центральную зону высохших капель занимают морфологические структуры в форме круга, в центре которого располагается кристалл NaCl, окруженный каскадом концентрически расположенных пластинчатых кристаллических образований (рис. 1.15, а). После облучения раствора дозой 1 Дж/см² наблюдается нарушение центрально-симметричного строения образующихся структур и частичная замена пластинчатых кристаллов на стреловидные (рис. 1.15, б). В кристаллограммах раствора, облученного дозой 3 Дж/см², видно дальнейшее нарастание дефектов структуризации, проявляющееся в анизоморфии и замене пластинчатых кристаллов на структуры типа дендритов (рис. 1.15, в).

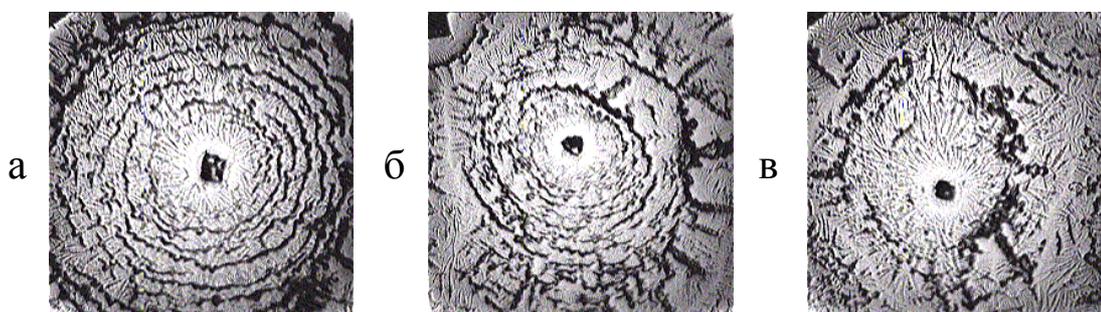


Рис. 1.15. Кристаллическая структура высохшей капли раствора при 70-кратном увеличении: а – $D = 0$; б – $D = 1$ Дж/см²; в – $D = 3$ Дж/см².

Морфология кристаллических структур зависит от свойств и состава раствора. Из рис. 1.15 видно изменение характера кристаллизации при воздействии УФ-излучения, что свидетельствует об изменении свойств белковых молекул уже при дозах $D \sim 1$ Дж/см². Для получения количественных оценок необходимы дальнейшие исследования, но и приведенные здесь результаты показывают перспективность использования данной методики для контроля процессов фотоагрегации на ранних стадиях УФ-облучения.

1.2.3 Выводы

Обнаружен новый эффект зависимости степени лазерной модификации исходно прозрачных сред, содержащих водорастворимые белки, под воздействием излучения ХеСІ лазера не только от экспозиции облучения, но и от плотности энергии лазерных импульсов и частоты их следования.

Создан метод экспериментального исследования этого эффекта. Апробированный на естественных биологических средах, метод был применен для изучения очищенного водорастворимого белка – карбоангидразы, выбранного в качестве модельного. При этом метод был усовершенствован и детализирован путем добавления спектрального и хроматографического контроля после облучения.

В следующей главе этот метод будет применен для исследования лазерного воздействия на водные растворы основных белков хрусталика глаза.

ГЛАВА 2. Исследование УФ-индуцированной агрегации кристаллинов хрусталика глаза при воздействии излучения ХеСІ лазера

По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) за 2004 год в 47,8 % случаев причиной ухудшения зрения и слепоты является катаракта [64], которая обусловлена появлением рассеяния света в хрусталике глаза. Возможными причинами роста светорассеяния могут быть природные и генетические факторы. Одним из природных факторов является воздействие на хрусталик ультрафиолетового (УФ) излучения. Проведенные в работах [133 -135] исследования показали связь между воздействием излучения с длинами волн (290-320) нм и развитием возрастной катаракты. Связь генетических мутаций в молекуле кристаллинов хрусталика глаза и образования катаракты показана в работах [136, 137]. Влияние одного из видов структурных модификаций β -кристаллина на его чувствительность к воздействию излучения с длиной волны 308 нм показано в работе [6*].

Возникновение и развитие некоторых форм катаракты, в том числе фотокаатарактогенеза, связано с агрегацией основных белков хрусталика глаза: α -, β - и γ -кристаллинов [69-72]. При воздействии УФ излучения кристаллины образуют высокомолекулярные соединения, которые приводят к помутнению хрусталика и увеличению в нем рассеяния и поглощения света [138]. К настоящему времени в научной литературе практически отсутствует информация о молекулярных механизмах УФ-индуцированной агрегации кристаллинов. Решение этой задачи важно как для построения теоретической модели фотоагрегации кристаллинов, так и для целенаправленного поиска антикатарактальных препаратов. Определенным шагом в этом направлении являются результаты работы [2*], в которой исследованы процессы агрегации модельного белка карбоангидразы при воздействии импульсного излучения ХеСІ лазера с длиной волны 308 нм. В предшествующих работах исследование фотоагрегации белков проводилось либо при воздействии на них непрерывным излучением ртутной лампы [69-71], либо при воздействии

импульсного лазерного излучения при постоянных значениях плотности энергии световых импульсов w и частоты их повторения F [106, 127, 114-116].

В предыдущей главе исследована УФ-индуцированная агрегация карбоангидразы в широком диапазоне изменения плотности энергии лазерных импульсов w и частоты их следования F . В этих экспериментах выявлена сильная зависимость агрегации от значений w и F . Из белков хрусталика глаза наиболее подверженным агрегации является γ -кристаллин, в меньшей степени β -кристаллин [114, 115], в то время как α -кристаллин обладает шаперон-подобной активностью и замедляет агрегацию этих белков при воздействии различных денатурирующих факторов [107].

В данной главе по методике, использовавшейся в п. 1.2, исследована фотоагрегация β L-кристаллина. Установлено, что подобно карбоангидразе эффективность агрегации β L-кристаллина сильно зависит от параметров импульсного лазерного излучения w и F . Приведены результаты исследований шаперонной активности α -кристаллина при УФ-индуцированной агрегации β L-кристаллина и смеси β L- с γ - кристаллином.

Приведенные ниже экспериментальные результаты позволили выделить из возможных процессов, происходящих при агрегации, три основных, описывающих процесс фотоагрегации на начальном этапе, а именно, активирование светом молекул белка, взаимодействие двух фотоактивированных молекул, и релаксацию фотоактивированного состояния по прошествии характерного времени. Это время является важным параметром модели, от величины которого существенно зависит эффективность фотоагрегации белков. Назовем его временем темновой дезактивации фотоактивированного состояния. Лабораторные эксперименты показали, что добавление некоторых короткоцепочечных пептидов оказывает влияние на этот параметр. Такие эксперименты позволяют производить экспресс отбор добавок, которые могут рассматриваться как потенциальные антикатарактальные препараты. Возможность применения результатов

изучения процессов, доминирующих при лазерном облучении, к случаю воздействия на хрусталик глаза естественного солнечного света будет обоснована в главе 4.

2.1 Материалы и методы

В экспериментах использовались α -, β - и γ -кристаллины фирмы “Sigma-Aldrich” (США), а также α - и β -кристаллины фирмы “Stressgen Biotechnologies” (Канада). Чувствительность белков, полученных от этих производителей, к воздействию УФ излучения совпадает с точностью ошибки измерения в наших экспериментах. Как и в исследованиях карбоангидразы (п. 1.2.1) для всех экспериментов белки растворялись в фосфатном буфере с $\text{pH} = 7,2$ и пропускались через мембранные фильтры с размерами пор $0,45 \text{ мкм}$ и $0,22 \text{ мкм}$ (фирма “Sartorius”, Германия). Для устранения мелких нерастворимых примесей пробирку с раствором центрифугировали 15 минут при комнатной температуре при ускорении $5 \times 10^3 \text{ g}$. После этого на дне пробирки оставляли некоторую часть раствора, которую не использовали при проведении экспериментов. В качестве источника УФ излучения использовался эксимерный импульсный XeCl лазер LPX-200 (фирма “Lambda Physik”, Германия) с длиной волны 308 нм , энергией в импульсе до 450 мДж и частотой повторения импульсов до 80 Гц . Эксперименты проводились при температуре $(22 \pm 1)^\circ \text{C}$, а нагрев раствора в процессе облучения не превышал 2°C . Для исследования динамики агрегации белков при УФ облучении снимались экспозиционные кривые – зависимости мощности P_p рассеянного в кювете с раствором белка пробного пучка от величины УФ дозы D ($D = w \cdot F \cdot t$, где t – время облучения). В качестве пробного пучка использовалось излучение одномодового (TEM_0) HeNe лазера с длиной волны 633 нм мощностью 10 мВт и расходимостью $1,1 \cdot 10^{-3}$ радиан. Одновременно с этим измерялась энергия импульсов излучения 308 нм , прошедших через кювету. До и после облучения белков

различными дозами снимались оптические спектры пропускания на спектрофотометре Specord M40 и молекулярно-массовые распределения (ММР) на хроматографической колонке Superose 12 HR. Высота кюветы, изготовленной из кварца КУ-1, составляла 10 мм, длина вдоль пучков HeNe и ХеСl лазеров – 10 мм и 5 мм, соответственно. Экспериментальная установка изображена на схеме 3. Измерение P_p проводилось, как и в п. 1.2.1, методом темного поля, что позволяло регистрировать абсолютное значение рассеянной мощности. В процессе облучения раствора белка энергия импульсов излучения ХеСl лазера поддерживалась на постоянном уровне и контролировалась, созданным и запатентованным [139] измерителем (11). Прошедшая через кювету (5) энергия излучения 308 нм регистрировалась измерителем (6) фирмы “Gentec” ED-200, Канада, а мощность рассеянного излучения 633 нм – фотодиодом (10). Сигналы с датчиков (6, 10, 11) в ходе эксперимента непрерывно обрабатывались автоматизированной системой (13) с усреднением по заданному числу импульсов ХеСl лазера. Результаты обработки выводились на монитор в виде графиков и сохранялись в файл.

2.2 Результаты и их обсуждение

2.2.1 Исследование УФ-индуцированной агрегации β L-кристаллина

Воздействие интенсивного лазерного излучения на растворы кристаллинов может инициировать процессы, которые отсутствуют при воздействии на хрусталик глаза естественного солнечного света. Прежде всего, возможно нелинейное, например, двухфотонное поглощение лазерного излучения в растворах белков. В предварительных экспериментах было измерено поглощение лазерного излучения в растворе β L-кристаллина с концентрацией 0,5 мг/мл в кювете длиной 5 см. Величина коэффициента поглощения составила $5 \times 10^{-2} \text{ см}^{-1}$ и оставалась постоянной при изменении w от 2 до 300 мДж/см², что свидетельствует об отсутствии нелинейного

поглощения. Во всех сериях экспериментов максимальное значение w не превышало 90 мДж/см^2 , исходя из этого можно утверждать, что поглощение лазерного излучения кристаллинами было однофотонным, как и при воздействии на хрусталик солнечного света.

Экспозиционная зависимость рассеяния пробного пучка для раствора βL -кристаллина с концентрацией $0,5 \text{ мг/мл}$, полученные при разных значениях w и F , приведены на рисунках 2.1 а, б. Как объяснялось в главе 1, одним из основных параметров, характеризующих эффективность агрегации, является величина дозы УФ облучения, с которой начинается рост интенсивности рассеянного излучения пробного пучка HeNe лазера в растворе белка. Этот параметр мы обозначаем D^* . Из рисунков видно, что для каждого значения w существует свое характерное значение F^* , ниже которого происходит существенное увеличение параметра D^* . Если при $w = 75 \text{ мДж/см}^2$ и при $F = 4 \text{ Гц}$ величина $D^* \sim 100 \text{ Дж/см}^2$, то при том же значении w , но при $F = 0,3 \text{ Гц}$ величина $D^* \sim 1000 \text{ Дж/см}^2$. Кроме того, при малых частотах повторения лазерных импульсов уменьшается угол наклона экспозиционных зависимостей рассеяния пробного пучка. С другой стороны, при больших F значение D^* и наклон экспозиционных зависимостей перестают зависеть от величины F . Эти результаты свидетельствуют о том, что при $F < F^*$ существенно уменьшается вероятность агрегации молекул белка.

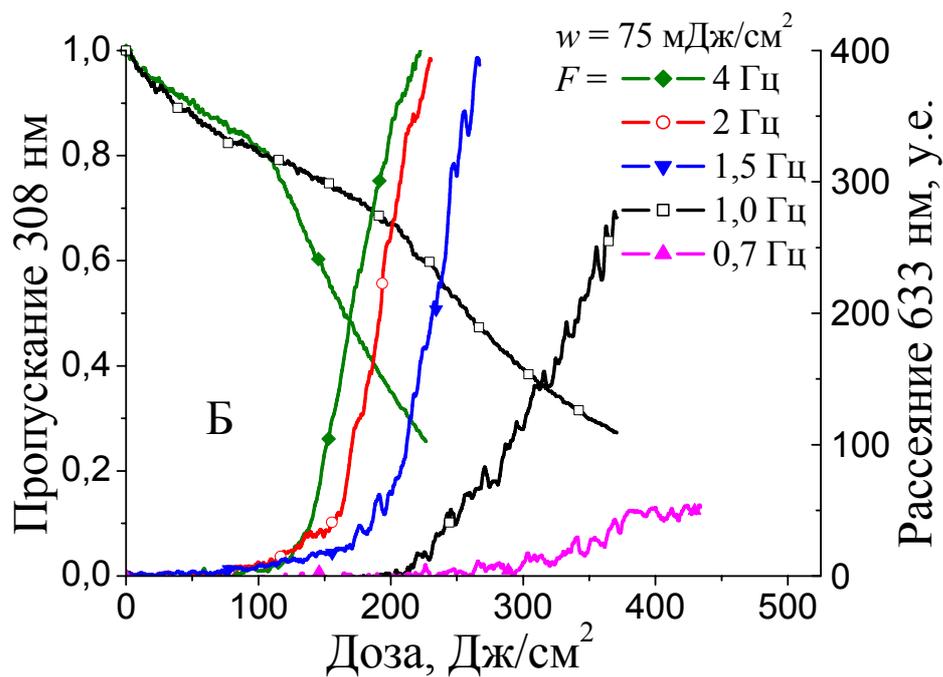
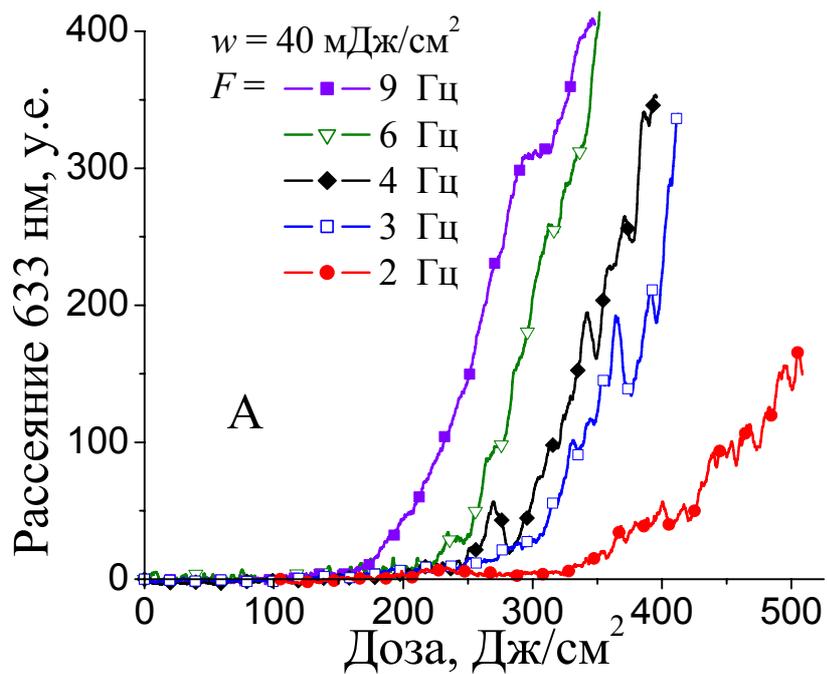


Рис. 2.1. Экспозиционные зависимости для раствора βL -кристаллина с концентрацией $C = 0,5 \text{ мг/мл}$ при разных плотностях энергии (w) и разных частотах повторения (F) лазерных импульсов. На рис. 2.1 Б показаны изменения пропускания 308 нм.

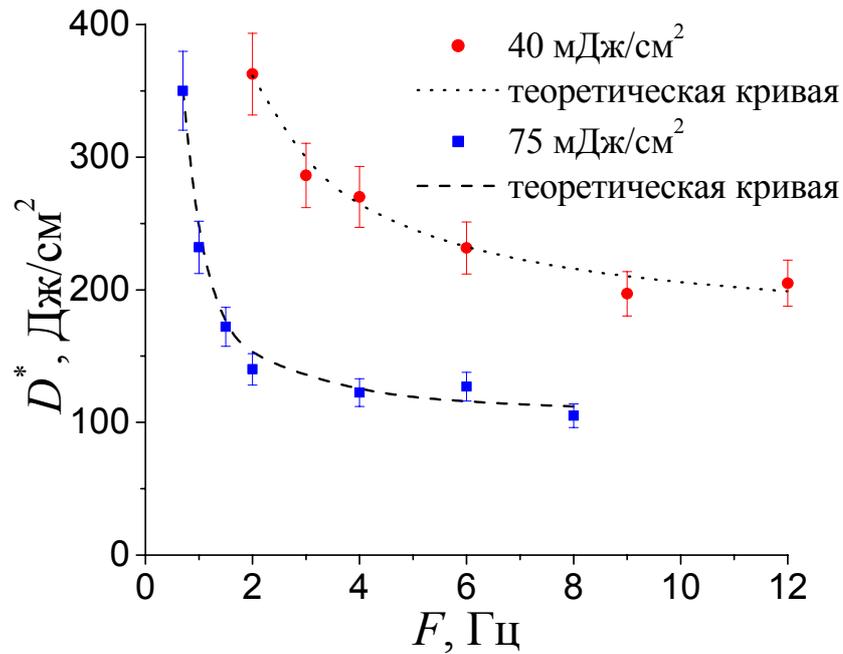


Рис. 2.2. Теоретические и экспериментальные кривые $D^*(F)$ при $w = \text{const}$.

Зависимости дозы начала рассеяния от частоты следования лазерных импульсов $D^*(F)$, полученные из обработки экспозиционных зависимостей рассеяния пробного пучка рис. 2.1 а, б, показаны на рис. 2.2. Экспозиционная зависимость развития рассеяния при постоянной частоте ($F = \text{const}$), но при различных значениях плотностей энергий (w) приведены на рис. 2.3. Заметим, что если при больших значениях w поведение экспозиционных зависимостей практически не зависит от плотности энергии, то при уменьшении w (начиная с величины $w \sim 75$ мДж/см²) происходит рост D^* и уменьшение угла наклона кривых. На рис. 2.4 показана зависимость дозы начала рассеяния от плотности энергии в импульсе $D^*(w)$.

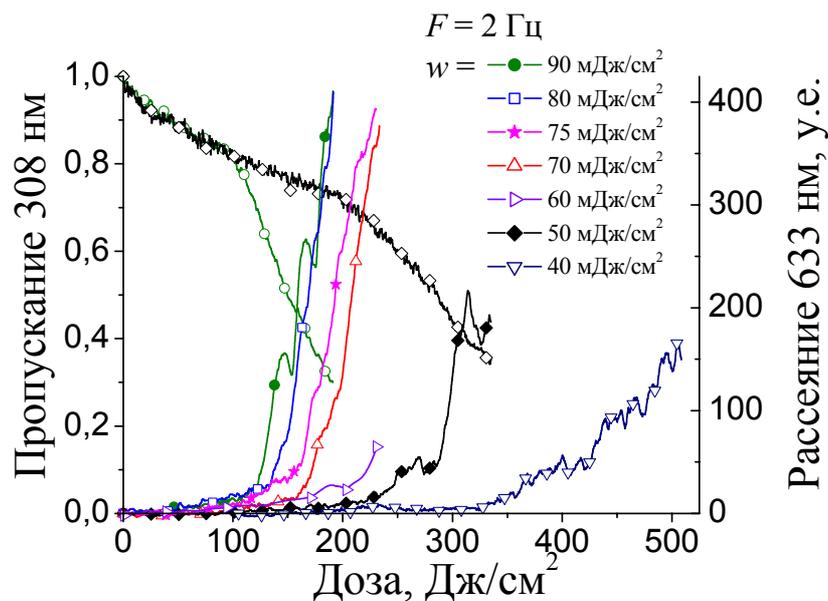


Рис. 2.3. Экспозиционные зависимости для раствора β_L -кристаллина с $C = 0,5 \text{ мг/мл}$ при постоянной частоте повторения (F) и различных плотностях энергии (w) импульсов. Показано изменение пропускания 308 нм.

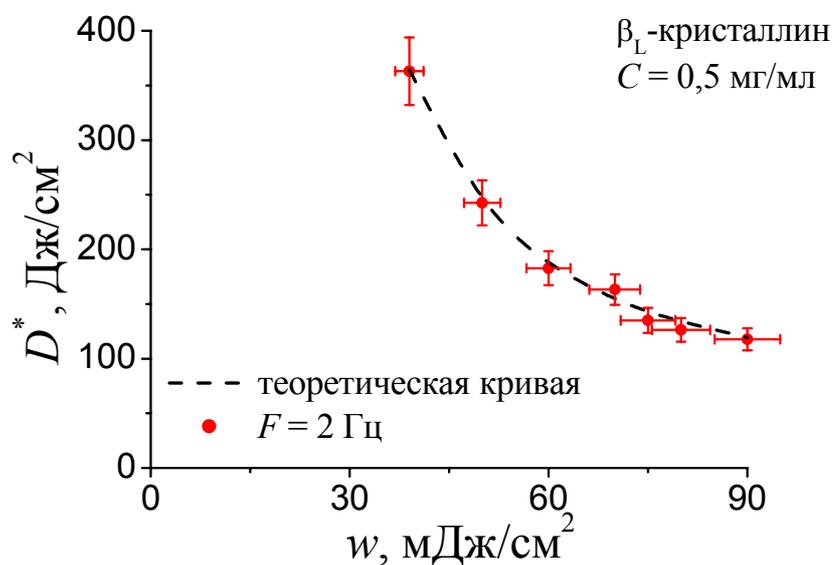


Рис. 2.4. Экспериментальная зависимость дозы начала рассеяния (D^*) от плотности энергии в импульсе при постоянной частоте их повторения 2 Гц.

Описанные выше экспозиционные кривые и зависимости $D^*(F)$ и $D^*(w)$ качественно совпадают с соответствующими результатами, полученными при исследовании УФ-индуцированной агрегации карбоангидразы п. 1.2.2. Это позволяет считать, что в первом приближении для описания процессов фотоагрегации β L-кристаллина также можно использовать упрощенную модель, согласно которой начальная стадия агрегации происходит при взаимодействии двух активированных светом молекул белка. Рост интенсивности рассеяния (P_p) обусловлен числом исходных белковых молекул (мономеров), перешедших в состав агрегатов.

Оптические спектры пропускания раствора белка после облучения различными УФ дозами (рис. 2.5) подобны соответствующим спектрам карбоангидразы п. 1.2.2 [101, 2*], а спектр наведенного поглощения аналогичен спектру, полученному в [69] для УФ облученной водорастворимой фракции хрусталика глаза быка. Во всех этих случаях в спектре наведенного поглощения присутствует пик при $\lambda \sim 305$ нм.

