

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ АГРЕГАЦИИ КРИСТАЛЛИНОВ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ИМПУЛЬСНЫМ ЛАЗЕРНЫМ УФ-ИЗЛУЧЕНИЕМ 308 нм

© 2008 г. Л.В. Соустов, Е.В. Челноков, Н.В. Сапогова, Н.М. Битюрин, В.В. Немов*, Ю.В. Сергеев**, М.А. Островский***

Институт прикладной физики РАН, 603950, Нижний Новгород, ул. Ульянова, 46;

**Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. И.Н. Блохиной, 603950, Нижний Новгород, ул. Грузинская, 44;*

***Национальный институт глаза Национального института здоровья США, 31 Center Drive MSC 2510 Bethesda, MD 20892–2510;*

****Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4*

Поступила в редакцию 06.11.07 г.

В обзоре приведены и проанализированы результаты исследований и фотоагрегации основных белков хрусталика глаза α -, β -, и γ -кристаллинов и модельного белка – карбоангидразы при воздействии на них импульсным излучением Хе-С1 лазера с длиной волны, равной 308 нм, в широком диапазоне изменения плотности энергии световых импульсов w и частоты их повторения F . Показана нелинейная зависимость скорости агрегации от значений этих параметров, а также от концентрации белка в растворе. Предложена теоретическая модель агрегации, которая на качественном уровне объясняет экспериментальные результаты. Проанализирована агрегация β -кристаллина A3tr, у которого была удалена часть N-концевой аминокислотной последовательности. Установлено, что потеря концевой части белка при мутации и старении хрусталика может увеличивать тенденцию β -кристаллина к агрегации при УФ-облучении, повышая предрасположенность хрусталика к возрастной катаракте. Рассмотрено влияние некоторых короткоцепочечных пептидов на скорость агрегации β -кристаллина и его смеси с α -кристаллином. На основе этого создана комбинация пептидов («новый препарат»), которая наиболее эффективно замедляет агрегацию кристаллинов. Этот препарат испытан на экспериментальных животных. Получен положительный эффект в замедлении развития УФ-индуцированной катаракты у крыс. Обсуждается возможность создания средства для профилактики развития катаракты у человека на основе нового препарата.

Ключевые слова: кристаллины хрусталика глаза, фотоагрегация, короткоцепочечные пептиды.

Хрусталик глаза человека и позвоночных животных на 90% состоит из α -, β - и α -кристаллинов. Содержание этих белков в хрусталике примерно одинаково, однако они существенно отличаются по структуре и по молекулярной массе.

Воздействие различных денатурирующих факторов, например, ультрафиолетового излучения или высоких температур, способно вызывать агрегацию кристаллинов. В результате агрегации образуются крупные светорассеивающие конгломераты, которые приводят к помутнению хрусталика, т. е. к развитию катаракты [1–6]. Такие процессы фотоагрегации характерны при воздействии на белки мягкого УФ-излучения, а при воздействии излучения более коротковолнового диапазона превалируют процессы фотолиза, что, в частности, было пока-

зано в работе [7] при воздействии на хрусталик глаза свиньи излучением с длинами волн, равными 308 или 266 нм.

Катаракта является наиболее распространенной причиной потери зрения. В настоящее время во всем мире около 20 млн человек страдают катарактой, а ее удельный вес в структуре глазной заболеваемости по данным Всемирной организации здравоохранения составляет 42% [8]. Для лечения этой патологии используются хирургические методы – удаление помутневшего хрусталика и имплантация эластичной интраокулярной линзы. Эти методы хорошо разработаны, однако и они не лишены некоторых недостатков, которые подробно описаны в работе [8]. Проблемы могут возникать как в процессе хирургического вмешательства, так и в послеоперационный период. К ним, в

частности, относится возможность развития вторичной катаракты, проблемы аккомодации и астигматизма искусственного хрусталика. В связи с этим весьма актуальной задачей остается поиск консервативных методов профилактики развития катаракты.

Причинами роста светорассеяния в хрусталике могут быть как внешние воздействия, так и генетические факторы. Одним из внешних факторов, приводящих к развитию возрастной катаракты, является воздействие на хрусталик УФ-излучения в диапазоне длин волн 290 – 320 нм [9,10]. Из этого диапазона солнечного излучения, достигающего поверхности земли ($2 \cdot 10^{-4}$ Вт/см²), на хрусталик глаза человека воздействует плотность мощности, равная 10^{-7} – 10^{-6} Вт/см² [11]. Если принять, что в году 240 солнечных дней, то получим оценку ежегодно экспонируемой на хрусталик средней дозы УФ-излучения около 10 Дж/см². В настоящей работе приведены результаты исследований агрегации кристаллинов при воздействии на них монохроматическим импульсным излучением с длиной волны 308 нм и с характерными значениями экспонируемых доз ~ 100 Дж/см². Излучение с длиной волны, равной 308 нм, слабо поглощается в исследованных белках, однако с уменьшением длины волны поглощение существенно возрастает, что может приводить к увеличению скорости их агрегации. Другое отличие результатов лабораторных экспериментов от результатов работы [11] состоит в том, что в хрусталике имеются метаболические системы, защищающие его от внешних воздействий. По этим причинам приведенные здесь эксперименты *in vitro* надо рассматривать в основном как моделирование воздействия повреждающего УФ-излучения на хрусталик глаза *in vivo*. В то же время, как будет показано ниже, на основе таких модельных экспериментов получены результаты, представляющие интерес как для теории фотоагрегации белков, так и для практической медицины.

Рассеяние света может возникать также из-за потери клеточного порядка в хрусталике в результате нарушения его развития или бесконтрольного деления клеток, а также потери прозрачности отдельными клетками хрусталика. Мутантные кристаллины могут стать причиной появления наследственной катаракты из-за изменения стабильности, межмолекулярных взаимодействий или растворимости. В работах [12,13] проведено сравнение фотоагрегации рекомбинантного β -кристаллина А3 и мутантного укороченного β -кристаллина А3tr, у которого были удалены 16 аминокислотных остатков на N-конце. Установлено, что такие дефекты, наблюдающиеся в стареющих и в катарактальных

хрусталиках, повышают скорость фотоагрегации и тем самым увеличивают вероятность развития катаракты.

К настоящему времени в литературе практически отсутствует информация о молекулярных механизмах УФ-индуцированной агрегации кристаллинов. Решение такой задачи важно как для построения теоретической модели фотоагрегации кристаллинов, так и для целенаправленного поиска препаратов для профилактики развития катаракты. Определенным шагом в этом направлении можно считать результаты работ [14–17], в которых исследованы процессы агрегации модельного белка карбоангидразы при воздействии на него импульсным излучением Хе-С1 лазера с длиной волны 308 нм. Этот белок был выбран по той причине, что при воздействии на него излучением Хе-С1 лазера зависимости мощности рассеянного в кювете с раствором белка пробного пучка HeNe лазера (длина волны 633 нм) от УФ-дозы P(D) близки к аналогичным зависимостям для β L-кристаллина [4]. В известных нам работах исследование фотоагрегации белков проводилось при воздействии на них либо непрерывным излучением ртутной лампы [18–21], либо импульсным лазерным излучением при постоянных значениях плотности энергии световых импульсов w и частоты их повторения F [2–5]. В работах [14–17] исследована УФ-индуцированная агрегация карбоангидразы в широком диапазоне изменения w и F . Благодаря такому режиму УФ-облучения удалось обнаружить нелинейную зависимость скорости агрегации от значений w и F . Построена теоретическая модель фотоагрегации карбоангидразы, в которой было сделано предположение, что агрегация происходит при парном взаимодействии молекул белка, каждая из которых активирована путем поглощения кванта падающего УФ-излучения. При этом было принято во внимание, что в активированном состоянии молекула может находиться лишь конечное время. В модели рассмотрен только процесс образования димеров и полагалось, что именно их накопление определяет увеличение рассеяния пробного пучка в растворе белка. Такая модель позволила на качественном уровне объяснить полученные экспериментальные результаты. Отметим, что нелинейную зависимость скорости агрегации от значений w и F впервые наблюдали в работе [7] при облучении Хе-С1 лазером хрусталика глаза свиньи. Позднее нелинейную зависимость скорости агрегации от параметров УФ-облучения наблюдали в работе [6] при воздействии излучения Хе-С1 лазера на β -кристаллин, выделенный из хрусталика глаза быка, и на рекомбинантный β -кристаллин А3. а также в ра-

ботах [14–17] при исследовании фотоагрегации карбоангидразы. Как и в работе [23], β -кристаллин А3 был экспрессирован в клетках Sf9, инфицированных бакуловирусом и содержащих кодирующую последовательность этого белка, и очищен с помощью ионообменной и гель-фильтрационной хроматографии.

Из белков хрусталика глаза наиболее подвержен агрегации γ -кристаллин, в меньшей степени – β -кристаллин [2,3,6], в то время как α -кристаллин обладает шаперонной активностью и замедляет агрегацию этих белков при воздействии как УФ-излучения, так и других денатурирующих факторов (температура, восстановители S-S-связей) [4,24]. Считается, что с возрастом шаперонная активность α -кристаллина ослабевает, что может являться одной из причин развития возрастной катаракты [25]. В связи с этим возможны несколько путей поиска препаратов, способных замедлять развитие катаракты. Во-первых, это поиск веществ, замедляющих агрегацию непосредственно γ - и β -кристаллинов, и, во-вторых, веществ, поддерживающих защитную активность α -кристаллина. В работе [26] в экспериментах *in vitro* показано, что D-пантетин и составляющие его компоненты замедляют скорость тепловой агрегации смеси β - и α -кристаллинов, положительно влияя на защитные свойства α -кристаллина. В работе [27] представлены результаты исследования свойств L-карнозина и его производного – N-ацетилкарнозина как антикатарактальных препаратов.

Далее мы приводим обзор и теоретический анализ полученных нами результатов исследований УФ-индуцированной агрегации карбоангидразы и некоторых типов β L-кристаллина, а также результаты подробных исследований фотоагрегации β L-кристаллина, полученные по методике, использовавшейся в [14–17]. Было установлено, что подобно карбоангидразе скорость агрегации β L-кристаллина тоже нелинейно зависит от значений w и F . Приводятся результаты исследований шаперонной активности α -кристаллина при УФ-индуцированной агрегации β -кристаллина. Анализируются результаты исследований некоторых короткоцепочечных пептидов на скорость фотоагрегации β L-кристаллина, смеси β L- и α -кристаллинов и смеси β L-, α - и γ -кристаллинов. Приводятся результаты исследований *in vitro* подобранной нами комбинации пептидов [28–30], защитные свойства которой оказались лучше, чем у D-пантетина, L-карнозина или N-ацетилкарнозина, на основе которых созданы средства, запатентованные как антикатарактальные препараты [31,32]. Созданная нами комбинация пепти-

дов была испытана *in vivo* на экспериментальных животных [33]. Получен положительный эффект в замедлении развития УФ-индуцированной катаракты у крыс. Полученные результаты позволяют считать, что созданная нами комбинация обладает шапероноподобной активностью. В дальнейшем мы будем называть эту комбинацию пептидов «новым препаратом».

Для теоретического описания результатов, полученных при лазерном облучении, и их связи с агрегацией белков при естественном солнечном освещении построена модель, в которой принято, что начальный процесс фотоагрегации происходит как при взаимодействии фотоактивированных молекул белка между собой, так и фотоактивированных молекул с исходными. Первый процесс доминирует при лазерном облучении, а второй – может преобладать при воздействии на хрусталик глаза естественного солнечного света. Важным параметром модели, от величины которого существенно зависит скорость фотоагрегации белков, является время темновой дезактивации (релаксации) фотоактивированного состояния белковой молекулы. Показано, что добавление некоторых короткоцепочечных пептидов и их комбинации оказывает существенное влияние на этот параметр и, соответственно, на скорость агрегации белков. Исползованная методика позволяет производить экспресс-отбор соединений, которые могут рассматриваться как потенциальные препараты для профилактики развития катаракты.

