

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Савина Екатерина Дмитриевна

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы

Исследование фотохимических реакций кинуреновой
кислоты с аминокислотами и белками хрусталика

Направление подготовки
Направленность

04.06.01 Химические науки
02.00.10 Биоорганическая химия

1. Введение

С увеличением продолжительности жизни человека повышается риск развития возрастных заболеваний, причины возникновения которых на сегодняшний день остаются во многом неизвестными. В основе многих распространенных болезней, в частности, катаракты, лежат реакции биополимеров с реакционно-активными частицами, образующимися в организме под воздействием внешних и внутренних факторов. Важным внешним фактором является солнечное излучение. Под действием света в клетках запускаются каскад фотохимических реакций, продуктами которых часто являются высокорекреационные формы кислорода и молекул с малым молекулярным весом, которые присутствуют в живой ткани и поглощают УФ излучение. Дальнейшие реакции этих реакционно-активных частиц в настоящее время мало изучены; их итогом может являться модификация белков с последующей агрегацией.

Основными мишенями УФ излучения и реакционных частиц в хрусталиках глаза являются его водорастворимые белки и метаболиты. Белки хрусталика – кристаллины – играют ключевую роль в поддержании прозрачности хрусталика и его светопреломляющей силы. Кристаллины не обновляются на протяжении жизни индивида и накапливают многочисленные пост-трансляционные модификации [1-2]. В молодом возрасте они защищены от окислительных повреждений низким уровнем кислорода в клетках ($p(O_2) < 2$ Торр [3]) и высокой концентрацией антиоксидантов (аскорбат и глутатион [4-6]). Однако с возрастом антиоксидантная защита хрусталика ослабевает, что приводит к накоплению модифицированных биомолекул в клетках и развитию катаракты.

Наиболее пагубное влияние на компоненты хрусталика оказывают УФБ (280-315 нм) и УФА (315-400 нм) диапазоны излучения Солнца. Фотоокисление белков может протекать по двум основным путям. Первый путь – прямое фотоокисление белков за счет поглощения света УФБ диапазона, что может приводить к их фотоионизации и агрегации. По второму пути происходит фотовозбуждение молекул, присутствующих в ткани и поглощающих излучение УФА диапазона, с образованием реакционно-активных триплетных состояний. Последние реагируют с белками в реакциях двух типов: (1) прямая реакция с белком и образованием радикалов (тип I) и (2) перенос энергии от фотовозбужденной молекулы хромофора УФА света к молекулам O_2 с образованием синглетного кислорода (1O_2), который окисляет находящиеся рядом аминокислотные остатки белков (тип II) [7]. В хрусталике глаза человека УФА излучение поглощается молекулами с небольшим молекулярным весом – кинуренином (KN) и его производными. Кинуренины, метаболиты хрусталика, присутствуют в клетках в большом количестве [5-6] и выполняют функцию светофильтров. При фотовозбуждении они эффективно преобразуют поглощенный свет в тепло [8-9], защищая содержимое хрусталика от повреждения. Лишь небольшая часть кинуренинов под действием света может переходить в триплетное состояние [10-11], которое способно участвовать в процессах повреждения кристаллинов, что в конечном итоге приведет к развитию катаракты. Особенностью кинуренинов является их термическая нестабильность, что приводит к формированию в клетках хрусталика фотохимически активных соединений, играющих

роль фотосенсибилизаторов. Кинуреновая кислота (KNA), один из продуктов распада KN, является наиболее эффективным фотосенсибилизатором из исследованных производных KN. Хотя KNA присутствует в хрусталике в небольших количествах, она демонстрирует высокий выход триплетного состояния, и образование активных частиц в хрусталике под воздействием УФА излучения может быть сравнимо с KN. Следует подчеркнуть, что количество KNA значительно возрастает при развитии катаракты, что указывает на её возможное участие в модификации белков. В настоящее время фотохимические свойства KNA мало изучены, а информация о её фотоиндуцированных реакциях с белками хрусталика и вовсе отсутствует. Поэтому **целью** настоящей работы было изучение фотохимических реакций с участием KNA и установление её роли в фотоиндуцированной модификации белков хрусталика.

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

1. Исследование механизмов реакций триплетного возбужденного состояния KNA с рядом аминокислот, антиоксидантов, модельным белком лизоцимом и белками хрусталика глаза;
2. Исследование фотоиндуцированных модификаций белков хрусталика;
3. Исследование механизма KNA-фотосенсибилизированного повреждения белков хрусталика с помощью детального изучения фотоиндуцированных реакций между KNA и N-ацетил-L-триптофаном (NTpH).

Результаты, полученные при выполнении данной работы, являются важными и актуальными как с точки зрения фундаментальных исследований (механизмы фотоиндуцированных модификаций белков хрусталика), так и для понимания роли радикалов в развитии различных заболеваний, в первую очередь катаракты, с целью разработки новых методов замедления или предотвращения развития этого заболевания.

Научная новизна работы заключается в исследовании механизмов фотоиндуцированных радикальных реакций между хромофором хрусталика и аминокислотами / белками в условиях близких к естественным: (а) анаэробных условиях фотолиза (низкая концентрация кислорода) и (б) использовании УФА излучения, проникающего в глубь ткани хрусталика и поглощаемое его хромофорами. Установление детального механизма фотоиндуцированных реакций триплетного состояния KNA с белками, идентификация продуктов реакции, установление динамики их накопления и роли при фотоповреждении белков проведены впервые.

Методология и методы исследования. Исследования были проведены с использованием широкого набора физико-химических и биохимических методов, включая лазерный импульсный фотолиз, стационарный фотолиз, хроматографию, электрофорез и масс-спектрометрию.

Личный вклад автора. Автор работы участвовал в постановке задач, решаемых в настоящем исследовании, разработке плана исследований, в обсуждении результатов, формулировке выводов и подготовке публикаций. Все использованные в работе результаты были получены либо автором самостоятельно, либо при его непосредственном участии.