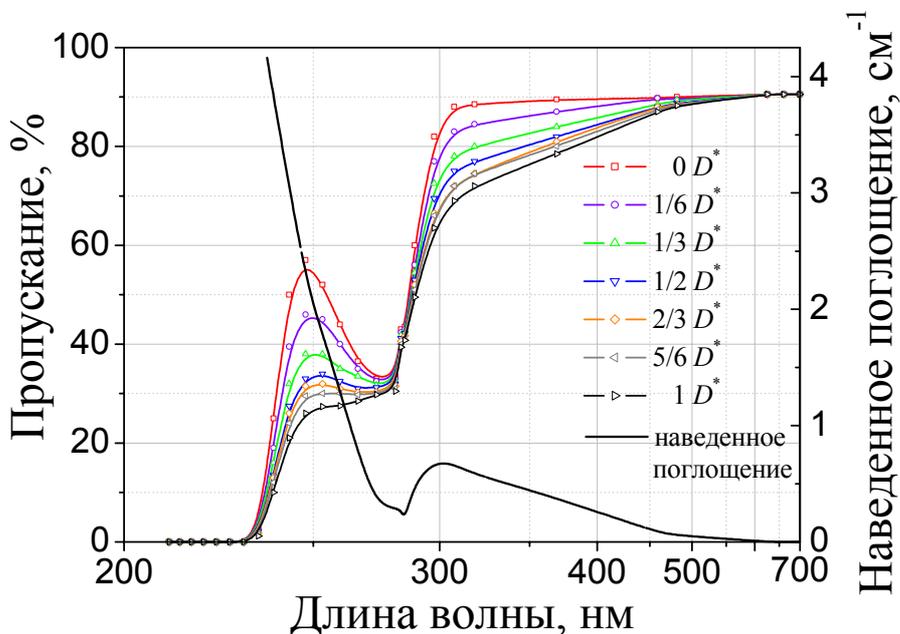


Рис. 2.5. Спектры оптического пропускания β L-кристаллина после облучения разными дозами от 0 до D^* и спектр наведенного поглощения после облучения дозой D^* .

Хроматографические измерения показали, что с ростом дозы облучения происходит монотонное уменьшение амплитуды пика β L-кристаллина с молекулярной массой $M_m \sim 45$ кДа. Одновременно с этим происходит уширение пика в основном в сторону бóльших масс. При $D \sim 0,5 D^*$ появляется пик с $M_m \geq 2000$ кДа, который соответствует верхней границе разрешаемого диапазона хроматографической колонки Superose 12 HR. С увеличением дозы облучения амплитуда этого пика возрастает. Таким образом, уже при таких достаточно малых дозах УФ облучения, при которых еще не начинается рост P_p , образуются агрегаты с эффективной массой на два порядка больше массы исходного белка.

2.2.2 Исследование УФ-индуцированной агрегации смеси кристаллинов

С помощью измерения экспозиционных кривых, хроматографических методов и по измерению поглощения излучения 308 нм в растворе белка нами проведены исследования УФ-индуцированной агрегации различных смесей кристаллинов. Концентрация белков составляла 0,5 мг/мл.

На рис. 2.6 приведены экспозиционные зависимости для β L-кристаллина, α -кристаллина и для смеси этих белков. Зависимости получены при $w = 75$ мДж/см² и $F = 2$ Гц, то есть при параметрах лазерного излучения, использовавшихся при исследовании фотоагрегации β L-кристаллина. Из рисунка видно, что α -кристаллин имеет меньшую скорость агрегации и обладает шаперонной активностью по отношению к β L-кристаллину. Эти результаты подобны приведенным в [106], где исследовано влияние α -кристаллина на скорость УФ-индуцированной агрегации γ -кристаллина.

На рис. 2.7 приведены хроматографические профили смеси β L- и α -кристаллинов после облучения растворов различными УФ дозами. Для большей наглядности на рисунке не приведены пики, соответствующие α -кристаллину и агрегатам разной массы, а показано только изменение пика

β L-кристаллина с $M_m \sim 45$ кДа и пика с $M_m \geq 2000$ кДа, который обусловлен высокомолекулярными белковыми агрегатами. С увеличением УФ дозы происходит уменьшение амплитуды и уширение пика с $M_m \sim 45$ кДа и рост пика высокомолекулярных агрегатов.

Приведенные результаты хроматографических исследований получены при достаточно малых дозах УФ облучения – в несколько раз меньше доз, при которых начинается увеличение R_p . Это говорит в данном случае о высокой эффективности использования метода жидкостной хроматографии при исследовании фотоагрегации кристаллинов.

Была исследована фотоагрегация смеси из β L-, α - и γ - кристаллинов. Такая смесь представляет особый интерес, поскольку она в наибольшей степени близка к составу белков хрусталика глаза. Соответствующие экспозиционные кривые приведены на рис. 2.8. Видно, что добавление γ -кристаллина к смеси β - и α - кристаллинов приводит к существенному увеличению эффективности агрегации. Это является подтверждением того, что γ -кристаллин является наиболее чувствительным к воздействию УФ излучения.

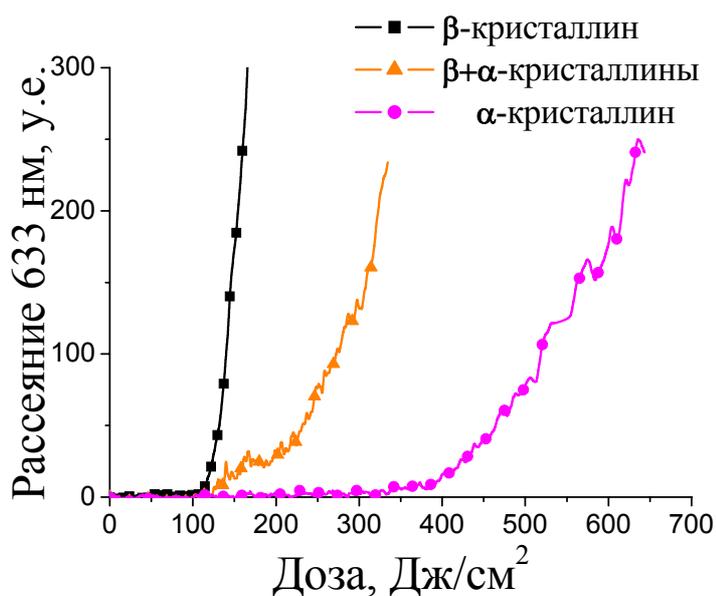


Рис. 2.6. Сравнение экспозиционных кривых α - и β -кристаллинов в смеси и по отдельности при УФ-индуцированной агрегации.

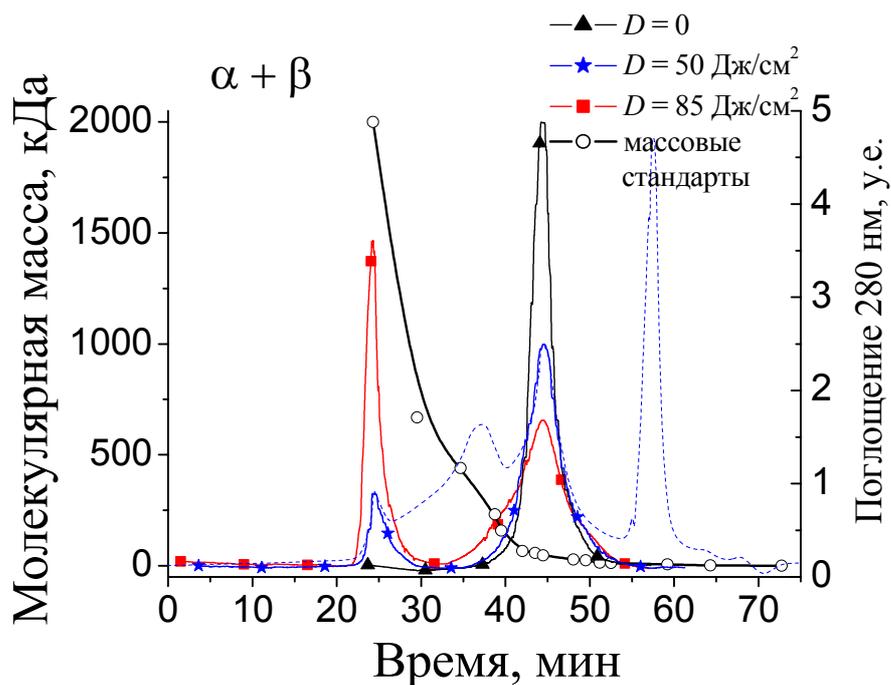


Рис. 2.7. Хроматографические профили. Показаны изменения только для пиков мономера β -кристаллина и высокомолекулярных фракций. Пунктиром показаны опущенные пики, соответствующие α -кристаллину и агрегатам разной массы.

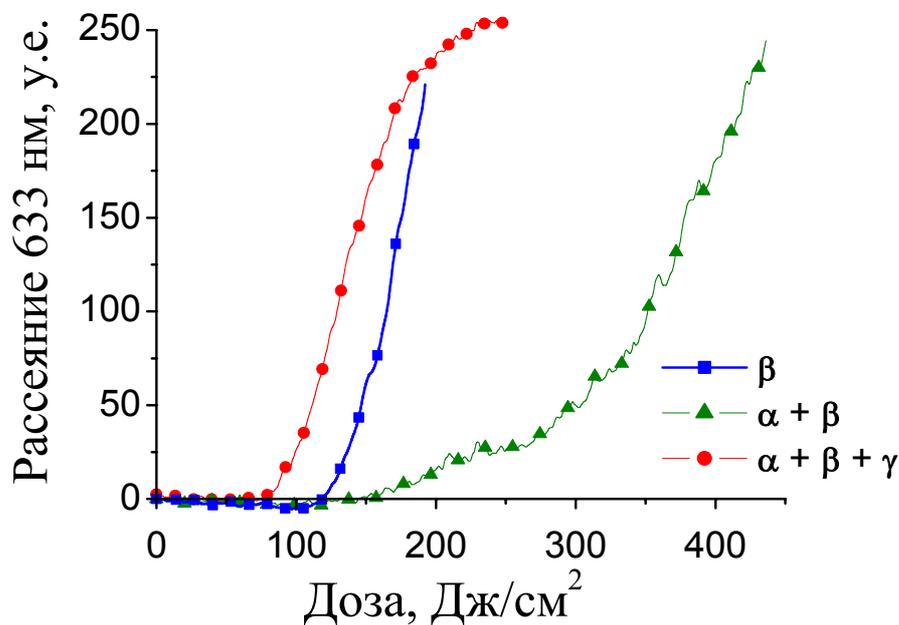


Рис. 2.8. Экспозиционные кривые для растворов α , $\alpha + \beta$ и полного набора кристаллинов.

При исследовании агрегации β L-кристаллина и влияния α -кристаллина на скорость его агрегации кроме измерения экспозиционных кривых и ММР проводилось измерение энергии лазерных импульсов, прошедших через

кювету с раствором белков. Зависимости пропускания излучения 308 нм от УФ дозы при различных режимах облучения и для различных белковых растворов приведены на рисунках 2.1 б и 2.3. Прежде всего отметим, что в тех экспериментах, когда наблюдается рост P_p , кривые пропускания имеют две характерные области. Начальный участок (при малых значениях D) хорошо аппроксимируется экспоненциальной функцией. Этот участок обусловлен ростом поглощения излучения 308 нм в растворе. Соответствующее изменение оптического спектра пропускания для β L-кристаллина приведено на рис. 2.5. С увеличением УФ дозы экспоненциальный участок заканчивается и происходит более быстрый спад кривой пропускания. Этот спад связан с ростом рассеянного излучения 308 нм в растворе белка. Как видно из рис. 2.1 и 2.3 появление излома кривой пропускания УФ происходило при дозах практически равных D^* , то есть одновременно с началом роста рассеяния пробного пучка HeNe лазера. Корреляция поведения кривых пропускания, как с соответствующими экспозиционными кривыми, так и с результатами хроматографических измерений, подтверждает, что кривые пропускания являются дополнительным источником информации о процессах УФ-индуцированной агрегации исследованных белков, в силу меньшей длины волны являясь более чувствительными к рассеивающим агрегатам.

Как будет показано ниже, в тех экспериментах, когда не наблюдалось роста P_p , кривая пропускания имеет только экспоненциальный участок без резкого излома. Это происходило при малых значениях w , F или C . Один из таких случаев приведен на рис. 4.9. Если при концентрации кристаллина $C = 0,6$ мг/мл рост P_p и излом кривой пропускания происходит при $D \sim 70$ Дж/см² (поглощенная доза ~ 42 Дж/см²), то при $C = 0,2$ мг/мл не наблюдалось роста P_p и излома кривой пропускания излучения 308 нм вплоть до значения $D \sim 1000$ Дж/см² (поглощенная доза ~ 200 Дж/см²) п. 4.4.2.3.

2.3 Выводы

В главе 2 были подробно экспериментально изучены особенности кинетики лазерной УФ агрегации водных растворов основных белков хрусталика глаза.

Результаты этой главы будут использованы при построении теоретической модели лазерной агрегации водорастворимых белков (глава 3) и для создания ускоренной методики отбора антикатарактальных препаратов (глава 4).

ГЛАВА 3. Построение модели фотоагрегации водорастворимых белков и сравнение с экспериментом

3.1 Оценки

Оценка тепловых эффектов.

Одной из задач, которая требовала решения перед началом экспериментов по селективному воздействию жестким и мягким ультрафиолетом на белковую составляющую биологических тканей с целью изучения механизмов фотохимических изменений в них, являлась задача о выборе режимов облучения, которые позволили бы уйти от тепловых эффектов, проявляющихся из-за наличия больших коэффициентов поглощения белка. Простейшей оценкой в этом случае является оценка плотности энергии облучающего излучения (флуенса, мДж/см²), которая нагревает среду на 1°С.

$$\Delta T = \frac{w \cdot \alpha}{c \cdot \rho} \quad (3.1)$$

где, w - флуенс излучения (плотность энергии в импульсе), c - теплоемкость единицы массы, α - коэффициент поглощения облучаемого вещества, ρ - плотность среды, ΔT - нагрев среды выше комнатной температуры. Ввиду того, что белковая среда более чем на 70 % состоит из воды, характерные параметры возьмем как у нее, в частности, $c = 4,19$ кДж/(кг·К), $\rho = 1,0$ кг/см³, а коэффициент поглощения соответствующий данной концентрации белка для данной длины волны.

Таблица 3. Плотность энергии импульса, нагревающего образец на 1°С.

| | 216 нм | 270 нм | 308 нм |
|-------------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Яичный белок | ~ 0,8 мДж/см ² | 25 мДж/см ² | 150 мДж/см ² |
| Хрусталик глаза | -- | ~ 5 мДж/см ² | 90 мДж/см ² |
| Карбоангидраза (0,5 мг/мл) | -- | -- | 70 Дж/см ² |

Таблица 3 представляет собой данные таблицы 1, преобразованные в соответствии с формулой (3.1). Высокое значение расчетной плотности энергии для раствора карбоангидразы определяется только низкой концентрацией белка.

Однако, такая оценка не совсем корректна, так как дает только значение изменения температуры за время импульса (длительность которого составляет десятки наносекунд). В то время как температура может накапливаться от импульса к импульсу. Учесть это тепло и подобрать флуенс помогло численное решение [8*, 140], рассматривающее одномерное уравнение теплопроводности [4, 141, 142]. В результате, флуенсы, выше которых становятся существенны тепловые эффекты (нагрев на $\sim 10^\circ\text{C}$) в яичном белке: для 5^{ой} гармоники – $0,01 \text{ Дж/см}^2$, для 4^{ой} – $0,1 \text{ Дж/см}^2$, для 308 нм - 10 Дж/см^2 .

В экспериментах с жестким УФ флуенсы ниже приведенных значений позволяют также избежать образования крупных пузырей, возникающих в процессе облучения в виду изменения среды и выделения газа в процессе химической реакции.

3.2 Физическая модель фотоагрегации

Важным экспериментальным результатом, требующим теоретического объяснения, является два принципиально отличающихся поведения интенсивности рассеяния пробного излучения при агрегации молекул белка в водном растворе под воздействием УФ лазера. Начальный этап агрегации происходит без существенного изменения рассеяния, последующий – со значительным его ростом. Особенно стоит отметить, что излом экспозиционной кривой рассеяния пробного пучка HeNe лазера и излом кривой пропускания силового пучка 308 нм происходят практически одновременно (п. 2.2.1). Это говорит о том, что момент излома определяется не только чувствительностью метода измерения рассеяния. Как уже

определялось в главе 1, четко регистрируемая доза облучения, при которой происходит излом экспозиционной зависимости, называется дозой начала рассеяния, и обозначается D^* . В эксперименте показано, что D^* зависит от плотности энергии лазерных импульсов (w) и от частоты их повторения (F), причем так, что при больших w и / или F доза D^* становится постоянной, а при малых - сильно зависит от их значений.

Для объяснения этих данных в работе построена модель, основным положением которой является то, что начальная стадия агрегации происходит при взаимодействии двух фотоактивированных молекул белка (ФАМ) [1^* , 2^*]. Под фотоактивированным состоянием, в данном случае подразумевается состояние молекулы, в которое она может перейти после поглощения кванта излучения. Это состояние обладает конечным временем жизни. В качестве возможного варианта такой фотоактивации может быть рассмотрено изменение молекулой ее пространственной (конформационной) структуры [4]. У такого состояния есть характерное время жизни τ , по истечении которого можно считать, что фотоактивированная молекула вернулась в исходное состояние. Причем, если время результативного взаимодействия двух ФАМ, в результате которого они образуют агрегат, меньше их времени жизни, то релаксация не имеет значения, все ФАМ скорее агрегируют, чем релаксируют. В другом предельном случае время агрегации ФАМ много больше времени жизни, тогда активированные состояния быстро «гибнут» и эффективность агрегации сильно зависит от характеристик облучения. Ниже будут приведены выкладки, позволяющие сравнить модель с экспериментальными результатами.

Как будет показано, предложенная модель хорошо объясняет изменения, происходящие в растворе белка при действии мягкого ультрафиолета, зависящие не только от дозы облучения (или, иначе, числа поглощенных фотонов) но и от режима их доставки. Несмотря на то, что истинная природа этой модификации белковой молекулы неизвестна и требует дополнительных исследований, построенная модель позволяет

сделать некоторые предположения об их природе. Для простоты рассмотрения не будем записывать уравнения на концентрации всех возможных агрегатов, а ограничимся учетом концентрации проагрегировавших мономеров, считая, что именно их концентрация M^* , определяет начало рассеяния в растворе белка. Тогда, если R и M - это концентрации фотоактивированных молекул и проагрегировавших мономеров соответственно, то кинетические уравнения, описывающие процесс агрегации фотоактивированных молекул имеют вид (3.2).

$$\begin{aligned} \frac{dR}{dt} &= \eta\sigma C \frac{I}{\hbar\omega} - k_2 R^2 - \frac{R}{\tau}, \\ \frac{dM}{dt} &= k_2 R^2, \\ \frac{dC}{dt} &= -\eta\sigma C \frac{I}{\hbar\omega} + \frac{R}{\tau} \end{aligned} \quad (3.2)$$

Где σ – эффективное сечение поглощения УФ квантов исходными молекулами белков (мономерами), η – квантовый выход фотоактивации мономеров при поглощении фотона, I – интенсивность УФ излучения, $\hbar\omega$ – энергия кванта излучения, k_2 – константа скорости образования димеров при взаимодействии двух фотоактивированных мономеров, C – концентрация молекул мономера, изменением которой в процессе агрегации мы пренебрегаем ($\Delta C \ll C_0$), C_0 – исходная концентрация молекул мономера, важным параметром модели является τ – характерное время жизни фотоактивированного состояния.

Учитывая постоянство концентрации молекул мономера C_0 , система (3.2) переписывается в виде (3.21):

$$\begin{aligned} \frac{dR}{dt} &= \eta\sigma C_0 \frac{I}{\hbar\omega} - k_2 R^2 - \frac{R}{\tau}, \\ \frac{dM}{dt} &= k_2 R^2. \end{aligned} \quad (3.21)$$

Чтобы понять основные свойства предлагаемой модели, рассмотрим сначала случай непрерывного облучения.

3.2.1 Режим непрерывного УФ-облучения

В этом случае систему (3.21) можно записать в виде:

$$\begin{aligned} \frac{dR}{dt} &= \eta\sigma C_0 \frac{I}{\hbar\omega} - k_2 R^2 - \frac{R}{\tau}, \\ \frac{dM}{dt} &= k_2 R^2, \end{aligned} \quad (3.3)$$

где интенсивность УФ излучения $I = const$.

Концентрация фотоактивированных мономеров R быстро выходит на стационарное значение $R = R_{stat}$, которое находится из первого уравнения системы (3.3), если приравнять нулю производную по времени.

$$R_{stat} = (2k_2\tau)^{-1} \times (\sqrt{1 + I/I_0} - 1) \quad (3.4),$$

где характерное значение интенсивности:

$$I_0 = \frac{\hbar\omega}{\eta\sigma C_0} \cdot \frac{1}{4k_2\tau^2} \quad (3.5).$$

Если принять, что начало рассеяния пробного пучка связано с образованием в растворе некоторого характерного значения концентрации агрегировавших мономеров M^* , то доза УФ облучения D^* , при которой начинается рост рассеяния, может быть оценена из второго уравнения системы (3.3) как $D^* \approx \frac{M^* I}{k_2 R_{stat}^2}$, или, используя соотношение (3.4),

$$D^* \approx \frac{4k_2\tau^2 M^* I}{(\sqrt{1 + I/I_0} - 1)^2} = D_0 \frac{I/I_0}{(\sqrt{1 + I/I_0} - 1)^2} \equiv D_0 \frac{I/I_0}{I/I_0 - 2 \cdot (\sqrt{1 + I/I_0} - 1)} \quad (3.6),$$

$$\text{где } D_0 = 4k_2\tau^2 M^* I_0 = \frac{\hbar\omega}{\eta\sigma} \cdot \frac{M^*}{C_0} \quad (3.7).$$

Отметим, что (3.3) и последующие формулы (3.4)-(3.6) справедливы, если $(M^* + R(t)) \ll C_0$, что ведет к выполнению неравенства $\Delta C \ll C_0$.

Из соотношения (3.6) следует, что при относительно больших интенсивностях (при $I \gg I_0$) получаем $\sqrt{1 + I/I_0} - 1 \approx \sqrt{I/I_0}$ и выражение для

$$D^* \text{ принимает вид} \quad D^* \approx D_0 \quad (3.8),$$

то есть величина D^* не зависит от интенсивности УФ излучения.

В другом предельном случае (при $I \ll I_0$) получаем $\sqrt{1+I/I_0} - 1 \approx \frac{I}{2I_0}$ и

$$D^* = 4D_0 \frac{I_0}{I} \quad (3.9).$$

Таким образом, при достаточно малых интенсивностях значение D^* обратно пропорционально интенсивности. Наблюдающиеся в эксперименте особенности кинетики агрегации, хорошо описываются формулами (3.8), (3.9), что подтверждает правильность основных предположений модели. Полная зависимость (3.6) $D^*(I/I_0)$ в безразмерных величинах приведена на рис. 3.1.

Из (3.9) и (3.5) следует также, что увеличение времени релаксации τ ведет к уменьшению дозы D^* . В связи с этим, одним из предполагаемых механизмов уменьшения эффективности агрегации является уменьшение времени релаксации τ .

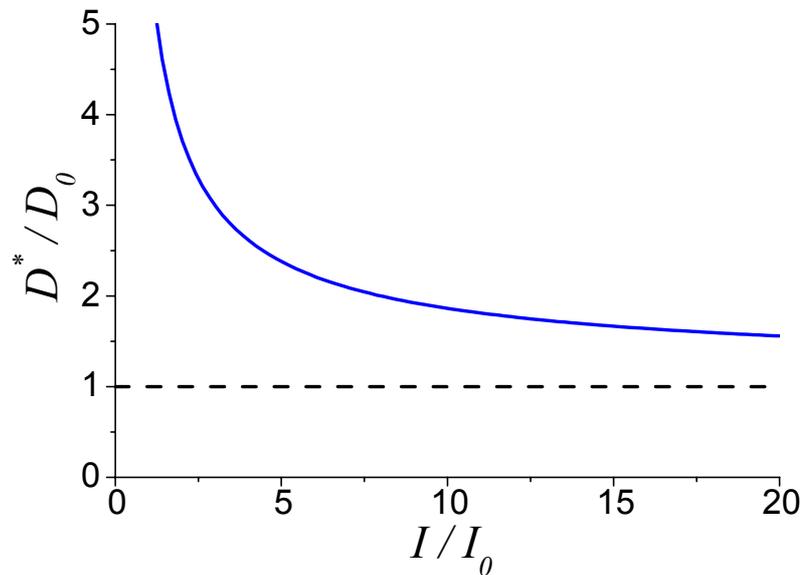


Рис. 3.1. Зависимость дозы начала рассеяния от интенсивности непрерывного УФ-излучения.

На рис. 3.1 изображена зависимость дозы начала рассеяния раствора от интенсивности непрерывного УФ-излучения, описываемая системой (3.3). При малых значениях I зависимость $D^*(I)$ является убывающей функцией интенсивности, а при больших значениях I величина D^* стремится к

постоянному значению D_0 . При этом величину I_0 можно считать границей между областью резкого роста D^* и областью, в которой D^* стремится к асимптоте. Определить характерные значения I_0 и D_0 поможет рассмотрение импульсного воздействия.

