На правах рукописи

Зеленцова Екатерина Анатольевна

ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И РЕАКЦИИ ХРОМОФОРОВ ХРУСТАЛИКА ЧЕЛОВЕКА

03.01.02 – биофизика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Новосибирск – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук (МТЦ СО РАН), г. Новосибирск

Научный руководитель:	**Центалович Юрий Павлович** доктор химических наук, профессор
Научный консультант:	**Шерин Петр Сергеевич** кандидат физико-математических наук
Официальные оппоненты:	**Поляков Николай Эдуардович**, доктор химических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук (ИХКГ СО РАН), г. Новосибирск, ведущий научный сотрудник лаборатории магнитных явлений **Немцева Елена Владимировна**, кандидат физико-математических наук, доцент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ), старший научный сотрудник лаборатории биолюминесцентных биотехнологий
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН), г. Москва

Защита состоится «27» сентября 2018 г. в 10:00 на заседании диссертационного совета Д 003.075.04 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) по адресу: 660036, г. Красноярск, Академгородок, д. 50, стр. 50.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биофизики Сибирского отделения Российской академии наук – обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН и на сайте http://www.ibp.ru.

Автореферат разослан « » 2018 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета — Есимбекова Елена Николаевна

Общая характеристика работы

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

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

молекулярных процессов, происходящих в тканях хрусталика в процессе жизнедеятельности и в ходе старения. Накопление информации об этих процессах позволит построить апробированные модели развития патологий и найти пути ингибирующего воздействия на них.

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

Для понимания процессов, происходящих в хрусталике под действием света, необходимо иметь больше информации о фотохимических свойствах его компонент: как фракций в целом (метаболомной и белковой), так и отдельных

соединений, присутствующих в тканях. В литературе на данный момент недостаточно информации о фотохимии продуктов кинуренина (KN) – одного из основных УФ-фильтров человека. Корректное установление потенциальных вкладов от составляющих хрусталика в катарактогенез позволит создать модель протекающих патогенных процессов, а также апробировать на ней возможные пути ингибирования этих процессов.

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

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

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

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

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

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

Исследование фотоиндуцированных модификаций белков хрусталика;

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

Научная новизна работы заключается в том, что моделирование химических реакций в тканях хрусталика под действием света с последующим анализом продуктов производится впервые. Фотохимические реакции УФ-фильтров и продуктов их разложения ранее не рассматривались в качестве источника белковых сшивок в тканях хрусталика, а информация об их фотохимических свойствах была неполной или отсутствовала полностью. При оценке возможной роли кинуренинов в хрусталике не учитывалось влияние особенностей среды хрусталика, таких как вязкость или крайне низкая концентрация кислорода. Данная работа проведена в условиях, максимально

приближенных к естественным, что является неоспоримым преимуществом перед уже имеющимися работами по фотохимии хрусталика. Кроме того, связь между изменениями оптических свойств ткани хрусталика в целом и свойствами белковой и метаболомной фракций этой ткани при старении и развитии катаракты проводится также впервые.

Теоретическая ценность работы заключается в построении адекватной модели процессов, происходящих в тканях хрусталика под действием света, на основании имеющихся в литературе и полученных в результате исследования данных о его составляющих. Хрусталик, как уже было сказано ранее, является уникальной по своему строению тканью, поэтому на него невозможно экстраполировать данные о механизмах развития патологий в других тканях и органах.

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

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

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

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Возрастные и катарактальные изменения в протеомном и метаболомном составах хрусталика включают в себя уменьшение концентрации

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

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

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

Апробация работы. По результатам диссертационной работы опубликовано 12 печатных работ: из них 1 статья в российском и 3 статьи в международных журналах из списка ВАК и 8 публикаций в сборниках тезисов докладов научных конференций. Содержание диссертации докладывалось на Международной научной студенческой конференции (МНСК, Новосибирск, Россия) в 2012, 2013 и 2014 г., Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Менделеев – 2012» (Санкт-Петербург, Россия), Международной конференции по фотохимии ICP-2013 (Левен, Бельгия), Азиатской фотохимической конференции APC-2014 (Тируванантапурам, Индия), Центрально-европейской конференции по фотохимии CEPC-2016 (Бад Хофгаштайн, Австрия) и Международной конференции «Химическая биология – 2016» (Новосибирск, Россия).

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

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

Структура диссертационной работы. Данная диссертационная работа состоит из введения, 6 глав, выводов, списка сокращений и списка цитируемой

литературы. Диссертация изложена на 126 листах и включает 9 таблиц, 7 схем и 34 рисунка.

Основное содержание работы

В первой главе приведен обзор имеющейся литературы по тематике диссертационной работы. В представленном тексте описаны особенности строения человеческого глаза и хрусталика; в частности, приведены статистические данные, подтверждающие статус исследования как социально значимого. Кроме того, в главе подробно представлены имеющиеся знания о возможных механизмах возникновения катаракты под действием УФ-излучения.