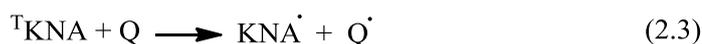
СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2. Фотохимические реакции KNA с биологическими молекулами

Возбуждение KNA в водном растворе приводит к образованию триплетного состояния, ^1KNA , которое характеризуется полосой поглощения с $\lambda_{\text{max}}=600$ нм [12-13] и квантовым выходом 82% [12]. ^1KNA может вступать в следующие реакции: (1) триплет-триплетной аннигиляции с переходом в основное состояние; (2) переноса электрона с молекулой-тушителем, с образованием соответствующих радикалов [14] и (3) переноса энергии в случае O_2 с образованием основного состояния KNA и синглетного кислорода [12]. При этом реакции второго и третьего типа характеризуются высокими константами скорости, $1-2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ соответствующие диффузионно-контролируемым процессам. Стоит отметить, что предыдущие эксперименты [14] проводились в водных растворах без контроля pH. Однако было показано, что спектральные свойства ^1KNA и её радикала сильно зависят от кислотности раствора [15]. Таким образом, поддержание pH раствора является важным условием для изучения фотохимических реакций с участием KNA. Поэтому все эксперименты в данной работе проводились в буферном растворе с постоянным значением pH раствора 7.4, близким к физиологическим условиям в хрусталике глаза (pH 6.85 [16]). Кроме того, кислород в хрусталике присутствует в следовых количествах [3], поэтому эксперименты проводились в анаэробных условиях (растворы продувались постоянным потоком аргона) с целью воспроизведения физиологических параметров среды.

2.1 Определение констант скорости тушения ^1KNA различными аминокислотами, кислородом и антиоксидантами

В данной работе были исследованы реакции тушения ^1KNA аминокислотами (триптофан, тирозин, цистеин, гистидин, фенилаланин и метионин), O_2 и антиоксидантами – аскорбатом (Asc) и глутатионом (GSH), которые присутствуют в хрусталике в значительных количествах [17]. Измерения проводились в нативных и денатурирующих условиях (с добавлением 6 М мочевины). Рассматриваемые аминокислоты являются донорами электронов и активно участвуют в процессах тушения возбужденных состояний. Метионин, цистеин и GSH были выбраны из-за наличия SH-группы (замещенной метильной группой в случае метионина), которая потенциально может участвовать в подобных реакциях. Схема реакций, протекающих в растворе, может быть представлена следующим образом (Q – молекула-тушитель):



Результаты работы показали, что наибольшие значения констант скорости (Таблица 1) демонстрируют O_2 и аминокислоты Trp, Tug и Cys. Основываясь на полученных значениях, можно сделать вывод, что другие аминокислоты (His, Phe и Met) не являются эффективными тушителями ^1KNA . Среди антиоксидантов наибольшее значение константы скорости тушения возбужденного состояния KNA демонстрирует Asc, который является эффективным тушителем триплетного состояния УФ фильтров хрусталика [18]. Значительное снижение константы скорости реакции с

участием GSH по сравнению с другими активными тушителями, в частности с Cys, вероятно, связано с наличием заместителей по его N- и C-концам (глутамина и глицина), которые стерически затрудняют реакцию с ^TKNA. Как можно заметить, константы в нативных условиях в 1.5 - 2 раза выше, чем в присутствии 6 М мочевины. Такая разница объясняется увеличением вязкости раствора примерно в 1.5 раза при добавлении 6 М мочевины [19].

Таблица 1 Константы скорости тушения ^TKNA различными тушителями в нативных и денатурирующих условиях.

Тушитель	$k_q \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$	
	PBS	PBS / 6М мочевины
Триптофан (Trp)	25.3 ± 3.0	16.0 ± 2.2
Тирозин (Tyr)	5.2 ± 1.0	2.2 ± 0.4
Цистеин (Cys)	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.2
Гистидин (His)	< 0.01	< 0.01
Фенилаланин (Phe)	< 0.01	< 0.01
Метионин (Met)	< 0.01	< 0.01
Аскорбат (Asc)	14.0 ± 1.4	11.0 ± 1.1
Глутатион (GSH)	0.11 ± 0.02	0.05 ± 0.01
Кислород	23.0 ± 2.3	13.0 ± 1.3
Лизоцим	10.3±0.1	-
α-кристаллин	-	9.4 ± 0.9

На рисунке 1 в качестве примера приведены спектры промежуточного поглощения, зарегистрированные при лазерном фотолизе 0.3 мМ KNA в PBS (pH 7.4) с добавлением 6М мочевины и в присутствии 1 мМ Trp и 1мМ Tyr; длина волны возбуждения 355 нм, энергия импульса лазера 3 мДж. Представленные спектры соответствуют короткоживущим частицам, образующихся после тушения ^TKNA (через 37 мкс после лазерного импульса). В случае Trp и Tyr наблюдаются полосы промежуточного поглощения с максимумами на 510 и 410 нм, соответственно, которые ранее наблюдали для радикалов этих аминокислот [20-21]. Таким образом, можно сделать вывод, что тушение ^TKNA происходит с образованием радикалов аминокислот и KNA. Кроме того, на спектре наблюдается отрицательная оптическая плотность в районе 310-350 нм, соответствующая уменьшению концентрации исходного вещества в основном состоянии за счет его перехода в продукты реакции. На основании полученных данных можно сделать вывод, что аминокислотные остатки белков Trp и Tyr являются наиболее уязвимыми для атаки ^TKNA, поскольку именно эти аминокислоты демонстрируют значительно более высокие значения констант скорости тушения ^TKNA по сравнению с остальными аминокислотами.

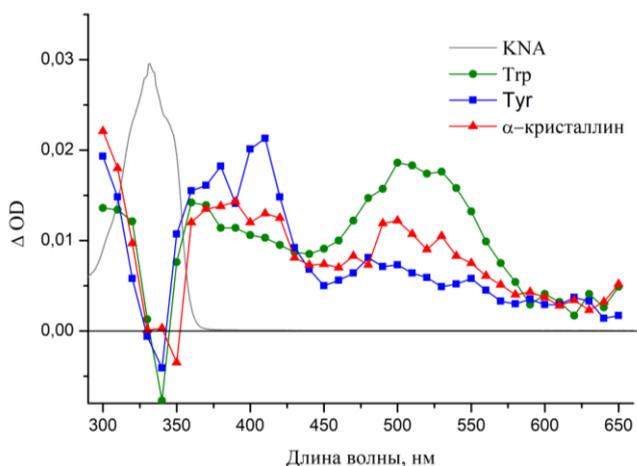


Рисунок 1 Спектры поглощения промежуточных частиц, полученные при фотолизе 355 нм KNA в насыщенном аргоном растворе через 37 мкс после лазерной вспышки: зеленые кружки - в присутствии Tgr; синие квадраты - при наличии Tug; красные треугольники - в присутствии α-кристаллина. Серая линия: стационарный спектр поглощения KNA.

