

Исследовано воздействие излучения ХеСl-лазера на белок - карбоангидразу. Установлена сильная зависимость вероятности образования высокомолекулярных агрегатов от плотности энергии лазерных импульсов и частоты их повторения. Построена теоретическая модель, дающая представление о процессах фотоагрегации белковых молекул при воздействии непрерывного и импульсного УФ-излучения.

INVESTIGATION OF PHOTOAGGREGATION OF PROTEINS IRRADIATED BY XECL LASER LIGHT

L. V. Soustov, E. V. Chelnokov, N. M. Bityurin, V. V. Nemov, T. A. Yahno, Yu. V. Sergeev, M. A. Ostrovsky

The effect of XeCl laser radiation on carbonic anhydrase solution is studied. It is investigated that kinetics of protein aggregation is strongly influenced by both laser fluence and repetition rate. The theoretical model is constructed which allows one to explain qualitatively the features of experimental findings.

Рецензент

к.ф.-м.н. В. А. Каменский

© Институт прикладной физики РАН, 2002

В последнее время появляется много публикаций об исследовании воздействия УФ-излучения на кристаллины, которые являются основными структурно-функциональными белками хрусталика глаза позвоночных. Такой интерес обусловлен тем, что воздействие УФ-излучения считается одним из важнейших природных факторов возникновения катаракты. В основе молекулярного механизма развития некоторых видов катаракты лежит повреждение структуры альфа-, бета- и гамма-кристаллинов [1-4], молекулярные массы которых соответственно Мм ~ 800 кД, (45-200) кД и (20-25) кД. Между аминокислотными остатками этих белков при светоповреждении могут образовываться ковалентные связи (в дальнейшем будем называть их сшивками), что в свою очередь приводит к возникновению высокомолекулярных агрегатов, сильно рассеивающих свет и вызывающих помутнение хрусталика. Такие процессы фотоагрегации характерны при воздействии мягкого УФ-излучения, а в более коротковолновом диапазоне преобладают процессы фотолиза, что, в частности, было показано в работе [5] при воздействии на яичный белок излучением с длинами волн $\lambda = 308$ нм и $\lambda = 266$ нм. В экспериментах по фотоагрегации белков обычно используют либо излучение ксеноновой лампы, пропущенное через водяной фильтр и монохроматор, настроенный на пропускание $\lambda = 295$ нм, либо излучение ХеСl-лазера с $\lambda = 308$ нм [6, 7]. Поглощение белков при $\lambda = 308$ нм на порядок меньше, чем при 295 нм, однако эффективность лазерного воздействия оказывается на два порядка выше за счет более высокой интенсивности лазерного излучения. В [7] исследовалось воздействие излучения ХеСl-лазера на альфа-, бета- и гамма-кристаллины. Для регистрации изменений в этих белках в процессе облучения снимались кинетические кривые – зависимость от УФ-дозы D интенсивности рассеянного в кювете с растворенным белком и прошедшего через диафрагму излучения пробного пучка ($D = w \times F \times t$, где w – плотность энергии облучающего импульса, F – частота повторения импульсов, t – время облучения). Растворы бета- и гамма-кристаллинов становились мутными при $D = (500-750)$ Дж/см², а рост рассеянного излучения в бета-кристаллине начинался при $D^* \sim 250$ Дж/см². В работе [6] по такой же методике исследовалось воздействие излучения с $\lambda = 295$ нм и $\lambda = 308$ нм на различные белки, в том числе и на карбоангидразу.

В известных нам работах УФ-облучение проводилось при фиксированной интенсивности w и при постоянной частоте повторения световых импульсов F . Целью настоящей работы является исследование воздействия на белок УФ-излучения в широком диапазоне изменения w и F . В качестве объекта исследования была выбрана карбоангидраза. Этот выбор обусловлен следующими обстоятельствами. Во-первых, она представляет собой

мономер с молекулярной массой (29 кД), близкой по величине молекулярного веса к гамма-кристаллину и некоторым формам бета-кристаллина. Во-вторых, поведение ее кинетической кривой при облучении ХеСl-лазером [6] близко к аналогичным зависимостям для других белков, включая гамма- и бета-кристаллины [7]. Кроме оптических методов использовался метод высокоэффективной жидкостной хроматографии и качественный анализ морфологии кристаллических структур, образующихся при высушивании капли раствора белка [8-10], причем изменение кристаллической структуры проявлялось уже при $D \sim 1$ Дж/см². На основании результатов этих исследований построена физическая модель процесса образования сшивок внутри и между молекулами белка и определены некоторые характерные параметры этого процесса.

2. Материалы и методы исследования

Физиологический забуференный фосфатами раствор карбоангидразы с pH = 7,2 и концентрацией белка 0,5 мг/мл пропускаться через мембранный фильтр с размерами пор 0,45 мкм (фирма Sartorius). Перед УФ-облучением пробирка с белком выдерживалась один час при комнатной температуре, а затем центрифугировалась 15 минут при ускорении 80 g. 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 (TEM₀) HeNe-лазера ($\lambda = 633$ нм) мощностью 10 мВт и расходимостью пучка $1,1 \times 10^{-3}$ рад. Оптическая схема отличалась от используемых в [6, 7] и приведена на рис. 1.