Обзор наших результатов по типу изложения построен как экспериментальная статья с традиционными разделами: «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение». Завершается обзор обобщенной теоретической моделью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали карбоангидразу, α -, β - и γ -кристаллины фирмы Sigma, США. Пептиды были получены от фирм Sigma и Nippon Chemicals Ltd., Япония. Белки в концентрации $C_0 = 0,5$ мг/мл растворяли в фосфатном буфере (0,15M NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 3 mM K_2HPO_4 , pH 7,2) и пропускали через мембранные фильтры с размерами пор 0,45 и 0,22 мкм (фирма Sartorius, Германия). Для устранения нерастворимых примесей пробирку с раствором центрифугировали 15 мин при комнатной температуре при ускорении 5000 g. После этого на дне пробирки оставляли некоторую часть раствора, которую не использовали при проведении экспериментов. β -Кристаллины А3 и А3tr были экспрессированы и очищены в Национальном институте глаза (NEI/NIH, USA)

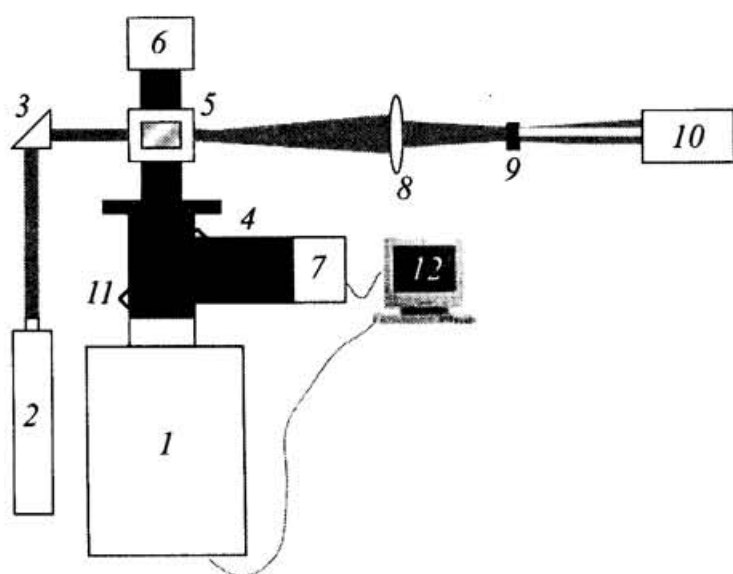


Рис. 1. Схема экспериментальной установки: 1 – Хе-С1 лазер 308 нм (LPX-208 Lambda Physik); 2 – He-Ne лазер 633 нм (10 мВт); 3 – призма; 4 – диаграмма; 5 – кварцевая кювета с раствором белка; 6, 7 – измерители энергии УФ-облучения; 8 – линза; 9 – экран; 10 – фотодиод; 11 – кварцевая пластина; 12 – система автоматизации.

по методике, описанной в [23,34–36]. Эти белки были разведены в фосфатно-солевом буфере (1хФСБ) рН 7,2, с добавлением 1 мМ дитиотреитола и 50 мкМ ТСЕР.

В качестве источника УФ-излучения использовали эксимерный импульсный Хе-С1 лазер LPX-200 (фирма Lambda Physik, Германия). Эксперименты проводили при температуре $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$, а нагрев раствора в процессе облучения не превышал 2°C , что контролировалось дистанционным термометром и соответствовало проведенным теоретическим расчетам. Для исследования динамики агрегации белков при УФ-облучении снимали зависимости мощности P пробного пучка, рассеянного в кювете с раствором белка, от величины УФ-дозы D (доза определена как $D = w \times F \pm t$, где t – время облучения). В качестве пробного пучка использовали излучение He-Ne лазера мощностью 10 мВт и расходимостью $1,1 \cdot 10^{-3}$ радиан. Одновременно с этим измеряли энергию импульсов излучения с длиной волны, равной 308 нм, прошедших через кювету. До и после облучения белков различными дозами регистрировали оптические спектры пропускания на спектрофотометре Specord M40 и молекулярно-массовые распределения с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для измерения молекулярно-массовых распределений использовали колонки Superose 12 10/30 HR (Pharmacia Biotech) и Superdex 75 10/30 HR (GE Healthcare, Piscataway, NJ) с детектированием при 280 нм. Колонка Superose 12 10/30 HR была прокалибрована молекулярно-массовыми стандартами:

голубой декстран 2000, тиреоглобулин, ферритин, каталаза, альдолаза, альбумин, овальбумин, химотрипсиноген, рибонуклеаза А, цитохром с, апротинин, витамин B_{12} (Pharmacia Biotech, Sigma). Хроматографию проводили в буфере: 25 мМ трис-НС1, 200 мМ NaCl, 3 мМ NaN_3 (рН 7,2). Перед хроматографией растворы белков пропускали через фильтр с минимальной сорбцией (PVDF) Millex®-GV с размерами пор 0,22 мкм. Для калибровки колонки Superdex 75 10/30 HR использовали молекулярно-массовые стандарты: бычий сывороточный альбумин, овальбумин, карбоангидразу, химотрипсиноген А, цитохром с, рибонуклеазу А и апротинин. Высота кварцевой кюветы с раствором белков составляла 10 мм, длина вдоль пучков He-Ne и Хе-С1 лазеров – 10 и 5 мм соответственно. Схема экспериментальной установки приведена на рис. 1.

Измерения рассеянной мощности пробного пучка P проводили, как и в работах [6,13–17], методом темного поля, что позволяло регистрировать абсолютные значения P . Энергию импульсов излучения Хе-С1 лазера регистрировали измерителем (7), на который получен патент [37], и поддерживали на постоянном уровне в процессе облучения раствора белка. Прошедшую через кювету (5) энергию излучения с длиной волны 308 нм измеряли приемником (6) ED-200 фирмы Gentec, Канада, а мощность рассеянного излучения с длиной волны, равной 633 нм, – фотодиодом (10). Сигналы с датчиков (6, 7, 10) непрерывно обрабатывались автоматизированной системой (12) с усреднением по заданному числу импульсов Хе-С1 лазера. Результаты обработки выводились на монитор в виде графиков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование УФ-индуцированной агрегации карбоангидразы и βL -кристаллина. При воздействии интенсивного лазерного излучения на растворы белков могут проявляться процессы, которые отсутствуют при воздействии на хрусталик глаза естественного солнечного света. Прежде всего это возможность нелинейного, например, двухфотонного поглощения лазерного излучения в растворах белков. Нами было измерено поглощение лазерного излучения в растворах исследованных белков с концентрациями 0,5 мг/мл в кювете длиной 5 см. Значение величины коэффициента поглощения составило около $5 \cdot 10^{-2} \text{ см}^{-1}$ и оставалось постоянным при изменении w от 2 до 300 мДж/см^2 , что свидетельствовало об отсутствии нелинейного поглощения. В наших экспериментах максимальное значение w составляло 300 мДж/см^2 , поэтому поглощение лазерного излучения белками

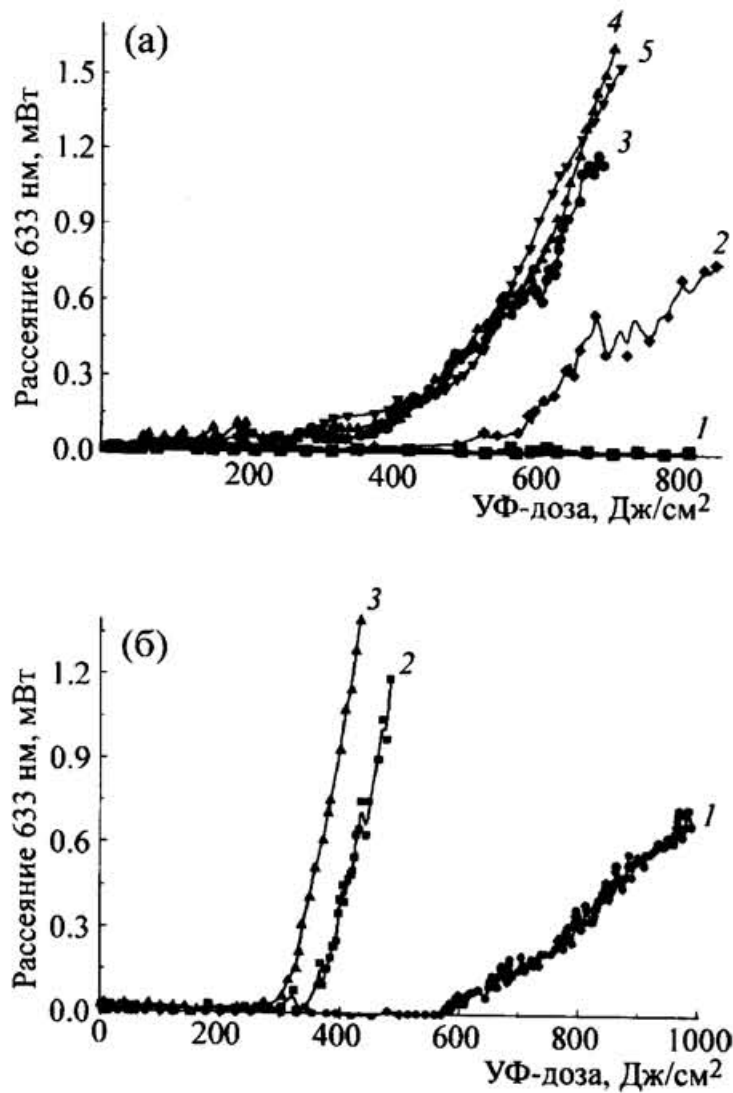


Рис. 2. Дозовые зависимости мощности рассеянного излучения 633 нм $P(D)$ в растворе карбоангидразы при разных значениях плотности энергии w лазерных УФ-импульсов и частотах их повторения F ; (а) — $w = 40$ мДж/см²; частота повторения: 1 — 3; 2 — 4; 3 — 6; 4 — 10; 5 — 16 Гц; (б) — $w = 84$ мДж/см²; частота повторения: 1 — 1; 2 — 2; 3 — 4 Гц.

было однофотонным, как и при воздействии света малой интенсивности в естественных условиях.

Рассеяние пробного пучка He-Ne лазера при различных параметрах УФ-облучения изучали на примере карбоангидразы. Зависимости рассеянной мощности от дозы облучения $P(D)$ для раствора карбоангидразы с концентрацией $C_0 = 0,5$ мг/мл, полученные при разных значениях плотности энергии лазерных импульсов w и частоты их повторения F , приведены на рис. 2.

Одним из основных параметров, характеризующих скорость агрегации, является величина дозы УФ-облучения, с которой начинается рост зависимости $P(D)$. Этот параметр мы будем обозначать как D^* . Из рисунка видно, что для каждого значения w существует свое характерное значение F^* , ниже которого происходит существенное увеличение параметра D^* .

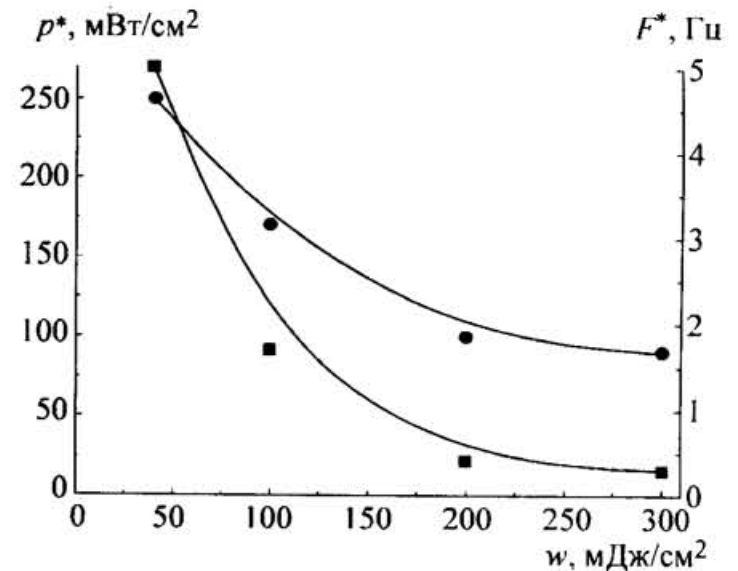


Рис. 3. Зависимости параметров плотности мощности p^* и частоты F^* для раствора карбоангидразы от плотности энергии w лазерных УФ-импульсов: 1 — $p^*(w)$; 2 — $F^*(w)$; $p^* = F^* \cdot w$.