Приближение расходующегося исходного мономера.

Решение (3.6) системы (3.3) получено в приближении $(M^* + R(t)) \ll C_0$ или, что то же самое $\Delta C \ll C_0$, то есть предполагалось, что концентрация исходного мономера практически не расходуется. Рассмотрим более общий случай, когда концентрация исходного мономера уменьшается существенно, тогда систему уравнений (3.3) необходимо дополнить уравнением на концентрацию исходного мономера $C(t)$ и переписать в виде:

$$\begin{aligned} \frac{dR}{dt} &= \eta\sigma C \frac{I}{\hbar\omega} - k_2 R^2 - \frac{R}{\tau}, \\ \frac{dM}{dt} &= k_2 R^2, \\ \frac{dC}{dt} &= -\eta\sigma C \frac{I}{\hbar\omega} + \frac{R}{\tau}. \end{aligned} \quad (3.3a)$$

Аналитически эта система не решается, поэтому оставим приближение, что концентрация фотоактивированных мономеров R выходит на стационарное значение R_{stat} быстрее, чем успевает измениться C , однако дальнейшее изменение C будет влиять на стационарное значение, то есть $R_{stat}(C)$.

Перепишем уравнение (3.4) в виде

$$R_{stat}(C) = (2k_2\tau)^{-1} \left(\sqrt{1 + 4k_2\tau C \cdot I / I_0} - 1 \right), \quad (3.4a)$$

где, $I_0 = D_0 / \tau$, а $D_0 = \frac{\hbar\omega}{\eta\sigma}$

Подставляем полученное выражение для $R_{stat}(C)$ в уравнение системы на $C(t)$:

$$\frac{dC}{dt} = -\frac{I}{I_0} C + \frac{1}{2k_2\tau} \left(\sqrt{1 + 4k_2\tau C \cdot I / I_0} - 1 \right). \quad (3.5a)$$

Проинтегрируем данное уравнение, с учетом начального условия $C(t=0) = C_0$. Функция $C(t)$ в явном виде не выражается, однако можно получить функцию

$t(C)$. Так как доза есть произведение интенсивности излучения на время ($D = I \times t$), то получаем

$$D(C) = D_0 \frac{I_0}{I} \left(\frac{1 + \sqrt{1 + 4k_2\tau C \frac{I}{I_0}}}{2k_2\tau C} - \frac{1 + \sqrt{1 + 4k_2\tau C_0 \frac{I}{I_0}}}{2k_2\tau C_0} + 2 \frac{I}{I_0} \ln \frac{\sqrt{1 + 4k_2\tau C_0 \frac{I}{I_0}} - 1}{\sqrt{1 + 4k_2\tau C \frac{I}{I_0}} - 1} \right) \quad (3.6a).$$

Выражение (3.6a) является зависимостью дозы от концентрации исходных молекул. Для сравнения с решением (3.6) запишем решение (3.6a) для момента начала рассеяния, концентрации исходных мономеров в этот момент будет равняться $C^* = C_0 - M^* - R_{stat}(C^*)$. Полученное выражение является непрерывной функцией интенсивности. Для сравнения с решением (3.6) системы (3.3) рассмотрим предельные случаи малых и больших интенсивностей излучения.

Из соотношения (3.6) следует, что при относительно больших интенсивностях (при $2k_2\tau IC^* \gg I_0$) поведение D^* принимает вид:

$$D^* \approx D_0 \cdot \left(2 \ln \frac{C_0}{C^*} + \frac{\sqrt{I_0}}{\sqrt{I}} \frac{1}{\sqrt{k_2\tau C^*}} \left(\frac{\sqrt{C_0} - \sqrt{C^*}}{\sqrt{C_0}} \right) \right) \approx 2D_0 \ln \frac{C_0}{C^*} \quad (3.8a),$$

то есть величина D^* как и в (3.8) не зависит от интенсивности УФ излучения. Однако, следует заметить, что необходимо исключить случай, когда при очень больших интенсивностях $C^* = (C_0 - M^*) - R_{stat}(C^*)$ обращается в ноль, полностью переходя в фотоактивированные состояния. В этом случае возможен слабый рост D^* . Такое поведение не наблюдалось в эксперименте и выходит за рамки рассматриваемой модели, поэтому наложим ограничение, исключаяющее такой случай: $R(t) \ll C_0$.

Так как нас интересует ситуация, когда M^* может быть сравнима с C_0 , то при выполнении вышеуказанного неравенства мы имеем также $R(t) \ll M^*$ и в формуле (3.8a) $C^* = C_0 - M^*$.

В другом предельном случае при относительно малых интенсивностях (при $2k_2\tau C_0 I \ll I_0$) доза D^* ведет себя следующим образом

$$D^* \approx 2D_0 \cdot \frac{I_0}{I} \cdot \frac{1}{2k_2\tau} \frac{M^* + R_{stat}(C^*)}{C_0((C_0 - M^*) - R_{stat}(C^*))} \propto 2D_0 \cdot \frac{I_0}{I}. \quad (3.9a)$$

Обратим внимание, что $R_{stat}(C^*)$ зависит от интенсивности и последнее утверждение справедливо если $R_{stat}(C^*) \ll M^*$, это условие заведомо выполняется, когда $\eta \ll 1$.

Выражения (3.8a) и (3.9a) эквивалентны выражениям (3.8) и (3.9), то есть более мягкие условия позволили получить более общее решение, которое, однако, в предельных случаях ведет себя также как и полученное ранее (3.6).

3.2.2 Воздействие на раствор белка импульсного УФ-излучения

В случае импульсного ультрафиолетового излучения источник ФАМ – периодическая функция времени $\bar{R} = \bar{R}(t - i \cdot T)$, где i – целое число. Систему (3.21) будем решать для условий, которые выполнялись в экспериментах, описанных в гл. 2. Нетрудно показать, что при использовавшейся концентрации раствора 10^{16} см^{-3} (0,5 мг/мл) (расстояние между молекулами $L \sim 50 \text{ нм}$) и коэффициентом диффузии в воде при комнатной температуре

$\tilde{D} = \frac{kT}{6\pi \cdot \eta \cdot a}$ (k – постоянная Больцмана, T – температура, π - число Пи, η - вязкость, a – радиус молекулы) время между столкновениями молекул белка можно оценить как $t_x = \frac{kT}{6\pi \cdot \eta \cdot a} \cdot \frac{1}{L^2}$, где L – расстояние между молекулами.

Оно составляет $\sim 2 \times 10^{-6} \text{ с}$, что много больше длительности лазерного импульса ($3 \cdot 10^{-8} \text{ с}$). Будем считать, что за время лазерного импульса агрегаты не успевают образоваться, поэтому в (3.21) за источник ФАМ можно принять δ - функцию. При этом систему (3.21) можно записать в виде:

$$\begin{aligned} \frac{dR}{dt} &= R_p \delta(t - i \cdot T) - k_2 R^2 - \frac{R}{\tau}, \\ \frac{dM}{dt} &= k_2 R^2 \end{aligned} \quad (3.10)$$

Для концентрации фотоактивированных молекул за время между i и $i+1$ импульсами получаем:

$$R(t) = \frac{R_{0i}}{\exp(t/\tau) + k_2 \tau R_{0i} (\exp(t/\tau) - 1)}, \quad (3.11)$$

Концентрация после $(i+1)$ импульса определяется как

$R_{0(i+1)} = R(T) + R_p$, где $R_p = \eta C_0 \frac{\sigma w}{\hbar \omega}$ – приращение концентрации ФАМ после воздействия импульса с плотностью энергии w , а $R(T)$ – концентрация ФАМ в растворе в момент прихода лазерного импульса.

Поведение концентрации агрегировавших мономеров между импульсами описывается уравнением, полученным из системы (3.10).

$$\frac{dM}{dR} = -\frac{k_2 \tau R}{(1 + k_2 \tau R)} \quad (3.12)$$

Решением уравнения (3.12) является зависимость приращения концентрации агрегировавших мономеров за время между i и $(i+1)$ импульсами от концентрации ФАМ:

$$\Delta M(t) = \frac{1}{k_2 \tau} \left[k_2 \tau (R_{0i} - R(t)) + \ln \left(\frac{1 + k_2 \tau R(t)}{1 + k_2 \tau R_{0i}} \right) \right] \quad (3.13)$$

Зависимости $R(t)$ и $M(t)$, полученные численным счетом для определенных параметров, изображены на рис. 3.2 а и б соответственно.

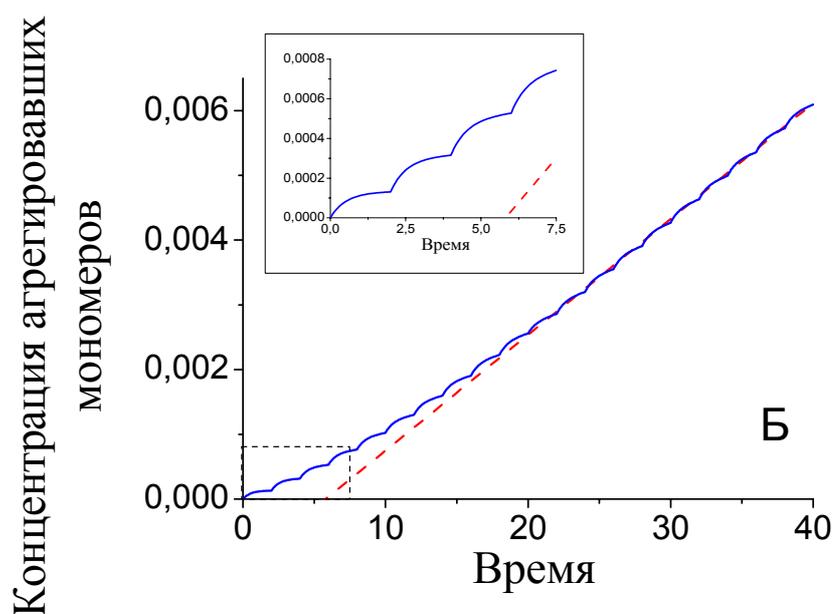
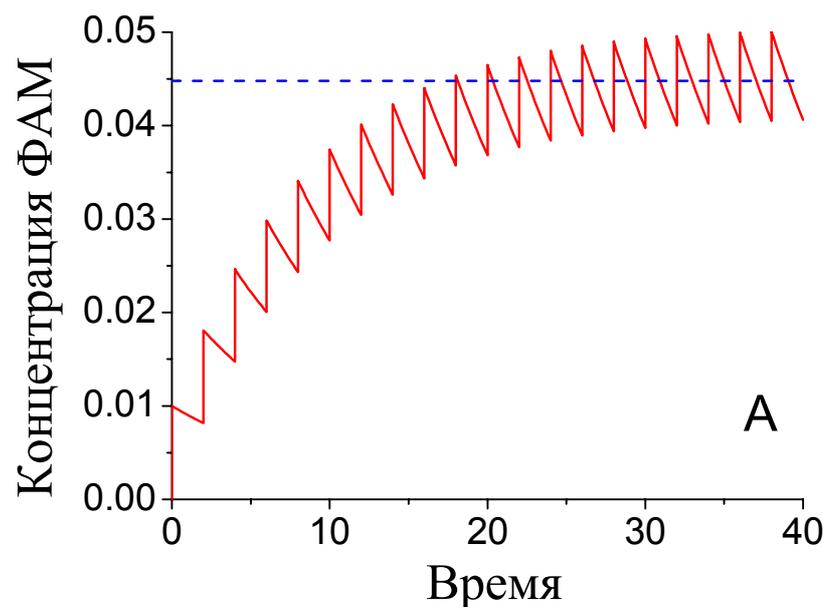


Рис. 3.2. Численное решение системы (3.10): (а) – рост концентрации ФАМ; (б) - агрегировавших мономеров в процессе импульсного УФ-облучения.

В процессе образования фотоактивированных молекул устанавливается стационарный режим, когда концентрация R ведет себя пилообразно и сразу после импульса равна $(R_p + R_s)$, а к началу каждого следующего импульса она опускается до некоторого постоянного значения R_s . При этом прирост концентрации агрегировавших мономеров становится одинаковым от импульса к импульсу и равняется:

$$\Delta M(T) = \frac{1}{k_2 \tau} \left[k_2 \tau R_p + \ln \left(\frac{1 + k_2 \tau R_s}{1 + k_2 \tau (R_p + R_s)} \right) \right], \quad (3.14)$$

$$\text{где } R_s = \frac{1}{2} \left(R_p + \frac{1}{k_2 \tau} \right) \cdot \left(\sqrt{1 + \frac{4R_p}{k_2 \tau (\exp(T/\tau) - 1) (R_p + 1/k_2 \tau)^2}} - 1 \right) \quad (3.15)$$

Стационарная концентрация фотоактивированных молекул R_s (3.15) получена из (3.11) при условии, что к началу следующего импульса концентрация становится такой же, как и перед предыдущим. Считая, что рассеяние наступает при достижении концентрации агрегировавших мономеров некоторой величины M^* и, зная приращение этой концентрации за промежуток времени между импульсами при стационарном процессе, можно записать дозу начала рассеяния через параметры импульсного лазерного излучения и характеристики среды:

$$D^* = w \frac{M^*}{\Delta M} = \frac{w \cdot M^* k_2 \tau}{\left(\chi - \ln \left(1 + \frac{2\chi}{1 - \chi + (\chi + 1) \sqrt{1 + \frac{4\chi}{(\exp(T/\tau) - 1)(\chi + 1)^2}}} \right) \right)}, \quad (3.16)$$

$$\text{где } \chi = k_2 \tau R_p = \eta k_2 \tau C_0 \frac{\sigma w}{\hbar \omega}.$$

Введем некоторые обозначения и перепишем (3.16) в виде:

$$D^*(w, F) = D_0 \frac{w/w_0}{\left(\frac{w/w_0}{2 \cdot w/w_0} - \ln \left(1 + \frac{2 \cdot w/w_0}{1 - w/w_0 + (w/w_0 + 1) \sqrt{1 + \frac{4 \cdot w/w_0}{(\exp(1/F\tau) - 1)(w/w_0 + 1)^2}}} \right) \right)}, \quad (3.17)$$

$$\text{где } w_0 = \frac{\hbar \omega}{\sigma k_2 \tau \eta C_0}, \quad D_0 = w_0 \cdot M^* k_2 \tau = \frac{\hbar \omega}{\eta \sigma} \cdot \frac{M^*}{C_0}$$

Выражение (3.17) описывает некоторую поверхность в безразмерных координатах (безразмерная доза как функция безразмерной частоты следования лазерных импульсов и безразмерной плотности энергии в импульсе), с характерными масштабами обезразмеривания D_0 , τ и w_0 соответственно. Заметим, что значение D_0 для импульсного и непрерывного случая одинаковы (3.7).

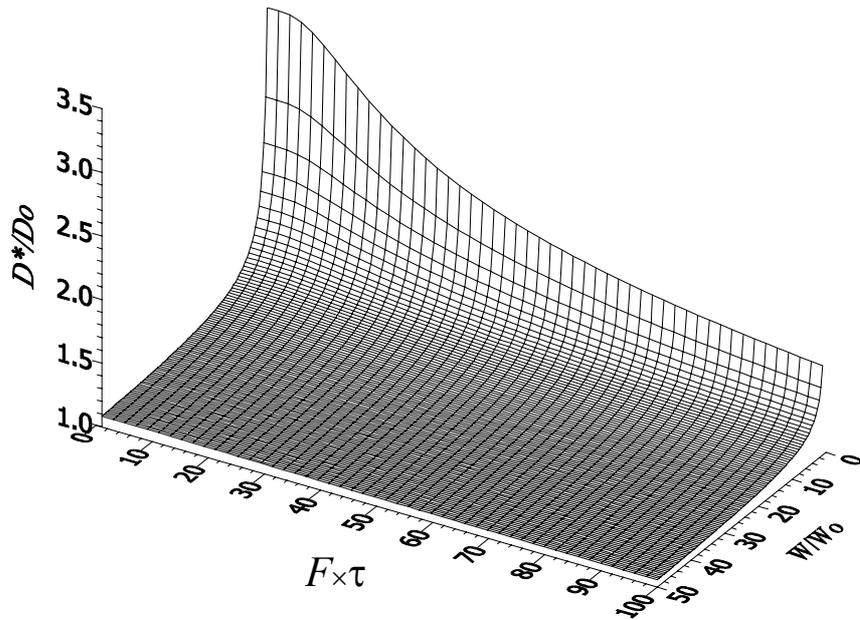


Рис. 3.3. Теоретическая зависимость дозы начала рассеяния излучения пучка пробного лазера от плотности энергии в импульсе w и частоты повторения F .

Таким образом, для случая импульсного лазерного УФ-излучения модель описывает зависимость дозы начала рассеяния пробного пучка, например HeNe-лазера (633 нм), от характеристик импульсного излучения: плотности энергии в импульсе и частоты их повторения. Трехмерная зависимость, описываемая выражением (3.17), представлена на рис. 3.3. Срез этой поверхности вертикальной плоскостью, параллельной оси w/w_0 , демонстрирует двумерную зависимость $D^*(w, F = \text{const})$ рис. 1.9. При увеличении w величина D^* уменьшается, стремясь к постоянному уровню D_0 , а при уменьшении w величина D^* неограниченно возрастает. Эта зависимость – аналог зависимости D^* от интенсивности непрерывного излучения п. 3.2.1. Срез поверхности вертикальной плоскостью, параллельной оси $F \times \tau$, показывает зависимость $D^*(F, w = \text{const})$ рис. 1.10. Большой частоте повторения лазерных импульсов соответствует меньшая доза, ограниченная снизу той же величиной D_0 , что и для зависимости $D^*(w)$, а уменьшение частоты приводит к увеличению D^* . В отличие от зависимости $D^*(w, F = \text{const})$ этот рост ограничен сверху значением $D^*_{\max}(F \rightarrow 0, w_1) \cong 1 / [1 - \ln(1 + w_1/w_0)^{w_0/w_1}]$, где $w = \text{const} = w_1$. Иначе

говоря, для каждой конечной наперед заданной плотности энергии в импульсе существует конечная доза D^*_{max} , накопление которой редкими одиночными импульсами приведет к возникновению рассеяния.

В общем, модель принципиально различает два случая. Когда концентрация фотоактивированных молекул велика (большие интенсивности), характерное время встречи (агрегации) меньше времени релаксации настолько, что молекулы, активированные светом, скорее все проагрегируют, чем срелаксируют. При этом зависимость от интенсивности исчезает, процесс становится дозовым и выходит на насыщение. Второй предельный случай, когда концентрация ФАМ настолько мала, что процесс агрегации конкурирует с релаксацией, в этом случае результат критически зависит от режима облучения и D^* неограниченно возрастает при уменьшении интенсивности.

Для получения наилучшего совпадения теоретических и экспериментальных зависимостей был произведен подбор параметров в уравнении (3.17). В результате этого получены следующие оценки величин, использовавшихся в модели: $D_0 \sim 45$ Дж/см², $w_0 \sim 0,15$ Дж/см², $\tau \sim 10$ сек, $M^*/\eta C_0 \sim 3 \times 10^2$, $k_2 \eta C_0 \sim 9 \times 10^{-2}$ 1/сек. При получении этих оценок были использованы экспериментальные значения: $C_0 = 10^{16}$ см⁻³, $\alpha = 5 \times 10^{-2}$ см⁻¹, $\sigma = 5 \times 10^{-18}$ см², $\hbar\omega = 6,62 \times 10^{-19}$ Дж.

3.2.3 Выводы

Полученные характерные времена жизни фотоактивированного состояния (секунды) попадают в диапазон времен конформационных изменений белковой молекулы [143 - 145], что является аргументом в пользу гипотезы о механизме формирования фотоактивированного состояния.

По аналогии с I_0 величину w_0 можно считать границей между областью резкого роста D^* и областью, в которой D^* стремится к асимптоте. Полученная оценка значения w_0 получается ниже плотности энергии

вызывающей нагрев образца (таблица 3), обе эти величины обратно пропорциональны концентрации исходных молекул. Для больших концентраций соотношение w_0 и плотности энергии вызывающей нагрев должно сохраниться.

3.3 Исследование постагрегации. Самосогласование модели

Объяснение физического смысла D^ .*

В соответствии с предложенной теорией, экспозиции начала рассеяния в растворе соответствует некоторая концентрация агрегировавших мономеров M^* , при которой в растворе происходят качественные изменения. Однако изложенная модель ничего не говорит о судьбе агрегатов после их образования.

Для более глубокого понимания происходящих процессов были проведены дополнительные эксперименты по выяснению роли света на рост рассеяния после достижения экспозиции достаточной для его начала, эти эксперименты проясняют механизмы дальнейшего образования крупных агрегатов. А именно, был выбран фиксированный режим облучения β L-кристаллина ($w = 65$ мДж/см², $F = 2$ Hz, $C = 0,5$ мг/мл). Экспозиция начала рассеяния пробного пучка (D^*) для выбранного режима составила 110 Дж/см² (что соответствует 14 минутам облучения в данном режиме). Для исследования процессов, последующих за выключением ультрафиолета (*постагрегации*), УФ излучение выключалось при дозе превышающей D^* . Наблюдение за интенсивностью рассеянного излучения HeNe лазера продолжалось. Результаты такого эксперимента приведены на рисунке 3.5. Оказалось, что рассеяние продолжает расти, наклон экспозиционной кривой определялся разницей дозы выключения и дозы начала рассеяния, чем меньше была разница, тем меньше наклон.

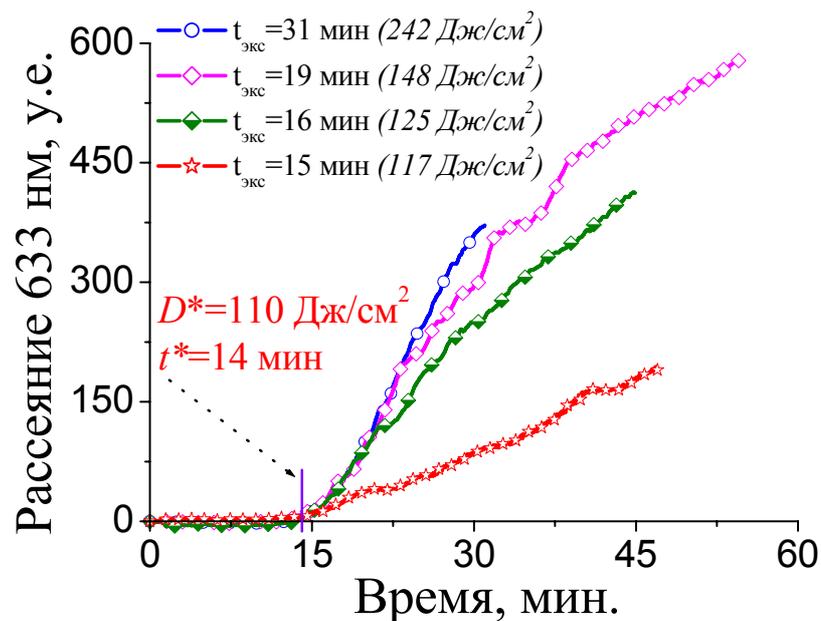


Рис. 3.5. Постагрегация раствора β L-кристаллина при экспозициях $D > D^*$.

В других экспериментах УФ излучение выключалось при дозах меньше дозы начала рассеяния. Оказалось, что рассеяние пробного излучения появляется и в этом случае, но спустя некоторое характерное время задержки (рис. 3.6).