Особый класс метаболитов хрусталика – УФ-фильтры – рассмотрен подробно: описаны фотохимические свойства, пути их термического превращения и проанализирована их роль в ткани хрусталика. Эффективно поглощая УФА-излучение, УФ-фильтры имеют очень высокие скорости внутренней конверсии и существенно более низкие скорости других каналов гибели возбужденного синглетного состояния. Говоря иначе, эти молекулы эффективно поглощают УФ-излучение солнца и переводят его энергию в тепло с минимальным выходом реакционно-активных форм или продуктов. Они защищают тем самым сетчатку, для которой воздействие УФ-излучения губительно, и предохраняют ткани хрусталика от фотоповреждений. В хрусталике основными УФ-фильтрами являются KN и его производные. Являясь фотохимически стабильными, они подвержены термическому разложению с образованием продуктов, фотохимические свойства которых изучены слабо (KNA) или не изучены вовсе (KNY).

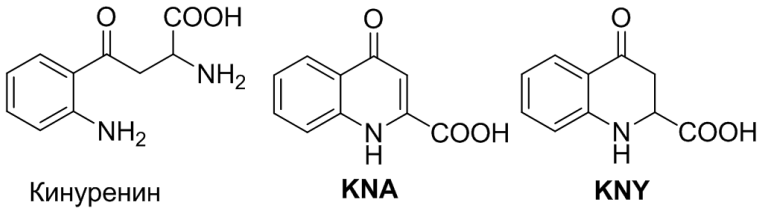

Схема 1. Химические структуры KN, KNA и KNY

Еще один класс метаболитов – антиоксиданты – представлен в главе сведениями о Asc и GSH, поскольку данные соединения являются основными антиоксидантами человеческого хрусталика. Для тканей хрусталика антиоксиданты имеют особое значение – благодаря отсутствию процесса возобновления клеток негативное воздействие окислительного стресса имеет накопительный характер, и, таким образом, дает еще больший вклад в развитие патогенных процессов и заболеваний.

В первой главе также представлен обзор основных белков хрусталика и их естественных посттрансляционных модификаций. Особое внимание уделено модификациям белков, образовавшимся при реакции с фотовозбужденными хромофорами. Заключительная часть главы посвящена описанию заболевания катаракты и методам диагностики и лечения данного заболевания. Статистика, приведенная в этой части работы, обосновывает социально значимый статус проведенного исследования.

Вторая глава посвящена объектам исследования и методам, использованным в данной работе. В тексте описан синтез одного из исследуемых соединений (KNY). Отдельное внимание уделено получению экстрактов тканей хрусталика, поскольку отказ от использования промышленных белков обоснован фактом накопления белками хрусталика в ходе жизнедеятельности естественных посттрансляционных модификаций.

В работе был использован широкий диапазон методов биохимического и оптического анализа, включающий такие методы, как: стационарная оптическая спектроскопия, стационарные и времяразрешенные флуоресцентные измерения, лазерный импульсный фотолиз, электрофорез и другие. Установка лазерного импульсного фотолиза уникальна и была создана в Группе протеомики и метаболомики. Масс-спектрометрический анализ белков и пептидов производился с использованием двух типов масс-спектрометров: MALDI-TOF и UHPLC-ESI-q-TOF. Такая комбинация позволяет говорить о полноте и достоверности полученных данных.

В третьей главе представлены результаты исследования оптических и флуоресцентных свойств составляющих хрусталика. С возрастом или при развитии патогенных процессов содержание УФ-фильтров и их продуктов в тканях хрусталика существенно изменяется: концентрация «первичных» УФ-фильтров с возрастом падает, в то время как для продуктов УФ-фильтров, напротив, наблюдается рост. Существенные изменения происходят и с белками хрусталика. Ярким примером является тот факт, что исходные кристаллины не поглощают в УФА-диапазоне, однако кристаллины возрастных хрусталиков имеют желтую окраску и поглощают в области 320-400 нм из-за возрастных посттрансляционных модификаций, накопленных в процессе жизнедеятельности. Флуоресцентные свойства хрусталика также изменяются с возрастом.

Эта часть работы посвящена установлению вклада малых молекул (метаболитов, МЕТ), водорастворимых (ВР) и мочевинорастворимых (МР) белков в общее поглощение и флуоресценцию хрусталика. Все измерения производились для трех типов хрусталиков: здоровых хрусталиков от пациентов среднего

возраста, здоровых возрастных хрусталиков и катарактальных. Целью данной части работы является определение изменений в фотохимических свойствах отдельных фракций хрусталика, которые связаны с возрастными процессами и развитием катаракты и могут существенно ослабить защиту хрусталика от УФ-излучения.

В работе было установлено, что массовая доля ВР белков в хрусталике уменьшается с возрастом и при развитии катаракты, в то время как доля водонерастворимых белков увеличивается. Исследование спектральных данных поглощения и флуоресценции белков и метаболитов хрусталика с возрастом и при развитии катаракты позволило установить вклады от белковых и метаболомной составляющих ткани хрусталика в общее поглощение и флуоресценцию в зависимости от возраста человека и от наличия катаракты (Рисунок 1).

