

УДК 577.3.535-31

ФОТОАГРЕГАЦИЯ ВОДОРАСТВОРИМОГО БЕЛКА  
(КАРБОУАНГИДРАЗЫ) ПОД ДЕЙСТВИЕМ  
УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ХеСІ-ЛАЗЕРА© 2003 г. Л. В. Соустов, Е. В. Челноков, Н. М. Битюрин,  
В. В. Немов, Ю. В. Сергеев, академик М. А. Островский

Поступило 30.10.2002 г.

В основе молекулярного механизма возникновения и развития некоторых форм катаракты, в том числе фотокатарактогенеза, лежат повреждение и агрегация основных водорастворимых белков хрусталика глаза –  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -кристаллинов [1–4]. Повреждающее действие света на эти белки и на целый хрусталик в значительной мере имитирует те изменения, которые наблюдаются при развитии старческой катаракты – одной из наиболее распространенных форм катаракты [5]. Подробное исследование механизмов УФ-индуцированного повреждения и агрегации растворов кристаллинов следует рассматривать как удобную модель для изучения процессов помутнения хрусталика, в первую очередь вызванного ультрафиолетовым излучением.

В настоящей работе представлено экспериментальное исследование и теоретическое описание кинетики УФ-индуцированной агрегации модельного водорастворимого белка – карбоангидразы. В процессе облучения эксимерным лазером (308 нм) раствора карбоангидразы нами снимались кинетические кривые зависимости интенсивности рассеяния пробного пучка от дозы УФ-облучения. Этот белок представляет собой мономер с молекулярной массой ( $M_m = 29$  кДа), близкой к  $\gamma$ - ( $M_m = 19$  кДа) и некоторым формам  $\beta$ -кристаллинов ( $M_m = 23$ – $29$  кДа), а поведение кинетической кривой близко к аналогичным зависимостям для  $\gamma$ - и  $\beta$ -кристаллинов [6, 7].

В известных нам работах УФ-облучение проводилось при фиксированной плотности энергии световых импульсов  $w$  и при постоянной частоте повторения  $F$ . Конкретной целью настоящей работы явилось исследование действия УФ-излучения на белок в широком диапазоне изменений  $w$  и  $F$ . Это позволило получить информацию о динамике образования высокомолекулярных комплексов (сшивок) и обнаружить сильную зависимость вероятности их образования от  $w$  и  $F$ . На основании полученных результатов построена физическая модель агрегации белка, индуцированной УФ-облучением. Здесь предполагается, что агрегация белка вызвана взаимодействием модифицированных светом молекул, и определены некоторые характерные параметры этого процесса.

В качестве пробного пучка использовалось излучение одномодового HeNe-лазера ( $\lambda = 633$  нм). Оптическая схема установки [8, 9] отличалась от тех, которые использовались ранее. Во-первых, измерение интенсивности рассеяния пробного пучка проводилось методом темного поля [10], который позволял регистрировать абсолютное значение рассеянной мощности. Во-вторых, одновременно с этим измерялась энергия прошедших через кювету импульсов эксимерного лазера. Сразу за кюветой находился измеритель с большой апертурой, который регистрировал увеличение поглощения излучения 308 нм в растворе белка. Часть прошедшей через кювету энергии лазерных импульсов направлялась на УФ-фотодиод с входной апертурой диаметром 1 мм, который находился на расстоянии 4 м от кюветы. При этом УФ-фотодиод регистрировал изменение сигнала, обусловленное совместным влиянием поглощения и рассеяния излучения 308 нм в кювете с белком. Такая схема позволила регистрировать рассеяние излучения 308 нм при дозах на порядок меньших  $D^*$ , характерных для начала рассеяния излучения HeNe-лазера. До и после УФ-облучения карбоангидразы различными дозами снимались оптические спектры пропускания и молекулярно-массовое распределение (ММР). Коэффициент поглощения  $\alpha$  раствора карбоангидразы с

*Институт прикладной физики  
Российской Академии наук,  
Нижегород*  
*Нижегородский научно-исследовательский  
институт эпидемиологии и микробиологии  
им. И.Н. Блохиной*  
*Национальный институт глаза Национального  
института здоровья, Вашингтон, США*  
*Институт биохимической физики  
им. Н.М. Эмануэля  
Российской Академии наук, Москва*