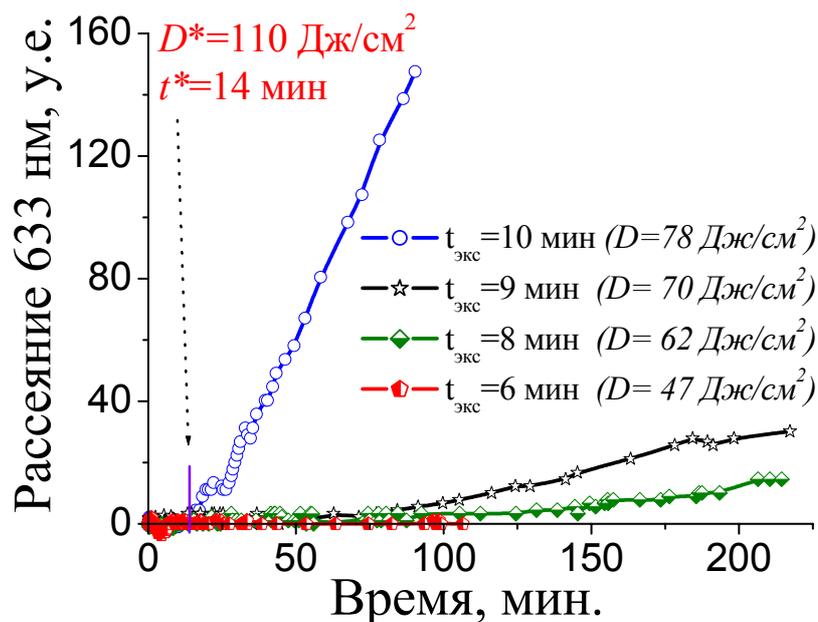


Рис. 3.6. Постагрегация раствора β L-кристаллина при экспозициях $D < D^*$.

Зависимость этого времени задержки от дозы выключения приведена на рисунке 3.7. Важно отметить, что как только доза выключения УФ становится меньше D^* , характерное время задержки начала роста рассеяния пробного пучка значительно увеличивается. Отсюда можно сделать следующие выводы. Будучи инициированной УФ излучением, агрегация дальше может идти без действия света (аналог тепловой агрегации). При этом рост рассеяния обусловлен увеличением размеров агрегатов за счет взаимодействия уже образовавшихся мелких агрегатов, так как молекул в фотоактивированном состоянии, спустя время жизни τ после выключения УФ, уже нет. Еще один вывод заключается в том, что верхней границей применимости построенной в этой главе теории является доза начала рассеяния D^* .

Дальнейшее укрупнение агрегатов может быть описано с помощью модели диффузионно- и / или реакционно-ограниченной агрегации [146].

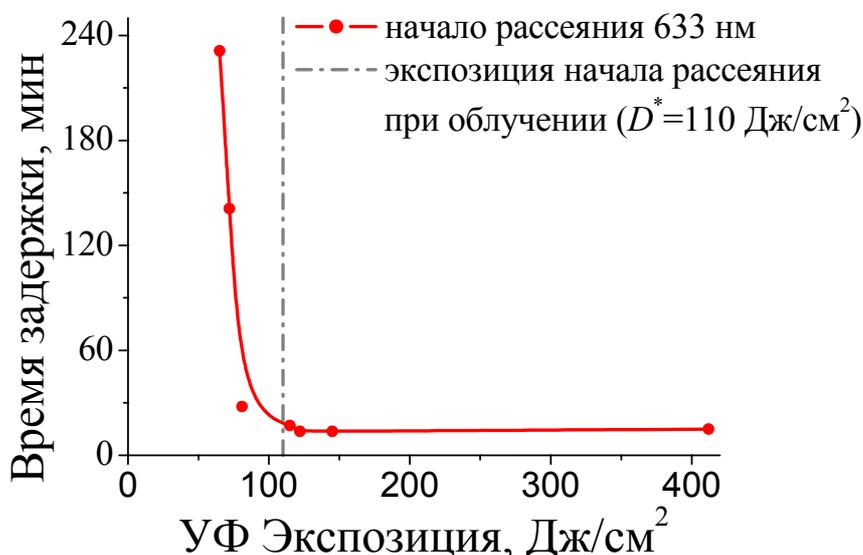


Рис. 3.7. Время задержки начала рассеяния пробного пучка HeNe лазера от экспозиции УФ.

Таким образом, результаты, полученные в этих экспериментах, проясняют механизмы дальнейшего образования крупных агрегатов. А именно следует

предположить, что образовавшиеся агрегаты могут агрегировать друг с другом и без фотоактивации.

3.4 Заключение

Предложена простая теоретическая модель, дающая представление о процессах фотоагрегации, происходящих в растворе белков под воздействием непрерывного и импульсного ультрафиолетового излучения и объясняющая обнаруженный нами и описанный в предыдущих главах эффект зависимости дозы начала рассеяния пробного пучка от плотности энергии в импульсе и от частоты повторения лазерных импульсов.

Согласно этой модели начальная стадия агрегации при УФ лазерном облучении происходит при взаимодействии двух фотоактивированных белковых молекул. При этом фотоактивированное состояние имеет конечное время жизни. Модель позволяет качественно и количественно описать экспериментальные результаты и сделать некоторые оценки. Оценки времени жизни активированного состояния позволяют сделать предположения о том, что фотоактивированное состояние белковой молекулы, скорее всего, проявляется как изменение ее конформации.

ГЛАВА 4. Экспресс-метод исследования УФ-лазерной агрегации водорастворимых белков и некоторые его применения

Как уже было отмечено выше, агрегация белков является причиной многих заболеваний [59-63]. Одно из них - катаракта, являющаяся по данным Всемирной Организации Здравоохранения основной причиной потери зрения во всем мире [64, 65]. Катаракта является клиническим результатом увеличения рассеяния света хрусталиком глаза. Это светорассеяние может возникать из-за потери клеточного порядка в хрусталике в результате нарушения процесса его развития или бесконтрольного деления клеток, а также из-за потери прозрачности отдельных клеток хрусталика. Последнее, в частности, может произойти из-за фотоповреждения основных белков хрусталика - кристаллинов, вызывающего их агрегацию. Причиной появления наследственной катаракты могут стать генетически измененные кристаллины из-за изменения стабильности связи (ассоциации) или растворимости. Вызванная воздействием на хрусталик ультрафиолетовым излучением катаракта активно изучается *in vivo* [66-68] и *in vitro* [69-72].

Ранние эпидемиологические исследования показали связь между действием УФ-В излучения (длины волн от 290 до 320 нм) и возрастной катарактой хрусталика глаза [133-135]. Из всего количества солнечного УФ-В излучения, достигающего поверхности земли (около $2 \cdot 10^{-4}$ Вт/см²), хрусталик глаза человека получает $10^{-7} - 10^{-6}$ Вт/см² УФ-В излучения *in vivo* [147]. По этим данным, полагая, что в году 240 солнечных дней, можно оценить ежегодно аккумулируемое УФ излучение, получаемое хрусталиком глаза человека: 2,5 – 20,6 Дж/см², со средним значением 11,5 Дж/см². Таким образом, УФ доза, например в 200 Дж/см², воздействующая на растворы кристаллинов в наших экспериментах на длине волны 308 нм в УФ-В диапазоне, эквивалентна кумулятивному УФ излучению, получаемому хрусталиком глаза человека в течение примерно 20 лет. Хрусталик имеет метаболические системы, сохраняющие восстановительную окружающую

среду [148], однако они ослабевают с возрастом и в катарактозных хрусталиках [149]. Таким образом, можно считать, что экспериментальные дозы сопоставимы с физиологическим уровнем УФ излучения и использование вышеописанной методики позволяет моделировать *in vitro* воздействие УФ на отдельные кристаллины и их модифицированные формы во время старения хрусталика и развития катаракты у человека.

Предыдущие главы были посвящены фундаментальному исследованию агрегации растворов белка под действие лазерного УФ излучения и построению теоретической модели объясняющей наблюдаемые закономерности исходя из простейших утверждений. Попытаемся применить полученные знания к конкретным задачам. В частности, как это было заявлено во введении к задачам медицины.

4.1 Исследование влияния короткоцепочечных пептидов на скорость УФ-индуцированной агрегации смеси кристаллинов

В настоящее время актуально стоит проблема поиска веществ, обладающих защитными свойствами по отношению к действию УФ излучения на белки хрусталика глаза, которые могли бы быть использованы при создании новых антикатарактальных препаратов. Упомянутая выше молекула α -кристаллина является высокомолекулярным образованием. Будучи выделенным из здорового хрусталика, например животного донора, этот шаперон не обладает достаточной проникающей способностью для использования его в профилактических или лечебных целях. Кроме того, шаперонная активность α -кристаллина с возрастом может ослабевать, что также может являться одной из причин развития старческой катаракты [113].

Одними из исследуемых веществ являются пептиды. В работе [104] в экспериментах *in vitro* показано, что пантетин и его составляющие компоненты замедляют скорость тепловой агрегации смеси β L- и α -кристаллинов за счет поддержания защитных свойств α -кристаллина. В

работах А. А. Болдырева и др. (см., например, [150]) были проведены опыты на экспериментальных животных по выявлению свойств карнозина в качестве антикатарактального препарата.

Рассмотрим в начале, как влияют на лазерную агрегацию водных растворов кристаллинов хрусталика глаза (смеси β L-кристаллина с α -кристаллином и смеси β L-, α - и γ -кристаллинов) вещества, на основе которых созданы известные антикатарактальные препараты.

4.1.1 Материалы и методы

Растворы α -, β - и γ -кристаллинов готовились так же как описано в п. 2.1. Эксперимент осуществлялся по схеме 3. Короткоцепочечные пептиды приобретались в фирмах “Sigma” и “Hamari Chemicals Ltd.”, Япония. Использовались пептиды D-пантетин и L-карнозин, а также их формы и составляющие: N-ацетилкарнозин, анзерин, пантотеновая кислота, β -аланин.

4.1.2 Результаты и их обсуждение

В полной аналогии с исследованиями, изложенными в п. 2.2.2. проведены исследования влияния некоторых пептидов, использовавшихся в [104, 150], на скорость УФ-индуцированной агрегации различных смесей кристаллинов. Концентрация добавляемых веществ, как и белков, составляла 0,5 мг/мл. В частности, были исследованы защитные свойства D-пантетина и L-карнозина, на которые, группами сотрудников Джона Кларка и А. А. Болдырева, получены патенты как на антикатарактальные препараты [151, 152]. С целью поиска нового эффективного антикатарактального препарата были проведены аналогичные исследования ряда других веществ.

Из всех исследованных нами веществ эффект замедления фотоагрегации смесей кристаллинов оказался больше при использовании D-пантетина и L-карнозина. Ниже описаны только результаты, полученные с

этими пептидами. На рис. 4.1 приведены экспозиционные кривые для β L-кристаллина, смеси β L- и α -кристаллинов и для этой смеси при добавлении в нее D-пантетина и L-карнозина. Видно, что эти добавки обладают шаперонными (защитными) свойствами.

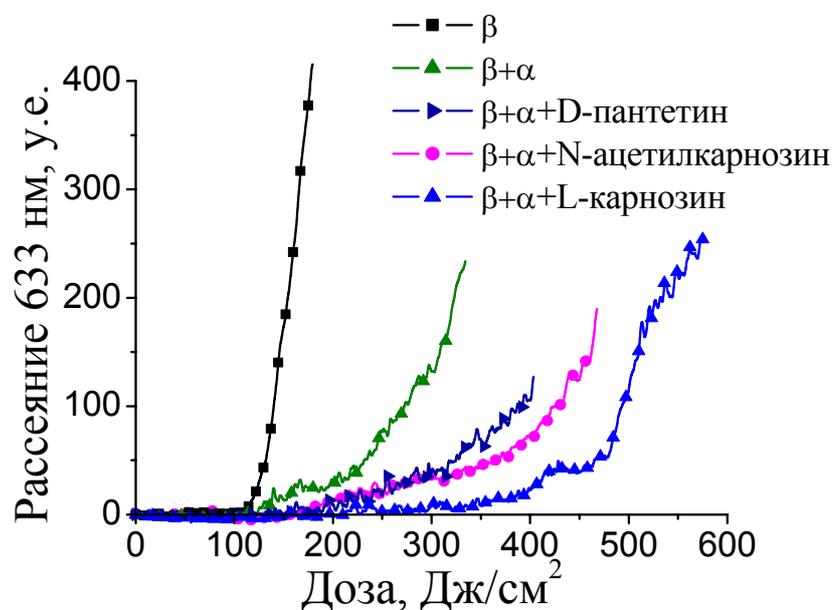


Рис. 4.1. Влияние пептидов на УФ индуцированную агрегацию раствора α - и β -кристаллинов.

Используя экспериментальную схему 3 было изучено воздействие УФ излучения на раствор всех основных белков, входящих в хрусталик глаза: α -, β - и γ -кристаллинов. Такая смесь представляет особый интерес, поскольку она в наибольшей степени близка к составу хрусталика глаза. Таким образом, в лабораторных условиях было смоделировано защитное действие различных пептидов в условиях развития УФ индуцированной катаракты. На рис. 4.2 а, б представлены экспозиционные зависимости для полного набора кристаллинов при добавлении D-пантетина и N-ацетилкарнозина как по отдельности, так и в смеси. D-пантетин и N-ацетилкарнозин на длине волны воздействующего УФ не поглощают.

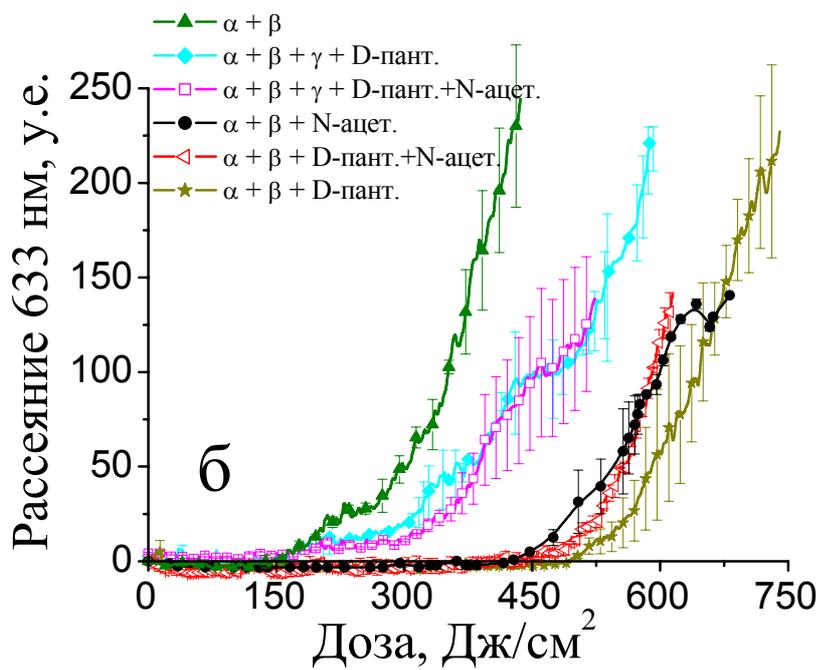
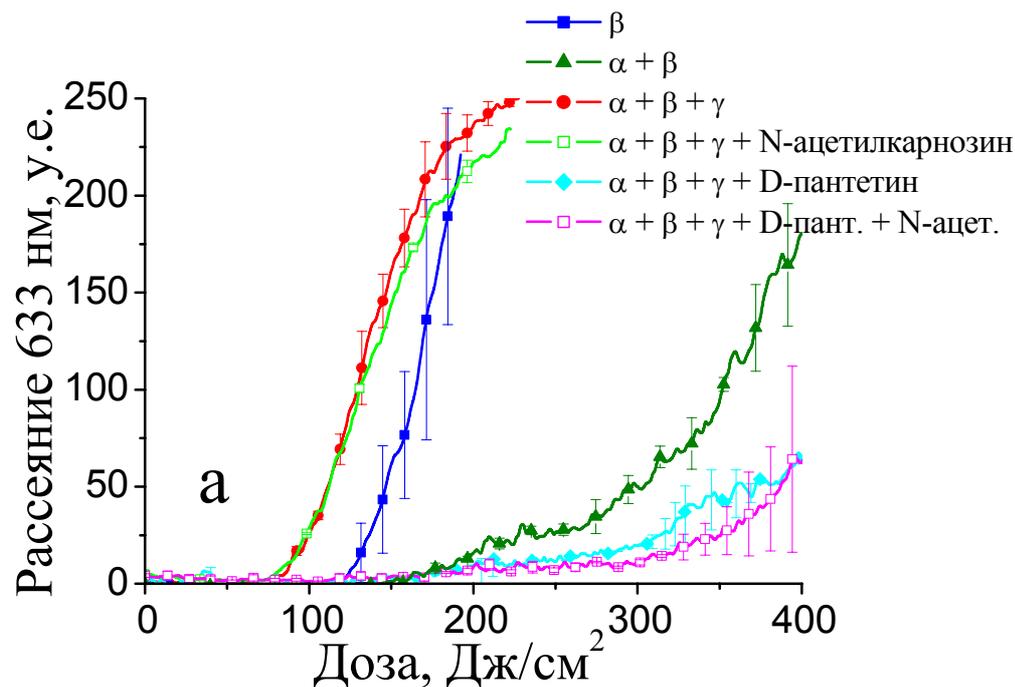


Рис. 4.2. Экспозиционные зависимости для полного набора кристаллинов с добавлением D-пантетина и N-ацетилкарнозина. Концентрация всех белков и добавок в растворе 0,5 мг/мл.

Из экспериментальных данных следует, что такие известные вещества как L-карнозин и D-пантетин, используемые в качестве антикатарактальных препаратов, замедляют УФ-индуцированную агрегацию растворов белков и под действием лазерного излучения, что, вообще говоря, не очевидно, так как лазерное и солнечное воздействия существенно отличаются. Попробуем объяснить с точки зрения принципов теоретической модели, построенной в главе 3, с чем может быть связана правомочность применения исследования по воздействию лазерного излучения на растворы белков к исследованиям воздействия солнечных интенсивностей на хрусталик глаза.

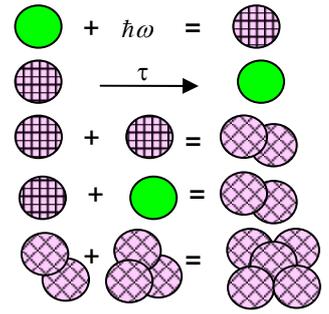
4.2 Обобщение модели на случай слабых интенсивностей

Поясним, каким образом к проблеме образования УФ-индуцированной катаракты может быть применена построенная модель после некоторого ее обобщения.

Как было описано в главе 3, мощности лазерного излучения, недостаточные для нелинейного поглощения и нагрева, предполагаются достаточными для индуцирования других нелинейных процессов, в частности по концентрации фотоактивированных молекул. Однако, для того, чтобы данная теория формально могла быть применима для случая низких интенсивностей (например, солнечного излучения, агрегация белков при котором вызывает катаракту) необходимо учесть, что образование агрегатов возможно при взаимодействии не только двух фотоактивированных молекул, но и фотоактивированной молекулы с исходной. Как будет показано ниже, первый процесс превалирует при лазерном воздействии (когда образуется много фотоактивированных молекул белка), тогда как второй может быть основным при маломощном, например, солнечном освещении. Как было показано при исследовании эффекта постагрегации (п. 3.3), в общем случае надо предположить и взаимодействие образовавшихся агрегатов друг с

другом. Тогда процессы, происходящие согласно созданной модели, схематически будут выглядеть так:

- 1) активирование светом молекулы (ФАМ)
- 2) возвращение в исходное состояние за время τ
- 3) агрегация двух фотоактивированных молекул (ФАМ)
- 4) агрегация (ФАМ) и исходной молекулы
- 5) агрегация образовавшихся агрегатов друг с другом



По аналогии с (3.1) полная система уравнений запишется в виде:

$$\begin{aligned}
 \frac{dR}{dt} &= \eta\sigma C \frac{I}{\hbar\omega} - k_2 R^2 - k_1 CR - \frac{R}{\tau}, \\
 \frac{dM}{dt} &= k_2 R^2 + k_1 CR, \\
 \frac{dC}{dt} &= -\eta\sigma C \frac{I}{\hbar\omega} + \frac{R}{\tau}
 \end{aligned}
 \tag{4.1}$$

Где R – концентрация фотоактивированных молекул, η – квантовый выход фотоактивации мономеров при поглощении фотона, σ – эффективное сечение поглощения УФ квантов исходными молекулами белков (мономерами), I – интенсивность УФ излучения, $\hbar\omega$ – энергия кванта излучения, k_2 – константа скорости образования димеров при взаимодействии двух фотоактивированных мономеров, k_1 – константа скорости образования димеров при взаимодействии фотоактивированных и исходных мономеров, τ – характерное время жизни фотоактивированного состояния, M – концентрация проагрегировавших мономеров (M^* – концентрация проагрегировавших мономеров, при которой начинается рассеяние), C – концентрация молекул мономера, изменением которой в процессе агрегации мы пренебрегаем ($M^* \ll C_0$), C_0 – исходная концентрация молекул мономера.

Тогда, в приближении непрерывного излучения слабой интенсивности, концентрация фотоактивированных мономеров мала, поэтому в уравнении на концентрацию ФАМ можно пренебречь квадратичным членом ($k_2 R^2 \ll R/\tau$). Такое приближение соответствует воздействию на кристаллик солнечного

излучения. С учетом этого приближения и при постоянстве концентрации мономеров система (4.1) запишется в виде:

$$\begin{aligned} \frac{dR}{dt} &= \eta\sigma C \frac{I}{\hbar\omega} - \frac{R}{\tau}, \\ \frac{dM}{dt} &= k_1 CR \end{aligned} \quad (4.2)$$

для стационара по концентрации фотоактивированных молекул получаем

$$\begin{aligned} \Delta M &= k_1 R_{stat} \cdot \Delta t, \quad R_{stat} \sim \tau \\ M(t) &= k_1 R_{stat} \cdot t \\ D^* &= I \cdot t^* = I \cdot \frac{M^*}{k_1 R_{stat}}, R_{stat} \sim \tau \end{aligned} \quad (4.3)$$

Получаем, что доза, необходимая для начала рассеяния, обратно пропорциональна τ .

$$D^* \sim \frac{1}{\tau} \quad (4.4)$$

Для воздействия непрерывного лазерного излучения в пункте 3.2.1 получено, что доза, требуемая для начала рассеяния обратно пропорциональна τ в квадрате, так как $I_0 = \frac{\hbar\omega}{\eta\sigma C} \cdot \frac{1}{4k_2\tau^2}$, $D_0 = 2 \frac{\hbar\omega}{\eta\sigma} \cdot \frac{M^*}{C}$ (3.5), а

$$D^* = 4D_0 \frac{I_0}{I} \quad (3.9) \text{ при } I \ll I_0, \text{ то есть } D^* \sim 1/\tau^2. \quad (4.5)$$

Линейный член по концентрации фотоактивированных молекул в систему уравнений, описывающих процесс агрегации под действием мягкого УФ, позволил учесть взаимодействие исходных и фотоактивированных молекул. Для случая «солнечного» воздействия характерна низкая концентрация фотоактивированных молекул. Следовательно, преобладание линейных процессов над нелинейными и обратная пропорциональность дозы начала рассеяния характерному времени τ . Для случая же лазерных интенсивностей, когда концентрация фотоактивированных молекул настолько велика, что линейными слагаемыми можно пренебречь, зависимость D^* оказывается обратно пропорциональна τ^2 .

Надо заметить, что получается неважным то, каким образом мы накопили агрегаты (интенсивным лазерным воздействием или слабым солнечным).

Таким образом, если вводимые добавки уменьшают время релаксации τ , то они будут увеличивать дозу D^* , как в случае лазерного, так и в случае солнечного воздействия. Это объясняет корреляцию в действии добавок на развитие естественной катаракты и на лазерную агрегацию растворимых кристаллинов. Это позволяет сформулировать экспресс-метод отбора добавок подозрительных на антикатарактальное действие. Применение этого экспресс-метода будет рассмотрено ниже.

4.3 Подбор новых антикатарактальных добавок

Как уже отмечалось выше, в продолжение исследования защитных свойств D-пантетина и L-карнозина (п. 4.1), с целью поиска нового эффективного антикатарактального препарата были проведены аналогичные исследования ряда других веществ. В результате была подобрана комбинация короткоцепочечных пептидов, которая *in vitro* в большей степени замедляет агрегацию смеси β L- и α -кристаллинов, чем вещества, на основе которых созданы известные антикатарактальные препараты. Это позволяет надеяться, что подобранная нами комбинация (условно назовем ее «фармацевтическая композиция») может стать основой более эффективного антикатарактального препарата, чем запатентованные в [151, 152] средства.

По сравнению с D-пантетином и L-карнозином «фармацевтическая композиция» демонстрирует максимальное замедление скорости агрегации белков в эксперименте. По сравнению с D-пантетином его эффективность выше в 2,5 раза, а по сравнению с L-карнозином почти в 1,5 раза.

По аналогии с рис. 2.7 на рис. 4.3 приведены хроматографические профили смеси β L- и α -кристаллинов с добавлением «фармацевтической композиции» после облучения растворов различными УФ дозами.