Если при $w = 40$ мДж/см² величина D^* практически не меняется в диапазоне частот $F = 6 - 16$ Гц и составляет ~ 250 Дж/см², то при $F = 4$ Гц параметр $D^* \sim 400$ Дж/см², а при $F = 3$ Гц величина $D^* > 800$ Дж/см². Кроме того, при малых значениях F уменьшается угол наклона зависимостей $P(D)$. С другой стороны, при $F > F^*$ значение D и наклон кривых $P(D)$ перестают зависеть от величины F . Эти результаты свидетельствуют о том, что при $F < F^*$ существенно уменьшается эффективность агрегации молекул белка. На рис. 3–5 показаны зависимости $D^*(w)$, $D^*(F)$, $F^*(w)$ и средней интенсивности $p^*(w)$, где $p^* = F^* \times w$, которые демонстрируют нелинейную зависимость скорости агрегации карбоангидразы от режимов УФ-облучения. Отметим, что ранее [7] похожую зависимость $D^*(w)$ наблюдали при фотоагрегации хрусталика глаза свиньи под воздействием излучения с длиной волны ~ 308 нм, в то время как при воздействии на хрусталик излучением с длиной волны, равной 266 нм, когда преобладали процессы фотолиза, наблюдали $D^*(w) \approx \text{const}$.

Агрегация белка должна приводить к появлению в растворе образований с молекулярными массами, отличными от масс исходных молекул. Мы использовали гельфильтрацию, чтобы подтвердить это предположение. На рис. 6 приведены профили элюции исходного белка карбоангидразы и облученного УФ-дозой $D = 0,1D^*$, полученные на колонке Superose 12 10/30 HR. Видно, что пик с молекулярной массой ~ 58 кДа (димерная фракция) начинает увеличиваться и уширяться в сторону больших масс при дозе, которая не приводит к появлению рассеянного излучения пробного пучка 633 нм.

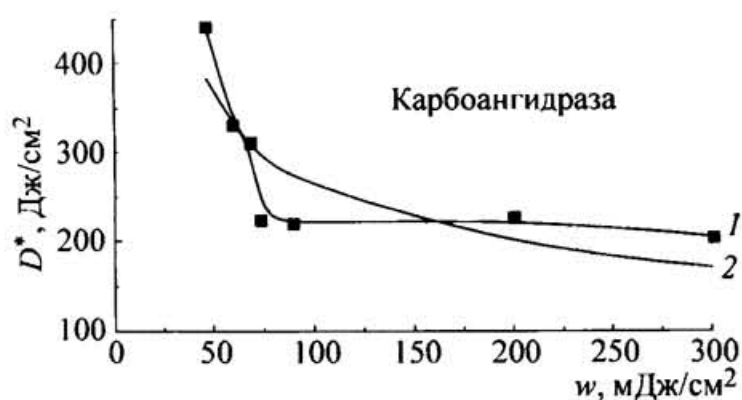


Рис. 4. Зависимости параметра D^* для раствора карбоангидразы от плотности энергии w лазерных УФ-импульсов: 1 – $F = 2$ Гц; 2 – теоретическое решение. По оси абсцисс – плотность энергии УФ-импульсов (w , мДж/см²).



Рис. 5. Зависимости параметра D^* для раствора карбоангидразы от частоты повторения F лазерных УФ-импульсов: 1 – $w = 70$ мДж/см²; 2 – теоретическое решение. По оси абсцисс – плотность энергии УФ-импульсов (F , Гц).

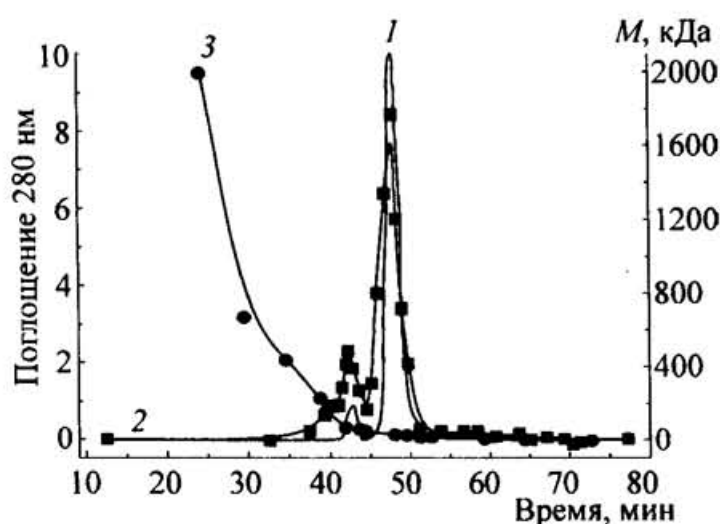


Рис. 6. Молекулярно-массовые распределения раствора карбоангидразы до (1) и после УФ-облучения (2), снятые на колонке Superose 12 10/30 HR при скорости потока 0,3 мл/мин, и калибровочная кривая (3); 1 – $D = 0$; 2 – $D = 0,1D^*$; 3 – стандарты. По оси ординат справа – молекулярная масса (M , кДа).

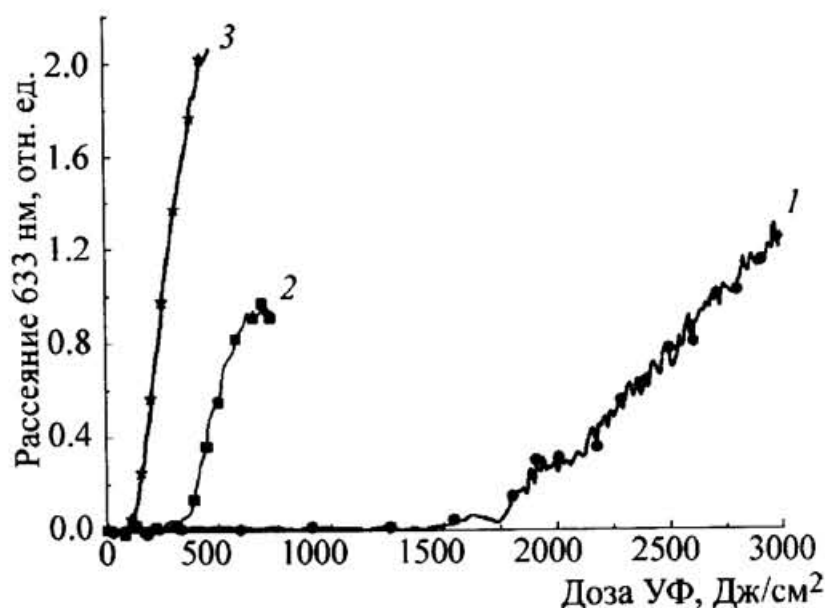


Рис. 7. Различная чувствительность α -, β - и γ -кристаллинов (кривые 1, 2, 3 соответственно) к фотоагрегации при действии УФ-излучения (308 нм, эксимерный лазер при плотности энергии импульсов $w = 2,5$ мДж/см² и частоте их повторения 50 Гц). Рисунок публикуется из работы [6] с разрешения редакции журнала «Molecular Vision».

В работе М.А. Островского и др. [6] приведено сравнительное исследование УФ-индуцированной агрегации α -, β - и γ -кристаллинов. Показано, что наименьшая скорость агрегации у α -кристаллина, больше у β -кристаллина и еще больше у γ -кристаллина (рис. 7). Эти данные согласуются с полученными ранее результатами [2]. В той же работе [6] установлено, что при воздействии импульсного излучения Хе-С1 лазера динамика агрегации β -кристаллина, выделенного из хрусталика глаза быка, мало отличается от динамики агрегации рекомбинантного β -кристаллина АЗ.

Нами была исследована агрегация раствора β -кристаллина АЗ при различных его концентрациях C_0 (рис. 8) [22]. Из рисунка видно, что скорость агрегации сильно зависит от C_0 . Если при $C_0 = 0,8$ мг/мл и 1,0 мг/мл скорость агрегации выходит практически на стационарный уровень и при этих концентрациях $D^* \sim 50$ Дж/см², то при $C_0 = 0,2$ мг/мл величина $D^* > 1000$ Дж/см². Таким образом, уменьшение концентрации белка всего в четыре раза приводит к уменьшению скорости агрегации более чем в 20 раз. Зависимость $D^*(C_0)$ приведена на рис. 9.

На рис. 10а приведены зависимости $P(D)$, полученные при воздействии излучения Хе-С1 лазера на β -кристаллины с концентрациями, равными 0,8 мг/мл, при значениях $w = 2,5$ мДж/см и $F = 50$ Гц, а на рис. 10б – при действии этого излучения на β -кристаллины с

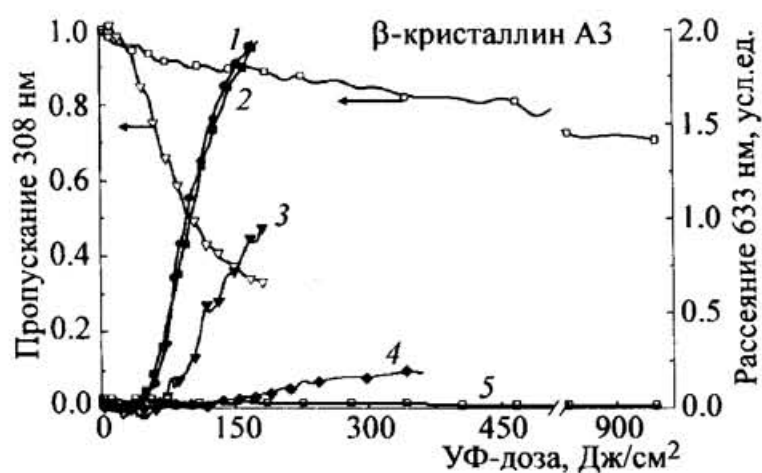


Рис. 8. Дозовые зависимости мощности рассеянного излучения 633 нм $P(D)$ и пропускания 308 нм при различных концентрациях β -кристаллина АЗ (C_0 , мг/мл), облученного при $w = 75$ мДж/см² и $F = 2$ Гц: 1 – 1; 2 – 0,8; 3 – 0,6; 4 – 0,4; 5 – 0,2 мг/мл.

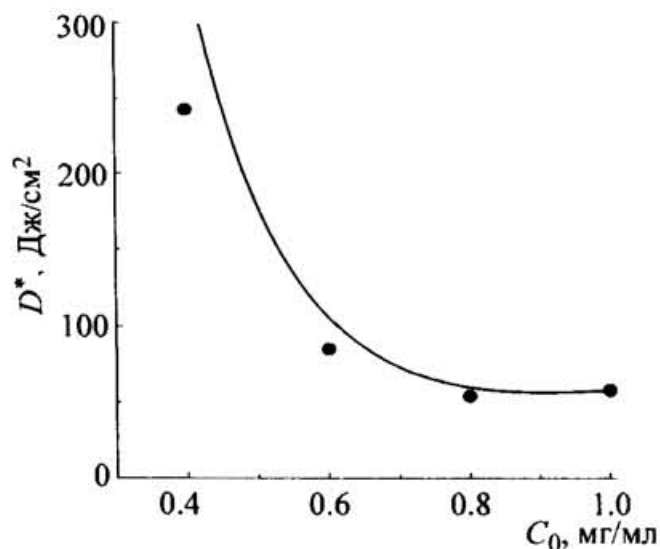


Рис. 9. Зависимость параметра D^* от концентрации раствора β -кристаллина АЗ (C_0 , мг/мл) при воздействии лазерными УФ-импульсами с плотностью энергии $w = 75$ мДж/см и частотой повторения $F = 2$ Гц.