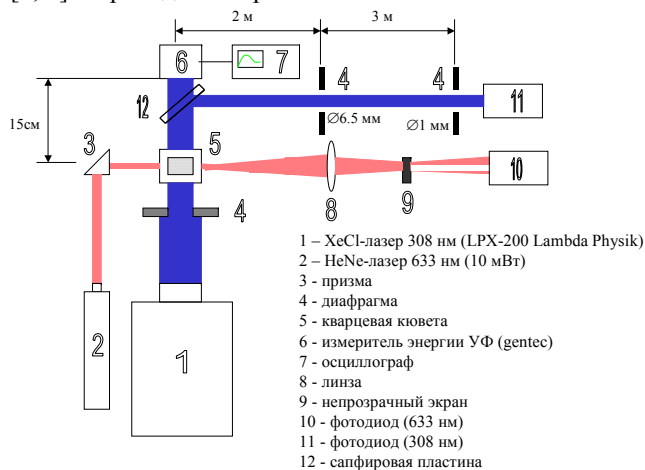


Рис. 1. Схема эксперимента

Измерение мощности рассеянного излучения пробного пучка проводилось методом темного поля [11]. Пробный пучок, проходящий через кварцевую кювету (размеры кюветы: длина вдоль пробного пучка 9 мм, вдоль УФ-пучка 5 мм и высота 9 мм) с необлученным раствором белка, 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, куда и помещался фотодиод 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, который находился на расстоянии 15 см после кюветы. Между измерителем энергии и кюветой помещалась сапфировая плоскопараллельная пластина толщиной 0,5 мм. Отраженный от этой пластины пучок 308 нм (~ 10 % от прошедшей через кювету энергии) пропускаться через пространственный фильтр, представляющий собой две диафрагмы с диаметрами $d_1 = 6,5$ мм и $d_2 = 1$ мм, разнесенные друг от друга на расстояние $L = 3$ м. После ослабления интерференционными фильтрами излучение 308 нм направлялось на УФ-фотодиод LF302UV (фирма Lambda Physik). Такая схема позволила измерять непосредственно в процессе УФ-облучения как изменение поглощения белка на длине волны 308 нм, так и рассеяние УФ-излучения в кювете, которое начиналось при дозах на порядок меньших D^* , характерных для начала рассеяния излучения HeNe-лазера.

После УФ-облучения карбоангидразы различными дозами снимались оптические спектры пропускания на спектрофотометре Spexord M40 (фирма Carl Zeiss) и молекулярно-массовое распределение с использованием аналитической колонки для FPLC Superose 12HR 10/30 (Pharmacia Biotech). Хроматография проводилась в буфере: 25 мМ Трис-НСl, 200 мМ NaCl, 3 мМ NaN₃ (pH = 7,2) со скоростью протока 0,3 мл/мин. Колонка была прокалибрована молекулярно-массовыми стандартами: голубой декстран 2000, тиреоглобулин, ферритин, каталаза, альдолаза, альбумин, овальбумин, хитотрипсиноген, рибонуклеаза А, цитохром С, апротинин, 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) [8-10].

3. Результаты и их обсуждение

Перед исследованием кинетических кривых был измерен коэффициент поглощения α раствора карбоангидразы с концентрацией 0,5 мг/мл в кювете длиной 5 см в диапазоне интенсивностей излучения ХеСI-лазера $w = (2-300)$ мДж/см². Величина α составила 6×10^{-2} см⁻¹ и оставалась постоянной во всем диапазоне изменений w , что свидетельствует 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.

Поведение кинетических кривых, полученных при различных значениях w и F , приведено на рис. 2, а-в. Из этих рисунков видно, что для каждого значения w существует свое характерное значение F^* , ниже которого происходит существенное (в несколько раз) увеличение D^* , что свидетельствует о резком уменьшении вероятности сшивок. Так, при $w = 40$ мДж/см² $F^* \sim 6$ Гц, при $w = 84$ мДж/см² $F^* \sim 2$ Гц, а при $w = 300$ мДж/см² $F^* \sim 0,3$ Гц.