Уменьшение амплитуды и уширение пика с $M_n \sim 45$ кДа, а также рост пика высокомолекулярных агрегатов с увеличением УФ дозы существенно уменьшаются, что свидетельствует о замедлении скорости агрегации смеси β L- и α -кристаллинов, вызванной добавлением «фармацевтической композиции». На рис. 4.4 показаны результаты обработки хроматограмм, полученных после облучения смеси β L- и α - кристаллинов и этой смеси при добавлении в нее D-пантетина, и L-карнозина и «фармацевтической композиции».

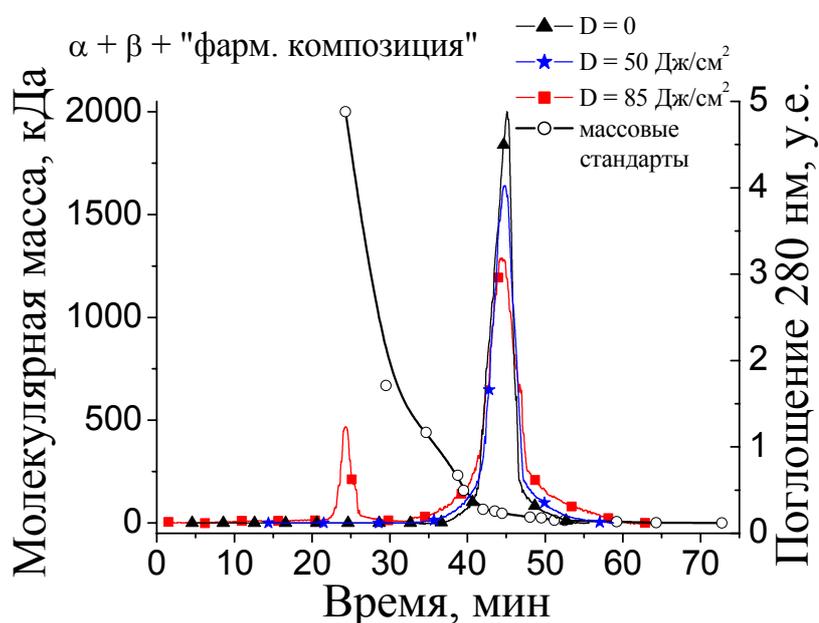


Рис. 4.3. Хроматографические профили. Показаны изменения только для пиков мономера β -кристаллина и высокомолекулярных фракций.

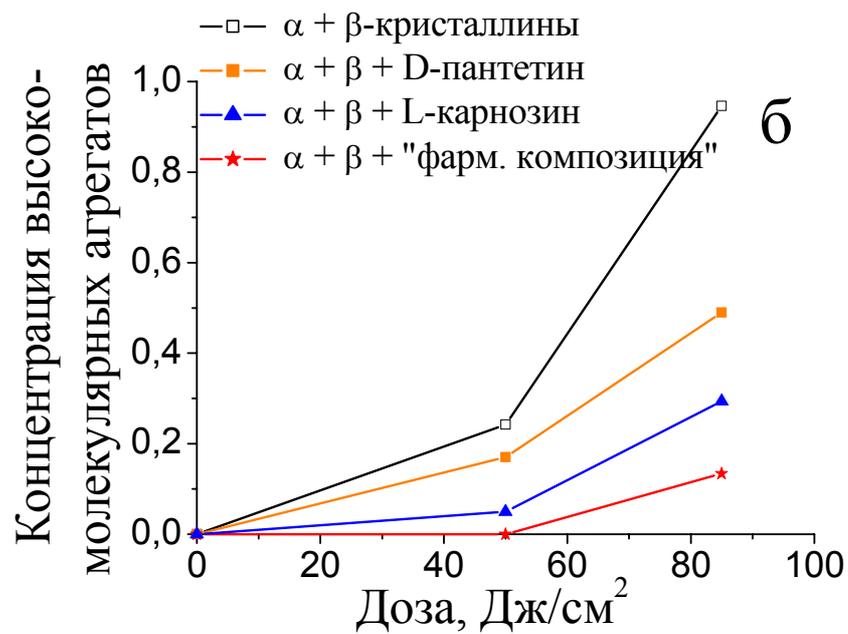
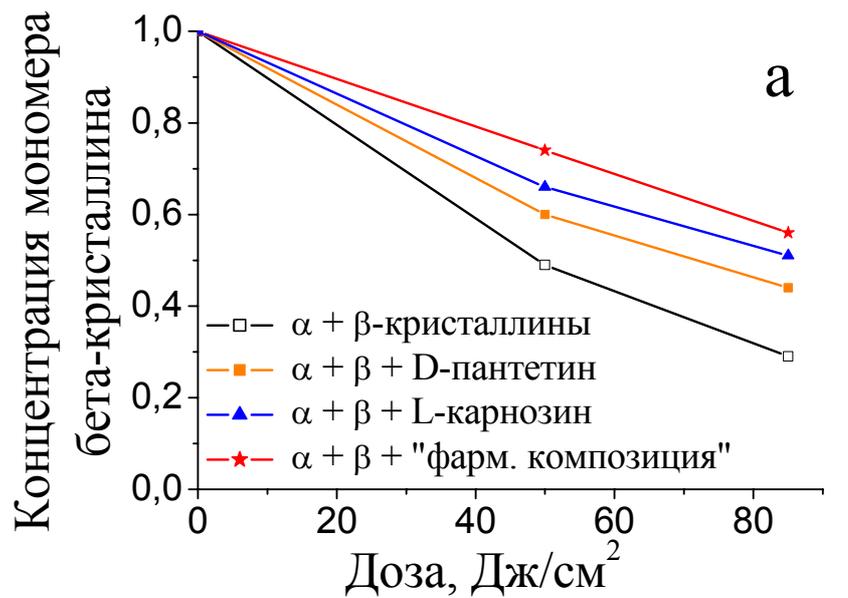


Рис. 4.4. Изменение амплитудных значений мономерной фракции β-кристаллина (а) и высокомолекулярных агрегатов (б), нормирование на максимальное значение.

Из этих рисунков видно, что наиболее эффективное замедление скорости агрегации смеси двух белков происходит при добавлении к ней «фармацевтической композиции».

Интересно отметить что, не все короткоцепочечные пептиды обладают одинаковыми защитными свойствами, так из сравнения кривых ($\alpha\beta\gamma$), ($\alpha\beta\gamma N$) и ($\alpha\beta\gamma D$) ($\alpha\beta\gamma DN$) рис. 4.2 а видно что N-ацетилкарнозин не оказывает на полную смесь кристаллинов защитного воздействия. Однако, как очевидно следует из кривых ($\alpha\beta N$), ($\alpha\beta D$) и ($\alpha\beta DN$), лежащих в пределах погрешности эксперимента, N-ацетилкарнозин обладает не меньшим защитным действием на раствор α - и β - кристаллинов, чем D-пантетин, который в свою очередь, оказывает наилучшее защитное действие на смеси как α - с β - так и α -, β - с γ -кристаллином рис. 4.2 б. В абсолютных единицах, полученных из доз начала рассеяния, 0,5 мг/мл D-пантетина приводит к замедлению начала агрегации любой из приведенных смесей в 3 раза.

Представленная к защите методика позволяет проверять препараты на шаперонные свойства, как на всю смесь, так и на отдельные ее составляющие. Например, из рисунка 4.5 следует, что пантетин не оказывает защитного действия на β -кристаллин, в то время как защищает смесь α и β (рис. 4.2). Карнозин же наоборот, сильно действует на β -кристаллин, в то время как смесь α и β защищает хуже (рис. 4.1). При накоплении статистики, а также при сотрудничестве с биологами и молекулярными конструкторами появляется возможность не только анализировать и сравнивать шапероноподобные вещества между собой, но и давать рекомендации (синтезировать) новые вещества, которые будут обладать еще более хорошими защитными свойствами. На основе такой методики возможно создание промышленного образца прибора, способного количественно анализировать и сравнивать между собой как препараты, так и образцы материала.

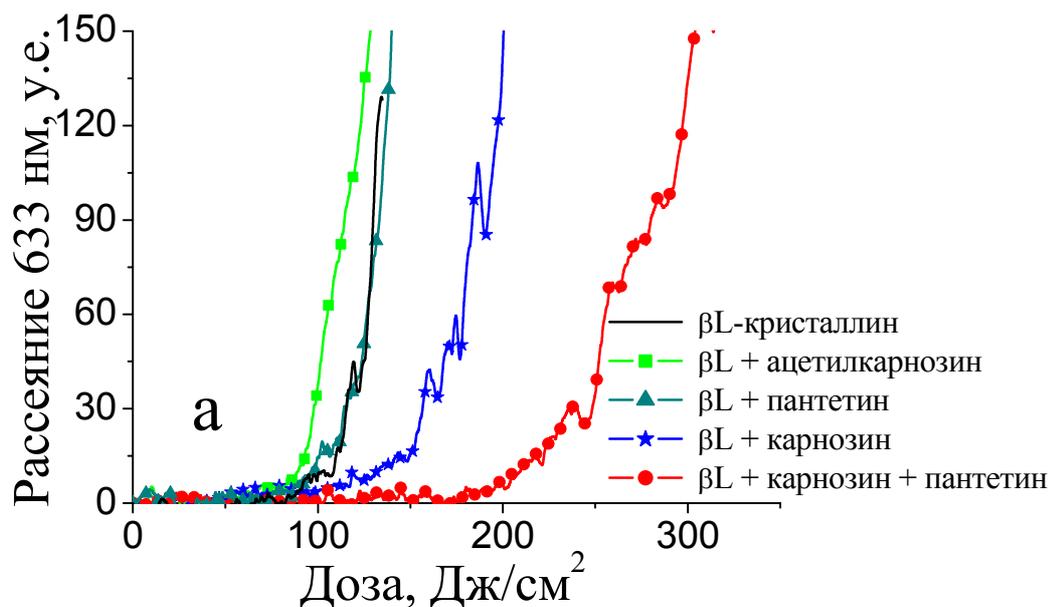


Рис. 4.5. Защитные свойства пептидов по отношению к β-кристаллину.

«Фармацевтическая композиция» испытывалась в рамках совместных исследований с ГУ Научно-исследовательский институт глазных болезней РАМН. Получен положительный эффект в замедлении развития УФ-индуцированной катаракты у экспериментальных животных [2*, 3*].

Изучение зависимости защитных свойств пептидов от их концентрации в растворе белков (данные не приведены) поможет оценить физиологически значимые дозы будущего антикатарактального препарата. Исследование кинетики рассеяния для разных частот повторения лазерных импульсов и плотностей энергии в них (данные не приведены) в совокупности с развитой в главе 3 физической моделью фотохимической агрегации позволило сделать предположения о физических механизмах действия короткоцепочечных пептидов (п. 4.2).

Результаты совместных исследований опубликованы в серии работ [2*, 3*]. Получено решение Роспатента о выдаче патента на изобретение «Фармацевтическая композиция для профилактики развития и лечения начальной стадии возрастной катаракты (варианты)» [19*].

Количественная оценка влияния добавок.

Покажем, что, используя приведенную выше теорию и зная параметры модели для чистого кристаллина, можно количественно оценить влияние веществ, обладающих шапероноподобными свойствами, и сделать предположения о механизме их действия. Для этого расположим на зависимости $D^*(F, w = 75 \text{ мДж/см}^2)$ экспериментальные кривые и точки для разных смесей рис. 4.6.

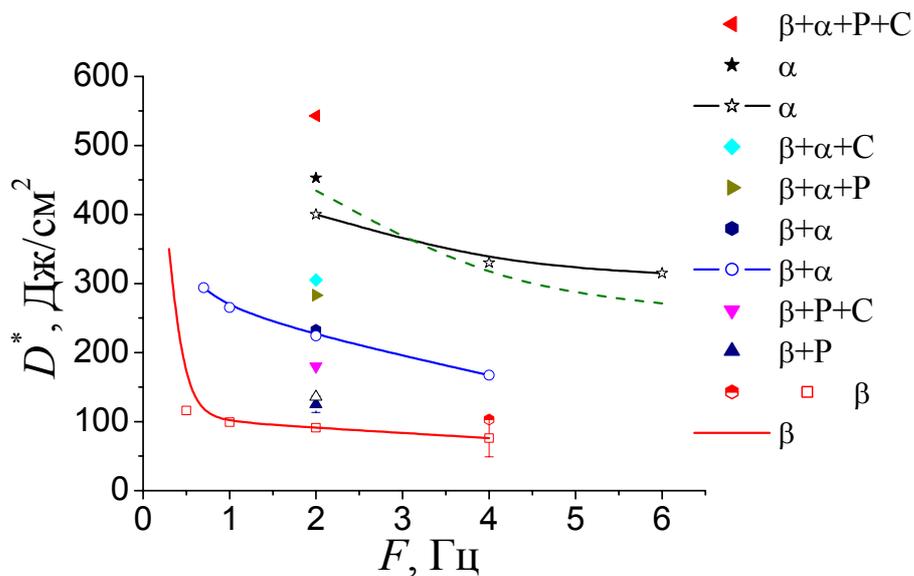


Рис. 4.6. Зависимость дозы начала рассеяния от частоты следования лазерных импульсов. Точки – серия экспериментов при фиксированной частоте, точки с кривой – серия экспериментов для разных частот. (α , β - альфа и бета кристаллины, соответственно, С – L-карнозин, Р – D-пантетин)

Возьмем значения параметров, с которыми теоретическое решение наилучшим образом совпадает с экспериментальной кривой для β -кристаллина (п. 3.2.2). Будем варьировать теперь один параметр при фиксированных прочих для того, чтобы решение прошло через точку, соответствующую выбранной смеси. В таблице 4 приведены полученные значения параметров.

Таблица 4. Параметры для разных смесей (P = пантетин, C = карнозин).

| Раствор | $D_0, Дж/см^2$ | $w_0, Дж/см^2$ | $\tau, сек$ | $M^* / \eta C_0$ | $k_2 \eta C_0, 1/сек$ |
|--------------------|----------------|----------------|-------------|-------------------|-----------------------|
| β | 45 | 0,15 | 10 | $3,3 \cdot 10^2$ | $90 \cdot 10^{-3}$ |
| $\beta+P$ | 71 | - | - | $5,4 \cdot 10^2$ | $16 \cdot 10^{-3}$ |
| | - | 0,8 | - | | |
| $\beta+P+C$ | - | - | 1,8 | $7,7 \cdot 10^2$ | $7 \cdot 10^{-3}$ |
| | 102 | - | - | | |
| | - | 1,7 | - | | |
| $\beta+\alpha$ | - | - | 0,82 | $9,9 \cdot 10^2$ | $5 \cdot 10^{-3}$ |
| | 132 | - | - | | |
| | - | 2,5 | - | | |
| $\beta+\alpha+P$ | - | - | 0,51 | $12,1 \cdot 10^2$ | $4 \cdot 10^{-3}$ |
| | 161 | - | - | | |
| | - | 3,3 | - | | |
| $\beta+\alpha+C$ | - | - | 0,37 | $13,1 \cdot 10^2$ | $3,7 \cdot 10^{-3}$ |
| | 173 | - | - | | |
| | - | 3,6 | - | | |
| $\beta+\alpha+P+C$ | - | - | 0,32 | $23,3 \cdot 10^2$ | $0,2 \cdot 10^{-3}$ |
| | 308 | - | - | | |
| | - | 6,3 | - | | |
| | - | - | 0,1 | | |

Если положить k_2 и M^* неизменными, тогда действие шапероноподобных веществ можно объяснить изменением характерного времени жизни фотоактивированных молекул τ . Как было показано в п. 4.2 уменьшение этого параметра приведет к увеличению дозы начала рассеяния D^* и отодвинет развитие катаракты. Остальные колонки можно объяснять так, что при прочих равных условия изменение положения кривых $D^*(w, F)$ можно трактовать и как изменение D_0 , или, что то же самое, как изменение концентрации M^* . Таким образом можно считать, что шапероны могут изменять концентрацию проагрегировавших мономеров, с которой начинается рассеяние, это может быть так, например, если проагрегировавшие мономеры без шаперонов и с ними будут образовывать агрегаты разной формы, то есть разного характерного размера. Предполагая только изменение характерного масштаба w_0 , влияние шаперонов может быть трактовано как замедление скорости реакции k_2 .

4.4 Повышенная чувствительность β А3-кристаллина с измененным строением молекулы (укороченной аминокислотной цепочкой) к фотоагрегации, вызванной УФ-излучением

В качестве еще одного примера применения экспресс метода, приведем данные сравнительно исследования фоточувствительности нормального кристаллина и кристаллина с измененным строением молекулы (укороченной аминокислотной цепочкой).

Структуры центральных доменов β - и γ -кристаллинов очень похожи. Однако β -кристаллины имеют отличия в строении молекулы, а именно, N- и C-концы, тогда как у γ -кристаллинов имеются только рудиментарные концевые части [153], что повышает возможность объяснения различий фото-поведения β - и γ -кристаллинов присутствием концевых частей у β -кристаллинов.

N- и C-концы β -кристаллина также иногда называют «ручками» [154]. При исследовании в растворе, β -кристаллины связываются в комплексы высшего порядка, тогда как γ -кристаллины существуют в растворах как стабильные мономеры [155 - 159].

Недавно было показано, что некоторым мутациям β А3-кристаллина соответствуют определенные виды катаракты [160-163]. Изменения α - [164 - 168], β - [169-171], а также γ -кристаллинов [138, 161, 172 - 178] также связаны с врожденными катарактами. Таким образом, кажется возможным, что структурные модификации кристаллинов хрусталика могут сделать их более восприимчивыми к последующему разрушению УФ излучением, повышая восприимчивость к возрастной катаракте.

Как уже было сказано выше, облучение УФ-В светом (длина волны 290-320 нм) является хорошо задокументированным фактором риска возникновения возрастной катаракты. При старении хрусталика в β -кристаллинах происходит протеолитическое расщепление их концевых

частей. Для определения влияния потери концевых ручек на функцию β -кристаллинов в работе проведено сравнение чувствительности к УФ индуцированной агрегации искусственно созданного (рекомбинантного) β A3-кристаллина, у которого отсутствует N-конец ($r\beta$ A3tr), и искусственно созданного $r\beta$ A3-кристаллина с полной белковой цепью. Последний сравнивался с естественным (выделенным из хрусталика) β L-кристаллином для проверки адекватности искусственного создания [127].

Как показывает рентгеновский дифракционный анализ, β - и γ -кристаллины теряют свою исходную структурную организацию при старческой катаракте, и похожие изменения наблюдаются при УФ облучении растворов бычьих кристаллинов [138]. Хотя о влиянии УФ излучения на отдельные $\beta\gamma$ -кристаллины известно мало, восприимчивость смешанных $\beta\gamma$ -кристаллинов хрусталика к УФ облучению хорошо изучена [106, 114-116], подтверждая более ранние результаты о том, что β -кристаллины более устойчивы к вызванной УФ излучением фотоагрегации, чем γ -кристаллины [106, 114].

Для изучения этой возможности образцы с полной цепочкой и усеченным N-концом β A3-кристаллинов были подвержены дозам УФ облучения сравнимым с естественными. Вызванные УФ излучением структурные модификации в $r\beta$ A3tr-кристаллине исследовались с помощью масс спектрометрии [6*]. Образование нерастворимых белковых агрегатов развивалось раньше и с большей скоростью у укороченного $r\beta$ A3tr-кристаллина, по сравнению с кристаллином, обладающим полной цепочкой, который в свою очередь показал схожую чувствительность с белком естественного происхождения. Увеличение чувствительности $r\beta$ A3tr к УФ свету позволяет предположить, что потеря N-конца у β -кристаллинов может увеличить их тенденцию к агрегации при УФ облучении, усиливая восприимчивость к возрастной катаракте.

4.4.1 Материалы и методы

Белки, результаты исследований которых приводятся в настоящем разделе, были приготовлены в Национальном институте глаза национальных институтов здоровья, США (NEI / NIH, USA). Суть методики, подробно изложенной в работе [6*], заключается в том, что гβA3- и гβA3tr-кристаллины были выращены (экспрессированы) в клетках, инфицированных вирусом, содержащим кодирующие последовательности гβA3 или гβA3tr. Далее эти белки выделялись из клеток, центрифугировались, очищались жидкостной хроматографией (FPLC). гβA3 и гβA3tr идентифицировались с помощью методов молекулярной биологии и биохимии (электрофорез в ПААГ (SDS-PAGE) и вестерн-блот анализа). βL-кристаллин приобретался в фирме «Sigma-Aldrich». Концентрация белка в необработанных образцах измерялась с помощью абсорбционной спектроскопии на 280 нм с использованием спектрофотометра (DU-650 UV, Beckman Instruments, Fullerton, CA).

Растворы, с различной концентрацией рекомбинантного βA3-кристаллина, выделенного из клеток с искусственно измененными генами, готовились так же как и растворы карбоангидразы и β-кристаллина (п. 1.2.1, 2.1) и замораживались. В замороженном состоянии на сухом льду (-70°C) доставлялись в ИПФ РАН из НИГ НИЗ (США) в пробирках по 0,5 мл. Так как часть исследований проводилась соавторами на территории США, после облучения образцы замораживались и отправлялись курьером на сухом льду (-70°C) в НИГ (Bethesda) для дальнейшего анализа.

УФ облучение кристаллинов.

Экспериментальные измерения проводились как описывалось ранее [127]. Вкратце, образцы быстро доводились до комнатной температуры (20°C) за один час до УФ облучения, проходили центрифугирование при

5000 g в течение 15 мин при 20°C, и облучались эксимерным лазером LPX-200 (Lambda Physik) при $\lambda = 308$ нм (XeCl). Изменение температуры образцов при УФ облучении не превышало 1-2°C (п. 3.1). Во время облучения образцов плотность энергии в импульсе эксимерного лазера составляла 75 мДж/см^2 при частоте повторения импульсов 2 Гц. Измерялись энергия импульсов эксимерного лазера и поглощение белка на 308 нм (ED-200 джоульметр, Gentec, Inc., Canada). Пучок HeNe лазера (10 мВт, $\lambda = 633$ нм) с расходимостью $1,1 \cdot 10^{-3}$ рад использовался в качестве пробного пучка для измерения рассеяния излучения в направлении, перпендикулярном пучку эксимерного лазера. Мощность рассеянного излучения пробного пучка определялась методом темного поля с использованием фотодиода. Таким образом, изменения поглощения белка на 308 нм и рассеяния на 633 нм измерялись в кювете во время эксперимента одновременно. УФ доза оценивалась с помощью выражения $D = w \cdot F \cdot t \text{ Дж/см}^2$, где t – время облучения в секундах ($w \cdot F = 0,15 \text{ Вт/см}^2$).

Сравнение кривых поглощения тестируемых образцов проводилось с использованием функции сравнения и подгонки (fit comparison tool, реализованного в Origin 7, OriginLab Corp., Northhampton, MA). Отметим особо, что для чистоты эксперимента необходимо было проконтролировать изменения, которые могли произойти с замороженными белками во время пересылки, для чего были выбраны два контрольных образца, один оставался в лаборатории НИГ НИЗ, а второй «путешествовал» с остальными, но не подвергался облучению. После возвращения образцов контрольные сравнивались, хорошее совпадение их характеристик позволило говорить, что за время пересылки изменений не произошло.

Дальнейшие исследования осуществлялись с использованием стандартных биохимических и молекулярно-биологических методик электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) [179], флуоресцентного анализа, анализа спектров поглощения, эксклюзионной хроматографии (SEC) а также Вестерн блотов [180].

4.4.2 Результаты

4.4.2.1 Кинетика фотоагрегации, вызванной УФ-облучением

Сравнение агрегации естественного β L и искусственно созданного r β A3-кристаллинов.

Кривые светорассеяния были охарактеризованы двумя параметрами: пороговая доза агрегации, полученная в пересечении горизонтальной оси прямой, аппроксимирующей рост пропускания, и скорость агрегации, полученная как наклон линейной части растущей кривой. Пороговая доза показывает минимальную дозу облучения, требуемую для инициирования детектируемого светорассеяния, соответствующего началу фотоагрегации белкового образца. Второй параметр – скорость агрегации показывает скорость изменения интенсивности рассеяния в единицу дозы сверх порогового значения, что соответствует переходу растворимых белков в агрегаты.