концентрациями, равными 0,5 мг/мл, и при $w = 75$ мДж/см и $F = 2$ Гц [6]. Из этих рисунков видно существенное различие параметров D^* . Если в первом случае $D^* \sim 250$ Дж/см², то во втором – $D^* \sim 60$ Дж/см². Это свидетельствует о том, что во втором случае скорость фотоагрегации белков значительно выше. Такое различие значений D^* (как и наблюдавшееся нами ранее в работе [7]) можно объяснить нелинейной зависимостью скорости агрегации от значения w , поскольку во втором случае величина w намного больше, чем в первом случае.

На рис. 11 приведены профили элюции исходного и облученного при значениях $w = 75$ мДж/см и $F = 2$ Гц различными УФ-дозами

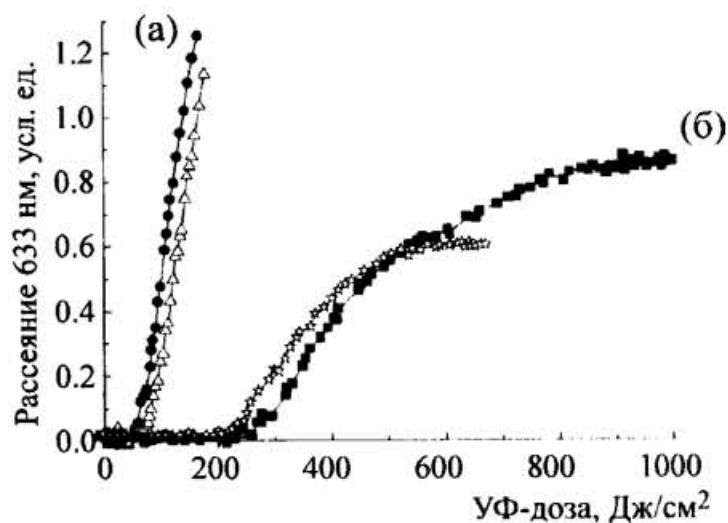


Рис. 10. Дозовые зависимости мощности рассеянного излучения с длиной волны, равной 633 нм, $P(D)$ для раствора β -кристаллинов с концентрацией $C_0 = 0,5$ мг/мл, облученных при $w = 75$ мДж/см² и $F = 2$ Гц ((а) – $\gamma\beta$ АЗ; β L), и с концентрацией $C_0 = 0,8$ мг/мл, облученных при $w = 2,5$ мДж/см² и $F = 50$ Гц ((б) – β L; $\gamma\beta$ АЗ). Рисунок публикуется из работы [6] с разрешения редакции журнала «Molecular Vision».

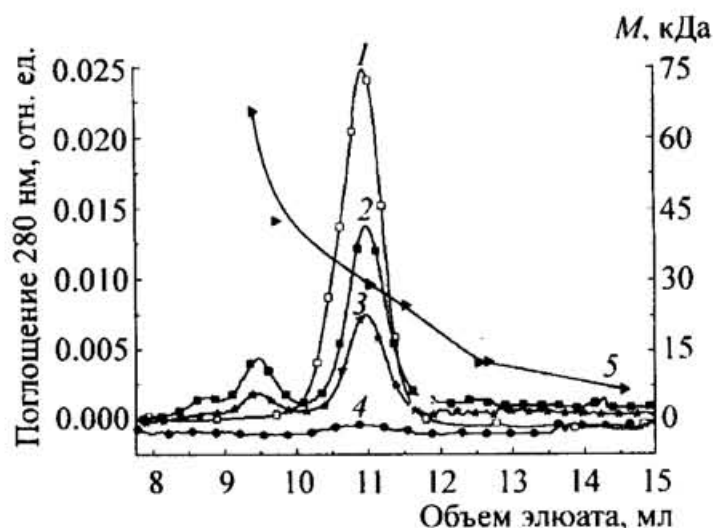


Рис. 11. Хроматографические профили исходного и облученного при $w = 75$ мДж/см² и $F = 2$ Гц различными УФ-дозами β -кристаллина АЗ (1 – 0; 2 – 26; 3 – 50; 4 – 170 мДж/см²; 5 – стандарты), снятые на колонке Superdex 75 10/30 HR при скорости потока 0,5 мл/мин. Рисунок публикуется из работы [6] с разрешения редакции журнала «Molecular Vision». По оси ординат справа – молекулярная масса (M , кДа).

β -кристаллина АЗ, снятые на колонке Superdex 75 10/30 HR при скорости потока 0,5 мл/мин [6]. Видно монотонное уменьшение основного пика с ростом УФ-дозы и формирование пика с молекулярной массой, величина которой вдвое больше, чем у исходного белка. Как и при облучении карбоангидразы, приведенные на рис. 11 профили элюции β -кристаллина АЗ показывают, что образование агрегатов проис-

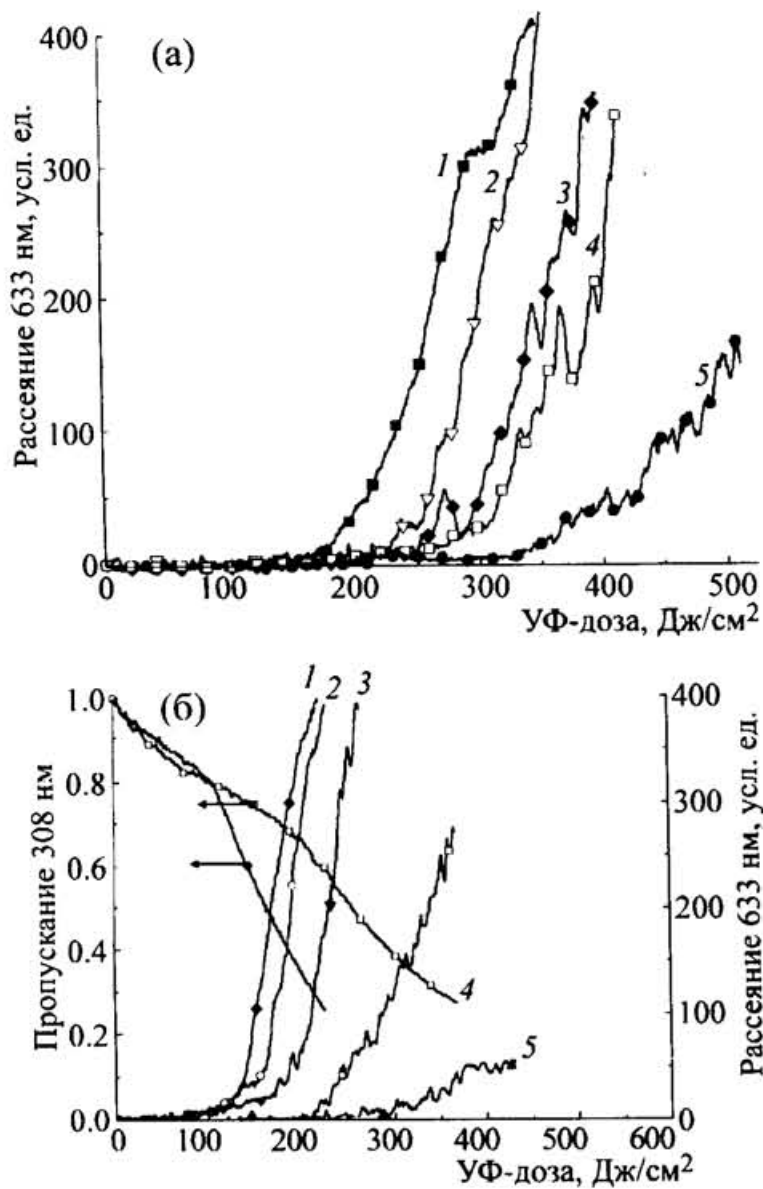


Рис. 12. Дозовые зависимости мощности рассеянного излучения с длиной волны, равной 633 нм $P(D)$ для раствора β L-кристаллина при разных плотностях энергии w и разных частотах повторения F лазерных УФ-импульсов: (а) – $w = 40$ мДж/см²; F , Гц: 1 – 9; 2 – 6; 3 – 4; 4 – 3; 5 – 2; (б) – $w = 75$ мДж/см²; F , Гц: 1 – 4; 2 – 2; 3 – 1,5; 4 – 1; 5 – 0,7. На рис. (б) показано изменение пропускания через кювету с раствором белка излучения с длиной волны, равной 308 нм.

ходит до начала рассеяния пробного пучка при 633 нм.

При изучении УФ-облученного β -кристаллина АЗ, проведенного с помощью молекулярной хроматографии, SDS-PAGE (электрофореза в полиакриламидном геле) и вестерн-блот анализа, выявили наличие двух процессов, происходящих в растворе белка [6]. Первый – это агрегация белка, при которой в результате модификации УФ-облучением сначала образуются агрегаты с массой вдвое большей, чем у исходного белка, второй – образование высокомолекулярных соединений. Этот процесс превалирует на начальных стадиях УФ-облучения, а при достаточно больших УФ-дозах начинает превалировать другой процесс – фотолиз, т. е.

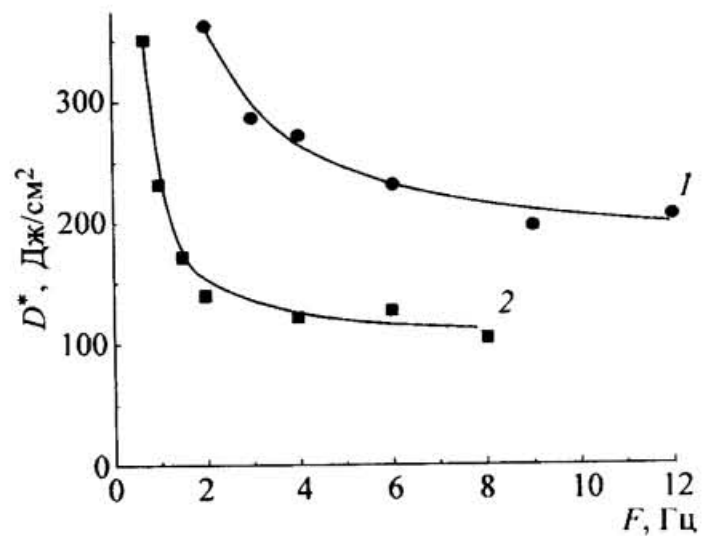


Рис. 13. Теоретические (сплошные кривые) и экспериментальные зависимости (1 – 40 мДж/см²; 2 – 75 мДж/см²) УФ-дозы $D^*(F, w = \text{const})$ для раствора β L-кристаллина с концентрацией $C_0 = 0,5$ мг/мл. по оси абсцисс – частота повторения УФ-импульсов (F , Гц).

уменьшение молекулярной массы белковых молекул из-за разрыва пептидных связей.

Нами была подробно исследована УФ-индуцированная агрегация β L-кристаллина [22] по методике, использовавшейся для изучения фотоагрегации карбоангидразы [14–17]. Зависимости $P(D)$ для раствора β L-кристаллина с концентрацией 0,5 мг/мл, полученные при разных значениях w и F , приведены на рис. 12а,б. Из рисунка видно, что, как и при фотоагрегации карбоангидразы, для каждого значения w существует свое характерное значение F^* , ниже которого происходит существенное увеличение параметра D^* , а при $F > F^*$ значение D^* перестает зависеть от величины F . Если при $w = 75$ мДж/см² и при $F = 4$ Гц величина $D^* \sim 100$ Дж/см², то при том же значении w , но при $F = 0,7$ Гц величина $D^* \sim 300$ Дж/см². Эти результаты свидетельствуют о том, что при $F < F^*$ существенно уменьшается вероятность агрегации молекул белка. На рис. 13 показаны зависимости $D^*(F)$.