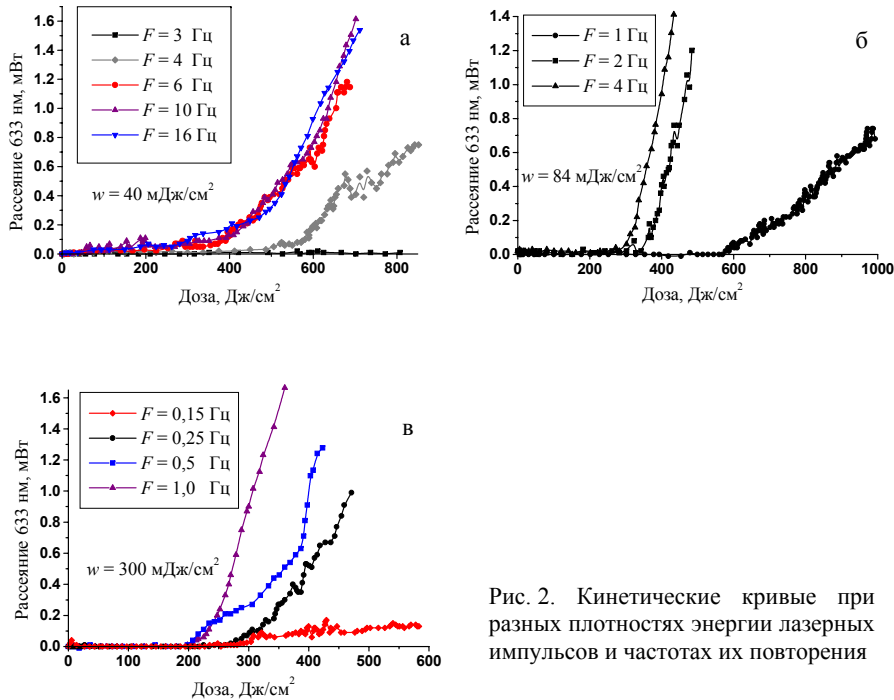


Рис. 2. Кинетические кривые при разных плотностях энергии лазерных импульсов и частотах их повторения

На рис. 3 приведены зависимости $F^*(w)$ и $p^*(w)$, где $p^* = w \times F^*$, а на рис. 4 и 5 – зависимости $D^*(w)$ и $D^*(F)$. Видно, что значения не только F^* , но и значения p^* и D^* существенно уменьшаются с ростом w .

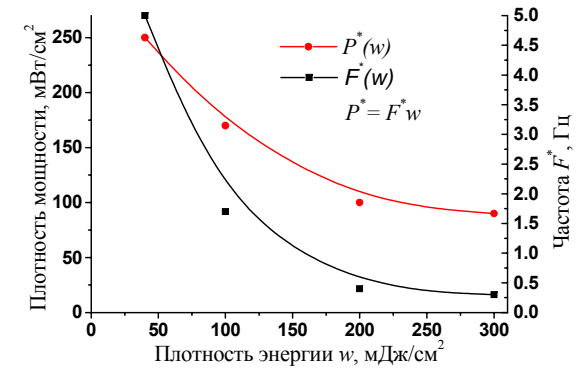


Рис. 3. Зависимость мощности P^* и F^* от плотности энергии в импульсе

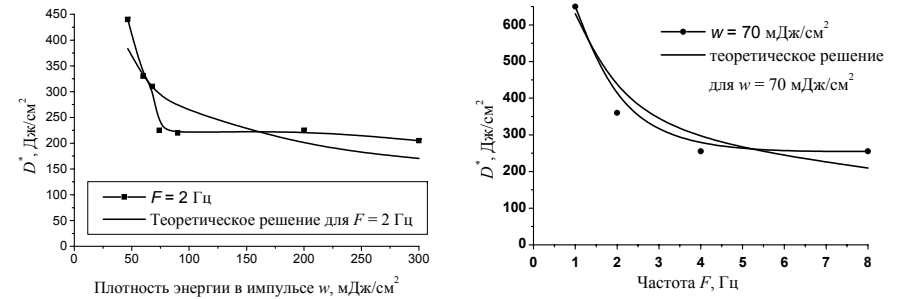


Рис. 4. Зависимость дозы $D^*(w)$

Рис. 5. Зависимость дозы $D^*(F)$

Для объяснения такого поведения кинетических кривых можно предложить следующую модель агрегации. После воздействия лазерного импульса в растворе имеются радикалы, концентрация которых составляет R_{0i} . Дальнейший процесс зависит от соотношения временных параметров: времени между столкновениями молекул в растворе; времени жизни радикалов; времени образования сшивки и периода следования лазерных импульсов $T = 1/F$. Если к началу следующего лазерного импульса концентрация оставшихся радикалов $R(T) \ll R_{0i}$, то фотоагрегация молекул происходит медленно, и вероятность образования сшивки остается малой. Такой ситуации соответствуют частоты повторения лазерных импульсов $F < F^*$. Если же к началу следующего импульса концентрация радикалов достаточно

велика, то от импульса к импульсу будет происходить их накопление, что приводит к увеличению вероятности образования сшивок и, соответственно, к уменьшению величины D^* .

На рис. 6 вместе с кинетической кривой рассеяния излучения 633 нм приведены зависимости от дозы облучения сигналов, снимаемых с измерителя энергии 6 (кривая 1) и УФ-фотодиода 11 (кривая 2). При малых дозах эти кривые совпадают, а начиная с $D \sim 20 \text{ Дж/см}^2$ сигнал с УФ-фотодиода спадает быстрее, чем сигнал с измерителя энергии. Это свидетельствует о том, что при малых дозах в эксперименте регистрируется только увеличение поглощения излучения 308 нм в растворе белка, а при увеличении дозы в уменьшение сигнала с УФ-фотодиода начинает давать вклад рассеяние УФ-пучка. Так как измеритель энергии находится близко к кювете, то появляющееся рассеянное излучение не выходит за апертуру измерителя, поэтому кривая 1 идет выше, чем кривая 2. При этом кривая 1 характеризует увеличение поглощения 308 нм. Начиная с $D \sim 300 \text{ Дж/см}^2$ рассеянное излучение начинает выходить за апертуру измерителя энергии, и крутизна спада кривой 1 увеличивается. Важно отметить следующее обстоятельство. Отношение доз, при которых начинается рассеяние излучения HeNe-лазера и XeCl-лазера, близко к значению $(633 \text{ нм} / 308 \text{ нм})^4$. Это позволяет считать, что по крайней мере на начальном этапе рассеяние в растворе белка излучения с $\lambda = 308 \text{ нм}$ и с $\lambda = 633 \text{ нм}$ является рэлеевским, то есть в обоих случаях выполняется условие $d \ll \lambda$, где d – размер рассеивающих частиц (молекула карбоангидразы имеет радиус 2,36 нм [12]).