**Таблица 1.** Результаты обработки кинетических кривых при разных значениях  $w$  и  $F$ .

Плотность энергии лазерных импульсов $w$ , мДж/см <sup>2</sup>	Частота повторения лазерных импульсов $F$ , Гц	УФ-доза, с которой начинается рассеяние пучка HeNe-лазера, $D^*$ , Дж/см <sup>2</sup>	Крутизна кинетической кривой, мВт · см <sup>2</sup> /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	0.005
	0.5	200	0.006
	1.0	200	0.014

концентрацией 0.5 мг/мл в диапазоне интенсивностей УФ-излучения  $w = (2-300)$  мДж/см<sup>2</sup> оказался равным  $6 \cdot 10^{-2}$  см<sup>-1</sup> и оставался постоянным во всем диапазоне изменений  $w$ , что свидетельствует об отсутствии нелинейного, прежде всего двухфотонного поглощения. При такой величине  $\alpha$  и при максимальном значении используемой в экспериментах величины  $w = 300$  мДж/см<sup>2</sup> нагрев раствора белка за один импульс составлял  $\Delta T_1 = 1.6 \cdot 10^{-3}$ °С, а нагрев раствора в процессе облучения не превышал  $\Delta T = 2$ °С. Облучение проводилось при комнатной температуре ( $23 \pm 2$ )°С.

Поведение кинетических кривых приведено на рис. 1. Видно, что для каждого значения  $w$  существует свое характерное значение  $F^*$ , ниже которого происходит существенное увеличение  $D^*$ , что свидетельствует о резком уменьшении вероятности сшивок. Кроме того, значение  $D^*$  зависит от величины  $w$ : при увеличении  $w$  параметр  $D^*$  уменьшается. Результаты обработки кинетических кривых приведены в табл. 1. Отметим, что ранее [11] похожая зависимость  $D^*(w)$  наблюдалась при фотоагрегации хрусталика глаза свиньи под воздействием излучения 308 нм, в то время как при воздействии на хрусталик излучением 266 нм, когда превалировали процессы фотолиза, наблюдалась  $D^*(w) \approx \text{const}$ .

На рис. 1 вместе с кинетическими кривыми приведены сигналы, снимаемые с измерителя энергии (кривая 1) и УФ-фотодиода (кривая 2). При малых дозах эти кривые совпадают, а начиная с  $D \sim 20$  Дж/см<sup>2</sup>, сигнал с УФ-фотодиода спа-

дает 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 с УФ-пучка. 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  $\lambda = 308$  нм и с  $\lambda = 633$  нм является рэлеевским, т.е. в обоих случаях выполняется условие  $d \ll \lambda$ , где  $d$  – размер рассеивающих частиц (радиус молекулы карбоангидразы 2.36 нм [12]). На рис. 2 приведены ММР белка, облученного различными УФ-дозами. На хроматограмме исходного образца выявляется основная фракция мономерных молекул и димерные формы. При  $D = 0.1D^*$  доля димерной фракции растет и появляются олигомерные формы. При  $D = D^*$  этот процесс продолжается и появляется фракция в области эксклюзионного предела колонки (с  $M_m = 2000$  кДа и более), представленная высокомолекулярными белковыми агрегатами. Содержание таких агрегатов, в том числе форм с кажущейся  $M_m$  более 2000 кДа, растет при дозе  $1.5D^*$ .

Измерения спектров поглощения раствора белка показали, что в диапазоне длин волн от 200 до 600 нм пропускание монотонно уменьшается с ростом дозы УФ-облучения (рис. 3). Спектр приведенного поглощения оказался аналогичным полученному в [1] для УФ-облученной водорастворимой фракции хрусталика глаза быка.

Полученные результаты можно объяснить, если предположить, что агрегация происходит при взаимодействии двух молекул белка, каждая из которых активирована при поглощении кванта падающего излучения. При этом примем во внимание, что в активированном состоянии молекула может находиться лишь конечное время. Мы ограничимся рассмотрением только процесса образования димеров, полагая, что именно их накопление определяет увеличение рассеяния в растворе белка. Запишем уравнения, описывающие эти процессы:

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

где  $R$  – концентрация активированных молекул,  $N$  – концентрация димеров,  $k$  – константа скорости уменьшения концентрации активированных молекул в парных процессах,  $\beta$  – вероятность образования димера,  $\tau$  – характерное время жизни молекул в активированном состоянии,  $\mathfrak{K}$  – источник активированных молекул.