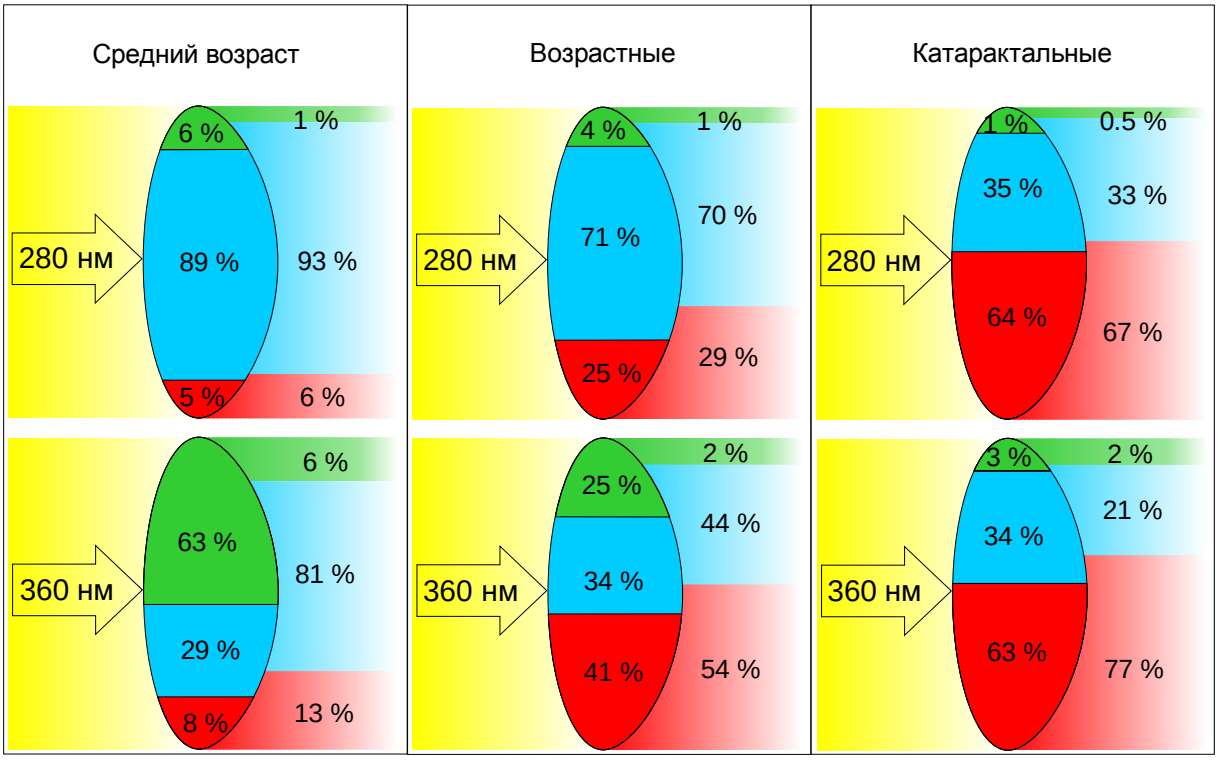

Рисунок 1. Вклад каждой фракции (зеленый – метаболомной, голубой – водорастворимых белков, красный – мочевинорастворимых белков) в полное поглощение (проценты внутри изображения хрусталика) и в полную флуоресценцию хрусталика (проценты за изображением хрусталика) для разных типов хрусталика.

Полученные результаты показывают, что спектральные свойства составляющих человеческого хрусталика – белков и метаболитов – с возрастом претерпевают значительные изменения. Белки приобретают окраску в УФА-диапазоне в связи с накоплением возрастных модификаций, в то время как поглощение метаболомной фракции в данном диапазоне длин волн падает за счет

уменьшения концентрации УФ-фильтров. Эти изменения становятся гораздо более выраженными для катарактальных хрусталиков: резкое падение концентрации УФ-фильтров ведет к десятикратному уменьшению поглощения метаболомной фракцией на 360 нм. Значительно уменьшается доля водорастворимых белков, и наблюдается красное смещение их флуоресценции, что указывает на частичную потерю белками нативной структуры с высвобождением триптофановых аминокислотных остатков для взаимодействия с растворителем. Наблюдаемые изменения в поглощении фракций хрусталика вызывают увеличение флуоресценции в его тканях: выход флуоресценции для хромофоров, связанных с белками, значительно выше, чем для свободных УФ-фильтров. Увеличение квантового выхода флуоресценции говорит о росте времени жизни фотовозбужденного синглетного состояния и, соответственно, росте квантового выхода реакционно-активного триплетного состояния. Поэтому возрастные и в особенности катарактальные хрусталики более уязвимы к воздействию УФА-излучения.

В четвертой главе представлены результаты исследования фотохимических свойств двух продуктов термического распада KN – KNA и KNY, химические структуры которых показаны на Схеме 1.

В главе подробно описаны спектральные свойства (Рисунок 2), механизмы гибели фотовозбужденных хромофоров и приведены полученные квантовые выходы продуктов и промежуточных интермедиатов (Таблица 1).