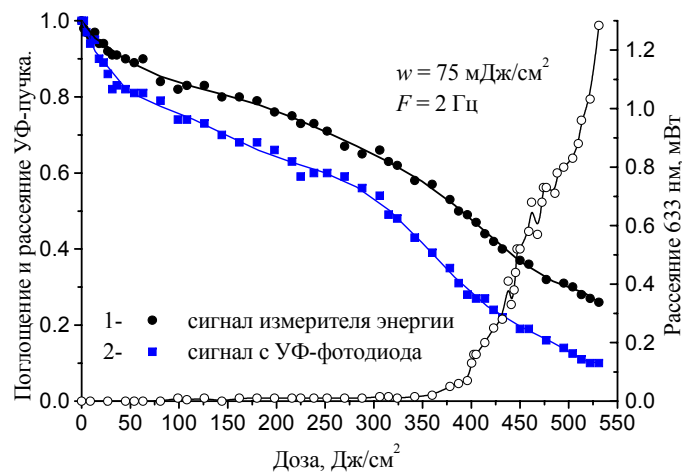


Рис. 6. Кинетическая кривая рассеяния излучения с длиной волны 633 нм и характеристика поглощения и рассеяния УФ-пучка

В растворах белка, облученных различными УФ-дозами при фиксированных значениях $w = 75 \text{ мДж/см}^2$ и $F = 2 \text{ Гц}$, были измерены молекулярно-массовые распределения (ММР) – рис. 7 и оптические спектры – рис. 8. При измерении ММР оценивалось появление различных агрегированных форм карбоангидразы в процессе облучения. На хроматограмме исходного образца выявляется основная фракция мономерных молекул и димерные формы. При $D = 0, 1D^*$ димерная фракция значительно вырастает и появляются олигомерные формы. При $D = D^*$ идет дальнейшее увеличение димерных и олигомерных форм и появляется фракция в области эксклюзионного предела колонки (с $M_m = 2000 \text{ кД}$ и более), представленная высокомолекулярными белковыми агрегатами. Доза $1,5D^*$ вызывает рост содержания высокомолекулярных белковых агрегатов, в том числе и форм с кажущейся молекулярной массой более 2000 кД (для получения соразмерных хроматографических профилей использовалась разная чувствительность при измерении оптической плотности раствора на длине волны 280 нм). Из сопоставления кривых на рис. 2, 6, 7 видно, что рост рассеяния излучения 308 нм соответствует образованию в ММР димерных форм, а рост рассеяния излучения 633 нм – образованию высокомолекулярной белковой фракции.

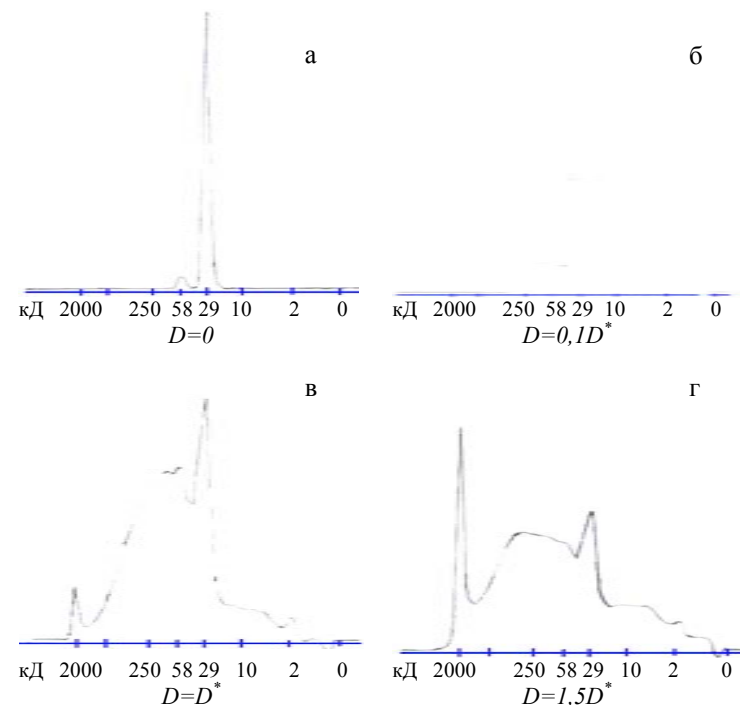


Рис. 7. Молекулярно-массовые распределения до (а) и после облучения разными дозами (б, в, г)