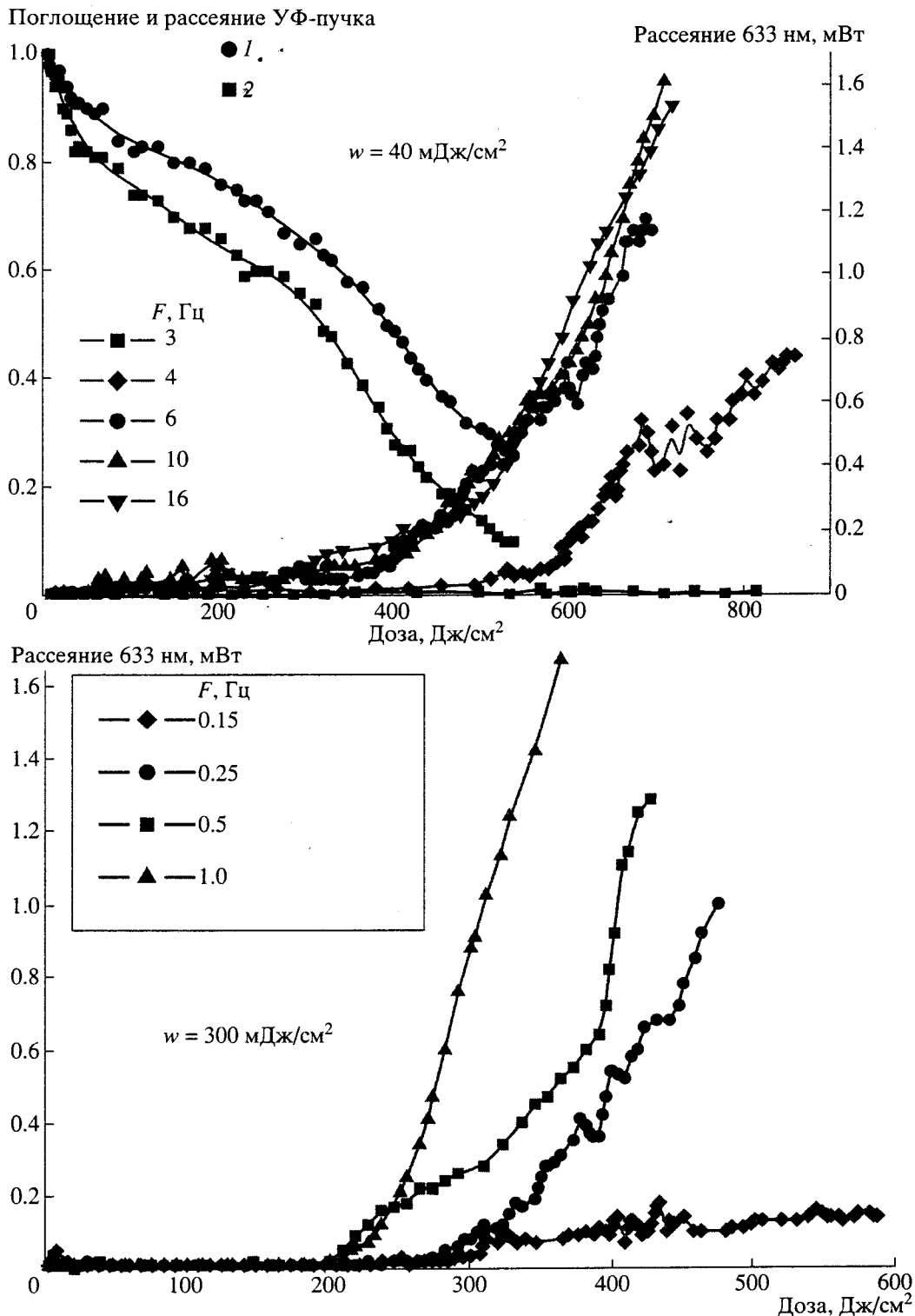


Рис. 1. Кинетические кривые при разных плотностях энергии лазерных импульсов и частотах их повторения и характеристика поглощения и рассеяния УФ-пучка. 1 – сигнал с измерителя энергии, 2 – сигнал с УФ-фотодиода.

В случае непрерывного УФ-воздействия систему (1) можно записать в виде:

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

где  $C_0$  – концентрация молекул мономера,  $\eta$  – квантовый выход образования активированных молекул,  $\sigma$  – эффективное сечение поглощения,  $I$  – интенсивность излучения,  $\hbar \omega$  – энергия кванта излучения.