Были измерены зависимости $P(D)$ β L-кристаллина с $C_0 = 0,5$ мг/мл при $F = \text{const}$ и при различных значениях w (рис. 14). Если при больших значениях w поведение зависимостей $P(D)$ практически не зависит от этого параметра, то при его уменьшении (начиная с величины $w \sim 75$ мДж/см²) происходит рост D^* и уменьшение угла наклона кривых. Из результатов, приведенных на рис. 14, следует, что при $w = 75$ мДж/см значение $F^* \sim 2$ Гц. На рис. 15 приведена зависимость $D^*(w)$.

Приведенные здесь зависимости $P(D)$, $D^*(F)$ и $D^*(w)$ качественно совпадают с соответствующими результатами, полученными при исследовании

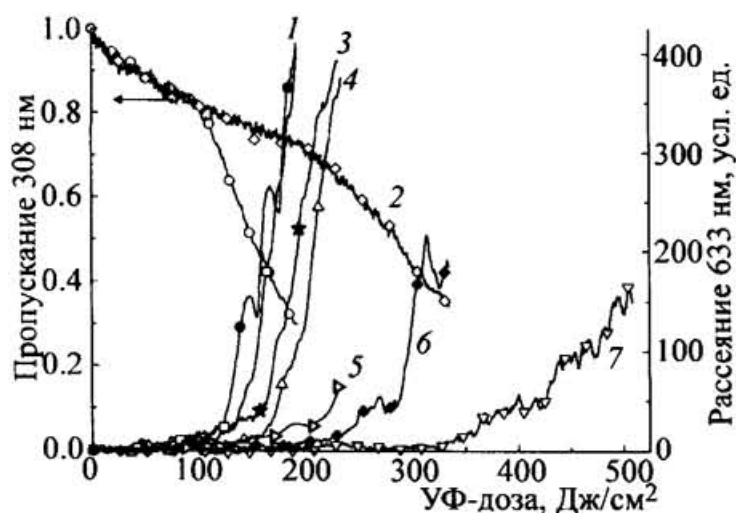


Рис. 14. Дозовые зависимости мощности рассеянного излучения 633 нм $P(D)$ для раствора β L-кристаллина с концентрацией $C_0 = 0,5$ мг/мл при постоянной частоте повторения $F = 2$ Гц и различных значениях плотности энергии w УФ-импульсов: 1 – 90; 2 – 80; 3 – 75; 4 – 70; 5 – 60; 6 – 50; 7 – 40 мДж/см². Показано изменение пропускания через кювету с раствором белка излучения с длиной волны 308 нм.

довании УФ-индуцированной агрегации карбоангидразы [14–17]. Это позволяет считать, что в первом приближении для описания процессов фотоагрегации β L-кристаллина также можно использовать упрощенную модель, согласно которой агрегация происходит при взаимодействии двух активированных светом молекул белка, а увеличение P происходит тогда, когда в растворе накапливается достаточное количество агрегированных белков (подробно см. в разделе «Теоретическая модель фотоагрегации»). В рамки этой модели укладываются и результаты, полученные нами при УФ-облучении рекомбинантного β -кристаллина А3 [22] при различных его концентрациях в растворе (рис. 9). При уменьшении C_0 так же, как и при уменьшении w или F , снижается концентрация фотоактивированных молекул белка, что приводит к уменьшению вероятности образования агрегатов, т.е. к замедлению скорости агрегации и к увеличению параметра D^* .

Оптические спектры пропускания раствора β -кристаллина до и после облучения различными УФ-дозами (рис. 16) оказались подобными соответствующим спектрам карбоангидразы, а спектр наведенного поглощения (разностного между спектрами облученного УФ-дозой $D = 1,5D^*$ и исходного белка) аналогичен полученному в [18] для УФ-облученной водорастворимой фракции хрусталика глаза быка. Во всех этих случаях в спектре наведенного поглощения присутствует пик при $\lambda = 305$ нм. Анализ хроматограмм показал, что с увеличе-

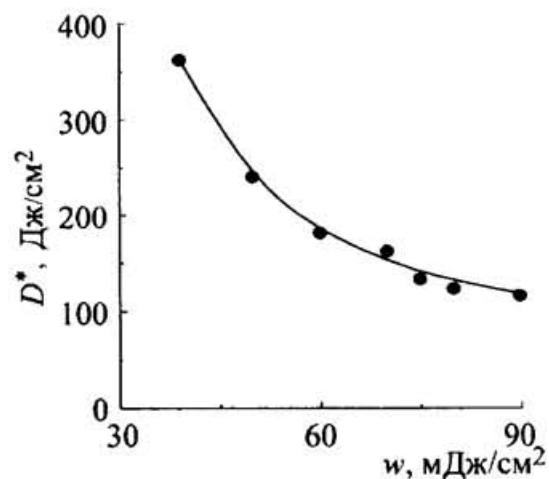


Рис. 15. Экспериментальная (точки) и теоретическая (сплошная кривая) зависимости УФ-дозы $D(w)$ для раствора β L-кристаллина с концентрацией $C_0 = 0,5$ мг/мл; $F = 2$ Гц. По оси абсцисс – плотность энергии УФ-импульсов (w , мДж/см²).

нием дозы облучения происходит монотонное уменьшение амплитуды пика исходного β L-кристаллина с молекулярной массой ~ 45 кДа. Одновременно с этим происходит уширение пика в основном в сторону больших масс. При $D \sim 0,5D^*$ появляется пик с $M \geq 2000$ кДа, который соответствует эксклюзионному пределу использованной колонки Superose 12 10/30 HR. С увеличением дозы облучения амплитуда этого пика возрастает. Таким образом, уже при достаточно малых дозах УФ-облучения, при которых еще не начинается рост рассеяния пробного пучка, в β L-кристаллине, так же как в карбоангидразе и в β -кристаллине А3, образу-

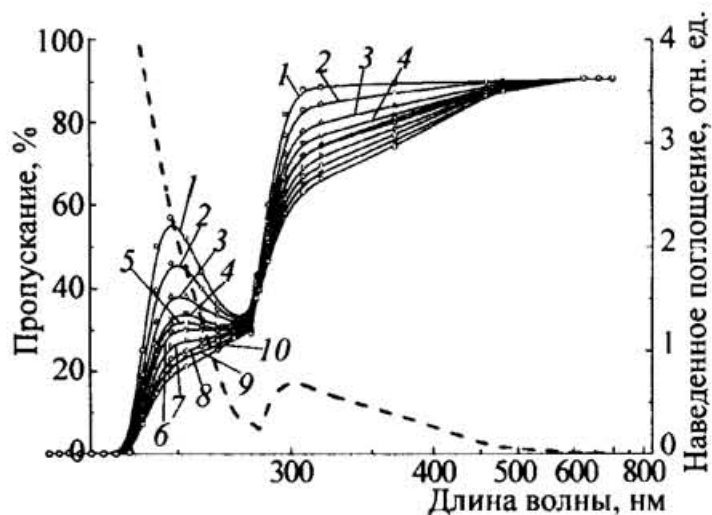


Рис. 16. Оптические спектры пропускания раствора β L-кристаллина с концентрацией $C_0 = 0,5$ мг/мл в кювете длиной 1 см до и после облучения различными УФ-дозами: 1 – 0; 2 – 1,6; 3 – 1/3; 4 – 1/2; 5 – 2/3; 6 – 5/6; 7 – 1,0; 8 – 7/6; 9 – 4/3; 10 – 3/2 D^* . Пунктирной кривой показано наведенное поглощение – разность спектров при $D = 1,5D^*$ и при $D = 0$.

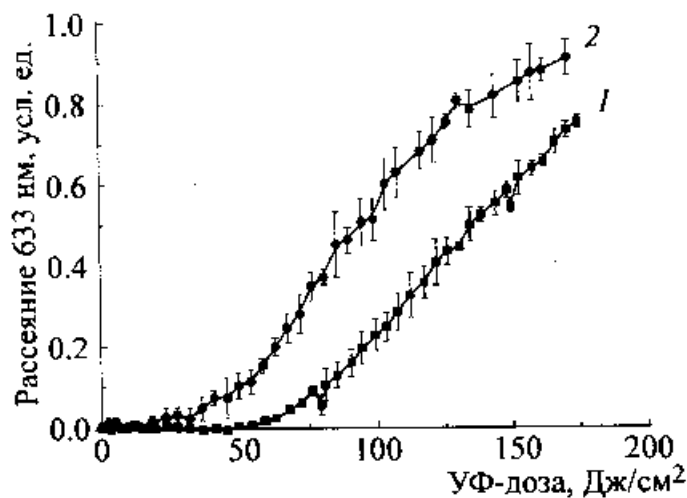


Рис. 17. Дозовые зависимости мощности рассеянного излучения с длиной волны 633 нм $P(D)$ для нормального и укороченного β -кристаллинов А3 (1) и А3tr (2). Рисунок публикуется из работы [13] с разрешения издательства «Association For Research In Vision And Ophthalmology».

ются агрегаты с эффективной массой, существенно большей массы исходных молекул белка.

Кроме внешних факторов причиной развития катаракты могут быть структурные изменения в хрусталике в результате нарушения его развития. Мутантные кристаллины могут стать причиной появления наследственной катаракты. В работах [38–41] было установлено, что некоторые виды мутации β -кристаллина А3 связаны с образованием аутосомной доминантной зонулярной катаракты. Во многих других работах, цитируемых в [13], показано, что изменения структуры большого ряда кристаллинов хрусталика глаза также связаны с врожденными катарактами. На основании этих результатов в [13] высказано предположение, что структурные модификации кристаллинов хрусталика могут сделать их более восприимчивыми к повреждению УФ-излучением и увеличить вероятность развития возрастной катаракты. Для проверки этого предположения в работе [13] была исследована агрегация при воздействии импульсного излучения Хе-С1 лазера на β -кристаллин А3 и на укороченный β -кристаллин А3tr, у которого были удалены 16 аминокислотных остатков на N-конце. Такие структурные изменения наблюдаются в процессе старения хрусталика и при развитии катаракты. На рис. 17 приведены зависимости $P(D)$ для нормального и укороченного β -кристаллинов А3. Из этого рисунка видно, что скорость агрегации β -кристаллина А3tr выше, чем скорость агрегации β -кристаллина А3.

Об этом свидетельствуют и хроматографические профили этих белков, облученных раз-

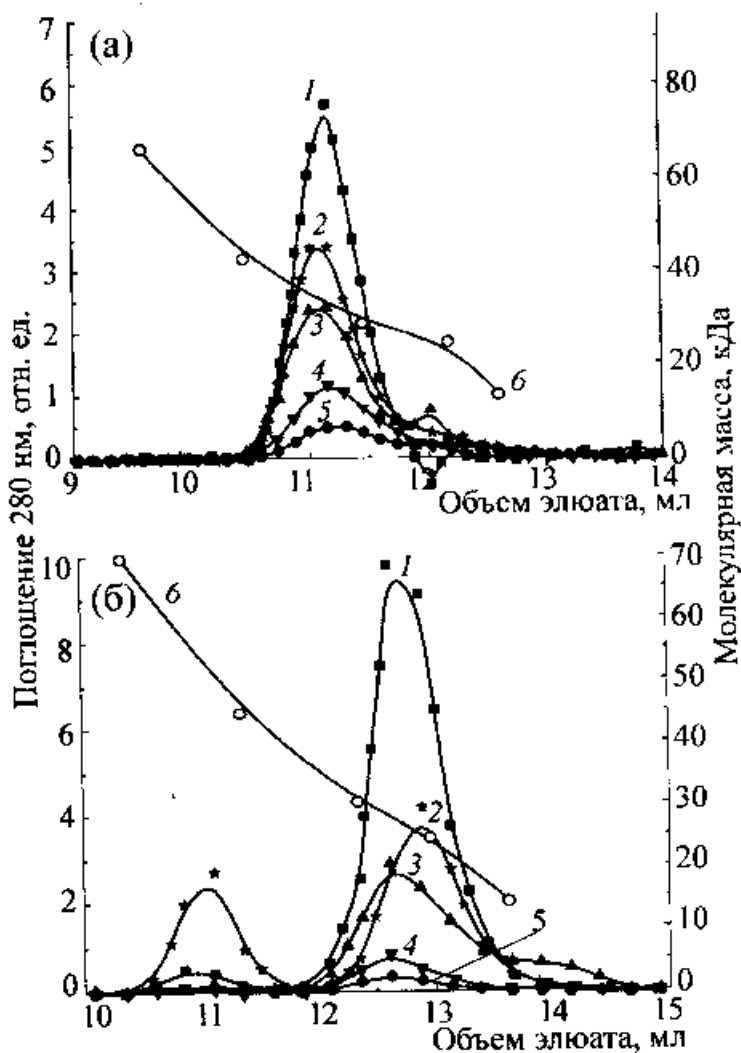


Рис. 18. Хроматографические профили исходных и облученных при $w = 15$ мДж/см² и $F = 2$ Гц различными УФ-дозами β -кристаллинов А3 (а) и А3tr (б), снятые на колонке Superdex 75 10/30 HR при скорости потока 0,5 мл/мин: 1 – 0; 2 – 25; 3 – 50; 4 – 125; 5 – 200 Дж/см²; 6 – стандарты на (а) и (б) соответственно. Рисунок публикуется из работы [13] с разрешения издательства «Association For Research In Vision And Ophthalmology».