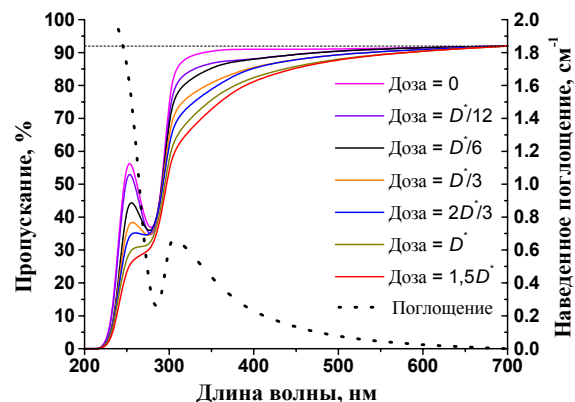


Рис. 8. Оптические спектры пропускания и спектр наведенного поглощения после облучения $D = 1,5D^*$

На рис. 8 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 $D = 1,5D^*$, вид которого аналогичен полученному в [1] для УФ-облученной водорастворимой фракции хрусталика глаза быка. На рис. 9 показано изменение коэффициента поглощения раствора карбоангидразы в процессе УФ-облучения на длинах волн 308 нм и 280 нм. Определение зависимости $\alpha(D)$ для излучения с $\lambda = 308$ нм, выполненное по набору оптических спектров - рис. 8, и согласно кривой 1 рис. 6 (участок до начала увеличения крутизны ее спада) дало одинаковые результаты.

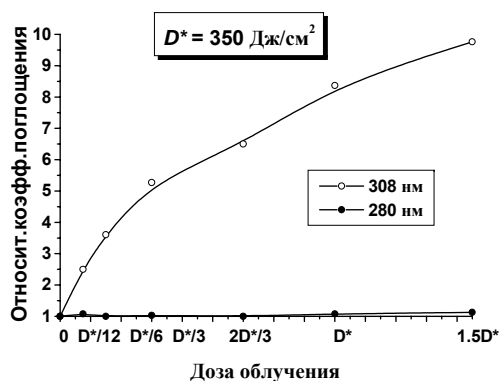


Рис. 9. Зависимость коэффициента поглощения $\alpha(D)$ излучения с длиной волн 308 нм и 280 нм

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. 10, а-в приведены фотографии типичных кристаллических структур в центральной зоне высушенной капли при 70-кратном увеличении. В необлученных образцах раствора карбоангидразы центральную зону высушенных капель занимают морфологические структуры в форме круга, в центре которого располагается кристалл NaCl, окруженный каскадом концентрически расположенных пластинчатых кристаллических образований (рис. 10, а). После облучения раствором дозой 1 Дж/см² наблюдается нарушение центрально-симметричного строения образующихся структур и частичная замена пластинчатых кристаллов на стреловидные (рис. 10, 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. 10, в).

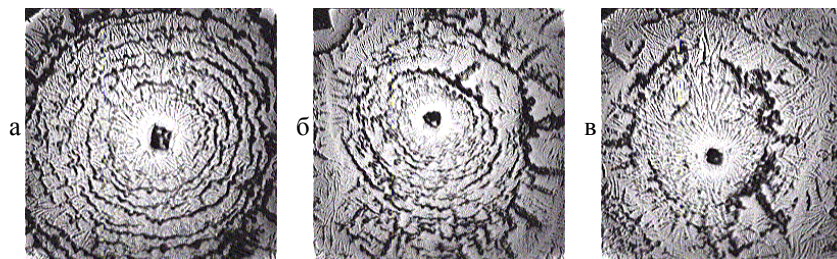


Рис. 10. Кристаллическая структура высушенной капли раствора при 70-кратном увеличении: а – $D = 0$; б – $D = 1$ Дж/см²; в – $D = 3$ Дж/см²

Морфология кристаллических структур зависит от свойств и состава раствора. Из рис. 10 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.

4. Физическая модель фотоагрегации

Как будет показано ниже, полученные экспериментальные результаты могут быть объяснены, если предположить, что агрегация происходит при

взаимодействии двух фотохимически модифицированных молекул белка. Такой процесс аналогичен рекомбинации радикалов, поэтому в дальнейшем будем называть взаимодействующие молекулы радикалами, хотя истинная природа этой модификации неизвестна и требует дополнительных исследований. Кроме того, в данной работе мы ограничимся процессом образования димеров, считая, что именно они определяют увеличение рассеяния в растворе белка. При этом учтем три процесса:

- 1) образования радикалов,
- 2) их релаксацию,
- 3) процесс агрегации двух радикалов с образованием димера.

Остальные процессы, включая образование высокомолекулярных белковых нерастворимых агрегатов, процессы модификации аминокислотных остатков тирозина, триптофана и цистеина, в настоящей модели не рассматриваются.

Запишем уравнения, описывающие эти процессы:

$$\begin{aligned} \frac{dR}{dt} &= \mathfrak{R} - kR^2 - \frac{R}{\tau}, \\ \frac{dN}{dt} &= \beta kR^2, \end{aligned} \quad (1)$$

R – концентрация радикалов,

N – концентрация димеров,

k – скорость уменьшения концентрации радикалов в парных процессах,

β – вероятность образования димера,

τ – характерное время жизни радикала,

\mathfrak{R} – источник радикалов.

4.1. Режим непрерывного УФ-облучения

В этом случае систему (1) можно записать в виде:

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

C_0 – концентрация молекул мономера

η – квантовый выход образования радикалов

σ – эффективное сечение поглощения

I – интенсивность излучения

$\hbar \omega$ – энергия кванта излучения.