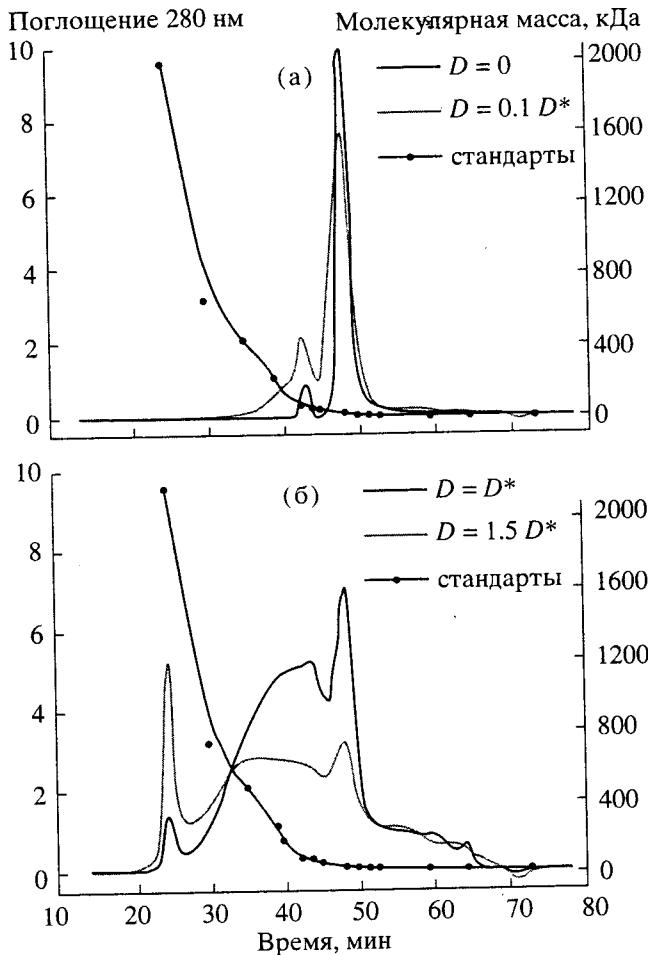


Рис. 2. Молекулярно-массовые распределения до и после облучения разными дозами и калибровочная кривая (а, б).

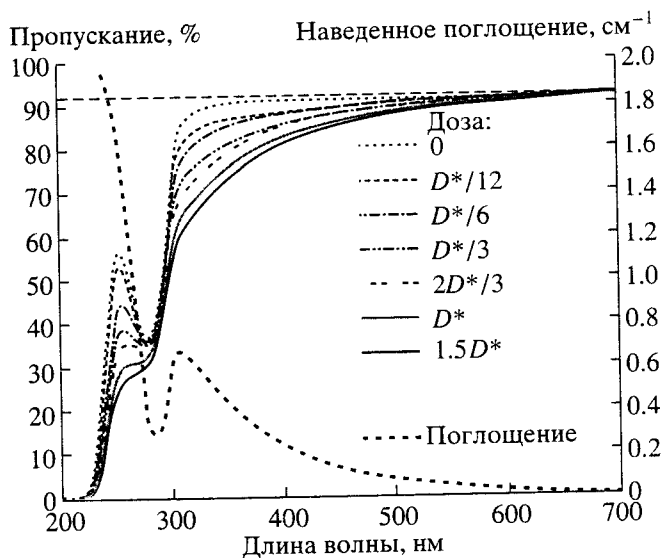


Рис. 3. Оптические спектры пропускания и спектр наведенного поглощения после облучения  $D = 1.5D^*$ .

Для стационарной концентрации активированных молекул ( $dR/dt = 0$ )

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

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

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

$$D^* = D_0 \frac{I/I_0}{(\sqrt{1 + I/I_0} - 1)^2}, \quad (3)$$

$$\text{где } I_0 = \frac{\hbar \omega}{4k\tau^2 \eta \sigma C_0}; \quad D_0 = 16 \frac{N^* \hbar \omega}{\beta \eta \sigma C_0}.$$

В предельных случаях: 1)  $\frac{I}{I_0} \ll 1$ ,  $D^* = 4D_0 \frac{I_0}{I}$ ,  
2)  $\frac{I}{I_0} \gg 1$ ,  $D^* = D_0 = \text{const.}$

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.