2.2 Определение констант скорости тушения T_{KNA} белками

Для изучения фотохимических реакций KNA с белками использовались следующие тушители: (1) модельный белок лизоцим и (2) белки хрусталика, экстрагированные из бычьего хрусталика и разделенные с помощью гель-хроматографии на 4 фракции (α -, β_H -, β_L - и γ -кристаллины). Обозначения β_H и β_L относятся к высокомолекулярным (октомеры) и низкомолекулярным (димерам) комплексам β -кристаллина, соответственно.

В таблицах 1 и 2 приведены значения констант скорости тушения T_{KNA} белками хрусталика и модельным белком в нативных условиях. Стоит отметить, что константа скорости тушения α -кристаллином в PBS (Таблица 2) является оценкой, поскольку мы наблюдаем очень слабый сигнал тушения из-за особенностей строения белкового комплекса, а именно его мультимерности [22-23]. В связи с этим спектр промежуточного поглощения для α -кристаллина был записан в денатурирующих условиях (Рисунок 1). На спектре наблюдается формирование полос поглощения с максимумами, соответствующими поглощению нейтральных радикалов Tgr \cdot (510 нм) и Tug \cdot (410 нм). Наличие этих полос поглощения говорит о том, что тушение T_{KNA} α -кристаллином проходит посредством реакций с аминокислотными остатками Tgr и Tug. В таблице 1 приведено значение константы скорости тушения T_{KNA} α -кристаллином в денатурирующих условиях (6М мочевины).

Таблица 2 Константы скорости тушения T_{KNA} белками в нативных условиях.

	Тушитель			
	α -кристаллин	β_H -кристаллин	β_L -кристаллин	γ -кристаллин
$k_d \times 10^3 \text{ мл мг}^{-1} \text{ с}^{-1}$	≤ 3.7	8.1	15	29

На рисунке 2 приведены спектры промежуточного поглощения, полученные при фотолизе 0.3 мМ раствора KNA в PBS в присутствии 2.7 мг/мл α -кристаллина (в присутствии 6М мочевины), 5.3 мг/мл β -кристаллина (объединенная фракция) и 5.6 мг/мл γ -кристаллина через 40 мкс после лазерного импульса. Сравнение спектров показывает, что фотолиз α - и β -кристаллинов в присутствии KNA протекает через взаимодействие с Tgr и Tug аминокислотными остатками, с образованием соответствующих нейтральных радикалов. В то время как представители семейства γ -кристаллинов тушат T_{KNA} в основном за счёт реакций с Tug

аминокислотными остатками, о чем свидетельствует мощный сигнал с максимумом поглощения на 410 нм (Тур[•]). На спектре промежуточного поглощения, полученного при фотолизе 0.3 мМ раствора KNA в PBS в присутствии 1 мМ лизоцима (данные не приводятся) наблюдается формирование полосы поглощения в диапазоне длин волн 450-570 нм с максимумом поглощения на 510 нм (Тгр[•]). При этом выраженного максимума поглощения на 410 нм не наблюдается, что говорит о незначительном вкладе остатков Тур в процесс тушения ¹KNA лизоцимом. Наблюдаемые эффекты объясняются различным составом аминокислотных последовательностей белков (Таблицу 3). В составе α- и β-кристаллинов Тур и Тгр содержится практически в одинаковых количествах, поэтому мы фиксируем сигналы радикалов обеих аминокислот. В γ-кристаллинах количество остатков Тур (12-15 остатков) значительно превышает Тгр (4-5 остатка). Кроме того, анализ трехмерных структур γ-кристаллинов [24-25] показывает, что в нативных условиях остатки Тгр находятся внутри белковой глобулы, то есть экранированы от молекул растворителя и от KNA. Следовательно, вероятность ¹KNA встретиться с Тур значительно выше, чем с Тгр, поэтому сигнала радикала Тгр[•] на спектре практически не наблюдается. Для лизоцима наблюдается аналогичная ситуация. Рентгеноструктурный анализ лизоцима без сигнальной последовательности (потеря 19 аминокислотных остатков с N-конца) показал, что только два Тгр62 и Тгр123 находятся на поверхности и доступны для атаки, остальные четыре Тгр и все Тур скрыты внутри белковой глобулы.

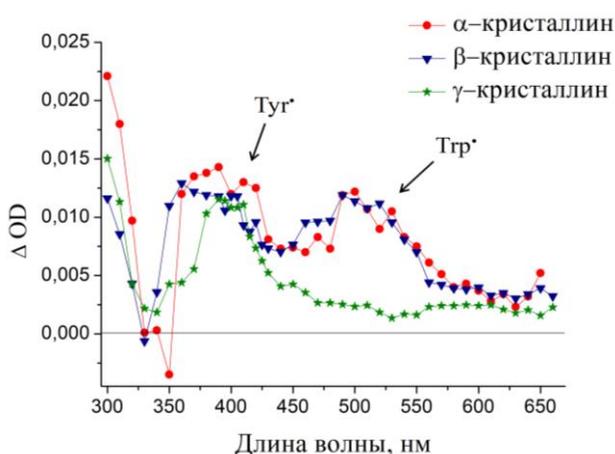


Рисунок 2 Спектры поглощения промежуточных частиц, наблюдаемые при лазерном импульсном фотолизе раствора KNA с кристаллинами через 40 мкс после импульса лазера. α-Кристаллин в денатурирующих условиях, β- и γ-кристаллины в нативных условиях.

Таблица 3 Содержание аминокислот в белках бычьего хрусталика и лизоциме(20-147).