Для стационарной концентрации радикалов ($dR/dt = 0$) находим:

$$R = (\sqrt{1 + 4k\tau A} - 1) / 8k\tau, \quad (3)$$

$$\text{где } A = \eta \sigma C_0 \frac{I}{\hbar \omega} \tau.$$

Подставив (3) в (2), получим

$$N(t) = N_0 + t \cdot \beta k (\sqrt{1 + 4k\tau A} - 1)^2 / (8k\tau)^2, \quad (4)$$

где N_0 – концентрация димеров, накопленная до выхода на стационарный уровень.

В случае отсутствия димеров в исходном веществе и быстром выходе на стационар $N_0 \sim 0$.

Обозначив через N^* концентрацию димеров, при которой регистрируется рост рассеянного излучения, получим выражение для D^* :

$$D^* = It^*$$

$$D^* = I \frac{N^*}{\beta k \left(\frac{\sqrt{1 + 4k\tau \eta \sigma C_0 \frac{I}{\hbar \omega} \tau} - 1}{8k\tau} \right)^2}, \quad (5)$$

где t^* – время, за которое накапливается концентрация N^* .

Для упрощения выражения (5) введем обозначения:

$$I_0 = \frac{\hbar \omega}{4k\tau^2 \eta \sigma C_0}; \quad D_0 = I_0 \cdot 64N^*(k\tau)^2 / \beta k. \quad (6)$$

Тогда

$$D^* = D_0 \frac{I/I_0}{\left(\sqrt{1 + I/I_0} - 1 \right)^2} \quad (7)$$

В предельных случаях:

$$1) \frac{I}{I_0} \ll 1 \quad D^* = 4D_0 \frac{I_0}{I} \quad (8)$$

$$2) \frac{I}{I_0} \gg 1 \quad D^* = D_0 = \text{const} \quad (9)$$

Полная зависимость $D^*(I/I_0)$ в безразмерных величинах приведена на рис. 11.

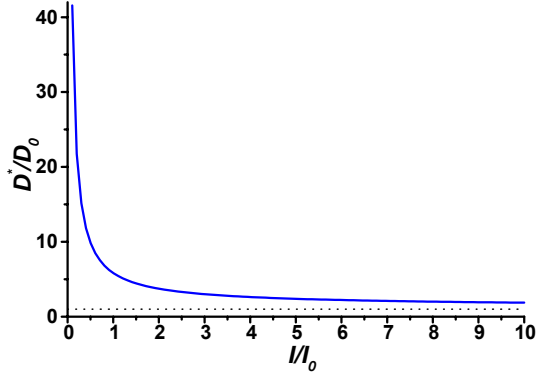


Рис. 11. Зависимость дозы начала рассеяния от интенсивности непрерывного УФ-излучения

На рисунке 11 изображена зависимость дозы начала рассеяния пучка пробного излучения HeNe-лазера (633 нм) от интенсивности непрерывного УФ-излучения, описываемая системой (2). 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.

4.2. Воздействие на раствор белка импульсного УФ-излучения

В этом случае источник радикалов – периодическая функция времени $\mathfrak{R} = \mathfrak{R}(t-nT)$, где n – целое число. Систему (1) будем решать для условий, которые выполнялись в описанных выше экспериментах. Нетрудно показать, что при использовавшейся концентрации раствора 10^{16} см^{-3} (0,5 мг/мл) время между столкновениями молекул белка составляет $\sim 10^{-5}$ с, которое много больше длительности лазерного импульса (3×10^{-8} с). За время лазерного импульса димеры не успевают образоваться, поэтому в (1) за источник радикалов можно принять их концентрацию R_{0i} , которая имеется в растворе сразу после воздействия i -го импульса. При этом систему (1) можно записать в виде:

$$\begin{aligned} \frac{dR}{dt} &= -kR^2 - \frac{R}{\tau} \\ \frac{dN}{dt} &= \beta k R^2 \end{aligned} \quad (10)$$

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

$$R(t) = \frac{R_{0i}}{\exp(t/\tau) + k\tau R_{0i}(\exp(t/\tau) - 1)}, \quad (11)$$

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

$$R_{0(i+1)} = R(T) + R_p,$$

где $R_p = \eta\sigma C_0 \frac{w}{\hbar\omega}$ – приращение концентрации радикалов после воздействия импульса с плотностью энергии w .

Поведение концентрации димеров описывается уравнением, полученным из системы (10).

$$\frac{dN}{dR} = -\frac{\beta k \tau R}{(1 + k\tau R)} \quad (12)$$

Решением уравнения (12) является зависимость приращения концентрации димеров за время между i и $(i+1)$ импульсами от концентрации радикалов:

$$\Delta N(t) = \frac{\beta}{k\tau} \left[k\tau(R_{0i} - R(t)) + \ln \left(\frac{1 + k\tau R(t)}{1 + k\tau R_{0i}} \right) \right] \quad (13)$$

Зависимости $R(t)$ и $N(t)$ качественно изображены на рис. 12, а и б соответственно.