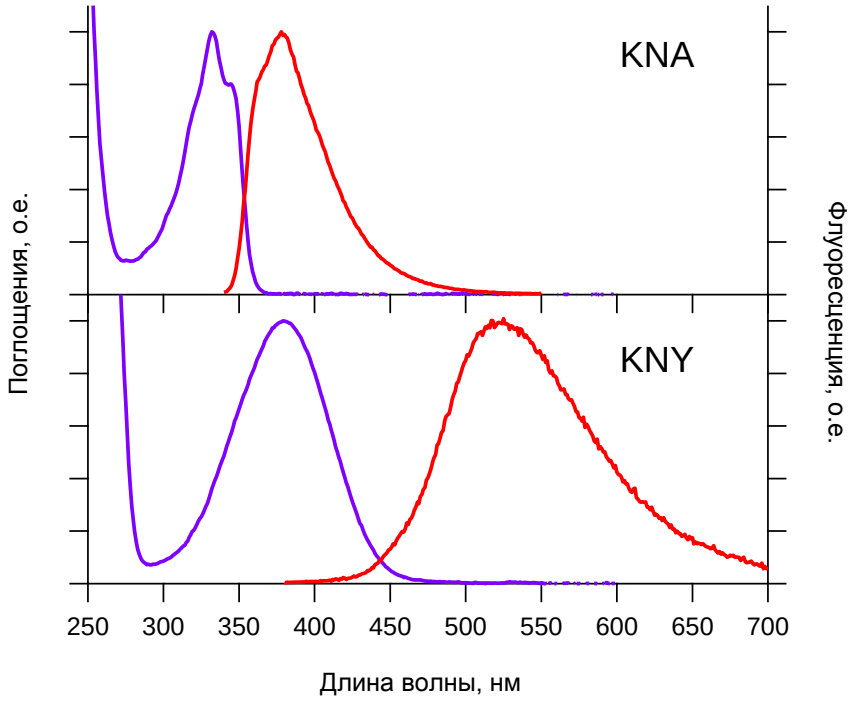

Рисунок 2. Спектры поглощения (фиолетовый) и флуоресценции (красный) для KNA (верхний) и KNY (нижний) в нейтральных водных растворах.

Схема фотолиза KNA представлена ниже:

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

В процессе фотолиза KNA эффективно образуется триплетное состояния (≈ 80 %), которое является единственным короткоживущим интермедиатом, образующимся при фотовозбуждении KNA. Оно характеризуется интенсивной и узкой полосой поглощения с максимумом на 600 нм.

В процессе лазерного импульсного фотолиза водных растворов KNY мы наблюдаем образование двух промежуточных интермедиатов – енольной формы KNY в основном состоянии и триплетного состояния KNY, а также двух конечных продуктов – 4-гидроксихинолин и 2,3-дигидро-4-гидроксихинолин (4HQN и DHQN, Схема 2). Однозначно показано, что 4HQN является продуктом термического разложения интермедиата, отнесенного к енольной форме KNY.

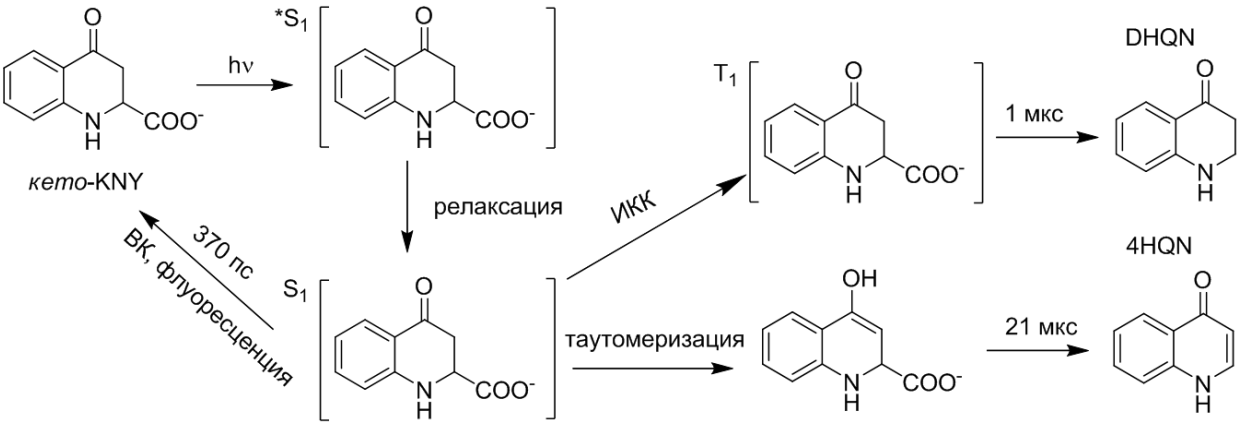

Схема 2. Схема фотоиндуцированных реакций KNY.