Чувствительность к ультрафиолету r β A3 и естественного (нерекомбинантного) β L-кристаллина сравниваются на рис. 4.7, соответствующие пороги и скорости показаны в таблице 5. Пороговая доза для r β A3 и бычьего β L-кристаллинов в одинаковых экспериментальных условиях и при тех же концентрациях одинаковы 60 и 70 Дж/см², скорости агрегации 0,013 и 0,011 O.D. x см²/Дж. Это подтверждает одинаковый отклик β L-кристаллина и r β A3 на УФ облучение. Эксперимент дублировался в Национальном институте глаза Национальных институтов здоровья (Бетезда, США). Таким образом, УФ индуцированная фотокинетика r β A3 и бычьего β L-кристаллинов одинакова с точностью до ошибки измерения [6*].

Итак, чувствительность к УФ очищенных искусственно полученных (рекомбинантных) кристаллинов аналогична чувствительности кристаллинов естественного происхождения. Эта аналогия может обеспечить выявление

патологических изменений специфических последовательностей кристаллина ассоциирующихся со старческими и наследственными катарактами.

Эти данные позволяют предположить, что исследование УФ индуцированного рассеяния света в рассмотренных неживых (*in vitro*) системах может быть использовано для понимания фотоповедения мутантных (генетически измененных) β -кристаллинов. Возможно удастся понять роль конечных отростков (ручек) β -кристаллина в светоиндуцированной агрегации и фотолизе.

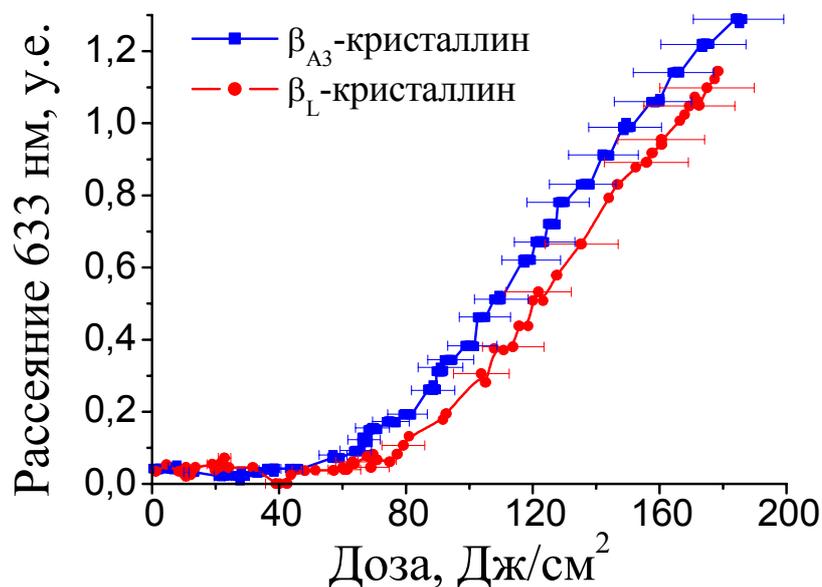


Рис. 4.7. Экспозиционные кривые для β_L - и β_{A3} -кристаллинов при одинаковых концентрациях по 0,5 мг/мл.

Таблица 5. Параметры экспозиционных кривых УФ индуцированной агрегации кристаллинов.

| Белок | Концентрация, мг / мл | Доза начала рассеяния, Дж / см ² | Скорость агрегации, О.П. x см ² / Дж |
|--------------------------|-----------------------|---|---|
| β_L -кристаллин | 0,5 | 70 | $1,1 \times 10^{-2}$ |
| β_{A3} -кристаллин | 0,5 | 60 | $1,3 \times 10^{-2}$ |

Сравнение рекомбинантных β A3-кристаллинов с полной и усеченной белковыми цепями.

Образцы белка облучались УФ излучением на длине волны 308 нм. Кривые рассеяния лазерного излучения, полученные для г β A3 и г β A3tr и показанные на рис. 4.8 похожи на ранее полученные данные [106, 127]. По мере увеличения УФ дозы, происходило увеличение рассеяния на длине волны 633 нм, что отражает увеличение рассеяния растворов белка (рис. 4.8 а), и соответствующее снижение пропускания на длине волны 308 нм (рис. 4.8 б). Оба эти фактора соответствуют фотоагрегации, вызванной УФ облучением. Кривая пропускания и кривая рассеяния, представленные на рис. 4.8, показывают, что мутантный г β A3tr-кристаллин с удаленным N-концом более восприимчив к вызванной УФ излучением агрегации, чем кристаллин с полной цепью (г β A3). Более выразительно это показывают данные рассеяния.

Количественные фотокинетические параметры (доза начала рассеяния D^* и скорость агрегации V), оцененные по данным рис. 4.8, представлены в таблице 6. Соотношения скоростей агрегации (V_m/V_{wt}), полученные по кривым пропускания на длине волны 308 нм, показывают лишь небольшое различие между г β A3 и г β A3tr ($8,3 \pm 0,4$ и $9,0 \pm 0,4$ мДж/см², соответственно), соотношение V_m/V_{wt} составляет 1,1 (таблица 6). Однако соотношения скорости агрегации (V_m/V_{wt}), полученные по данным рассеяния света на длине волны 633 нм, выявляют более существенные различия – $7,4 \pm 0,1$ (г β A3) и $11,7 \pm 0,2$ (г β A3tr) мДж/см², что дает соотношение 1,58. Как данные пропускания, так и данные рассеяния демонстрируют более высокую чувствительность (более низкий порог) у г β A3tr, чем у г β A3. Пороговые дозы (D^*) для г β A3 в сравнении с г β A3tr составляют 71 ± 1 против 39 ± 2 и 26 ± 3 против 9 ± 4 для кривых пропускания на 308 нм и для данных рассеяния на 633 нм, соответственно, причем и те и другие данные показывают более низкий порог чувствительности для г β A3tr, по сравнению с г β A3.

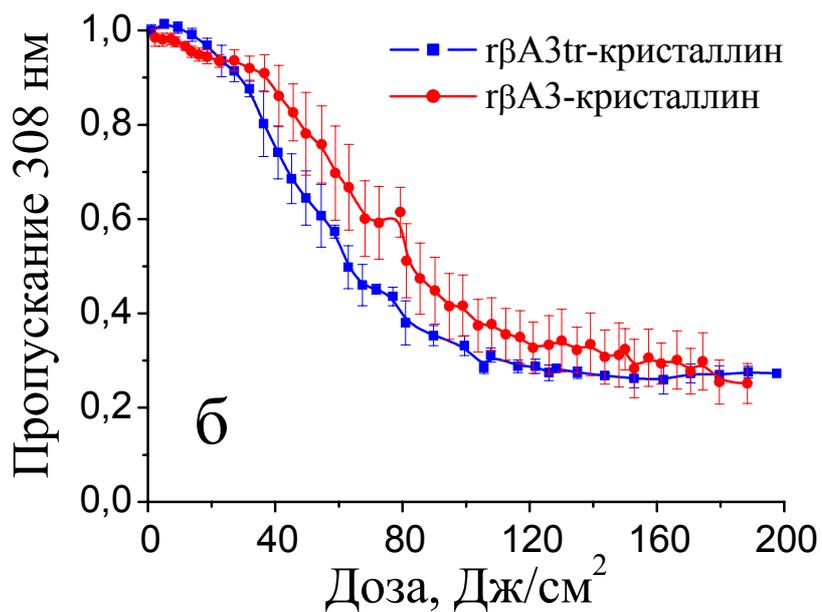
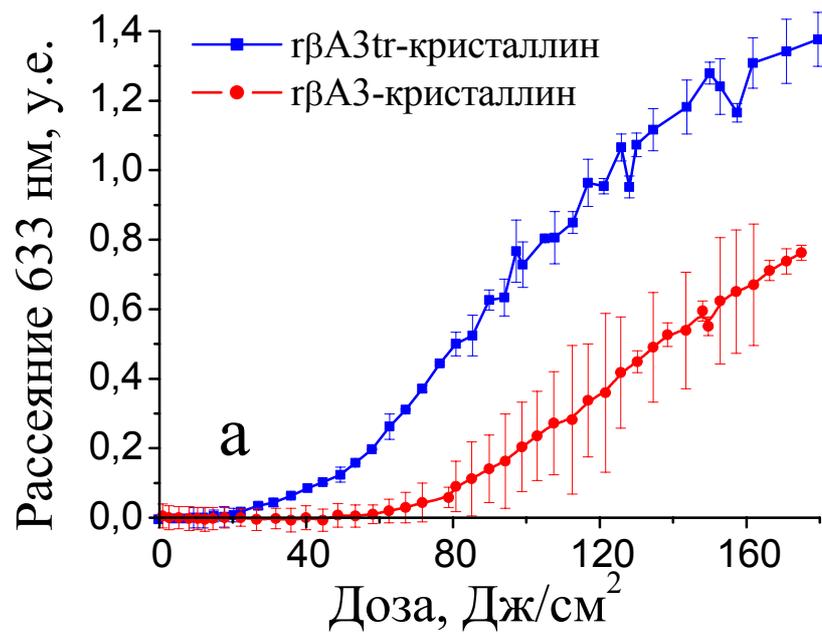


Рис. 4.8. Изменение рассеяния 633 нм (а) и пропускания 308 нм (б) при УФ облучении образцов гβА3 и гА3tr с концентрацией 0,5 мг/мл в зависимости от УФ дозы. Для каждой кривой представлены стандартные погрешности, демонстрирующие воспроизводимость измерений различных образцов одного и того же белка.

Таблица 6. Оценки фотокинетических параметров по данным светорассеяния (633 нм) и пропускания (308 нм).

| Длина волны, нм | Белок | D^* , Дж / см ² | V , см ² / Дж | Отношение V_m / V_{wt} |
|-----------------|-------|------------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| 308 | βA3tr | 9 ± 4 | (9,0 ± 0,4) × 10 ⁻³ | 1,1 ± 0,1 |
| | βA3 | 26 ± 3 | (8,3 ± 0,4) × 10 ⁻³ | |
| 633 | βA3tr | 39 ± 2 | (11,7 ± 0,2) × 10 ⁻³ | 1,58 ± 0,05 |
| | βA3 | 71 ± 1 | (7,4 ± 0,1) × 10 ⁻³ | |

Параметры на длине волны 308 нм, оцененные по данным поглощения (не показаны), которые были получены из кривых пропускания (рис. 4.8 б). Пороговая доза (D^*) соответствующая началу фото-агрегации белка и полученная путем продолжения восходящей линейной части экспозиционной кривой назад к точке пересечения D , позволяет оценить минимальную дозу УФ излучения, требуемую для начала детектируемого светорассеяния (рис. 4.8 а). Второй параметр, скорость агрегации (V), соответствующий тенденции растворимого белка к агрегации, получен как наклон восходящей линейной части кривой и показывает скорость изменения относительной интенсивности рассеяния при дозах больше пороговых. Отношение рассчитано как V_m / V_{wt} , где V_m и V_{wt} – скорости агрегации для мутантных (rβA3tr) белков и белков с полной цепью (rβA3), соответственно. Параметры D^* , V и погрешности (показаны в круглых скобках) были оценены, используя линейную подгонку в центральной части соответствующей кривой рассеяния.

Хотя подгонка данных поглощения на 308 нм не показала существенных различий между rβA3 и rβA3tr, различия кривых для rβA3 и rβA3tr на длине волны 633 нм оказались статистически значимыми [6*]. Однако в целом, как скорость агрегации, так и более низкая доза начала рассеяния показывают, что укороченный rβA3tr более чувствителен к УФ облучению, чем rβA3 с полной белковой цепью.

4.4.2.2 Исследование физико-химическими методами

Эксклюзионная хроматография (SEC) УФ облученных rβA3 и rβA3tr.

Образцы rβA3 и rβA3tr после облучения УФ дозами от 25 до 175 Дж/см² с шагом 25 Дж/см² анализировались с помощью спектроскопии и эксклюзионной хроматографии (SEC), электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) и Вестерн-блот анализа. Данные SEC и поглощения были получены для растворимой фракции rβA3 и rβA3tr после удаления всех нерастворимых белков путем центрифугирования. Была проведена эксклюзионная хроматография растворимых фракций rβA3 и rβA3tr, облученных дозами от 25 до 100 Дж/см² (колонок Superdex 75; GE Healthcare). Необлученные образцы rβA3 и rβA3tr показывают единичные основные пики, соответствующие видимым значениям молекулярного веса 29,5 кДа и 23,0 кДа, что схоже с ранее опубликованными результатами [156].

Облученные образцы как rβA3, так и rβA3tr показывают снижение высоты основного пика пропорционально уровню облучения. Однако высота пика для образцов rβA3tr снижается более заметно, чем для образцов rβA3, что согласуется с данными пропускания. При увеличении УФ облучения положение пика смещается мало или совсем не смещается, хотя пики действительно становятся немного шире, особенно на задних кромках. Образцы rβA3tr, облученные с дозой 25 Дж/см², показывают новый пик при 29,5 кДа. Этот пик минимально присутствует в контрольном образце и заметно уменьшается при увеличении уровней облучения. В образцах rβA3 в какой-либо значимой степени его нет.

Исследование УФ-индуцированных изменений rβA3tr кристаллина с помощью масс-спектрометрии (MS).

Атомы химических элементов имеют специфическую массу. Таким образом, точное определение массы анализируемой молекулы, позволяет определить ее элементный состав.

В органических веществах молекулы представляют собой определенные структуры, образованные атомами. Современные масс спектрометры способны фрагментировать детектируемые ионы и определять массу полученных фрагментов. Таким образом, можно получать данные о структуре вещества.

Когда образцы гβA3tr подвергались УФ облучению, высота спектральных пиков для большинства пептидов значительно снижалась, тогда как высота пиков лишь нескольких пептидов оставалась достаточно постоянной. Кроме того, при увеличении уровня УФ облучения в нижнем диапазоне спектров появилось несколько новых пиков. Эти изменения в спектрах позволяют предположить, что определенные области гβA3tr особенно чувствительны к фрагментации этими уровнями УФ излучения. При более высоких дозах УФ облучения, количество незатронутых пептидов уменьшилось. Таким образом, УФ облучение привело к обширной фрагментации гβA3tr.

Различие масс у некоторых из этих новообразованных пиков позволяет предположить, что при УФ облучении образуется лестница фрагментов С-концов. Два из С-конечных фрагментов были обнаружены в контрольных образцах, что показывает, что во время очищения или хранения произошло некоторое разрушение гβA3tr.

Кроме фрагментации белка, УФ облучение также может привести к фото-окислению. Триптические пептиды из гβA3tr изучались на предмет изменений окисления остатков метионина и триптофана после УФ облучения. Окисление остатков метионина и триптофана определялось по соотношению интенсивностей пиков для окисленных и немодифицированных пептидов в спектрах.

Флуорометрия и абсорбционная спектрофотометрия.

Кроме изменений, обнаруженных в этих специфичных остатках триптофана с помощью масс спектрометрии, общие изменения содержания

триптофана при УФ излучении были количественно определены с использованием флуорометрии и абсорбционной спектрофотометрии. При УФ обработке, Trp окислился до N-формилкинуруенина [181], максимум флуоресценции которого на 440 нм. В β A3-кристаллине при увеличении доз УФ облучения в среднем, интенсивность флуоресценции триптофана снижалась с увеличением УФ-В воздействия, тогда как у N-формилкинуруенина она увеличивалась. Эти результаты согласуются с данными поглощения. Значительная часть общего поглощения β -кристаллина на $\lambda = 280$ нм является результатом поглощения триптофана. Снижение поглощения на 280 нм с увеличением УФ-В доз согласуется с уменьшением количества триптофана в результате УФ разрушения.

4.4.2.3 Влияние концентрации раствора

Приведенные ниже результаты экспериментов с β A3-кристаллинами демонстрируют зависимость вероятности образования рассеивающих центров в растворе белка под действием излучения ХеСl-лазера от дозы облучения при изменении еще одного параметра, а именно – концентрации раствора белка, которая до настоящего момента оставалась неизменной и составляла 0,5 мг/мл. На рис. 4.9 приведены зависимости пропускания УФ сигнала раствора от поглощенной дозы облучения ($D_{\text{погл}} = D \cdot C / C_{1\text{мг/мл}}$) для концентраций $C = 0,8$ мг/мл и $C = 0,2$ мг/мл. Видно, что при $C = 0,2$ мг/мл не происходит резкого уменьшения пропускания на $\lambda = 308$ нм. Увеличение поглощения раствора белка обусловлено появлением новых связей между молекулами.

Зависимость от концентрации можно объяснить в рамках модели фотоагрегации п. 3.2. При этом концентрацию белка можно считать эквивалентом плотности энергии лазерного импульса. Ситуация аналогична зависимости $D^*(w)$, которая особенно наглядно приведена на рис. 2.4 (п. 2.2.1). Как было показано в главе 3, при малой концентрации белка (или

малой w) концентрация радикалов мала и они успевают “погибнуть” без образования высокомолекулярных соединений. При низких концентрациях и используемой $w = 75 \text{ мДж/см}^2$ необходимо повышать F , чтобы сохранить значение D^* , характерное для больших концентраций.

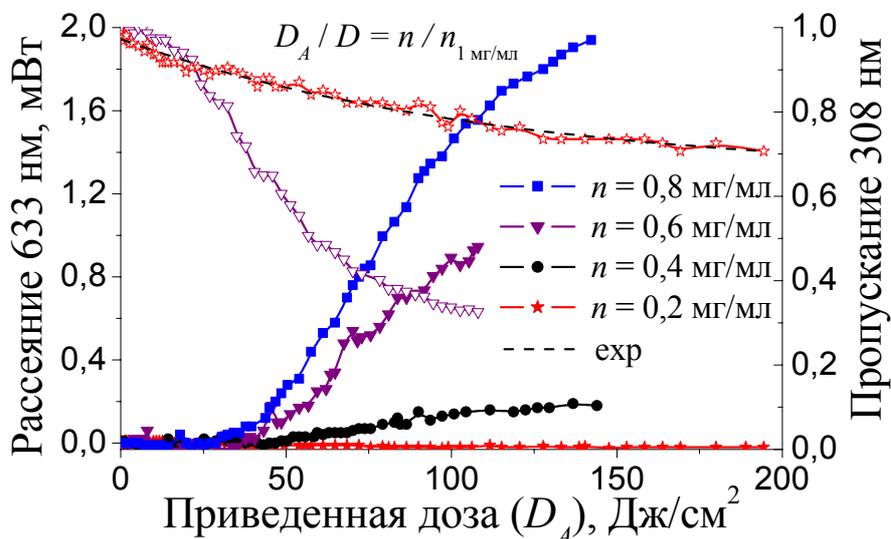


Рис. 4.9. Экспозиционные зависимости для различных концентраций $\beta A3$ -кристаллина и пропускание УФ-сигнала для концентраций $0,2 \text{ мг/мл}$ и $0,6 \text{ мг/мл}$.

Когда образцы $\beta A3$ и укороченных $\beta A3tr$ -кристаллинов подвергались УФ облучению, образование агрегата развивалось быстрее и с большей скоростью у укороченного $\beta A3tr$ кристаллина, по сравнению с белком с полной белковой цепью. Такая повышенная чувствительность укороченного $\beta A3tr$ к УФ-индуцированной агрегации позволяет предположить, что потеря концевых частей может быть связана с возрастным катарактогенезом, для которого воздействие УФ излучения, как известно, является фактором риска. $\beta A3tr$ -кристаллин был выбран для этих исследований из-за наличия обширной информации о его стабильности и свойств связывания. Известно, что мутации этого кристаллина вызывают катаракты с различной морфологией и, в некоторых случаях, с шовными и корковыми структурами [160-163]. Хотя укороченного кристаллина, использованного в данных исследованиях, в природе не существует, он был выбран, потому что дает

наилучшую непосредственную оценку влияния аминокислотной конечной части на чувствительность к УФ.

4.4.3 Выводы

Различие в чувствительности к УФ излучению у нормальных и укороченных рекомбинантных β A3-кристаллинов позволяет предположить, что потеря концевой части во время мутации и старения хрусталика может увеличить тенденцию β -кристаллина к агрегации при УФ облучении, повышая его восприимчивость к возрастной катаракте. Однако, молекулярные изменения, обнаруженные в β A3tr, включают в себя как агрегацию и сшивание, так фотолиз и окисление.

4.5 Заключение

При введении в водный раствор кристаллинов пептидов с доказанным антикатарактальным действием показано, что агрегация замедляется и в случае лазерного воздействия. Эта корреляция находит свое объяснение в модифицированной (обобщенной) теоретической модели лазерной и солнечной агрегации водорастворимых белков. Основываясь на этой корреляции, был сформулирован экспресс-метод отбора антикатарактальных добавок. С помощью метода отобрана смесь короткоцепочечных пептидов, которая обладает повышенным ингибированием фотоагрегации по сравнению с веществами, на основе которых созданы известные антикатарактальные препараты. Эта смесь была проверена на экспериментальных животных, что показало ее эффективность.

Экспресс-метод применим также для сравнения фоточувствительности белков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные результаты диссертационной работы:

1. Экспериментально обнаружено, что экспозиция УФ облучения ($D = w \cdot F \cdot t$), необходимая для агрегации водорастворимых белков, вызванной мягким УФ излучением ХеСІ лазера, зависит от значений плотности энергии лазерных импульсов w и частоты их следования F . При фиксировании одного из этих параметров (w или F) уменьшение второго приводит к увеличению экспозиции необходимой для агрегации, при увеличении же этого параметра необходимая для агрегации экспозиция стремится к константе.

2. Построена модель, согласно которой агрегация при УФ-лазерном облучении инициируется объединением двух фотоактивированных белковых молекул. При этом предполагается, что фотоактивированное состояние имеет конечное время жизни. Модель позволяет качественно и количественно описать экспериментальные результаты.

3. Создана экспресс-методика изучения УФ-лазерной агрегации белковых молекул при воздействии импульсного излучения ХеСІ лазера на водные растворы белков. С помощью этой методики установлена повышенная чувствительность к воздействию УФ излучения модифицированного β -кристаллина по сравнению с нормальным, а также исследовано влияние различных веществ на скорость УФ-индуцированной агрегации белков хрусталика глаза.

4. На основе исследования действия короткоцепочечных пептидов установлена селективность их воздействия на агрегацию различных кристаллинов хрусталика глаза. Создана комбинация пептидов, которая в большей степени замедляет агрегацию кристаллинов, чем вещества, на основе которых созданы известные антикатарактальные препараты.