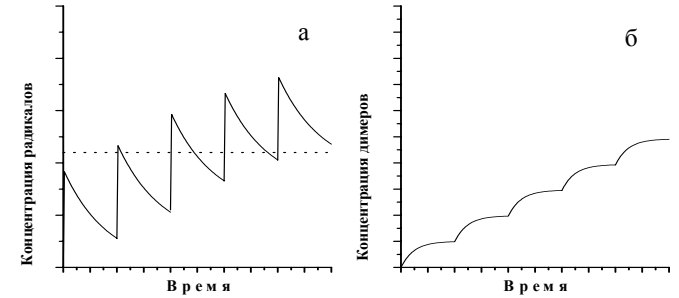


Рис. 12. Иллюстрация роста концентрации радикалов и димеров в процессе импульсного УФ-облучения

В процессе образования радикалов и димеров 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 димеров становится одинаковым от импульса к импульсу и равняется:

$$\Delta N(T) = \frac{\beta}{k\tau} \left[k\tau R_p + \ln \left(\frac{1 + k\tau R_s}{1 + k\tau(R_p + R_s)} \right) \right], \quad (14)$$

$$\text{где } R_s = \frac{R_p}{2} \left(\sqrt{1 + \frac{4}{k\tau R_p (\exp(T/\tau) - 1)}} - 1 \right) \quad (15)$$

Стационарная концентрация радикалов R_s (15) получена из (11) при условии, что к началу следующего импульса концентрация становится такой же, как и перед предыдущим. Считая, что рассеяние наступает при достижении концентрации димеров некоторой величины N^* 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:

$$D^* = w \frac{N^*}{\Delta N} = w \frac{N^* k\tau}{\beta} \frac{1}{\left(\chi - \ln \left(1 + \frac{2\chi}{1 - \chi + (\chi + 1) \sqrt{1 + \frac{4\chi}{(\chi + 1)^2 (\exp(T/\tau) - 1)}}} \right) \right)}, \quad (16)$$

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

Введем некоторые обозначения и перепишем (16) в виде:

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

$$\text{где } w_0 = \frac{\hbar\omega}{k\tau \eta \sigma C_0}, \quad D_0 = w_0 \frac{N^* k\tau}{\beta} \quad (17)$$

Выражение (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 безразмеривания D_0 , τ и w_0 соответственно.

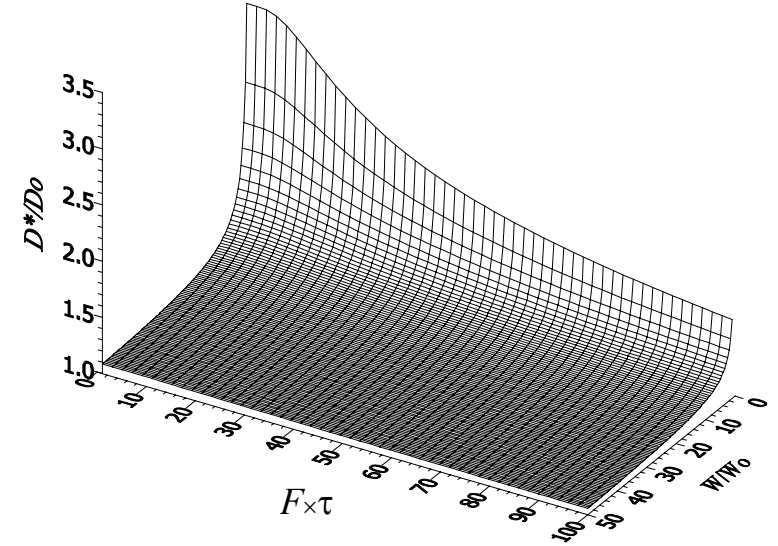


Рис. 13. Зависимость дозы начала рассеяния излучения пробного пучка HeNe-лазера (633 нм) от плотности энергии в импульсе w и частоты повторения F

Полученная физическая модель агрегации вещества под действием импульсного УФ-излучения описывает зависимость дозы начала рассеяния пробного пучка HeNe-лазера (633 нм) от характеристик импульсного излучения: плотности энергии в импульсе и частоты их повторения. Описываемая выражением (17) трехмерная зависимость представлена на рис. 13. Срез этой поверхности вертикальной плоскостью, параллельной оси w/w_0 , демонстрирует двумерную зависимость $D^*(w, F = \text{const})$ рис. 4. 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.

Срез поверхности вертикальной плоскостью, параллельной оси $F\tau$, показывает зависимость $D^*(F, w = \text{const})$ рис. 5. Больше 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 $D^*_{\max}(w, 0) = 1 / (1 - \ln(1 + w/w_0)^{w_0/w})$.

Для получения наилучшего совпадения теоретических и экспериментальных зависимостей был произведен подбор параметров в уравнении (17). В результате этого получены следующие оценки величин, использованных в модели: $D_0 \sim 2 \times 10^2$ Дж/см², $\tau = (10-100)$ сек, $\eta \sim 3 \times 10^{-8}$, $N^*/\beta \sim 10^{12}$ см⁻³. При получении этих оценок были использованы экспери-

ментальные значения: $C_0 = 10^{16} \text{ см}^{-3}$, $\alpha = 6 \times 10^{-2} \text{ см}^{-1}$, $\sigma = 6 \times 10^{-18} \text{ см}^2$, $\hbar\omega = 6,62 \cdot 10^{-19} \text{ Дж}$. Следует подчеркнуть, что в приведенной здесь физической модели фотоагрегации для простоты изложения рассмотрены только процессы образования димеров и не учтены другие возможные процессы, хотя их учет не представляет принципиальных затруднений. Такая упрощенная модель не может дать совпадения экспериментальных и теоретических зависимостей с высокой точностью, однако на качественном уровне она позволила объяснить полученные экспериментальные результаты.