В случае импульсного воздействия источник активированных молекул – периодическая функция времени  $\mathfrak{R} = \mathfrak{R}(t - nT)$ , где  $n$  – целое число,  $T = F^{-1}$ . Систему (1) будем решать для условий описанных выше экспериментов. При концентрации раствора  $10^{16} \text{ см}^{-3}$  (0.5 мг/мл) время между столкновениями молекул белка составляет  $\sim 10^{-5}$  с, которое много больше длительности лазерного импульса ( $3 \cdot 10^{-8}$  с). Поэтому за время лазерного импульса димеры не успевают образоваться и за источник активированных молекул в (1) можно принять их текущую концентрацию  $R_0$ . При этом систему (1) можно записать в виде:

$$\frac{dR}{dt} = -kR^2 - \frac{R}{\tau}, \quad \frac{dN}{dt} = \beta kR^2. \quad (4)$$

В стационарном режиме концентрация  $R$  ведет себя пилообразно и сразу после импульса равна  $(R_p + R_s)$ , где  $R_p = \eta \sigma C_0 \frac{w}{\hbar \omega}$ . К началу каждого следующего импульса она опускается до некоторого

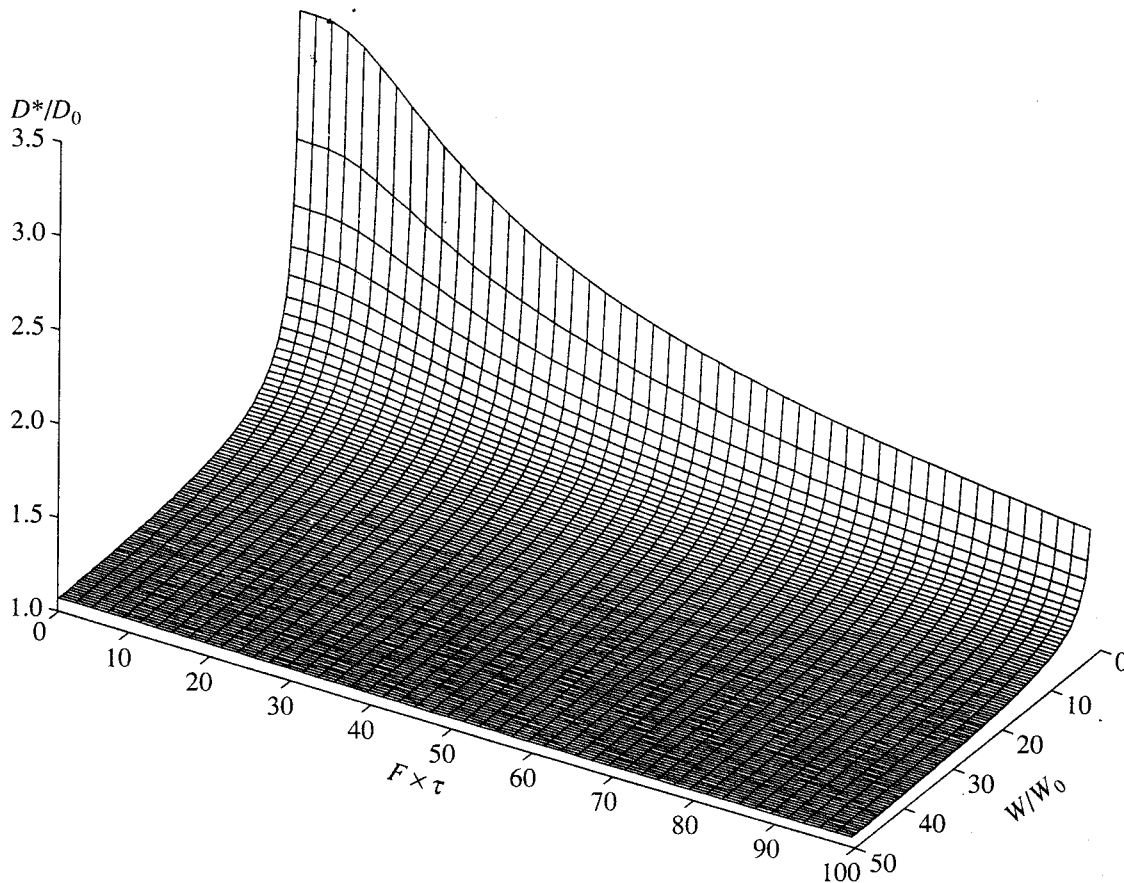


Рис. 4. Зависимость дозы начала рассеяния излучения пробного пучка (633 нм) от плотности энергии в импульсе  $w$  и частоты повторения  $F$ .