	Тгр	Тур	Cys
α-кристаллин	1-2	1-6	1
β-кристаллин	5-9	7-11	2-8
γ-кристаллин	4-5	12-15	5-10
лизоцим	6	3	8

Из общих соображений ясно, что способность белков хрусталика тушить ¹KNA зависит от следующих факторов: (1) аминокислотного состава белка, а именно, от количества Тгр и Тур аминокислотных остатков в полипептидной цепочке белка, (2) упаковки аминокислотных остатков внутри белковой глобулы и (3) от количества субъединиц, из которых состоит белок. Полученные результаты показывают, что константы скорости тушения уменьшаются в ряду α (мультимеры)

$\langle \beta_h \rangle$ (октомеры) $< \beta_L$ (димеры) $< \gamma$ - (мономер), то есть в первую очередь с увеличением мультимерности белков β -кристаллинов по сравнению с γ -кристаллинами не приводит к увеличению итоговой константы скорости. Это означает, что в случае кристаллинов упаковка белков и их трехмерная структура играют более важную роль, нежели количество аминокислотных остатков в их составе.

3. Фотолиз кристаллинов в присутствии KNA

3.1 Спектры поглощения белков после фотолиза

После фотолиза растворов β - и γ -кристаллинов в присутствии KNA лазерным излучением (355 нм) в спектрах электронного поглощения белка (на рисунок 3 в качестве примера приведён спектр для γ -кристаллина) наблюдается монотонное увеличение интенсивности полосы поглощения с максимумом около 335 нм с увеличением дозы облучения. Это указывает на формирование модификаций, которые образуются в структуре белка и поглощают в области ближнего УФ. При этом интенсивность поглощения этих модификаций заметно возрастает при добавлении мочевины. Необходимо отметить, что на всех спектрах не наблюдается изменений в положении и форме полосы поглощения на 280 нм, соответствующей поглощению остатков Trp и Tyr. Это свидетельствует о том, что образующиеся модификации обладают спектральными свойствами, сильно отличающимися от спектров поглощения Trp и Tyr.

Ранее было показано, что для α -кристаллина, облучённого с помощью ртутной лампы (330-390 нм) в течение 20 минут в присутствии KNA, в спектрах оптического поглощения и флуоресценции наблюдается формирование аналогичных модификаций, количество которых значительно снижалась в присутствии антиоксидантов хрусталика Asc и GSH [26]. Таким образом, полученные данные как по поглощению, так и по флуоресценции однозначно указывают на образование флуоресцентных модификаций в белках хрусталика, спектральные свойства которых заметно отличаются от свойств остатков Trp и Tyr.

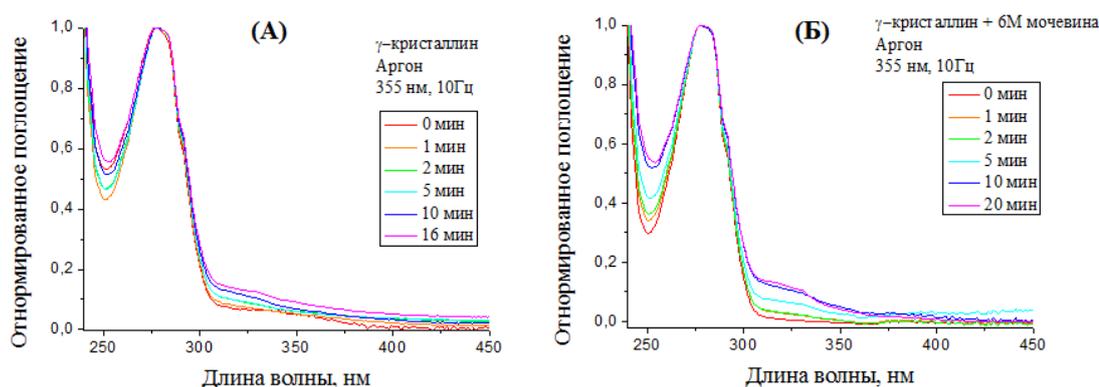


Рисунок 3 Нормализованные спектры оптического поглощения γ -кристаллинов после KNA -сенсibilизированного УФА фотолиза (355 нм) с разным временем облучения: (А) γ -кристаллин в нативных условиях, (Б) γ -кристаллин в денатурирующих условиях.

3.2 Электрофоретический анализ белков хрусталика после фотолиза

На рисунке 4 в качестве примера приведены изображения гелей для γ -кристаллинов в нативных и денатурирующих условиях (с добавлением 6М мочевины). Электрофоретический

анализ белков после фотолиза в нативных условиях (Рисунок 4 (А)) показал, что происходит уменьшение количества мономерной формы белка с увеличением дозы УФ излучения, и пропорциональное увеличение олигомерных форм белков: димеров, тримеров, тетрамеров и более высокомолекулярных мультимеров. Для α - и β -кристаллинов наблюдались аналогичные эффекты. Денатурирующие условия приводят к снижению выхода олигомеров и уменьшению концентрации мономерной формы γ -кристаллинов в процессе фотолиза (Рисунок 4 (Б)). Для других кристаллинов добавление 6 М мочевины приводит к значительному усилению агрегации и практически полному исчезновению мономерной формы белка, что может быть связано с потерей пространственной самоорганизации белка и увеличением доступности остатков Тгр и Туг для атаки ^1KNA , вызывая их модификацию и, как следствие, агрегацию.

УФА фотолиз γ -кристаллинов в присутствии КНА с использованием стационарного источника излучения проводили при барбатировании раствора кислородом (Рисунок 4 (В)) и аргоном (данные не представлены), чтобы сравнить характер модификаций, вызванных реакциями ^1KNA с белками хрусталика, в аэробных и анаэробных условиях. Фотолиз при физиологических условиях (нативное состояние, широкий диапазон излучения) проводили только для γ -кристаллинов. Это связано с тем, что среди всех кристаллинов эти белки проявляют наибольшую реакционную способность по отношению к $^1\text{O}_2$, который, вероятно, будет образовываться при аэробном фотолизе [27].