5. Заключение

Проведено комплексное исследование воздействия излучения ХеСІ-лазера на раствор карбоангидразы. Установлена сильная зависимость вероятности образования высокомолекулярных агрегатов от плотности энергии лазерных импульсов и частоты их повторения. С помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии показано образование димеров, тримеров, олигомеров вплоть до полимеров с кажущейся $M_n > 2000 \text{ кД}$ по мере увеличения дозы УФ-облучения. Исследовано изменение поглощения излучения 308 нм и рассеяния излучения 308 нм и 633 нм в зависимости от дозы. Показано, что начало рассеяния излучения 308 нм и 633 нм соответствует рэлеевскому.

Предложена и освоена методика проведения комплексного исследования воздействия излучения ХеСІ-лазера на растворы белков.

Построена теоретическая модель, дающая представление о процессах фотоагрегации, происходящих в растворе карбоангидразы под воздействием непрерывного и импульсного ультрафиолетового излучения. Упрощенная модель, учитывающая лишь образование димеров, позволила получить не только качественное совпадение теоретического поведения зависимости дозы D^* , с которой начинается рассеяние пробного пучка, от плотности энергии и частоты повторения УФ-импульсов с экспериментальными зависимостями, но и получить некоторые количественные оценки.

Авторы благодарны С. В. Шубину за помощь в проведении эксперимента.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ: № 00-02-16411-а, № 02-04-49342-а, № 02-02-17745-а и программы Президиума РАН “Фундаментальные науки - медицине”.

Литература

1. Корхмазян М.М., Федорович И.Б., Островский М.А. Механизмы фотоповреждения структур глаза. Действие УФ-света на растворимые белки хрусталика. // Биофизика. 1983. Т. 28. С. 966-967.
2. Ельчанинов В.В., Федорович И.Б. Механизмы фотоповреждения структур глаза. Образование агрегатов полипептидов при УФ-облучении белков хрусталика. // Биофизика. 1989. Т. 34. С. 758-762.
3. Ельчанинов В.В., Федорович И.Б. Механизм фотоповреждения структур глаза. Изменение зарядов кристаллинов хрусталика при ультрафиолетовом облучении. // Биофизика. 1990. Т. 35. С. 200-204.
4. 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. 1994. Т. 8, № 3-4. С. 135-146.
5. Nikita M. Bityrin, Sergey V. Muraviov, Vladislav A. Kamensky, Aleksey Yu. Malyshev, Evgeny V. Chelnokov, Lev V. Soustov, Grigory V. Gelikonov. Kinetics of low scattering biotissue photodenaturation induced by the UV harmonics of a Nd:YAP laser and by Nd:YAG laser at a wavelength of 1440 nm. // Proc. SPIE. V. 4161. P. 1-11.
6. Borkman RF., Knight G., Obi B. The molecular chaperone alpha-crystalline inhibits UV-induced protein aggregation. // Exp. Eye. Res. 1996; 62:141-148.
7. 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. 2002. V. 8. P. 72-78.
8. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Морфология биологических жидкостей человека. М.: “Хризостом”, 2001. 303 с.
9. Рапис Е.Г. Образование упорядоченной структуры при высыхании пленки белка. // Письма в ЖТФ. 1988. Т. 14, вып. 17. С. 1560-1565.
10. Яхно Т.А., Яхно В.Г., Санин А.Г., Шмелев И.И. Исследование динамики фазовых переходов жидкостей разного типа методом регистрации акустомеханического импеданса высыхающей капли. // Биофизика (принята к печати).
11. 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. 1988. Т. 65, № 6. С. 1281-1285.
12. Wong K.P., Tanford C. Denaturation of bovine carbonic anhydrase B by guanidine hydrochloride. A process involving separable sequential conformational transitions. // J. Biol. Chem. 1973 Dec 25; 248(24):8518-23.



**Исследование фотоагрегации белков
при воздействии излучения ХеСІ-лазера**

*Л. В. Соустов, Е. В. Челноков, Н. М. Битюрин, В. В. Немов,
Т. А. Яхно, Ю. В. Сергеев, М. А. Островский*

Препринт №

**Нижний Новгород
2002**

*Л.В. Соустов (1), Е.В. Челноков (1), Н.М. Битюрин (1), В.В. Немов (2),
Т.А. Яхно (1), Ю.В. Сергеев (3), М.А. Островский (4).*

- 1 – Институт прикладной физики РАН г. Нижний Новгород,
2 – Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика
И.Н. Блохиной,
3 – Национальный институт глаза Национального института здоровья
США,
4 – Институт биохимической физики РАН г. Москва.*

*L.V. Soustov (1), E.V. Chelnokov (1), N.M. Bityurin (1), V.V. Nemov (2),
T.A. Yahno (1), Yu.V. Sergeev (3), M.A. Ostrovsky (4)*

- 1 – Institute of Applied Physics RAS Nizhny Novgorod,
2 – Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod
3 – National Eye Institute of NIH, USA,
4 – Institute of Biochemical Physics RAS Moscow.*