Основным каналом гибели S_1 состояния KNY является внутренняя конверсия в основное состояние. Другие каналы, а именно флуоресценция, интеркомбинационная конверсия в триплетное состояние и таутомеризация в енольную форму дают заметно меньший вклад в общую деактивацию S_1 состояния KNY. Основным каналом гибели триплетного состояния KNY является декарбоксилирование с образованием DHQN, тогда как декарбоксилирование енольной формы приводит к образованию 4HQN.

Таблица 1 суммирует основные фотохимические свойства KN и продуктов его разложения, KNA и KNY, исследованных в этой работе. Из таблицы видно, что продукты разложения являются существенно более фотоактивными, чем исходный KN.

Таблица 1. Времена жизни флуоресценции ($t_{фл}$); квантовые выходы флуоресценции ($\Phi_{фл}$), триплетного состояния (Φ_T), внутренней конверсии ($\Phi_{вк}$), таутомеризации ($\Phi_{енол}$), анаэробного ($\Phi_{фр}^{анаэр}$) и аэробного фоторазложения ($\Phi_{ФР}^{аэр}$); константы скорости флуоресценции ($k_{фл}$), интеркомбинационной конверсии ($k_{икк}$), внутренней конверсии ($k_{вк}$), таутомеризации ($k_{енол}$) для KN, KNA, KNY.

	KN	**KNA**	**KNY**
$t_{фл}$, пс	26.9±0.8	150±30	370±30
$\Phi_{фл}$	$(9.2\pm1.0)\cdot10^{-4}$	$(1.4\pm0.2)\cdot10^{-2}$	$(7.5\pm1.0)\cdot10^{-3}$
Φ_T	$(7.0\pm1.7)\cdot10^{-3}$	0.82±0.15	$(2.2\pm0.6)\cdot10^{-2}$
$\Phi_{вк}$	0.99	0.17	0.96
$\Phi_{енол}$	НО	НО	$(1.2\pm0.4)\cdot10^{-2}$
$K_{фл}$, $с^{-1}$	$3.4\cdot10^{7}$	$9.1\cdot10^{7}$	$2.0\cdot10^{7}$
$K_{икк}$, $с^{-1}$	$2.6\cdot10^{8}$	$5.5\cdot10^{9}$	$5.9\cdot10^{7}$
$K_{вк}$, $с^{-1}$	$3.7\cdot10^{10}$	$1.1\cdot10^{9}$	$2.6\cdot10^{9}$
$K_{енол}$	НИ	НИ	$3.2\cdot10^{7}$
$\Phi_{фр}^{анаэр}$	$(1.5\pm0.2)\cdot10^{-5}$	$(6.0\pm1.5)\cdot10^{-3}$	$(3.0\pm0.8)\cdot10^{-2}$
$\Phi_{фр}^{аэр}$	$(3.8\pm0.4)\cdot10^{-5}$	$(2.6\pm0.6)\cdot10^{-3}$	$(8\pm2)\cdot10^{-3}$

НО – не обнаружено; НИ – не измерено;

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

Пятая глава посвящена установлению влияния вязкости среды на фотохимические свойства исследуемых ранее соединений – KNA и KNY, что позволит более достоверно оценить возможную роль УФ-фильтров в вязкой среде хрусталика.

Для исследования были использованы методы и подходы, аналогичные экспериментам в прошлой главе. Изменение вязкости среды осуществлялось путем варьирования доли глицерина в бинарных водно-глицериновых смесях,

используемых в качестве растворителя. Как видно из Рисунка 3, А, квантовый выход флуоресценции KNA очень слабо зависит от вязкости раствора, а выход триплетных состояний KNA не зависит.

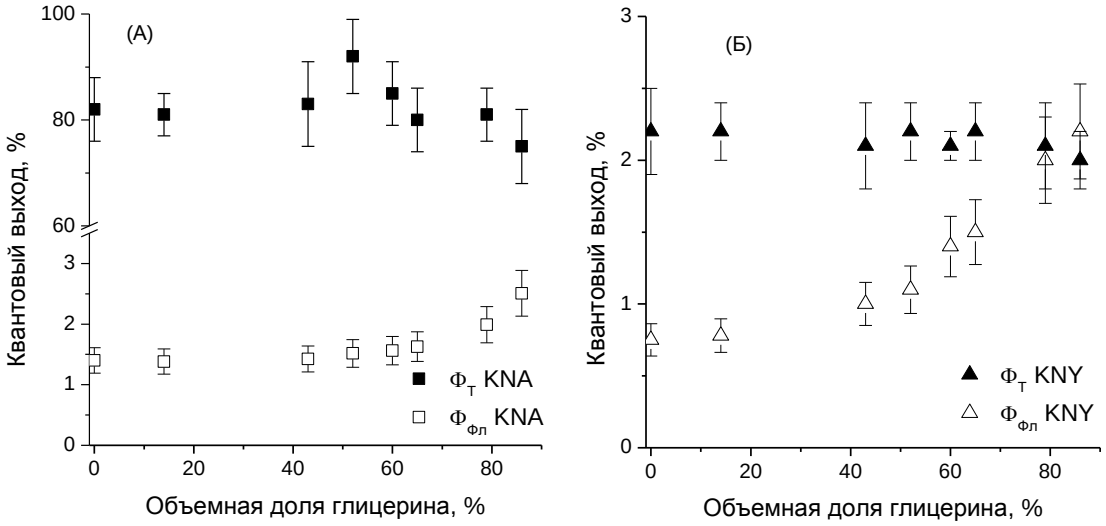

Рисунок 3. Зависимость квантовых выходов флуоресценции ($\Phi_{фл}$, открытые символы) и триплетных состояний (Φ_T, сплошные символы) от объемной доли глицерина для KNA (А, квадраты) и KNY (Б, треугольники), измеренных при комнатной температуре (25°C).