постоянного значения  $R_s$ . При этом прирост концентрации димеров составляет

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

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

Стационарное значение  $R_s$  получено из условия, что к началу следующего импульса концентрация становится такой же, как и перед предыдущим. Считая, что рассеяние наступает при достижении концентрации димеров некоторой величины  $N^*$ , можно записать:

$$D^*(w, F) = D_0 \frac{w/w_0}{\left( w/w_0 - \ln \left( 1 + \frac{2 \cdot w/w_0}{1 - w/w_0 + (w/w_0 + 1) \cdot Z} \right) \right)}, \quad (5)$$

где

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

$$Z = \sqrt{1 + \frac{4 \cdot w/w_0}{(w/w_0 + 1)^2 \left( \exp\left(\frac{1}{F\tau}\right) - 1 \right)}}.$$

Описываемая выражением (5) трехмерная зависимость представлена на рис. 4. Из рисунка видно, что при увеличении  $w$  величина  $D^*$  уменьшается, стремясь к постоянному уровню  $D_0$ , а при уменьшении  $w$  величина  $D^*$  неограниченно возрастает. Такое поведение – аналог зависимости  $D^*$  от интенсивности непрерывного излучения. При увеличении  $F$  величина  $D^*$  уменьшается и ограничена снизу той же величиной  $D_0$ , что и для зависимости  $D^*(w)$ , а уменьшение  $F$  приводит к увеличению  $D^*$ . Для получения наилучшего совпадения теоретических и экспериментальных зависимостей был произведен подбор параметров в уравнении (5). В результате этого получены следующие оценки величин, использовавшихся в модели:  $D_0 \sim 2 \cdot 10^2$  Дж/см<sup>2</sup>,  $\tau = (10-100)$  с,  $\eta \sim 3 \cdot 10^{-8}$ ,

$N^*/\beta \sim 10^{12} \text{ см}^{-3}$ . В приведенной физической модели фотоагрегации для простоты изложения рассмотрены только процессы образования димеров. Такая упрощенная модель позволяет на качественном уровне объяснить полученные нами результаты.

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

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 00-02-16411-а, 02-04-49342-а, 02-02-17745, 02-04-49923), программы поддержки научных школ (грант 00-15-97827) и программы Президиума РАН "Фундаментальные науки – медицине".

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Корхмазян М.М., Федорович И.Б., Островский М.А. // Биофизика. 1983. Т. 28. С. 966–967.
2. Ельчанинов В.В., Федорович И.Б. // Биофизика. 1989. Т. 34. С. 758–762.
3. Ельчанинов В.В., Федорович И.Б. // Биофизика. 1990. Т. 35. С. 200–204.
4. Островский М.А., Федорович И.Б., Ельчанинов В.В., Кривандин А.В. // Сенсор. системы. 1994. Т. 8. № 3/4. С. 135–146.
5. Krivandin A.V., L'vov Yu.M., Ostrovsky M.A. et al. // Exp. Eye Res. 1989. V.49. P.853–859.
6. Borkman R.F., Knight G., Ohi B. // Exp. Eye Res. 1996. V. 62. P. 141–148.
7. Ostrovsky M.A., Sergeev Y.V., Atkinson D.L. et al. // Mol. Vision. 2002. V. 8. P. 72–78.
8. Соустов Л.В., Челноков Е.В., Битюрин Н.М. и др. // Препр. № 599. ИПФ РАН. Н. Новгород, 2002. 19 с.
9. Soustov L.V., Chelnokov E.V., Bityurin N.M. et al. // Proc. SPIE (in print).
10. Бубис Е.Л., Варьгин В.В., Кончалина Л.Р., Шилов А.А. // Оптика и спектроскопия. 1988. Т. 65. № 6. С. 1281–1285.
11. Bityurin N.M., Muraviov S.V.; Kamensky V.A. et al. // Proc. SPIE. 2000. V. 4161. P. 1–11.
12. Wong K.P., Tanford C. // J. Biol. Chem. 1973. V. 248. № 24. P. 8518–8523.