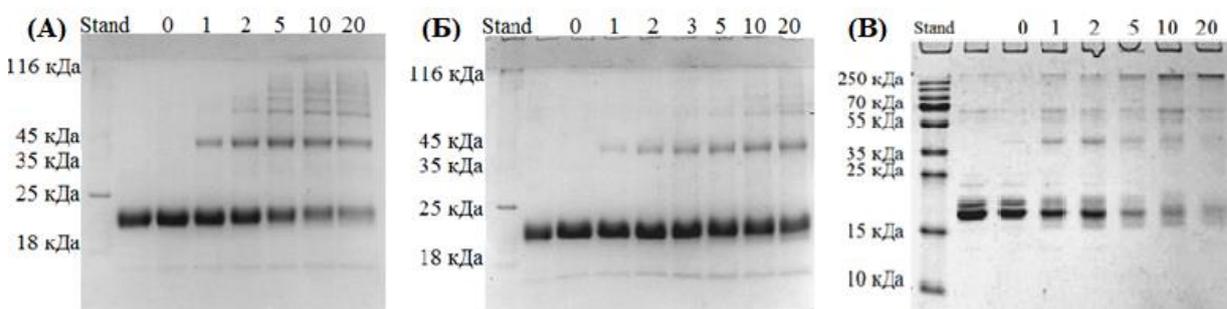


Рисунок 4 15%-ДСН-ПАА гели γ -кристаллина после фотолиза в присутствии КНА без мочевины (А), в присутствии 6 М мочевины (Б) и в аэробных условиях без мочевины (В): дорожка Stand соответствует стандарту, следующая дорожка соответствует образцу без барбатирования и засветки. Для остальных дорожек указана продолжительность фотолиза (в минутах).

Стационарный фотолиз в анаэробных условиях продемонстрировал результаты, аналогичные эксперименту с использованием лазера в качестве источника излучения (Рисунок 4 (А)). В присутствии кислорода (Рисунок 4 (В)) наблюдается практически полная деградация мономерной формы и образование высокомолекулярных агрегатов. Наблюдаемые различия в степени олигомеризации при анаэробном и аэробном фотолизе γ -кристаллинов свидетельствуют о различиях в механизмах протекания реакций. Вероятно, при аэробных условиях основным механизмом фотоокисления белка является не прямое окисление (тип I), а окисление (тип II). Кислород, присутствующий в растворе в больших концентрациях, быстро реагирует с молекулами ^1KNA с образованием $^1\text{O}_2$, который затем окисляет белки [7, 27-28]. Окисление белков приводит к их

олигомеризации, что мы и наблюдаем на геле. Реакции по типу I также вносят вклад в модификацию белков в аэробных условиях, но значительно меньший, чем тип II. При фотоокислении в анаэробных условиях наблюдается обратная картина, и основным механизмом модификации γ -кристаллинов становится тип I. Однако при этих условиях тип II также может вносить небольшой вклад за счёт присутствия остаточного кислорода в растворе ($\sim 10^{-5}$ M).

Таким образом, было показано, что фотолиз белков хрусталика в присутствии KNA приводит к агрегации кристаллинов. Склонность образовывать высокомолекулярные агрегаты зависит, прежде всего, о мультимерности белкового комплекса, что коррелирует с наблюдаемой зависимостью для констант скорости тушения ^1KNA белками.

3.3 Масс-спектрометрический анализ белков после фотолиза

Масс-спектрометрический анализ белков показал, что с увеличением дозы УФ излучения происходит монотонное уменьшение исходных форм белка, скорость этого процесса значительно возрастает при добавлении 6 M мочевины. Таким образом, незначительное уменьшение мономерной формы на гелях и увеличение интенсивности полосы поглощения с максимумом на 335 нм, свидетельствуют о том, что в денатурирующих условиях происходит модификация белков с незначительным вкладом в изменение молекулярной массы белка и образованием продуктов, поглощающих в УФ области. В отсутствие мочевины основными продуктами фотоповреждения, по-видимому, остаются высокомолекулярные агрегаты белков. Масс-спектрометрический анализ пептидов белков, полученных при ферментативном гидролизе трипсином, показал значительное уменьшение количество T_{gr}- и T_{ug}-содержащих пептидов в случае α -кристаллина [26] и в основном T_{ug}-содержащих пептидов для γ -кристаллинов. Присутствие антиоксидантов предотвращает деградацию пептидов [26]. Анализ пептидов β -кристаллина в настоящем исследовании не проводился в связи с многообразием представителей этого семейства.

Таким образом, полученные нами данные подтверждают механизм, который был предложен в разделе 2.2. Согласно этому механизму, тушение ^1KNA белками хрусталика происходит за счёт реакций с T_{gr} и T_{ug} аминокислотными остатками α - и β -кристаллина и с остатками T_{ug} для γ -кристаллина. Деградация соответствующих пептидов, T_{gr}- и T_{ug}-содержащих для α -кристаллина, и по всей видимости для β -кристаллина, и T_{ug}-содержащих для γ -кристаллина, говорит об их активном участии в фотоповреждении белков.

4. Механизм димеризации и окисления T_{gr} в результате УФА фотолиза в присутствии KNA

4.1 Спектральные характеристики радикала KNA \cdot

Реакция между T_{gr} и ^1KNA протекает по механизму переноса электрона с константой скорости $2.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ с образованием соответствующих радикалов (см. раздел 2.1). Образовавшиеся радикалы могут участвовать в реакциях между собой или O_2 , присутствующим в растворе. Эксперименты в атмосфере аргона, воздуха и кислорода показали, что скорость гибели радикалов увеличивается пропорционально концентрации кислорода в растворе. Увеличение скорости гибели в аэробных условиях, по-видимому, связана с взаимодействием радикалов с O_2 .

По литературным данным известно, что радикалы Trp^\cdot реагируют с O_2 с очень маленькой константой скорости ($\leq 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [29-30]) и на использованной временной шкале нашего эксперимента (10 мкс) мы не могли её зарегистрировать. Следовательно, наблюдаемый эффект можно отнести к реакции между $\text{KNA}^{\cdot-}$ и O_2 , которая приводит к восстановлению KNA и образованию супероксида $\text{O}_2^{\cdot-}$. Константа скорости этой реакции была определена в работе и составила $(2.0 \pm 0.2) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. На рисунке 5 представлен спектр промежуточного поглощения радикала $\text{KNA}^{\cdot-}$, который имеет две широкие полосы поглощения с максимумами около 370 и 510 нм. Кроме того, в работе был рассчитан коэффициент экстинкции радикала $\text{KNA}^{\cdot-}$ ($\epsilon_{\text{KNA}^{\cdot-}}$):

$$\epsilon_{\text{KNA}^{\cdot-}}(\lambda) = \epsilon_{\text{Trp}^\cdot}(\lambda) * A(\lambda)/B(\lambda) \quad (4.1),$$

где $\epsilon_{\text{NTGr}^\cdot}(\lambda)$ - коэффициент экстинкции радикала NTGr^\cdot на длине волны λ , отношение $A(\lambda) / B(\lambda)$ экспериментально измерено. Из литературных данных известно, что $\epsilon_{\text{NTGr}^\cdot}(510 \text{ нм}) = 1800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [31]. Таким образом, $\epsilon_{\text{KNA}^{\cdot-}} = 2100 \pm 200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