При фотолизе KNY в водно-глицериновых смесях обнаружено значительное увеличение интенсивности флуоресценции при увеличении доли глицерина, и наблюдается сдвиг полосы эмиссии в синюю область видимого спектра, что можно объяснить уменьшением эффективности сольватации S^1 состояния в присутствии глицерина за счет ослабления межмолекулярных водородных связей. Значение Φ_T при фотолизе KNY не зависит от доли глицерина (Рисунок 3, Б).

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

триплетное состояние, квантовый выход которого для УФ-фильтров определялся только в водном растворе, но в вязкой среде может быть значительно выше.

Шестая глава посвящена изучению механизмов взаимодействия фотовозбужденных УФ-фильтров с белками хрусталика. В качестве модельных объектов использовались основной структурный белок хрусталика альфа-кристаллин и KNA, буферный раствор которых облучался УФ-излучением в анаэробных условиях. Кроме того, в шестой главе представлены результаты исследования влияния естественных антиоксидантов хрусталика –Asc и GSH – на фотоиндуцированные модификации белков хрусталика. Облученные белки анализировались с применением оптических, масс-спектрометрических и других биохимических методов.

При облучении наблюдается формирование полосы поглощения с максимумом на 355 нм (фотоиндуцированная модификация кристаллина) и образование рассеивающих центров (Рисунок 4, оранжевая линия). При добавлении в раствор естественных антиоксидантов хрусталика в концентрациях, близких к значениям для здорового хрусталика человека (2 мМ Asc или 2 мМ GSH) наблюдается существенное снижение эффективности наблюдаемых процессов (зеленая и синяя линии). Денатурирующие условия (6 М мочевины), напротив, ускоряют фотоиндуцированные процессы (фиолетовая линия). Контрольный эксперимент (красная линия) подтверждает фотоиндуцированный механизм образования модификаций.

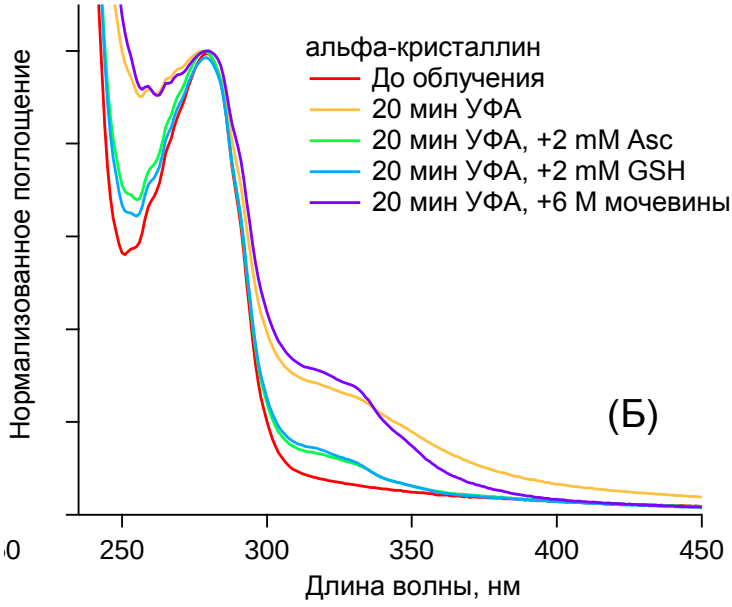

Рисунок 4. Нормализованные спектры оптического поглощения облученного альфа-кристаллина после очистки от низкомолекулярной фракции через 20 минут облучения с KNA в присутствии антиоксидантов или мочевины.

Наиболее показательным результатом анализа продуктов фотолиза кристаллинов с KNA является изображение гелей после разделения облученных белков (Рисунок 5): образование стабильных белковых агрегатов с высокой молекулярной массой (> 200 кДа) является основным изменением структуры белка, наблюдаемым через 20 минут УФ-облучения в присутствии KNA (Рисунок 5, 4 дорожка). В присутствии мочевины наблюдаемый эффект агрегации приводит к образованию еще больших мультимеров и практически полному исчезновению мономеров альфа-кристаллинов (Рисунок 5, 7 дорожка). Присутствие в растворе антиоксидантов полностью ингибирует наблюдаемый процесс формирования белковых агрегатов (Рисунок 5, 5-6 дорожки). Все модифицированные белки подвергались масс-спектрометрическому анализу, включающему идентификацию и оценку квантовых выходов.