личными УФ-дозами (рис. 18). Различие в чувствительности к УФ-излучению у нормальных и укороченных рекомбинантных β -кристаллинов А3 позволяет предположить, что потеря С-концевой или N-концевой части при мутации и старении хрусталика может увеличивать тенденцию β -кристаллина к агрегации при УФ-облучении, повышая предрасположенность хрусталика к возрастной катаракте.

Исследование влияния короткоцепочечных пептидов на скорость УФ-индуцированной агрегации кристаллинов. Нами было исследовано влияние некоторых короткоцепочечных пептидов, в том числе использовавшихся в работах [26,27], на скорость УФ-индуцированной агрегации β Л-кристаллина и различных смесей кристаллинов. Исследования проводили с помощью измерения зависимостей $P(D)$, хроматографических методов и с учетом изменения

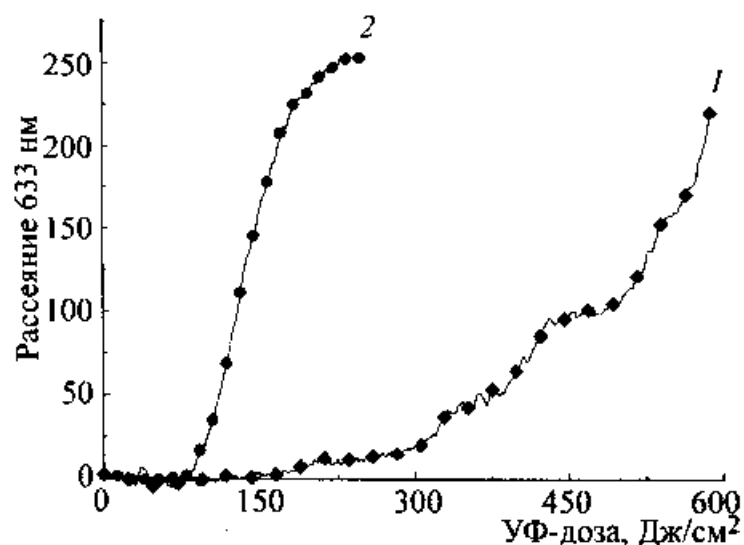


Рис. 19. Влияние D-пантетина на скорость УФ-индуцированной агрегации смеси β L-, α - и γ -кристаллинов: 1 – $\alpha + \beta + \gamma + D$ -пантетин; 2 – $\alpha + \beta + \gamma$.

пропускания излучения с длиной волны, равной 308 нм в растворе белка. В первую очередь была изучена фотоагрегация белков в смеси: β L-, α - и γ -кристаллинов и влияние D-пантетина на скорость фотоагрегации. Такая смесь кристаллинов представляет особый интерес, поскольку она в наибольшей степени близка к составу белков хрусталика глаза. Соответствующие зависимости $P(D)$ приведены на рис. 19. Из рисунка видно, что добавление D-пантетина с концентрацией 0,5 мг/мл в смесь трех кристаллинов с концентрацией каждого из них, равной 0,5 мг/мл, приводит к замедлению скорости агрегации более чем в два раза.

Более подробно было исследовано влияние короткоцепочечных пептидов на скорость агрегации β L-кристаллина и его смеси с α -кристаллином. В частности, были исследованы защитные (подавляющие агрегацию белков) свойства D-пантетина, L-карнозина и N-ацетилкарнозина, на основе которых сотрудниками Д. Кларка и А.А. Болдырева созданы средства, запатентованные как антикатарактальные препараты [31,32]. Нами были определены пептиды, которые замедляют УФ-индуцированную агрегацию либо непосредственно β L-кристаллина, либо смеси β L- и α -кристаллинов за счет поддержания шаперонной активности α -кристаллинов. В результате этих исследований была создана комбинация пептидов, обладающая шапероноподобной активностью («новый препарат») [28–30], которая *in vitro* в большей степени замедляет агрегацию смеси β L- и α -кристаллинов, чем D-пантетин, либо L-карнозин, или N-ацетилкарнозин.

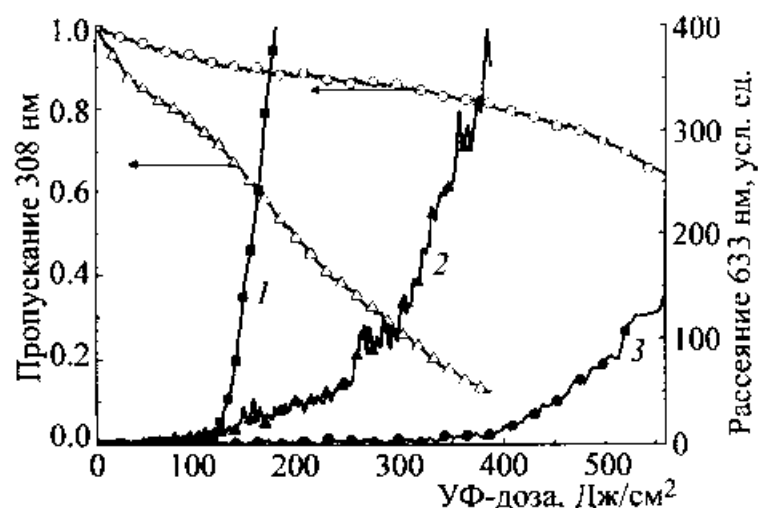


Рис. 20. Дозовые зависимости мощности рассеянного излучения 633 нм $P(D)$ и изменение пропускания через кювету с раствором белка излучения с длиной волны, равной 308 нм, в растворах β L-, α -кристаллинов и их смеси: 1 – β -кристаллин; 2 – $\beta + \alpha$ -кристаллины; 3 – α -кристаллин.

На рис. 20 приведены зависимости $P(D)$ для β L-кристаллина, α -кристаллина и для смеси этих белков, полученные при $w = 75$ мДж/см и $F = 2$ Гц. Видно, что α -кристаллин имеет меньшую скорость агрегации и обладает шаперонной активностью по отношению к β L-кристаллину. Эти результаты подобны приведенным в работе [4], где исследовано влияние α -кристаллина на скорость УФ-индуцированной агрегации γ -кристаллина.

Из всех исследованных нами веществ эффект замедления фотоагрегации смесей кристаллинов оказался больше при использовании D-пантетина, L-карнозина, N-ацетилкарнозина или но-

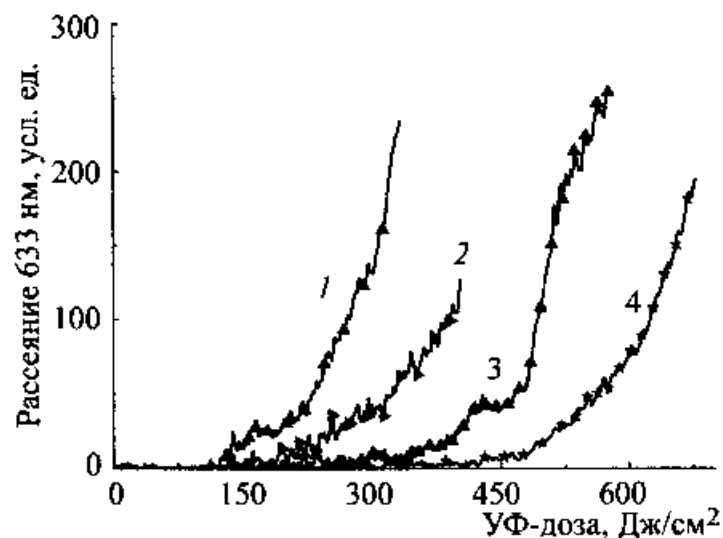


Рис. 21. Влияние дипептидов и нового препарата на скорость УФ-индуцированной агрегации смеси β L- и α -кристаллинов: 1 – $\beta + \alpha$; 2 – $\beta + \alpha + D$ -пантетин; 3 – $\beta + \alpha + N$ -ацетилкарнозин; 4 – $\beta + \alpha +$ новый препарат.

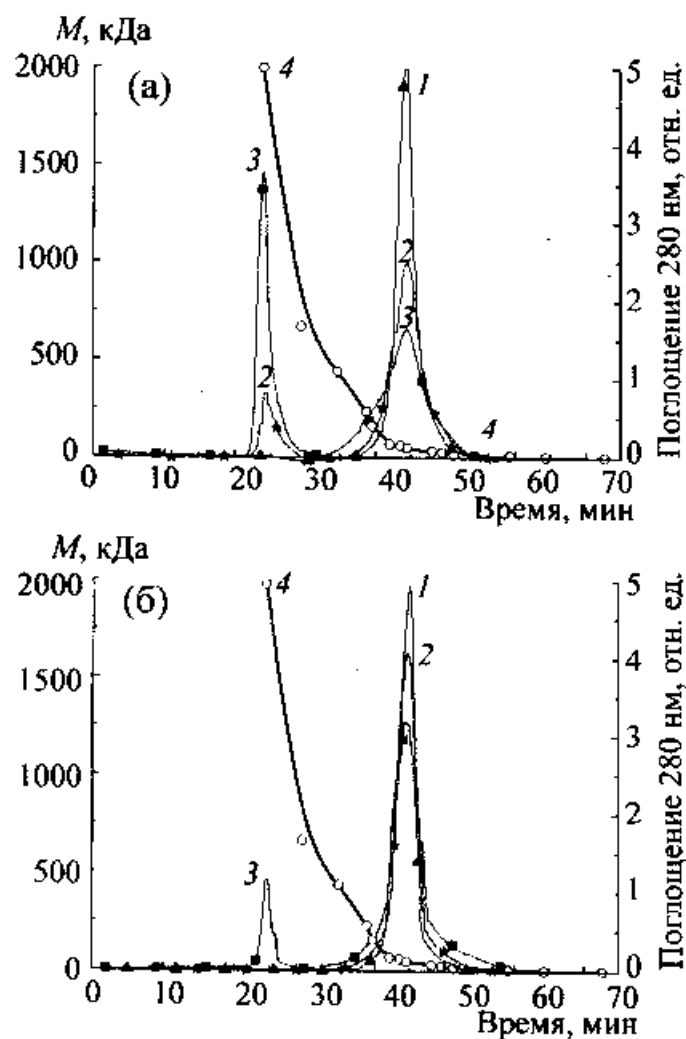


Рис. 22. Влияние нового препарата на изменение профилей элюции смеси β L- и α -кристаллинов ((а) – $\alpha + \beta$ L; (б) – $\alpha + \beta +$ новый препарат) после облучения различными УФ-дозами: 1 – $D = 0$; 2 – $D = 50$; 3 – 85 Дж/см²; 4 – стандарты. Профили сняты на колонке Superose 12 10/30 HR при скорости потока 0,3 мл/мин. Показаны изменения только для пиков исходного β L-кристаллина с молекулярной массой $M \sim 45$ кДа и фракций с $M \geq 2000$ кДа.