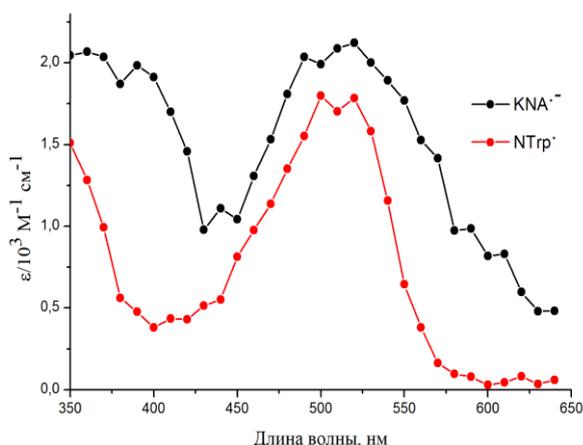


Рисунок 5. Спектры поглощения радикалов $\text{KNA}^{\cdot-}$ и NTGr^\cdot .

В работе также была определена константа скорости реакции гибели радикалов $\text{KNA}^{\cdot-}$ и NTGr^\cdot . Радикалы могут гибнуть в реакциях между двумя одинаковыми радикалами или вступать во взаимодействие друг с другом. Первоначально мы предположили, что эти реакции могут протекать с одинаковыми скоростями. Полученное значение $k_R = (3.2 \pm 0.6) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ значительно выше, чем значение константы скорости реакции рекомбинации двух радикалов Trp^\cdot , известное по литературным данным ($(2-8) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, [29-30]). Поэтому наше предположение оказалось не совсем верным, и полученное значение k_R следует рассматривать как оценочное значение константы скорости реакции между радикалами $\text{KNA}^{\cdot-}$ и NTGr^\cdot .

4.2 Стационарный и псевдо-стационарный фотолиз

Образцы, содержащие 0.3 мМ KNA и 1 мМ NTGrH в PBS, облучали с помощью ртутной лампы (стационарный фотолиз). Диапазон длин волн, соответствующий УФА излучению, вырезали с помощью водного и набора стеклянных фильтров (355-380 нм). Облучение также осуществлялось с помощью низкоинтенсивного лазера (355 нм, 3 мДж/импульс, частота 10 Гц) – псевдо-стационарный фотолиз.

Стационарный фотолиз растворов показал, что скорость разложения NTGrH зависит от концентрации кислорода в растворе и значительно превышает скорость разложения KNA (Рисунок 6, Таблица 4). Различия в скорости разложения исходных форм NTGrH и KNA связано с

участием $O_2^{\cdot -}$ и 1O_2 в фотохимических реакциях. Синглетный кислород может образовываться в реакциях тушения 1KNA кислородом, и затем окислять аминокислоту. Для оценки степени участия 1O_2 в разложении NTGrH был проведен дополнительный эксперимент по фотолизу в дейтерированной воде. Известно, что время жизни 1O_2 значительно увеличивается при переходе от H_2O (4 мкс) к D_2O (64 мкс) [33]. Следовательно, более длительное присутствие 1O_2 в растворе должно увеличить разложение NTGrH. Наши эксперименты показали, что фоторазложение NTGrH в D_2O в атмосфере воздуха и кислорода увеличивается примерно в два раза по сравнению с аналогичными экспериментами, проведенными в H_2O , в то время как для анаэробных условий Φ_{dec} не изменяется. Это указывает на то, что в анаэробных условиях (при низких концентрациях O_2) реакции с 1O_2 дают незначительный вклад в общую гибель реагентов и тушение 1KNA происходит только в реакции с аминокислотой. Следовательно, значительное увеличение разложения NTGrH в аэробных условиях следует связать с реакцией NTGr с синглетным кислородом с образованием окисленных продуктов.

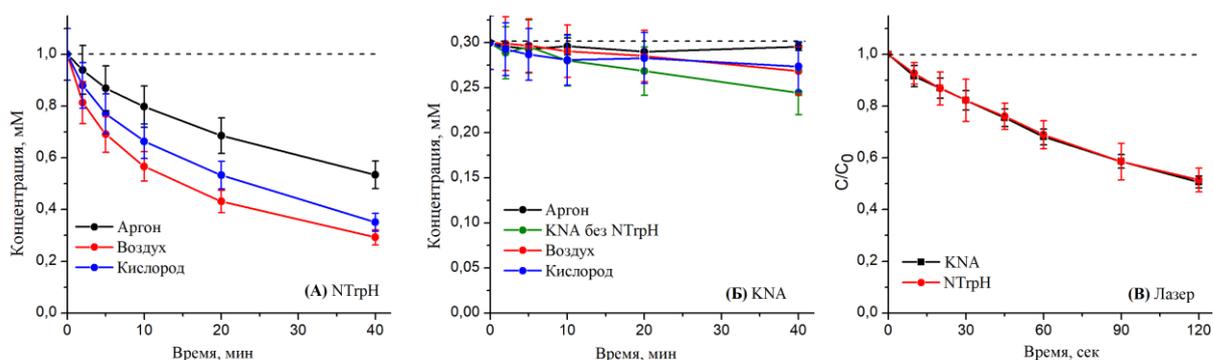


Рисунок 6 Зависимости степени разложения (А) NTGrH и (Б) KNA при стационарном УФ-А фотолизе KNA и NTGrH в PBS от дозы облучения: черная линия – под аргоном; красная – под воздухом и синяя – под кислородом. (Б) зеленая линия – фоторазложение KNA под аргоном в отсутствие NTGrH. (В): Зависимости разложения NTGrH и KNA от времени облучения относительно их начальных концентраций (C/C_0) при псевдо-стационарном фотолизе KNA и NTGrH в PBS в атмосфере аргона. Каждая точка представляет собой среднее значение \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

При псевдо-стационарном фотолизе происходит генерация высоких концентраций 1KNA и радикалов за короткое время. Как видно из таблицы 4, Φ_{dec} (NTGrH) и Φ_{dec} (KNA) значительно возрастают при переходе от стационарного к псевдо-стационарному фотолизу, что может быть вызвано прямыми реакциями между радикалами $KNA^{\cdot -}$ и $NTGr^{\cdot}$ с образованием диамагнитных продуктов. При стационарном фотолизе концентрация радикалов значительно ниже, и образовавшиеся радикалы $KNA^{\cdot -}$ в основном участвуют в реакциях с остаточным O_2 в растворе с образованием восстановленной формы KNA и $O_2^{\cdot -}$. Следует также отметить, что зависимости C/C_0 для KNA и NTGrH совпадают (Рисунок 6 (В)); это указывает на то, что при фоторазложении одной молекулы KNA происходит гибель трех молекул NTGrH.