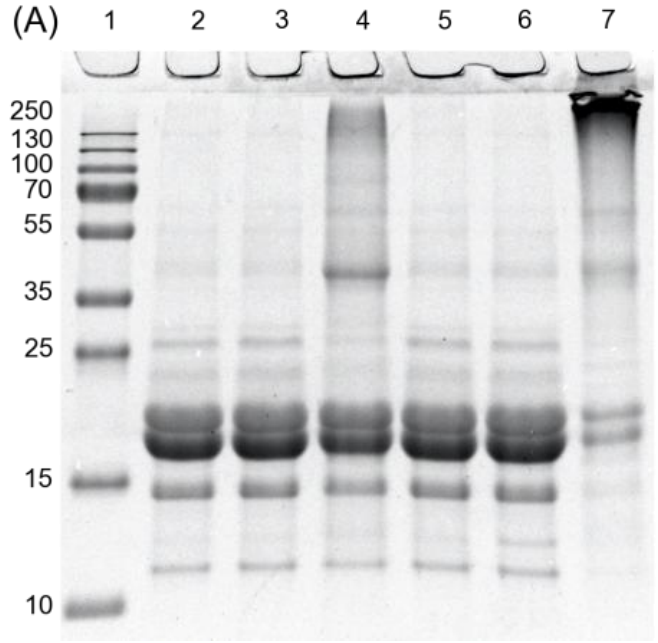

Рисунок 5. 15 % полиакриламидный гель, содержащий в дорожках: 1 – смесь стандартов (PageRuler, Fermentas) для определения размера белка; 2- альфа-кристаллин без обработки (контроль); 3 – 20 минут барботирования аргоном; 4 – 20 минут фотолиза с KNA; 5 – с добавлением 2 мМ Asc; 6 – с добавлением 2 мМ GSH; 7 – в денатурирующих условиях (6 М мочевины).

Полученные в ходе работы результаты позволяют предположить наиболее вероятный механизм взаимодействия альфа-кристаллина с фотовозбужденной KNA в анаэробных условиях фотолиза (Схема 3):

- фотовозбужденная молекула KNA переходит в триплетное состояние;

- поскольку константы скорости тушения ^{T}KNA для Trp и Tyr существенно выше, чем для других аминокислот, то ^{T}KNA реагирует с альфа-кристаллином

через триптофановые и тирозиновые аминокислотные остатки с образованием их радикалов;

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

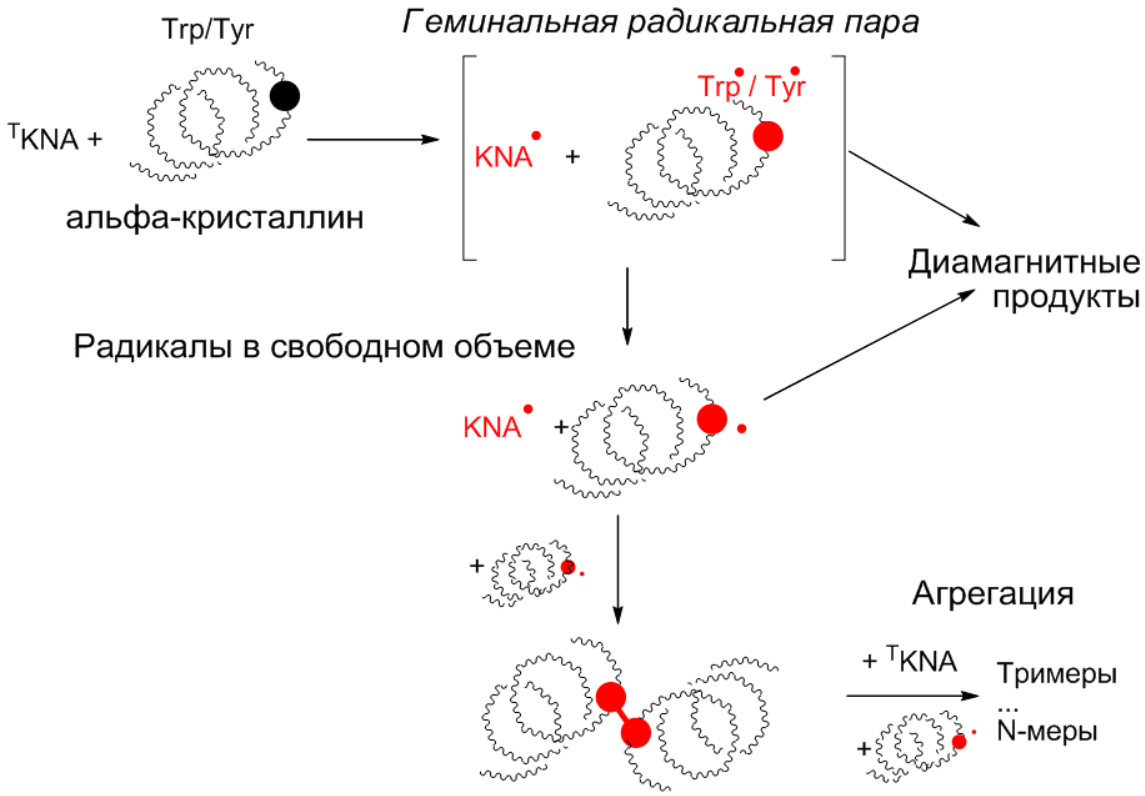

Схема 3. Механизм KNA-сенсибилизированного фотолиза альфа-кристаллина в анаэробных условиях.