СПИСОК РАБОТ ПО ДИССЕРТАЦИИ

- 1*. Битюрин Н.М., Соустов Л.В., Челноков Е.В., Немов В.В., Яхно Т.А., Сергеев Ю.В., Островский М.А., Исследование фотоагрегации белков при воздействии излучения ХеСl лазера // *Препринт ИПФ РАН*, № 599, Нижний Новгород, 19 с., 2002.
- 2*. Соустов Л.В., Челноков Е.В., Битюрин Н.М., Немов В.В., Сергеев Ю.В., академик Островский М.А., Фотоагрегация водорастворимого белка (карбоангидразы) под действием ультрафиолетового излучения ХеСl-лазера // *Доклады Академии Наук*, **388(5)**, с. 683-688, 2003.
- 3*. Соустов Л.В., Челноков Е.В., Сапогова Н.В., Битюрин Н.М., Немов В.В., Карпова О.Е., Шеремет Н.Л., Полуниин Г.С., Аветисов С.Э., Островский М.А., Исследование влияния шапероноподобной (защитной) активности короткоцепочечных пептидов на скорость УФ-индуцированной эксимерным лазером агрегации бета-кристаллина // *Вестник офтальмологии*, **124(2)**, сс. 6-8, 2008.
- 4*. Аветисов С.Э., Полуниин Г.С., Шеремет Н.Л., Макаров И.А., Федоров А.А., Карпова О.Е., Муранов К.О., Тимофеева А.К., Соустов Л.В., Челноков Е.В., Битюрин Н.М., Сапогова Н.В., Немов В. В., Болдырев А.А., Островский М.А., Изучение воздействия смеси ди- и тетра-пептидов на «продолгованной» модели ультрафиолет-индуцированной катаракты у крыс // *Вестник офтальмологии*, **124(2)**, сс. 12-16, 2008.
- 5*. Л. В. Соустов, Е. В. Челноков, Н. В. Сапогова, Н. М. Битюрин, В. В. Немов, Ю. В. Сергеев, М. А. Островский. “Исследование биофизических механизмов агрегации кристаллинов, индуцированной импульсным лазерным УФ излучением 308 нм.” // *Биофизика*, т. **53(4)**, сс. 582-597, 2008.
- 6*. Sergeev Yu.V., Soustov L.V., Chelnokov E.V., Bityurin N.M., Backlund P.S., Wingfield Jr.P.T., Ostrovsky M.A., and Hejtmancik J.F., Increased Sensitivity of Amino-Arm Truncated β A3-Crystallin to UV-Light-Induced Photoaggregation // *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, **46(9)**, pp. 3263-3273, 2005.
- 7*. Evgeny Chelnokov, Lev Soustov, Natalia Sapogova, Mikhail Ostrovsky, and Nikita Bityurin, Nonreciprocal XeCl laser-induced aggregation of beta-crystallins in water solution // *Optics Express*, **16(23)**, pp. 18798–18803, 2008.
- 8*. Bityurin N.M., Muraviov S.V., Kamensky V.A., Malyshev A.Y., Chelnokov E.V., Soustov L.V., Gelikonov G.V., Kinetics of low scattering biotissue photodenaturation induced by the UV harmonics of a Nd:YAP laser and by a YAG:Nd laser at a wavelength 1440 nm // *Proc. SPIE*, **4161**, pp. 1-11, 2000.
- 9*. Soustov L.V., Chelnokov E.V., Bityurin N.M., Nemov V.V., Yahno T.A., Sergeev Yu.V., Ostrovsky M.A., Investigation of photo-aggregation of proteins irradiated by XeCl laser light // *Proc. SPIE*, **5149**, pp. 85-95, 2003.
- 10*. Soustov L.V., Chelnokov E.V., Bityurin N.M., Kiselev A.L., Nemov V.V., Sergeev Yu.V., Ostrovsky M.A., Photoaggregation of crystallins (main proteins of eye lens) under the action of XeCl laser radiation // *Proc. SPIE*, **5506**, p. 28-33, 2004.
- 11*. Soustov L.V., Chelnokov E.V., Kiselev A.L., Bityurin N.M., Nemov V.V., Sergeev Yu.V., Ostrovsky M.A., Study of molecular mechanisms of UV-induced aggregation of crystallins and possibility of maintaining eye lens transparency // *Proc. SPIE*, **6257**, p. 280-287, 2006.

- 12*. Соустов Л. В., Челноков Е. В., Битюрин Н. М., Киселев А. Л., Немов В. В., Сергеев Ю. В., Островский М. А., Исследование агрегации кристаллинов хрусталика глаза при воздействии неионизирующего УФ излучения и шапероно-подобных свойств короткоцепочечных пептидов // *Труды XI нижегородской сессии молодых ученых*, стр. 210-210, 2006.
- 13*. Соустов Л.В., Челноков Е.В., Киселев А. Л., Немов В.В., Сергеев Ю. В., Островский М.А., Битюрин Н.М., Исследование молекулярных механизмов УФ-индуцированной агрегации кристаллинов хрусталика глаза и возможностей поддержания его прозрачности // *Альманах клинической медицины*, XII, труды II триумфальной конференции «Медицинская физика и инновации в медицине», стр. 34, 2006.
- 14*. Челноков Е.В., Соустов Л.В., Сапогова Н.В., Сергеев Ю. В., Островский М.А., Битюрин Н.М., Модель УФ-индуцированной агрегации бета-кристаллина при различных уровнях облучения // *Альманах клинической медицины*, XVII(1), стр. 109-112, 2008.
- 15*. а. Kamensky V., Muraviov S., Malyshev A., Chelnokov E., Bityurin N., Photomodification of low-scattering biotissues by a YAG:Nd laser at a wavelength of 1440 nm and by the fifth harmonic of a Nd:YAP laser (216 nm) below ablation threshold // *Abstracts of X International Conference NLMI-10*, St.-Petersburg, 21-23 august, p. 29, 2000.
- 15*. б. Bityurin N., Muraviov S., Malyshev A., Chelnokov E., Kamensky V., Kinetics of low scattering biotissue photodenaturation induced by the fifth harmonic of a Nd:YAP laser (216 nm) and by a YAG:Nd laser at a wavelength 1440 nm // *Technical Programme of European Biomedical Optics Week, EBIO*, Amsterdam, 4-8 July, p. 74, 2000.
- 15*. в. Soustov L.V., Chelnokov E.V., Bityurin N.M., Ostrovsky M.A., Nemov V.V., Sergeev Yu.V., Investigation of photoaggregation of proteins irradiated by XeCl laser light // *Technical program of International Quantum Electronics Conference 2002 / Conference on Lasers, Applications, and Technologies*, Moscow, 22–27 June, p. 155, 2002.
- 15*. г. Chelnokov E.V., Soustov L.V., Bityurin N.M., Nemov V.V., Sergeev Yu.V., Ostrovsky M.A., Photoaggregation of Crystallins (Main Proteins of Eye Lens) Under the Action of XeCl Laser Radiation // *Abstracts of XI International Conference Laser Matter Interaction (LMI-XI)*, St.-Petersburg-Pushkin, june 30 – july 2, p. 21, 2003.
- 15*. д. Sergeev Y.V., Soustov L.V., Chelnokov E.V., Bityurin N.M., Wingfield P.T., Ostrovsky M.A., Hejtmancik J.F., Increased Sensitivity of Amino-arm Truncated β A3 Crystallin to UV-light Induced Photo-aggregation // *Abstracts of Association for Research in Vision and Ophthalmology*, Fort Lauderdale, Florida, USA, 4 May, 2003.
- 15*. е. Sergeev Yu.V., Backlund P.S., Soustov L.V., Chelnokov E.V., Ostrovsky M.A., Hejtmancik J.F., Increased UV-Light Sensitivity of Amino-Arm Truncated β A3-Crystallin: Specific Structural Modifications // *Abstracts of Association for Research in Vision and Ophthalmology*, Fort Lauderdale, Florida, USA, 1-5 May, 2005.
- 15*. ж. Soustov L.V., Chelnokov E.V., Kiselev A.L., Bityurin N.M., Nemov V.V., Sergeev Yu.V., Ostrovsky M.A., Study of molecular mechanisms of UV-induced

- aggregation of crystallins and possibility of maintaining eye lens transparency // *Conference program of ICONO/LAT-2005*, p. 108, 2005.
- 15*. з. Соустов Л.В., Челноков Е.В., Битюрин Н.М. и др., *Тезисы отчетных конференций по Программе Президиума РАН “Фундаментальные науки – медицине”*, Москва, 25-26 ноября, с. 51, 2002; 10-11 декабря, с. 36, 2003; 2-3 декабря, стр.192, 2004; 14-16 декабря, с. 114, 2005, 27-29 ноября, стр. 47, 2006; 3-4 декабря, стр. 54, 2007, Москва.
- 15*. и. Soustov L.V., Chelnokov E.V., Bityurin N.M., Nemov V.V., Sergeev Yu.V., Ostrovsky M.A., Study of molecular mechanisms of UV aggregation of eye proteins // *Abstracts of Saratov Fall Meeting*, p. 7, 2005.
- 15*. к. Chelnokov E.V., Soustov L.V., Sapogova N.V., Bityurin N.M., Ostrovsky M.A., Postaggregation in XeCl laser irradiated water solutions of β L-crystallin at low exposures // *Technical Digest of International Conference on Coherent and Nonlinear Optics / International Conference on Lasers, Applications, and Technologies (ICONO/LAT-2007)*, May 28 – June 1, Minsk, Belarus, 2007.
- 15*. л. Chelnokov E.V., Soustov L.V., Sapogova N.V., Bityurin N.M., Ostrovsky M.A., Postaggregation in XeCl laser irradiated water solutions of β L-crystallin // *Technical Digest of Laser Applications in Life Sciences (LALS-2007)*, June 11-14, Moscow, Russia, 2007.
- 16*. Соустов Л.В., Челноков Е.В., Битюрин Н.М., Киселев А.Л., Немов В.В., Сергеев Ю.В., Островский М.А., Исследование механизмов поддержания прозрачности хрусталика глаза при воздействии УФ излучения // *Отчет о научной и научно-организационной деятельности ИПФ РАН за 2004 год*, с. 36, 2005.
- 17*. Соустов Л.В., Челноков Е.В., Битюрин Н.М., Островский М.А., Sergeev Yu.V., Backlund P.S., Wingfield P.T., Hejtmancik J.F., Лабораторное моделирование развития катаракты под действием УФ излучения // *Отчет о научной и научно-организационной деятельности ИПФ РАН за 2005 год*, с. 50, 2006.
- 18*. Соустов Л.В., Челноков Е.В., Битюрин Н.М., Немов В.В., Аветисов С.Э., Полунин Г.С., Шеремет Н.Л., Карпова О.Е., Муранов К.О., Островский М.А., Замедление развития катаракты // *Отчет о научной и научно-организационной деятельности ИПФ РАН за 2008 год*, с. 50, 2009.
- 19*. Соустов Л.В., Челноков Е.В., Битюрин Н.М., Немов В.В., Аветисов С.Э., Полунин Г.С., Шеремет Н.Л., Карпова О.Е., Муранов К.О., Островский М.А., Фармацевтическая композиция для профилактики развития и лечения начальной стадии возрастной катаракты (варианты), *Заявка на патент*, Россия, № **2007144339** от 3.12.2007. Дата принятия положительного решения РосПатента - 17 сентября 2008 года.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов С.И., Имас Я.А., Романов Г.С., Ходыко Ю.В., Действие излучения большой мощности на металлы // М. Наука, 1970.
2. Веденов А.А., Гладуш Г.Г., Физические процессы при лазерной обработке материалов // М. Энергоатомиздат, 207 с., 1985.
3. Bäuerle D., *Laser Processing and Chemistry* // Springer, 3rd ed., Berlin, 2000.
4. Bityurin N., Luk'yanchuk B.S., Hong M.H., and Chong T.C., Models for Laser Ablation of Polymers // *Chemical Reviews*, **103**(2), pp. 519-552, 2003.
5. Bityurin N., Studies on laser ablation of polymers // *Annu. Rep. Prog. Chem. Sect. C*, **101**, pp. 216–247, 2005.
6. Jacques S.L., Laser-tissue interaction: Photochemical, photothermal and photomechanical // *Surgical Clinics of North America*, **72**(3), pp. 531-558, 1992.
7. Avriillier S. and Schermann J.P., Applications of Lasers to Early Detection of Cancers and Mass Spectrometric Determination of Structures of Clusters of Biological Interest // *Conference on Lasers Applications*, Plovdiv (Bulgaria), September 1999.
8. Berlien H.-P. and Müller G.J., *Applied Laser Medicine* // Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2003.
9. Niemz M.H., *Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and Applications* // *Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering*, Springer-Verlag, 2003.
10. Asshauer T., Delacretaz G., Rastegar S., Photothermal denaturation of egg white by pulsed holmium laser // *Proc. SPIE*, **2681**, pp. 120-124, 1996.
11. Каменский В.А., Исследование режимов лазерной модификации мягких биотканей при помощи ИК лазерных устройств // Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук. Саратовский Государственный Университет, 2001.
12. Bityurin N.M., Kamensky V.A., Muraviov S.V., Feldchtein F.I., Malyshev A.Yu., Sergeev A.M., Snopova L.B., Yurkin A.M., Combined effect of IR and UV laser radiation on biological tissues: cleaning // *Technical Digest Series, CLEO'98*, p. 230, 1998.
13. Welsh A.J., The Thermal Response of Laser Irradiated Tissue // *IEEE Journal of Quantum Electronics*, **20**, pp. 1471-1481, 1984.
14. Firsov N.N., Priezzhev A.V., Ryaboshapka O.M., Aggregation and disaggregation kinetics of erythrocytes in whole blood under low-energy laser irradiation // *Proc. SPIE*, **2086**, pp. 365-370, 1994.
15. London R.A., Glinsky M.E., Zimmerman G.B., Bailey D.S., Eder D.C., and Jacques S.L., Laser-tissue interaction modeling with LATIS // *Appl. Optics*, **36**, pp. 9068-9074, 1997.
16. Жоли М., Физическая химия денатурации // Мир, Москва, с. 153-170, 1968.
17. DeYoung L.R., Fink A.L., and Dill K.A., Aggregation of globular proteins // *Accounts Chem. Res.*, **26**, pp. 614-620, 1993.
18. Jaenicke R., Intermolecular forces in the process of heat aggregation of globular proteins and the problem of correlation between aggregation and denaturation phenomena // *J. Polym. Sci. C*, **16**, pp. 2143-2160, 1967.
19. Mitraki A., King J., Protein folding intermediates and inclusion body formation // *BioTechnology*, **7**, pp. 690-697, 1989.
20. Fields G.B., Alonso D.O.V., Stigter D., and Dill K.A., Theory for the aggregation of proteins and copolymers // *J. Phys. Chem.*, **96**, pp. 3974-3981, 1992.
21. Jaenicke R., Buchner J., Protein folding: From “Unboiling an egg” to “Catalysis of folding” // *Chemtracts: Biochem. Mol. Biol.*, **4**, pp. 1-30, 1993.

22. a. Smolukowski M., Drei Vorträge über Diffusion, Brownsche Molekularbewegung und Koagulation von Kolloidteilchen (Three Lectures on Diffusion, Brownian Motion, and Coagulation of Colloidal Particles) // *Phys. Zeits.*, **17**, p. 557 and 585, 1916.
 б. Smolukowski M., Versuch einer Mathematischen Theorie der Koagulationskinetik Kolloider Lösungen (Trial of a Mathematical Theory of the Coagulation Kinetics of Colloidal Solutions) // *Zeitschrift fuer Physikalische Chemie*, Leipzig, **92**(129), p. 155, 1917.
 в. Габович А.М., Мариан Смолуховский и Броуновское движение (к 130-летию со дня рождения) // *Квант*, **6**, с. 3-9, 2002.
23. Manna L., Milliron D.J., Meisel A., Scher E.C. and Alivisatos A.P., Controlled growth of tetrapod-branched inorganic nanocrystals // *Nature materials*, **2**, pp. 382-385, 2003.
24. Witten T.A., Sander L.M., Diffusion-Limited Aggregation, a Kinetic Critical Phenomenon // *Phys. Rev. Lett.*, **47**(19), p. 1400, 1981.
25. Micali N., Monsu'Scolaro L. and Romeo A., Mallamace F., Light absorption study of aggregating porphyrin in aqueous solutions // *Phys. Rev. E*, **57**, pp. 5766–5770, 1998.
26. Chandra A., Shukla M.K., Mishra P.C., and Chandra S., Fractal growth in uv-irradiated DNA: Evidence of nonuniversal diffusion limited aggregation // *Phys. Rev. E*, **51**, pp. R2767–R2768, 1995.
27. Feder J. and Jøssang T., Rosenqvist E., Scaling Behavior and Cluster Fractal Dimension Determined by Light Scattering from Aggregating Proteins // *Phys. Rev. Lett.*, **53**, pp. 1403–1406, 1984.
28. Zhang J.Z., Nucleation-aggregation of molybdena crystals at the vapour-solid interface // *J. Phys.: Condens. Matter.*, **3**, pp. 8005-8009, 1991.
29. Family F., Meakin P., Deutch J.M., Kinetics of Coagulation with Fragmentation: Scaling Behavior and Fluctuations // *Phys. Rev. Lett.*, **57**(6), p. 727, 1986.
30. Sorensen C.M., Zhang H.X. and Taylor T.W., Cluster-Size Evolution in a Coagulation-Fragmentation System // *Phys. Rev. Lett.*, **59**(3), p. 363, 1987.
31. Vigil R.D. and Ziff R.M., Comment on "Cluster-Size Evolution in a Coagulation-Fragmentation System" // *Phys. Rev. Lett.*, **61**(12), p. 1431, 1988.
32. Bastea S., Aggregation Kinetics in a Model Colloidal Suspension // *Phys. Rev. Lett.*, **96**, p. 028305, 2006.
33. Zhenquan L., Jianhong K., Kinetics of a migration-driven aggregation process with birth and death // *Phys. Rev. E*, **67**(3), p. 031103, 2003.
34. Redner S., Aggregation kinetics of popularity // *Physica A*, **306**, pp. 402-411, 2002.
35. Kuzovkov V., Kotomin E., Dynamic particle aggregation in the bimolecular $A+B \rightarrow 0$ reaction // *The Journal of Chemical Physics*, **98**(11), pp. 9107-9114, 1993.
36. Mey W., Walker E.I.P., Hoesterey D.C., Bimolecular recombination in aggregate organic photoconductors // *Journal of Applied Physics*, **50**(12), pp. 8090-8094, 1979.
37. Stradner A., Sedgwick H., Cardinaux F., Poon W.C.K., Egelhaaf S.U. & Schurtenberger P., Equilibrium cluster formation in concentrated protein solutions and colloids // *Nature*, **432**, p. 492, 2004.
38. Краткая энциклопедия домашнего хозяйства. Т. 2. // М.: Большая Советская Энциклопедия, 1959.
 Большая Советская Энциклопедия, Изд. 1-е. // М.: Советская Энциклопедия, 1926–1947.
 Химическая энциклопедия // М.: Советская Энциклопедия, 1988–1998.
 ГОСТ 27583-88.
http://en.wikipedia.org/wiki/Egg_white

39. Битюрин Н.М., О непрерывном приближении для уравнений, описывающих полимеризацию // *Высокомолек. соед. сер. Б*, **23**(11), с. 859-862, 1981.
40. Битюрин Н.М., Генкин В.Н., Зубов В.П., Лачинов М.Б., *Высокомолек. соед. сер. А*, **23**(8), с.1702, 1981.
41. Pikulin A., Bityurin N., Spatial resolution in polymerization of sample features at nanoscale // *Phys. Rev. B*, **75**, pp. 195430-195441, 2007
42. Bityurin N., Znaidi L., Kanaev A., Laser-induced absorption in Titanium Oxide Based Gels // *Chem. Phys. Lett.*, **374**, pp. 95-99, 2003.
43. Оудиан Дж., Основы химии полимеров // М. Мир, 1974.
44. Уоллинг Ч., Свободные радикалы в растворе // М. Мир, 1960.
45. Коршак В.В., Виноградова С.В., Неравновесная поликонденсация // М. Наука, 1972.
46. Daniel M.-C., Austruc D., Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology // *Chem. Rev.*, **104**(1), pp. 293-346, 2004.
47. Смирнова Л.А., Александров А.П., Якимович Н.О., Сапогова Н.В., Кирсанов А.В., Соустов Л.В., Битюрин Н.М., УФ индуцированное формирование наночастиц золота в полимерной матрице полиметилметакрилата // *Доклады академии наук*, **400**(6), с. 779-781, 2005.
48. Alexandrov A., Smirnova L., Yakimovich N., Sapogova N., Soustov L., Kirsanov A., Bityurin N., UV-initiated Growth of Gold Nanoparticles in PMMA Matrix // *Appl. Surf. Sci.*, **248**, pp. 181-184, 2005.
49. Link S., Burda C., Nikoobakht B., and El-Sayed M.A., Laser-Induced Shape Changes of Colloidal Gold Nanorods Using Femtosecond and Nanosecond Laser Pulses // *Journal of Physical Chemistry B*, **104**(26), pp. 6152–6163, 2000.
50. Mafuné F., Kohno J., Takeda Y., and Kondow T., Full Physical Preparation of Size-Selected Gold Nanoparticles in Solution: Laser Ablation and Laser-Induced Size Control // *Journal of Physical Chemistry B*, **106**(31), pp. 7575–7577, 2002.
51. Itoh H., Tahara A., Naka K., and Chujo Y., Photochemical Assembly of Gold Nanoparticles Utilizing the Photodimerization of Thymine // *Langmuir*, **20**(5), pp. 1972–1976, 2004.
52. Maye M.M., Lim I.S., Luo J., Rab Z., Rabinovich D., Liu T., and Zhong C.-J., Mediator-Template Assembly of Nanoparticles // *Journal of the American Chemical Society*, **127**(5), pp. 1519–1529, 2005.
53. Privalov P.L., Thermodynamic Problems of Protein Structure // *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, **18**, pp. 47-69, 1989.
- Privalov P.L., Khechinashvili N.N., A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: A calorimetric study // *J. Mol. Biol.*, **86**, pp. 665–684, 1974.
54. Shakhnovich E.I., Gutin A.M., Formation of unique structure in polypeptide chains. Theoretical investigation with the aid of a replica approach // *Biophys. Chem.*, **34**, pp. 187–199, 1989.
- Shakhnovich E.I., Gutin A.M., Implications of thermodynamics of protein folding for evolution of primary sequences // *Nature*, **346**, pp. 773–775, 1989.
55. Judge R.A., Jacobs R.S., Frazier T., Snell E.H., and Pusey M.L., The Effect of Temperature and Solution pH on the Nucleation of Tetragonal Lysozyme Crystals // *Biophysical Journal*, **77**, pp. 1585–1593, 1999.
56. Pande A., Pande J., Asherie N., Lomakin A., Ogun O., King J., and Benedek G.B., Crystal cataracts: Human genetic cataract caused by protein crystallization // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**(11), pp. 6116–6120, 2001.
57. McRee D.E., Practical Protein Crystallography // Second Edition, Academic Press, 1994.

58. Blundell T.L., Johnson L., Protein Crystallography (Molecular Biology Series) // Academic Press, 1976.
59. Nilsson R., Brunner J., Hoffman N.E. and Wijk K.J., Interactions of ribosome nascent chain complexes of the chloroplast-encoded D1 thylakoid membrane protein with cpSRP54 // *The EMBO Journal*, **18**(3), pp. 733–742, 1999.
60. Chiti F., Taddei N., Baroni F., Capanni C., Stefani M., Ramponi G. and Dobson C.M., Kinetic partitioning of protein folding and aggregation // *Nature structural biology*, **9**(2), pp. 137-143, 2002.
61. Giasson B.I., Duda J.E., Murray I.V.J., Chen Q.S., José M., Hurtig H.I., Ischiropoulos H., Trojanowski J.Q., Lee V.M.-Y., Oxidative Damage Linked to Neurodegeneration by Selective [alpha]-Synuclein Nitration in Synucleinopathy Lesions // *Science*, **290**(5493), pp. 985-989, 2000.
62. Taylor J.P., Hardy J., Fischbeck K.H., Toxic Proteins in Neurodegenerative Disease // *Science*, **296**(5575), pp. 1991-1995, 2002.
63. Taubes G., Protein Chemistry: Misfolding the Way to Disease // *Science*, **271**, pp. 1493-1495, 1996.
64. World Health Organization Fact Sheet No. 282; WHO November 2004; available at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs282/en/index.html>
65. Clark A.F. and Yorio T., Ophthalmic drug discovery // *Nature reviews*, **2**, pp. 448-459, 2003.
66. Ayala M.N., Michael R., and Söderberg P.G., Influence of Exposure Time for UV Radiation–Induced Cataract // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **41**(11), pp. 3539-3543, 2000.
67. Löfgren S., Michael R., and Söderberg P.G., Impact of Age and Sex in Ultraviolet Radiation Cataract in the Rat // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **44**(4), pp. 1629-1633, 2003.
68. Merriam J.C., Löfgren S., Michael R., Söderberg P., Dillon J., Zheng L., and Ayala M., An Action Spectrum for UV-B Radiation and the Rat Lens // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **41**(9), pp. 2642-2647, 2000.
69. Корхмазян М.М., Федорович И.Б., Островский М.А., Механизмы фотоповреждения структур глаза. Действие УФ-света на растворимые белки хрусталика. // *Биофизика*, **38**(6), с. 966-971, 1983.
70. Ельчанинов В.В., Федорович И.Б., Механизмы фотоповреждения структур глаза. Образование агрегатов полипептидов при УФ-облучении белков хрусталика // *Биофизика*, **34**, с. 758-762, 1989.
71. Ельчанинов В.В., Федорович И.Б., Механизм фотоповреждения структур глаза. Изменение зарядов кристаллинов хрусталика при ультрафиолетовом облучении // *Биофизика*, **35**, с. 200-204, 1990.
72. Островский М.А., Федорович И.Б., Ельчанинов В.В., Кривандин А.В., Опасность повреждающего действия света на структуры глаза. Хрусталик - как естественный светофильтр и объект фотоповреждения // *Сенсорные системы*, **8**(3-4), с. 135-146, 1994.
73. Gehrman M., Marienhagen J., Eichholtz-Wirth H., Fritz E., Ellwart J., Jäättelä M., Zilch T. and Multhoff G., Dual function of membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40: protection against radiation-induced effects and target structure for natural killer cells // *Cell Death and Differentiation*, **12**, pp. 38–51, 2005.
74. Haslbeck M., Braun N., Stromer T., Richter B., Model N., Weinkauff S. and Buchner J., Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae* // *The EMBO Journal*, **23**, pp. 638–649, 2004.