Таблица 4. Квантовые выходы разложения (Φ_{dec}) KNA и NTrpH в PBS (pH 7.4) при стационарном (облучение лампой) и псевдо-стационарном (облучение лазером) фотолизе.

Источник излучения	Условия	Растворитель	$\Phi_{\text{dec}}(\text{KNA}) / \%$	$\Phi_{\text{dec}}(\text{NTrpH}) / \%$
Лампа (355-380 нм)	Аргон, без NTrpH	H ₂ O	0.11 ± 0.02	–
	Аргон	H ₂ O	0.021 ± 0.013	1.6 ± 0.3
		D ₂ O	0.041 ± 0.018	1.6 ± 0.4
	Воздух	H ₂ O	0.055 ± 0.009	7.3 ± 1.4
		D ₂ O	0.067 ± 0.021	14.0 ± 2.8
	Кислород	H ₂ O	0.043 ± 0.025	3.6 ± 0.2
D ₂ O		0.053 ± 0.034	5.8 ± 1.2	
Лазер (355 нм)	Аргон	H ₂ O	5.7 ± 1.1	19.0 ± 3.8

4.3 Анализ продуктов, образующихся при УФА фотолизе

Масс-спектрометрический анализ позволил определить основные продукты фотохимических реакций, характеризующиеся отношением массы к заряду (m/z) иона ($M+H^+$): 176.0710, 146.0595, 263.1026, 279.0973 и 491.1926 (в порядке возрастания времени удерживания).

К продуктам фоторазложения KNA относятся соединения 4-гидроксихинолин (4HQ, m/z 146.0595) и 1,4-дигидрохинолин-2-карбоновая кислота (1,4-DHQ, m/z 176.0710), структуры (Рисунок 7) которых были доказаны на основе МС/МС спектров и сравнении спектров поглощения с литературными данными [8]. Эти продукты образуются из KNA в реакциях, приводящих к отрыву атома кислорода от карбоксильной или карбонильной группы, соответственно, и их концентрация увеличивается во время фотолиза. Стоит также отметить, что эти продукты не образуются при аэробном фотолизе, что свидетельствует о протекании реакции между $\text{KNA}^{\cdot-}$ и кислородом, при которой происходит эффективное восстановление KNA.

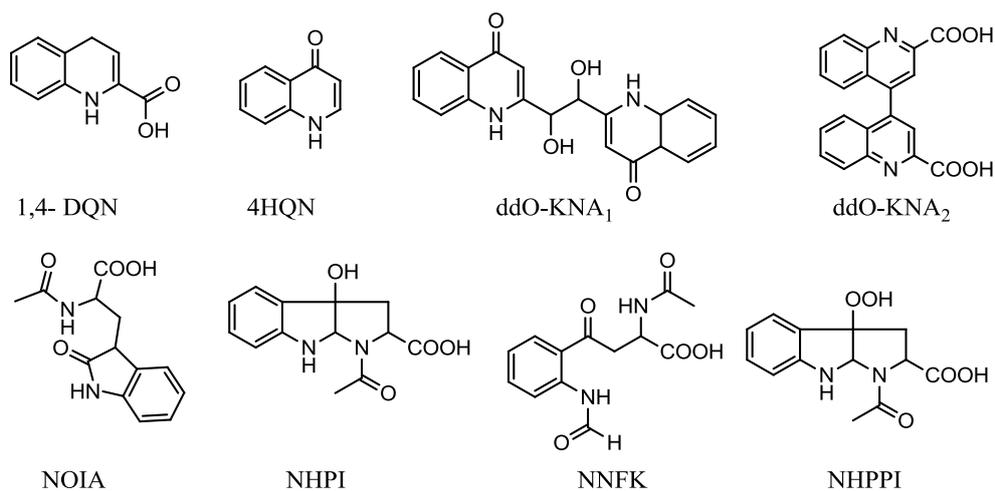


Рисунок 7 Структуры продуктов фотохимических реакций между KNA и NTrpH.

Продукты с m/z 263.1026 и m/z 279.0973 элюируются в виде двух отдельных пиков и соответствуют одно- и двукратно окисленным формам NTrp. Структуры продуктов были определены на основании совпадения их спектров оптического поглощения с литературными данными по окисленным формам Trp. Таким образом, однократно окисленным (m/z 263.1026)

производным NTGr соответствуют: N-ацетил-оксиндолаланин (NOIA) [34] и N-ацетил-3 α -гидроксипирролоиндол (NHPI) [35-37]. К двукратно окисленным (m/z 279.0973) относятся: N-ацетил-N-формилкинурунин (NNFK) и N-ацетил-3 α -гидропероксипирролоиндол (NHPPi) [35-37] (Рисунок 7). Продукты окисления NTGrH отсутствуют в исходном растворе, и их содержание увеличивается в зависимости от времени облучения. В аэробных условиях выходы NHPI, NNFK и NHPPi увеличиваются в несколько раз, в то время как NOIA показывает увеличение содержания только на 30%.

Продукты с m/z 491,1926 выходят на хроматограмме в виде шести пиков и относятся к димерам NTGr, ковалентно связанным по различным положениям индольного кольца и / или аминокислотного остова. Спектры оптического поглощения и МС/МС спектры показывают образование трех пар димеров NTGr, часть из которых могут быть диастереоизомерами.