В последней главе диссертационной работы были использованы результаты и выводы прошлых глав для построения достоверной модели фотоиндуцированного повреждения белков хрусталика за счет взаимодействия с фотовозбужденными хромофорами. При постановке экспериментов и при формировании выводов учитывались все особенности специфичной ткани хрусталика: значение pH, высокая концентрация белков, крайне низкая концентрация кислорода, высокая вязкость среды, наличие антиоксидантов и др. Все это позволяет говорить о высоком уровне достоверности предложенных механизмов образования фотоиндуцированных модификаций и методов их

ингибирования. Наблюдаемое в ходе экспериментов формирование высокомолекулярных агрегатов белков иллюстрирует образование центров рассеяния света в процессе развития катаракты хрусталика. Результаты, представленные в данной главе, подтверждают вероятный вклад в патогенные процессы естественных «защитников» хрусталика – УФ-фильтров. Данное исследование позволяет существенно продвинуться в понимании процессов старения и катарактогенеза в тканях хрусталика. Именно через понимание причин возникновения заболевания возможна разработка метода профилактики или неинвазивного лечения.

Заключение

В рамках данной диссертационной работы были проведены исследования хрусталика и процессов в его тканях с возрастом и при развитии катаракты с целью установления молекулярных механизмов катарактогенеза. Понимание причин возникновения помутнения хрусталика позволит в будущем разрабатывать превентивные меры воздействия и нехирургические способы лечения катаракты. Полнота исследования подтверждается использованием в работе объектов изучения с разным уровнем организации: от целого хрусталика до молекулярных фракций (белковых и метаболомных) ткани хрусталика и отдельных компонент этих фракций (белков и хромофоров) с изучением их свойств и молекулярных реакций между ними.

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

Выводы

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

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

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

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

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

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

Результаты диссертационной работы опубликованы в следующих работах:

Статьи

Zelentsova E.A., Sherin P.S., Snytnikova O.A., Kaptein R., Vauthey E., Tsentalovich Yu.P. Photochemistry of aqueous solutions of kynurenic acid and kynurenine yellow // Photochem. Photobiol. Sci. 2013. Vol. 12, № 3. P. 546–558.

Sherin P.S., **Zelentsova E.A.**, Sormacheva E.D., Yanshole V.V., Duzhak T.G., Tsentalovich Yu.P. Aggregation of α-crystallins in kynurenic acid-sensitized UVA photolysis under anaerobic conditions // Phys. Chem. Chem. Phys. 2016. Vol. 18, № 13. P. 8827–8839.

Зеленцова Е.А., Шерин П.С., Центалович Ю.П., Сагдеев Р.З. Влияние вязкости среды на фотофизические свойства кинуреновой кислоты и желтого кинуренина // Изв. АН. Сер. хим. 2017. 66, № 2. с. 267–272.

Zelentsova E.A., Yanshole L.V., Fursova A.Zh., Tsentalovich Yu.P. Optical properties of the human lens constituents // J. Photochem. Photobiol. B. 2017. Vol. 173. P. 318–324.

Тезисы

Зеленцова Е.А., Снытникова О.А., Центалович Ю.П., Фотохимические свойства вторичных УФ-фильтров // Сборник тезисов Международной научной студенческой конференции (МНСК-50), 13-19 апреля 2012г., Новосибирск, Россия, с. 85.

Зеленцова Е.А., Шерин П.С., Снытникова О.А., Центалович Ю.П., Фотохимические свойства желтого кинуренина и кинуреновой кислоты // Сборник тезисов Международной научной студенческой конференции (МНСК-51), 12-18 апреля 2013г., Новосибирск, Россия, с. 72.

Зеленцова Е.А., Фотоиндуцированные реакции белков хрусталика // Сборник тезисов Международной научной студенческой конференции (МНСК-52), 11-18 апреля 2014г., Новосибирск, Россия, с. 54.

Зеленцова Е.А., Снытникова О.А., Шерин П.С., Центалович Ю.П., Photochemical properties of kynurenine derivatives – kynurenine yellow and kynurenic acid // Сборник тезисов Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием Менделеев - 2012, 3-6 апреля 2012г., Санкт-Петербург, Россия, с. 308-309.

Zelentsova E.A., Sherin P.S., Snytnikova O.A., Vauthey E., Tsentalovich Yu.P., Photochemistry of kynurenic acid and kynurenine yellow – products of decomposition of eye lens UV filters // Book of abstracts of the International Conference on Photochemistry, July 21-26, 2013, Leuven, Belgium, P. 132.

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

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

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