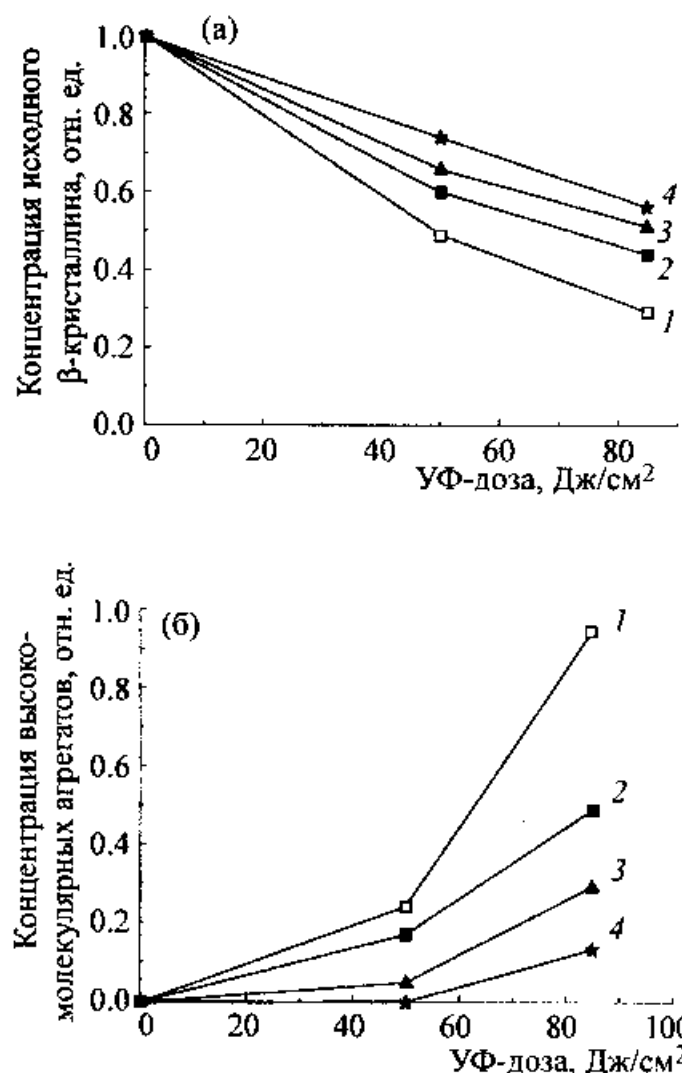


Рис. 23. Влияние короткоцепочечных пептидов и нового препарата на изменение амплитудных значений фракции исходного β L-кристаллина (а) и высокомолекулярных агрегатов (б) с $M \geq 2000$ кДа при облучении смеси β L- и α -кристаллинов различными УФ-дозами; на (а) и (б): 1 – $\alpha + \beta$ -кристаллины; 2 – $\alpha + \beta + D$ -пантетин; 3 – $\alpha + \beta + N$ -ацетилкарнозин; 4 – $\alpha + \beta +$ новый препарат.

вого препарата. Ниже приведены только результаты, полученные с этими добавками (поскольку защитные свойства L-карнозина и N-ацетилкарнозина оказались примерно одинаковыми, то показаны только результаты с использованием N-ацетилкарнозина). Что касается N-ацетилкарнозина, то в работе [42] показано, что молекулярный механизм действия N-ацетилкарнозина на УФ-индуцированную агрегацию β L-кристаллина связан не с его антиоксидантными, а с шапероноподобными свойствами, аналогичными свойствам α -кристаллина. На рис. 21 приведены зависимости $P(D)$ для смеси β L- и α -кристаллинов и для этой смеси при добавлении в нее D-пантетина, N-ацетилкарнозина или нового препарата. Концентрации белков и вводимых добавок составляли $\sim 0,5$ мг/мл. Видно, что все эти добавки обла-

дают защитными свойствами, а максимальное замедление скорости агрегации белков достигается при использовании нового препарата. По сравнению с D-пантетином эффективность этого препарата выше в 2,5 раза, а по сравнению с N-ацетилкарнозином – почти в 1,5 раза.

На рис. 22 приведены профили элюции смеси β L- и α -кристаллинов в отсутствие и в присутствии нового препарата после облучения растворов различными УФ-дозами. Показано изменение пика β L-кристаллина с $M \sim 45$ кДа и пика с $M \geq 2000$ кДа, который обусловлен высокомолекулярными белковыми агрегатами. С увеличением УФ-дозы происходит уменьшение амплитуды и уширение пика с $M \sim 45$ кДа и рост пика высокомолекулярных агрегатов. При добавлении нового препарата эти изменения существенно уменьшаются, что свидетель-

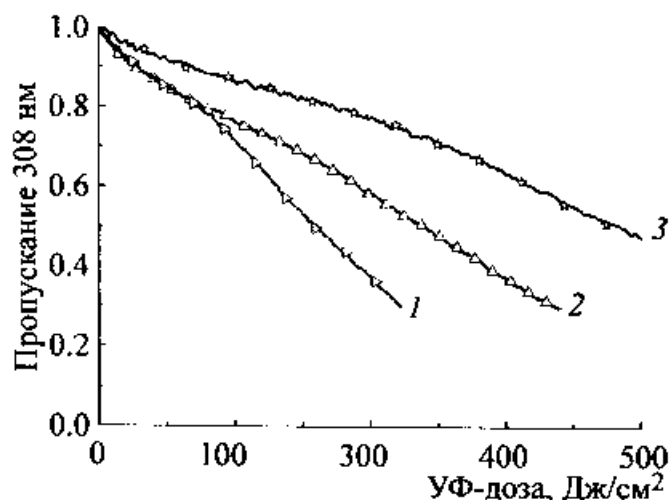


Рис. 24. Влияние D-пантетина и нового препарата на изменение пропускания излучения с длиной волны, равной 308 нм, через кювету с раствором смеси β L- и α -кристаллинов; 1 — $\beta + \alpha$; 2 — $\beta + \alpha +$ D-пантетин; 3 — $\beta + \alpha +$ новый препарат.

ствует о замедлении скорости агрегации смеси α L- и α -кристаллинов.

На рис. 23 показаны результаты обработки хроматограмм, полученных после облучения смеси β L- и α -кристаллинов и этой смеси при добавлении в нее D-пантетина, N-ацетилкарнозина или нового препарата. Приведены изменения амплитуд пиков, соответствующих исходному β L-кристаллину и образующимся высокомолекулярным агрегатам. Как видно из этого рисунка, что наиболее эффективное подавление агрегации смеси двух белков происходит при добавлении к ней нового препарата, что соответствует данным, приведенным на рис. 21.

При исследовании агрегации измеряли не только дозовые зависимости интенсивности рассеянного излучения пробного пучка, но и уменьшение энергии лазерных импульсов, прошедших через кювету с растворами белков. Ослабление УФ-излучения наблюдали при дозах, несколько меньших D^* . Возможно, этот процесс обусловлен фотохимическими реакциями и его изучение может представлять самостоятельный интерес. В тех экспериментах, где наблюдается увеличение рассеянного излучения пробного пучка, кривые пропускания имеют две характерные области. Начальный участок (при малых значениях D) как при агрегации β L-кристаллина, так и при агрегации его смеси с α -кристаллином хорошо аппроксимируется экспоненциальной функцией (рис. 12б, 14, 20). Этот участок заканчивается при относительном уровне пропускания 0,7 – 0,8 и, по-видимому, обусловлен в основном увеличением поглощения излучения с длиной волны, равной 308 нм в растворах. Для β L-кристаллина величина и

дозовая зависимость этого поглощения соответствуют изменению оптических спектров пропускания, приведенных на рис. 16. С увеличением УФ-дозы D появляется участок более резкого уменьшения УФ-сигнала, на котором превалирует роль рассеяния УФ-излучения в растворе белка. Нами были сделаны теоретические оценки, которые подтвердили предположения о причинах ослабления УФ-сигнала при разных дозах облучения. В тех экспериментах, когда не наблюдалось роста $P(D)$, кривая пропускания имеет только монотонный участок без резкого излома. Это происходило при малых значениях w , F или C_0 . Один из таких случаев приведен на рис. 8 [22]. Если при концентрации β -кристаллина АЗ с $C_0 = 0,6$ мг/мл рост P и излом кривой пропускания наблюдали при $D \sim 70$ Дж/см², то при $C_0 = 0,2$ мг/мл роста P и излома кривой пропускания излучения с длиной волны, равной 308 нм, не наблюдали вплоть до значения $D \sim 1000$ Дж/см².

На рис. 24 показано, что добавление к смеси β L- и α -кристаллинов D-пантетина или нового препарата приводит к увеличению дозы, при которой происходит излом кривой пропускания. Такое поведение кривых пропускания коррелирует как с соответствующими зависимостями $P(D)$, так и с результатами хроматографических измерений, т.е. кривые пропускания могут быть использованы как дополнительный источник информации о процессах, происходящих при УФ-индуцированной агрегации белков.

Новый препарат, созданный на основании результатов лабораторных экспериментов, прошел предварительные испытания в ГУ НИИ глазных болезней РАМН на экспериментальных животных [33]. Исследовали его влияние на скорость развития УФ-индуцированной катаракты у крыс самцов линии Wistar в возрасте от 20 до 23 дней. Для эксперимента были отобраны 33 крысы, которые были разделены на пять групп. Одна группа была контрольной, а остальные отличались по методу введения препарата и его концентрации. У всех животных, подвергавшихся УФ-облучению, при введении нового препарата наблюдали положительный эффект в замедлении развития катаракты. Полученный результат представляет большой интерес для практической медицины. После дополнительных исследований на основе нового препарата может быть создано средство для профилактики развития катаракты у человека.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ
ФОТОАГРЕГАЦИИ

Экспериментальные результаты и их отношение к агрегации кристаллинов при естественном солнечном освещении могут быть объяснены, если предположить, что переход мономеров в агрегированное состояние происходит как при взаимодействии двух фотоактивированных молекул белка, так и при взаимодействии фотоактивированной и исходной молекул. Первый процесс превалирует при лазерном воздействии, когда образуется много фотоактивированных молекул белка, тогда как второй может быть основным при маломощном, например, солнечном освещении. Если R и M — это концентрации фотоактивированных молекул и молекул белка, ставших частью агрегатов, соответственно, то кинетические уравнения, описывающие процесс, имеют вид:

$$\frac{dR}{dt} = \eta\sigma C_0 \frac{I}{\hbar\omega} - k_2 R^2 - k_1 C_0 R - \frac{R}{\tau}, \quad (1)$$

$$\frac{dM}{dt} = k_2 R^2 + 2k_1 C_0 R.$$

Здесь C_0 — концентрация молекул мономера, изменением которой в процессе агрегации мы пренебрегаем; I — интенсивность УФ-излучения, вообще говоря, зависящая от времени; $\hbar\omega$ — энергия кванта излучения; σ — эффективное сечение поглощения УФ-квантов мономерами; η — квантовый выход фотоактивации мономеров при поглощении фотона; k_2 — константа скорости образования димеров при взаимодействии двух фотоактивированных мономеров; k_1 — константа скорости образования димеров при взаимодействии фотоактивированных и исходных мономеров. При этом мы для простоты считаем, что по крайней мере на начальном этапе можно пренебречь присоединением фотоактивированных молекул к агрегатам. Важным параметром модели является τ -характерное время жизни фотоактивированного состояния.