75. Demmig-Adams B., Adams W.W.III, Antioxidants in Photosynthesis and Human Nutrition // *Science*, **298**(5601), pp. 2149-2153, 2002.
76. Mayhew M., da Silva A.C., Martin J., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Hartl F.U., Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex // *Nature*, **379**(6564), pp. 420-426, 1996.
77. Frydman J. and Hartl F.U., Principles of Chaperone-Assisted Protein Folding: Differences Between in Vitro and in Vivo Mechanisms // *Science*, **272**(5267), pp. 1497–1502, 1996.
78. Jakob U., and Buchner J., Assisting Spontaneity: The Role of Hsp90 and Small Hsps as Molecular Chaperones // *Trends Biochem. Sci.*, **19**, pp. 205-211, 1994.
79. Sax C.M., and Piatigorsky J., Expression of the alpha-crystallin/small heat-shock protein/molecular chaperone genes in the lens and other tissues // *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **69**, pp. 155-201, 1994.
80. Buchner J., Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones // *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, **10**, pp. 10-19, 1996.
81. Ehrnsperger, M., Gaestel, M., Buchner, J. Chaperon function of small heat shock proteins and a-crystallin. In: Molecular chaperones in the life cycle of proteins. Editor: A.L. Fink & Y. Goto. New York: Marcel Dekker, pp. 533-576, 1997.
82. Forreiter C. and Nover L., Heat stress-induced proteins and the concept of molecular chaperones // *J. Biosci.*, **23**, pp. 287-302, 1998.
83. Macario A.J., Macario E.C., The molecular chaperone system and other anti-stress mechanisms in archaea // *Front. Biosci.*, **6**, pp. d262-283, 2001.
84. Arsene F., Tomoyasu T., and Bukau B., The heat shock response of Escherichia coli // *Int. J. Food Microbiol.*, **55**, pp. 3-9, 2000.
85. Hartl F.U., Molecular chaperones in cellular protein folding // *Nature*, **381**(6583), pp. 571-579, 1996.
86. Skowyra D., Georgopoulos C., and Zylicz M., The E. coli dnaK gene product, the hsp70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner // *Cell*, **62**(5), pp. 939-944, 1990.
87. Hwang D.S., Crook E., and Kornberg A., Aggregated dnaA protein is dissociated and activated for DNA replication by phospholipase or dnaK protein // *J. Biol. Chem.*, **265**(31), pp. 19244-19248, 1990.
88. Ziemienowicz A., Skowyra D., Zeilstra-Ryalls J., Fayet O., Georgopoulos C., Zylicz M., Both the Escherichia coli chaperone systems, GroEL/GroES and DnaK/DnaJ/GrpE, can reactivate heat-treated RNA polymerase. Different mechanisms for the same activity // *J Biol Chem.*, **268**(34), pp. 25425–25431, 1993.
89. Johnson J.L., and Craig E.A., Protein folding in vivo: Unraveling complex pathways // *Cell*, **90**, pp. 201-204, 1997.
90. Freeman B.C., and Morimoto R.I., The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding // *EMBO Journal.*, **15**(12), pp. 2969-2979, 1996.
91. Freeman B.C., Toft D.O., and Morimoto R.I., Molecular chaperone machines: chaperone activities of the cyclophilin Cyp-40 and the steroid aporeceptor-associated protein p23 // *Science*, **274**(5293), pp. 1718-1720, 1996.
92. MacRae T.H., Structure and function of small heat shock/alpha-crystallin proteins: established concepts and emerging ideas. // *Cell. Mol. Life Sci.*, **57**, pp. 899-913, 2000.
93. Roy S.K., Hiyama T., and Nakamoto H., Purification and characterization of the 16-kDa heat-shock-responsive protein from the thermophilic cyanobacterium Synechococcus vulcanus, which is an α -crystallin-related, small heat shock protein // *Eur. J. Biochem.*, **262**(2), pp. 406-416, 1999.

94. DeYoung L.R., Dill K.A. and Fink A.L., Aggregation and Denaturation of Apomyoglobin in Aqueous Urea Solutions // *Biochemistry*, **32**, pp. 3877-3886, 1993.
95. Hook D.W.A., and Harding J.J., Molecular chaperones protect catalase against thermal stress // *Eur. J. Biochemistry*, **247**, pp. 380-385, 1997.
96. Chang Z., Primm T.P., Jakana J., Lee I.H., Serysheva I., Chiu W., Gilbert H.F., and Guiocho F.A., Mycobacterium tuberculosis 16-kDa antigen (Hsp16.3) functions as an oligomeric structure in vitro to suppress thermal aggregation // *J. Biol. Chem.*, **271**(12), pp. 7218-7223, 1996.
97. Roher N., Miré F., Boldyreff B., Llorens F., Plana M., Issinger O.-G., and Itarte E., The C-terminal domain of human grp94 protects the catalytic subunit of protein kinase CK2 (CK2 α) against thermal aggregation // *Eur. J. Biochem.*, **268**(2), pp. 429-436, 2001.
98. Kurganov B.I., Dobrov E.N., Rafikova E.R., Fedurkina N.V., Mitskevich L.G., Belousova L.V., and Zhou H.-M. Abstracts of 1st Tsinghua International Conference of Protein Sciences (may 21-23, 2001, Beijing, China), p. 36, 2001.
99. Kiefhaber T., Rudolph R., Kohler H.-H., and Buchner J., Protein aggregation *in vitro* and *in vivo*: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation // *BioTechnology*, **9**, pp. 825-859, 1991.
100. Курганов Б.И., Кинетика агрегации белков. Количественная оценка шаперонной активности в тестах, основанных на подавлении агрегации белков // *Биохимия*, **67**(4), с. 492-507, 2002.
101. Кривандин А.В., Муранов К.О., Островский М.А., Исследование комплексообразования в растворах α - и β L-кристаллинов при 60°C // *Молекулярная биология*, **38**(3), с. 1-15, 2004.
102. Cuenda A., Cohen Ph., Bue'e-Scherrer V. and Goedert M., Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38) // *The EMBO Journal (European Molecular Biology Organization)*, **16**(2), pp. 295-305, 1997.
103. Mao Y.-W., Liu J.-P., Xiang H. and Li D.W.-C., Human α A- and α B-crystallins bind to Bax and Bcl-XS to sequester their translocation during staurosporine-induced apoptosis // *Cell Death and Differentiation (Nature Publishing Group)*, **11**, pp. 512-526, 2004.
104. Clark J.I. and Huang Q.-L., Modulation of the chaperone-like activity of bovine α -crystallin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Cell Biology*, **93**, pp. 15185-15189, 1996.
105. Khanova H.A., Markossian K.A., Kurganov B.I., Samoilov, A.M., Kleimenov S.Yu., Levitsky D.I., Yudin I.K., Timofeeva A.C., Muranov K.O., Ostrovsky M.A., Mechanism of Chaperone-like Activity. Suppression of Thermal Aggregation of β L-Crystallin by α -Crystallin // *Biochemistry*, **44**(47), pp. 15480-15487, 2005.
106. Borkman R.F., Knight G. and Obi B., The Molecular Chaperone α -Crystallin Inhibits UV - Induced Protein Aggregation // *Exp. Eye Res.*, **62**, p. 141-148, 1996.
107. Horwitz J., α - crystallin can function as a molecular chaperone // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**, pp. 10449-10453, 1992.
108. Wang K., Spector A., The chaperone activity of bovine α - crystalline // *J. Biol. Chem.*, **269**, pp. 13601-13608, 1994.
109. Wang K., Spector A., α - crystallin can act as a chaperone under conditions of oxidative stress // *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, **36**, pp. 311-321, 1995.
110. Rao P.V., Huang Q., Horwitz J., Zigler J.S., Evidence that α -crystallin prevents non-specific protein aggregation in intact eye lens // *Biochem. Biophys. Acta.*, **1245**, pp. 439-447, 1995.

111. Srinivas V., Raman B., Rao K.S., Ramakrishna T., and Rao Ch.M., Structural perturbation and enhancement of the chaperone-like activity of α -crystallin by arginine hydrochloride // *Protein Science*, **12**, pp. 1262–1270, 2003.
112. Garrido C., Size matters: of the small HSP27 and its large oligomers // *Cell Death and Differentiation*, **9**, pp. 483-485, 2002.
113. Cherian M. and Abraham E.C., Decreased molecular chaperone property of alpha-crystallins due to posttranslational modifications // *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **208**, pp. 675-679, 1995.
114. Hott J.L. and Borkman R.F., Concentration dependence of transmission losses in UV-laser irradiated bovine alpha-, beta H-, beta L- and gamma-crystallin solutions // *Photochem. Photobiol.*, **57**, pp. 312-317, 1993.
115. Li D.Y., Borkman R.F., Wang R.H., and Dillon J., Mechanisms of photochemically produced turbidity in lens protein solutions // *Exp. Eye Res.*, **51**, pp. 663-669, 1990.
116. Andley U.P., Sawardekar M.A., and Burriss J.L., Action spectrum for photocross-linking of human lens proteins // *Photochem. Photobiol.*, **65**, pp. 556-559, 1997.
117. Тучин В.В., Исследование биотканей методами светорассеяния // *УФН*, **167(5)**, с. 517-539, 1997.
118. Zhou Sh., Burger Ch., Chu B., Sawamura M., Nagahama N., Toganoh M., Hackler U.E., Isobe H., Nakamura E., Spherical Bilayer Vesicles of Fullerene-Based Surfactants in Water: A Laser Light Scattering Study // *Science*, **291(5510)**, pp. 1944-1947, 2001.
119. Weitz D.A., Lin M.Y., Laser light scattering as a probe of fractal colloid aggregates // *NASA Laser Light Scattering Advanced Technology Development Workshop*, Annandale, NJ., pp. 173-183, 1988.
120. Бубис Е.Л., Варьгин В.В., Кончалина Л.Р., Шилов А.А., Исследование слабопоглощающих сред для ВРМБ в ближнем ИК диапазоне спектра // *Оптика и спектроскопия*, **65(6)**, с. 1281-1285, 1988.
121. Kamensky V.A., Feldchtein F.I., Gelikonov V.M., Snopova L., Muraviov S.V., Malyshev A.Y., Bityurin N.M., Sergeev A.M., In situ monitoring of laser modification process in human cataractous lens and porcine cornea using coherence tomography // *Journal of Biomedical Optics*, **04(01)**, pp. 137-143, 1999.
122. Sankaran V., Walsh J.T., An Optical, Real time Measurement of Collagen Denaturation // *Proc. SPIE*, **2975**, pp. 34-42, 1997.
123. Payne B.P., Nishioka N.S., Mikic B.B., Venugopalan V., Comparison of pulsed CO₂ laser ablation at 10.6 μm and 9.5 μm // *Lasers in surgery and medicine*, **23(1)**, pp. 1-6, 1998.
124. Калоус В., Павличек З., Биофизическая химия // пер. с чешск., М.: Мир, 1985.
125. Weinryb I., and Steiner R.F., The luminescence of the aromatic amino acids // In *Excited States of Proteins and Nucleic Acids*. Plenum Press, New York, pp. 277–318, 1971.
126. Под. ред. Берлиена Х.-П., Мюллера Г.Й. Прикладная лазерная медицина // *Учебное пособие*, пер. с нем. – М., АО "Интерэксперт", 1997.
127. Ostrovsky M.A., Sergeev Y.V., Atkinson D.L., Soustov L.V., Hejtmancik J.F., Comparison of UV-induced photo-kinetics for lens-derived and recombinant beta-crystalline // *Molecular Vision*, **8**, pp. 72-78, 2002.
128. Стыскин Е.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В., Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография // М. Химия, 284 с., 1986.
129. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н., Морфология биологических жидкостей человека // М. "Хризостом", 303 с., 2001.
130. Рапис Е.Г., Образование упорядоченной структуры при высыхании пленки белка // *Письма в ЖТФ*, **14(17)**, с. 1560-1565, 1988.

131. Яхно Т.А., Яхно В.Г., Санин А.Г., Шмелев И.И., Исследование динамики фазовых переходов жидкостей разного типа методом регистрации акусто-механического импеданса высыхающей капли // *Биофизика*, **47**(6), pp. 1101-1105, 2002.
132. Wong K.P., Tanford C. Denaturation of bovine carbonic anhydrase B by guanidine hydrochloride. A process involving separable sequential conformational transitions // *J. Biol. Chem.*, **248**(24), pp. 8518-8523, 1973.
133. Taylor H.R., The environment and the lens // *Br. J. Ophthalmol.*, **64**(5), pp. 303-310, 1980.
134. Zigman S., Cotlier E., The role of sunlight in human cataract formation // *Surv. Ophthalmol.*, **27**(5), pp. 317-326, 1983.
135. Taylor H.R., West S.K., Rosenthal F.S., Muñoz B., Newland H.S., Abbey H., Emmett E.A. Effect of ultraviolet radiation on cataract formation // *N. Engl. J. Med.*, **319**(22), pp. 1429-1433, 1988.
136. Itoh K., Ozaki Y., Mizuno A., Iriyama K. Structural changes in the lens proteins of hereditary cataracts monitored by Raman spectroscopy // *Biochemistry*, **22** (8), pp. 1773–1778, 1983.
137. Russella P., Uga S., Zigler J.S., Kaiser-Kupfera M. and Kuwabara T. Studies using human lenses from a family displaying hereditary congenital cataracts // *Vision Research*, **21**(1), pp. 169-172, 1981.
138. Krivandin A.V., Lvov Yu.M., Ostrovsky M.A., Fedorovich I.B., Feigin L.A., Structural conversions of crystallins under senile cataract, dehydration and UV-irradiation studied by X-ray diffraction // *Exp. Eye Res.*, **49**, pp. 853-859, 1989.
139. Kozakov M.Yu., Muraviev S.V., Soustov L.V., Измеритель энергии импульсов электромагнитного излучения // *Патент на изобретение № 203I378*, 26 марта 1991, Россия.
140. Bityurin N. and Malyshev A., Codes on laser ablation of polymers (nanosecond pulses) // www.iapras.ru/english/structure/lab_332_e.html.
141. Bityurin N. and Malyshev A., Bulk photothermal model for laser ablation of polymers by nanosecond and subpicosecond pulses // *J. Appl. Phys.*, **92**(1), pp. 605-613, 2002.
142. Samarskii A.A., Vabishchevich P.N., Computational heat transfer // Jhon Willey & Sons, New York, 1995.
143. Шайтан К.В., Конформационная подвижность белка с точки зрения физики // *СОЖ*, **5**, с. 8-13, 1999.
144. Kubelka J., Hofrichter J. and Eaton W.A., The protein folding "speed limit" // *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **14**, pp. 76-88, 2004.
145. Levinthal C., Are there pathways for protein folding? // *J. Chim. Phys.*, **65**, pp. 44-45, 1968.
146. Lin M.Y., Lindsay H.M., Weitz D.A., Ball R.C., Klein R., Meakin P., Universal reaction-limited colloid aggregation // *Phys. Rev. A*, **41**(4), pp. 2005–2020, 1990.
147. Zigman S., Environmental near-UV radiation and cataracts // *Optom. Vis. Sci.*, **72**, pp. 899–901, 1995.
148. Reddy V.N., Glutathione and its function in the lens: an overview // *Exp. Eye Res.*, **50**, pp. 771–778, 1990.
149. Spector A., The search for a solution to senile cataracts. Proctor Lecture // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **25**, pp. 130–146, 1984.
150. Болдырев А.А., Карнозин. Биологическое значение и возможности применения в медицине // М.: Изд-во МГУ, 320 стр., 1998.
151. Clark J.I., Benedek G.B., Siezen R.J., Thomson J.A., Friedman S.H., Chemical prevention or reversal of cataract by phase separation inhibitors // *United States Patent*, № 5.091.421, feb. 25, 1992.
152. Болдырев А.А., Рагимов А.А., Формазюк В.Е., Глазные капли для лечения катаракты

// Патент на изобретение, № 2071316, 5 августа 1993, Россия.

153. van Rens G.L., de Jong W.W., Bloemendal H., A superfamily in the mammalian eye lens: the beta/gamma-crystallins // *Mol. Biol. Rep.* **16**, pp. 1–10, 1992.
154. van Rens G.L.M., Raats J.M.H., Driessen H.P.C., Oldenburg M., Wijnen J.T., Khan P.M., de Jong W.W. and Bloemendal H., Structure of the bovine eye lens gammaS-crystallin gene (formerly betaS) // *Gene*, **78**, pp. 225–233, 1989.
155. Hejtmancik J.F., Wingfield P., Chambers C., Russell P., Chen H.-C., Sergeev Y.V., Hope J.N., Association properties of beta-B2- and betaA3-crystallin: ability to form dimmers // *Protein Eng.*, **10**, pp. 1347–1352, 1997.
156. Sergeev Y.V., Wingfield P.T., Hejtmancik J.F., Monomer-dimer equilibrium of normal and modified beta A3-crystallins: experimental determination and molecular modeling // *Biochemistry*, **39**, pp. 15799–15806, 2000.
157. Sergeev Y.V., Hejtmancik J.F., Wingfield P.T., Energetics of domain-domain interactions and entropy driven association of beta-crystallins // *Biochemistry* **43**, pp. 415–424, 2004.
158. Bax B., Lapatto R., Nalini V., Driessen H., Lindley P.F., Mahadevan D., Blundell T.L., Slingsby C., X-ray analysis of beta B2-crystallin and evolution of oligomeric lens proteins // *Nature*, **347**, pp. 776–780, 1990.
159. Lapatto R., Nalini V., Bax B., Driessen H., Lindley P.F., Blundell T.L., Slingsby C., High resolution structure of an oligomeric eye lens beta-crystallin: loops, arches, linkers and interfaces in betaB2 dimer compared to a monomeric gamma-crystallin // *J. Mol. Biol.*, **222**, pp. 1067–1083, 1991.
160. Kannabiran C., Rogan P.K., Olmos L., Basti S., Rao G.N., Kaiser-Kupfer M., Hejtmancik J.F., Autosomal dominant zonular cataract with sutural opacities is associated with a splice site mutation in the β A3/A1-crystallin gene // *Mol. Vision*, **4**, pp. 21, 1998.
161. Burdon K.P., Wirth M.G., Mackey D.A., Russell-Eggitt I.M., Craig J.E., Elder J.E., Dickinson J.L., Sale M.M., Investigation of crystalline genes in familial cataract, and report of two disease associated mutations // *Br. J. Ophthalmol.*, **88**, pp. 79–83, 2004.
162. Qi Y, Jia H, Huang S, Lin H., Gu J., Su H., Zhang T., Gao Y., Qu L., Li D., Li Y., A deletion mutation in the betaA1/A3 crystallin gene (CRYBA1/A3) is associated with autosomal dominant congenital nuclear cataract in a Chinese family // *Hum. Genet.*, **114**, pp. 192–197, 2004.
163. Bateman J.B., Geyer D.D., Flodman P., Johannes M., Sikela J., Walter N., Moreira A.T., Clancy K., Spence M.A., A new betaA1-crystallin splice junction mutation in autosomal dominant cataract // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, pp. 3278–3285, 2000.
164. Litt M., Kramer P., LaMorticella D.M., Murphey W., Lovrien E.W., Weleber R.G., Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human alpha crystallin gene CRYAA // *Hum. Mol. Genet.*, **7**, pp. 471–474, 1998.
165. Berry V., Francis P., Reddy M.A., Collyer D., Vithana E., MacKay I., Dawson G., Carey A.H., Moore A., Bhattacharya S.S., Quinlan R.A., Alpha-B Crystallin Gene (CRYAB) Mutation Causes Dominant Congenital Posterior Polar Cataract in Humans // *Am. J. Hum. Genet.*, **69**, pp. 1141–1145, 2001.
166. Bova M.P., Yaron O., Huang Q., Ding L., Haley D.A., Stewart P.L., Horwitz J., Mutation R120G in alphaBcrystallin, which is linked to a desmin- related myopathy, results in an irregular structure and defective chaperone-like function // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **96**, pp. 6137–6142, 1999.
167. Vicart P., Caron A., Guicheney P., Li Z., Prévost M.C., Faure A., Chateau D., Chapon F., Tomé F., Dupret J.M., Paulin D., Fardeau M., A missense mutation in the α B-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy // *Nat. Genet.*, **20**, pp. 92–95, 1998.

168. Pras E., Frydman M., Levy-Nissenbaum E., Bakhan T., Raz J., Assia E.I., Goldman B. and Pras E., A nonsense mutation (W9X) in CRYAA causes autosomal recessive cataract in an inbred Jewish Persian family // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, pp. 3511–3515, 2000.
169. Mackay D.S., Boskovska O.B., Knopf H.L., Lampi K.J., Shiels A., A nonsense mutation in CRYBB1 associated with autosomal dominant cataract linked to human chromosome 22q // *Am. J. Hum. Genet.*, **71**, pp. 1216–1221, 2002.
170. Litt M., Carrero-Valenzuela R., LaMorticella D.M., Schultz D.W., Mitchell T.N., Kramer P. and Maumenee I.H., Autosomal dominant cerulean cataract is associated with a chain termination mutation in the human beta-crystallin gene CRYBB2 // *Hum. Mol. Genet.*, **6**, pp. 665–668, 1997.
171. Gill D., Klose R., Munier F.L., McFadden M., Priston M., Billingsley G., Ducrey N., Schorderet D.F., Héon E., Genetic heterogeneity of the Coppock-like cataract: a mutation in CRYBB2 on chromosome 22q11.2 // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, pp. 159–165, 2000.
172. Heon E, Priston M, Schorderet DF, et al. The gamma-crystallins and human cataracts: a puzzle made clearer. *Am J Hum Genet.* 1999; 65:1261–1267.
173. Ren Z., Li A., Shastry B.S., Padma T., Ayyagari R., Scott M.H., Parks M.M., Kaiser-Kupfer M.I., Hejtmancik J.F., A 5-base insertion in the γ C-crystallin gene is associated with autosomal dominant variable zonular pulverulent cataract // *Hum. Genet.*, **106**, pp. 531–537, 2000.
174. Santhiya S.T., Manohar M.S., Rawlley D., Vijayalakshmi P., Namperumalsamy P., Gopinath P.M., Loster J., Graw J., Novel mutations in the gamma-crystallin genes cause autosomal dominant congenital cataracts // *J. Med. Genet.*, **39**, pp. 352–358, 2002.
175. Stephan D.A., Gillanders E., Vanderveen D., Freas-Lutz D., Wistow G., Baxevanis A.D., Robbins Ch.M., Auken A., Quesenberry M.I., Bailey-Wilson J., Juo S.-H.H., Trent J.M., Smith L., and Brownstein M.J., Progressive juvenile-onset punctate cataracts caused by mutation of the gamma D-crystallin gene // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **96**, pp. 1008–1012, 1999.
176. Kmoch S., Brynda J., Asfaw B., Bezouska K., Novák P., Rezácová P., Ondrová L., Filipce M., Sedláček J. and Elleder M., Link between a novel human gamma D-crystallin allele and a unique cataract phenotype explained by protein crystallography // *Hum. Mol. Genet.*, **9**, pp. 1779–1786, 2000.
177. Ren Z., Lin P.Y., Klintworth G.K., Iwata F., Munier F.L., Schorderet D.F., El Matri L., Theendakara V., Basti S., Reddy M., Hejtmancik J.F., Allelic and locus heterogeneity in autosomal recessive gelatinous drop-like corneal dystrophy // *Hum. Genet.*, **110**, pp. 568–577, 2002.
178. Heon E., Priston M.K., Billingsley G., Lubsen N.H., Munier F., Clarifying the role of gamma-crystallin in congenital CCL cataract (abstract) // *Am. J. Hum. Genet.*, **65**, p. A19, 1999.
179. Burnett W.N., "Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A // *Analytical Biochemistry*, **112**, pp. 195-203, 1981.
180. Schägger H. and von Jagow G., Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa // *Analytical Biochemistry*, **166**, pp. 368-379, 1987.
181. Walrant P., Santus R., N-formyl-kynurenine, a tryptophan photooxidation product, as a photodynamic sensitizer // *Photochem. Photobiol.*, **19**, pp. 411-417, 1974.