Чтобы понять основные свойства модели, рассмотрим непрерывное облучение $I = \text{const}$. Из анализа кинетики фотоагрегации белков следует, что

$$k_1 C_0 \ll \tau^{-1}. \quad (2)$$

Как показали наши исследования, в случае воздействия мощного лазерного излучения выполняется условие:

$$k_1 C_0 R \ll k_2 R^2. \quad (3)$$

Концентрация фотоактивированных мономеров R быстро выходит на стационарное значение $R = R_C$, которое находится из первого уравнения системы (1), если приравнять нулю производную по времени. Пренебрегая членом $k_1 C_0 R$ в системе уравнений (1), находим для случая лазерного воздействия:

$$R_C = (2k_2\tau)^{-1}(\sqrt{1 + I/I_0} - 1). \quad (4)$$

В выражение (4) введено характерное значение интенсивности:

$$I_0 = \frac{\hbar\omega}{\eta\sigma C_0} \frac{1}{4k_2\tau^2}. \quad (5)$$

Если принять, что начало рассеяния пробного пучка He-Ne лазера связано с образованием в растворе некоторого характерного значения концентрации агрегировавшихся мономеров M^* , то доза УФ-облучения D^* , при которой начинается рост увеличения рассеяния, может быть оценена из второго уравнения системы

(1) как $D^* \approx \frac{M^* I}{k_2 R_C^2}$, или, используя соотношение (1),

$$D^* \approx \frac{4k_2\tau^2 M^* I}{(\sqrt{1 + I/I_0} - 1)^2}. \quad (6)$$

Из соотношения (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^* принимает вид:

$$D^* \approx 4k_2\tau^2 M^* I_0 = \frac{\hbar\omega}{\eta\sigma} \frac{M^*}{C_0}, \quad (7)$$

т. е. величина D^* не зависит от интенсивности УФ-излучения.

В другом предельном случае (при $I \ll I_0$), но при выполнении условия (3) (как будет показано ниже, это условие означает, что $I \gg 4\tau k_1 C_0 I_0$), получаем $\sqrt{1 + I/I_0} - 1 \approx \frac{I}{2I_0}$ и

$$D^* \approx \frac{1}{I} 16k_2\tau^2 M^* I_0^2 = \frac{M^*}{Ik_2\tau^2} \left(\frac{\hbar\omega}{\eta\sigma C_0} \right)^2. \quad (8)$$

Таким образом, при достаточно малых интенсивностях значение D^* обратно пропорционально интенсивности. Особенности кинетики агрегации, следующие из формул (7), (8), наблюдаются в эксперименте, что подтверждает правильность основных предположений модели. Это показано на рис. 4, 5 для фотоагрегации

карбоангидразы и на рис. 13, 15 для фотоагрегации β L-кристаллина.

Из (8) следует также, что увеличение времени релаксации τ приводит к уменьшению дозы D^* . В связи с этим шаперонная активность вводимых добавок, продемонстрированная выше экспериментально как увеличение дозы D^* , может трактоваться как влияние этих добавок на время релаксации τ .

Рассмотрим теперь случай предельно малых интенсивностей, соответствующий воздействию на кристаллик солнечного излучения. Концентрация фотоактивированных мономеров в этом случае мала, поэтому в системе уравнений (1) можно пренебречь всеми квадратичными членами, т. е. выполняется условие:

$$k_1 C_0 R \gg k_2 R^2. \quad (9)$$

С учетом соотношения (2) для стационарной концентрации фотоактивированных мономеров получаем:

$$R_C = \eta \sigma C_0 \frac{I}{h\nu}. \quad (10)$$

Условие (9) можно написать в виде:

$$I \ll \frac{k_1 h\nu}{\tau k_2 \eta \sigma} = 4\tau k_1 C_0 I_0. \quad (11)$$

Из второго уравнения системы (1) получим значение параметра D^* :

$$D^* \approx \frac{h\nu}{2\eta\sigma} \frac{M^*}{k_1 C_0^2 \tau}, \quad (12)$$

т. е. $D^* \sim \tau^{-1}$. Уменьшая время релаксации, мы увеличиваем дозу D^* и замедляем скорость агрегации белка. Это означает, что, проводя эксперименты по лазерной агрегации белков, мы можем отбирать добавки, которые наиболее эффективно уменьшают время релаксации фотоактивированного состояния. Соотношение (12) показывает, что эти добавки должны при этом увеличивать дозу D^* также и в случае маломощного, естественного освещения.

Авторы выражают благодарность К.О. Муранову за полезные консультации и обсуждения.

Работа, выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине», Программы РАН «Биомолекулярная и медицинская химия» (10-я программа ОХНМ), Российского фонда фундаментальных исследований – гранты № 05-04-48749-а, № 06-02-17381-а, № 05-04-49945-а, № 06-04-08232.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. V. Krivandin, Yu. M. Lvov, M. A. Ostrovski, et al., *Exp. Eye Res.* **49**, 853 (1989).
2. J. L. Hott and R. F. Borkman, *Photochem. Photobiol.* **57**, 312 (1993).
3. D. Y. Li, R. F. Borkman, R. H. Wang, and J. Dillon, *Exp. Eye Res.* **51**, 663 (1990).
4. R. F. Borkman, G. Knight, and B. Obi, *Exp. Eye Res.* **62**, 141 (1996).
5. U. P. Andley, M. A. Sawardekar, and J. L. Burris, *Photochem. Photobiol.* **65**, 556 (1997).
6. M. A. Ostrovsky, Y. V. Sergeev, D. L. Atkinson, et al., *Molecular Vision* **8**, 72 (2002).
7. N. M. Bityurin, S. V. Muraviov, V. A. Kamensky, et al., *Proc. SPIE* **4161**, 1 (2000).
8. Б. Э. Малюгин, *Вестн. офтальмологии*, № 1, 37 (2006).
9. J. Blondin, V. Baragi, E. Schwartz, et al., *J. Free Rad. Biol. Med.* **2**, 275 (1986).
10. A. Taylor, *Nutr. Rev.* **47**, 225 (1989).
11. S. Zigman, *Optom. Vis. Sci.* **72**, 899 (1995).
12. Y. V. Sergeev, L. V. Soustov, E. V. Chelnokov, et al., *Abstracts of ARVO* (Florida, USA, 2003).
13. Yu. V. Sergeev, L. V. Soustov, E. V. Chelnokov, et al., *Investigat. Ophthalmol. and Visual Sci.* **46**, 3263 (2005).
14. Н. М. Битюрин, Л. В. Соустов, Е. В. Челноков, Препринт ИПФ РАН № 599 (Нижний Новгород, 2002).
15. Л. В. Соустов, Е. В. Челноков, Н. М. Битюрин и др., *Докл. РАН* **388** (5), 683 (2003).
16. L. V. Soustov, E. V. Chelnokov, N. M. Bityurin, et al., *Technical program of IQEC/LAT* (International Quantum Electronics Conference) (2002).
17. L. V. Soustov, E. V. Chelnokov, N. M. Bityurin, et al., *Proc. of SPIE* **5149**, 85 (2003).
18. М. М. Корхмазян, И. Б. Федорович и М. А. Островский, *Биофизика* **28**, 966 (1983).
19. В. В. Ельчанинов и К. Б. Федорович, *Биофизика* **34**, 758 (1989).
20. В. В. Ельчанинов и К. Б. Федорович, *Биофизика* **35**, 200 (1990).
21. М. А. Островский, К. Б. Федорович, В. В. Ельчанинов и др., *Сенсорные системы* **8** (3–4), 135 (1994).
22. L. V. Soustov, E. V. Chelnokov, N. M. Bityurin, et al., *Proc. SPIE* **5506**, 28 (2004).
23. J. N. Hope, H. C. Chen, and J. F. Hejtmancik, *Protein Eng.* **7**, 445 (1994).
24. J. Horwitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10449 (1992).
25. M. Cherian and E. G. Abraham, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **208**, 675 (1995).
26. J. I. Clark and Q. L. Huang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15185 (1996).
27. А. А. Болдырев, *Карнозин. Биологическое значение и возможности применения в медицине* (Изд-во МГУ, М., 1998).

28. Л. В. Соустов, Е. В. Челноков, Н. М. Битюрин и др., в сб. *Тезисы конф. «Фундаментальные науки – медицине»* («Слово», М., 2004), сс. 192–194.
29. L. V. Soustov, E. V. Chelnokov, K. M. Bityurin, et al., Technical program of IQEC/LAT. (International Quantum Electronics Conference) (2005).
30. L. V. Soustov, E. V. Chelnokov, A. L. Kiselev, et al., Proc. SPIE **6257**, 62570X1 (2006).
31. J. I. Clark, G. B. Benedek, R. J. Siezen, et al., US Patent, № 5.091.421 (1992).
32. А. А. Болдырев, А. А. Рагимов и В. Е. Формазюк, РФ, Патент № 2071316 (1993).
33. С. Э. Аветисов, Г. С. Полунин, Н. Л. Шеремет и др., Вестн. офтальмологии (в печати).
34. Y. V. Sergeev, P. T. Wingfield, and J. F. Hejtmancik, *Biochemistry* **39**, 15799 (2000).
35. Y. V. Sergeev, J. F. Hejtmancik, and P. T. Wingfield, *Biochemistry* **43**, 415 (2004).
36. J. N. Hope, H.-C. Chen, and J. F. Hejtmancik, *J. Biol. Chem.* **269**, 21141 (1994).
37. М. Ю. Казаков, С. В. Муравьев и Л. В. Соустов, РФ, Патент № 2031378 (1991).
38. C. Kannabiran, P. K. Rogan, L. Olmos, et al., *Mol. Vision.* **4**, 21 (1998).
39. K. P. Burdon, M. G. Wirth, D. A. Mackey, et al., *J. Ophthalmol.* **88**, 79 (2004).
40. Y. Qi, H. Jia, S. Huang, et al., *Hum. Genet.* **114**, 192 (2004).
41. J. B. Bateman, D. D. Geyer, P. Flodman, et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 3278 (2000).
42. К. О. Муранов, А. К. Тимофеева, А. А. Болдырев и др., Вестн. офтальмологии (в печати).

Investigation of the Mechanisms of Crystallin Aggregation Induced by Pulsed Laser UV Irradiation at 308 nm

L.V. Soustov*, E.V. Chelnokov*, N.V. Sapogova*, N.M. Bityurin*, V.V. Nemov**, Yu.V. Sergeev***, and M.A. Ostrovsky****

**Institute of Applied Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Ul'yanova 46, Nizhnii Novgorod, 603950 Russia*

***Blokhina Institute of Epidemiology and Microbiology, ul. Gruzinskaya 44, Nizhnii Novgorod, 603600 Russia*

****National Eye Institute of National Institutes of Health, MD 20892–1860, Bethesda, USA*

*****Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia*

The results of the investigations of photoaggregation of the main eye lens proteins α -, β - and γ -crystallins and the model protein carbonic anhydrase in response to pulsed irradiation by a XeCl laser at 308 nm in the wide range of pulse energy densities (w) and pulse repetition rates (F) have been reviewed. A nonlinear dependence of aggregation efficiency on the values of w , F , and the concentration of protein solution was found. A theoretical model that qualitatively describes the experimental results was developed. The aggregation of N-amino-arm truncated β A3-crystallin was analyzed. It was found that the loss of the N-amino-arm as a result of mutation or eye lens aging increases the probability of UV-induced β -crystallin aggregation, thereby increasing the predisposition of eye lens to senile cataract. The influence of some short-chain peptides on the aggregation efficiency of β -crystallin and β -crystallin in solution with α -crystallin was investigated. Based on the results obtained, a combination of peptides (called «a new preparation») was found that most effectively delays the crystallin aggregation. The preparation has been probed on experimental animals. The trials showed that the preparation increases the delay in the development of UV-induced cataract in rats. The possibility of designing a drug for the prophylaxis of the development of cataract in humans based on this preparation is discussed.

Key words: eye lens crystallins, photoaggregation, short-chain peptides