Аналогичный анализ продуктов был проведен для эксперимента по псевдо-стационарному фотолизу растворов KNA. Основное различие псевдо-стационарного фотолиза от стационарного заключалось в значительном увеличении выхода димерных форм аминокислоты и снижении окисленных производных. В частности, в данном эксперименте были обнаружены только два продукта окисления NTGr - NHPI и NNFK, количество которых увеличивалось с дозой облучения. Кроме того, был обнаружен ещё один димер NTGr (m/z 491.1926, седьмой пик), а также два пика с m/z 349.1182 и m/z 345.0869. Эти пики были отнесены к димерам дезоксигенированной KNA (ddO-KNA) с потерей двух атомов кислорода и добавлением (m/z 349.1182, ddO-KNA₁) или потерей (m/z 345.0869, ddO-KNA₂) двух атомов водорода (Рисунок 7). Скорее всего, образование ddO-KNA₁ и ddO-KNA₂ происходит через рекомбинацию двух радикалов KNA \cdot^- , которые уже потеряли атомы кислорода. Ещё одним продуктом является ковалентно связанный аддукт KNA-NTGr (m/z 434.1349). Продукт элюируется в виде нескольких пиков, что говорит об образовании ковалентных связей по различным положениям ароматического кольца как в структуре KNA, так и в аминокислоте. Структуры этих продуктов не были определены из-за низкой интенсивности сигнала.

Контрольные эксперименты по стационарному фотолизу растворов KNA без NTGrH в анаэробных условиях, а также по инкубации KNA с NTGrH в полной темноте показали, что все описанные выше продукты образуются только при фотоиндуцированных реакциях KNA с аминокислотой.

Продукты фоторазложения KNA: 1,4-DHQ, 4HQ, ddO-KNA₁ и ddO-KNA₂ были также обнаружены при анаэробном УФ фотолизе раствора, содержащего 6.0 мг/мл α -кристаллина и 0.3 мМ KNA в растворе PBS. Все четыре продукта демонстрируют монотонное увеличение их количества во время фотолиза. Полученные результаты показывают, что фотохимические реакции KNA с α -кристаллином и с одиночной аминокислотой NTGrH протекают по сходным механизмам.

4.4 Механизм взаимодействия фотовозбужденной KNA с NTGrH

Основываясь на результатах, полученных в настоящей работе, можно сделать вывод, что механизм фотолиза KNA с NTGrH зависит от двух основных факторов: концентрации радикалов

(стационарный и псевдо-стационарный фотолиз) и концентрации O_2 в растворе. В атмосфере аргона концентрация кислорода в растворе не превышает 5-10 мкМ. Поэтому при анаэробном псевдо-стационарном фотолизе концентрация O_2 значительно ниже концентрации NTrpH, используемой в работе, и сопоставима с концентрацией радикалов, образованных в фотохимических реакциях, 5-30 мкМ в зависимости от энергии лазерного импульса. В таких условиях единственным тушителем 1KNA является NTrpH, реакция протекает по механизму переноса электрона от аминокислоты к 1KNA с образованием радикалов NTrp \cdot и KNA $\cdot\cdot$. Последующие реакции радикалов приводят к образованию диамагнитных продуктов.

Как видно из таблицы 4, квантовые выходы разложения исходных веществ при псевдо-стационарном фотолизе значительно ниже квантового выхода 1KNA ($\Phi_T = 82\%$ [12]). Это указывает на то, что основным путем гибели радикалов является обратный перенос электрона с восстановлением исходных соединений. Наличие в растворе аддуктов KNA-NTrp и продуктов разложения KNA, а именно 1,4-DHQ, 4HQ, ddO-KNA $_1$ и ddO-KNA $_2$, указывает на то, что хотя обратный перенос электрона является основным путём рекомбинации радикалов NTrp \cdot и KNA $\cdot\cdot$, ковалентное присоединение и отщепление атома кислорода от карбоксильной или карбонильной группы от KNA $\cdot\cdot$ и перенос на радикал аминокислоты также может происходить в водных растворах. Эта реакция приводит к образованию окисленных форм NTrp и продуктов KNA с потерей кислорода. Отсутствие окисленных форм KNA также подтверждает перенос атома кислорода на радикал NTrp \cdot , а не на вторую молекулу KNA $\cdot\cdot$.

Кроме того, мы не обнаружили димеров KNA. Это говорит о том, что реакция между двумя KNA $\cdot\cdot$ протекает с значительно меньшей константой скорости, чем реакция образования димеров NTrp. Следовательно, можно предположить, что сразу после лазерного импульса концентрация радикалов выше, чем концентрация O_2 , и большинство радикалов NTrp \cdot гибнет в реакциях обратного переноса электрона или с образованием двух типов продуктов: димеров (основных продуктов) и окисленных форм. Оставшиеся радикалы KNA $\cdot\cdot$ вступают в реакцию с O_2 и восстанавливаются до KNA. Таким образом, низкая константа скорости реакции образования димеров KNA и восстановление KNA молекулярным кислородом объясняет отношение квантовых выходов разложения реагентов, $\Phi_{dec}(NTrpH)/\Phi_{dec}(KNA) \approx 3$.

При стационарном фотолизе в анаэробных условиях концентрация образующихся радикалов значительно ниже концентрации остаточного O_2 , и реакция восстановления KNA молекулярным кислородом становится основным путем гибели KNA $\cdot\cdot$. Это объясняет низкие значения квантового выхода разложения KNA при анаэробном фотолизе с использованием в качестве источника излучения ртутной лампы (см. Таблицу 4). Супероксид $O_2^{\cdot-}$, образованный в этой реакции, реагирует с радикалами Trp \cdot с константой скорости $1.2 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$ [29]. Эта реакция может приводить к образованию окисленной или восстановленной формы NTrp через перенос электрона. Результаты настоящей работы показывают, что несмотря на то, что в анаэробных условиях образование $O_2^{\cdot-}$ происходит с высокой эффективностью, квантовый выход разложения NTrpH составляет всего 1.6% (см. Таблицу 4). Следовательно, реакция восстановления

аминокислоты является основным путем взаимодействия между $O_2^{\cdot -}$ и $NTGr^{\cdot}$, тогда как вклад от реакции с образованием окисленных продуктов в фоторазложение аминокислоты незначителен. Кроме того, как было показано ранее, образование 1O_2 в реакции между 1KNA и кислородом не играет существенной роли в анаэробном фотолизе. Однако при переходе в среду с большим содержанием кислорода 1O_2 будет давать вклад в фотоокисление $NTGrH$. Константа скорости реакции между 1O_2 и Trp ($\sim 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [38-39]) является относительно низкой, но в отсутствие других возможных путей эта реакция является одним из основных каналов гибели 1O_2 .

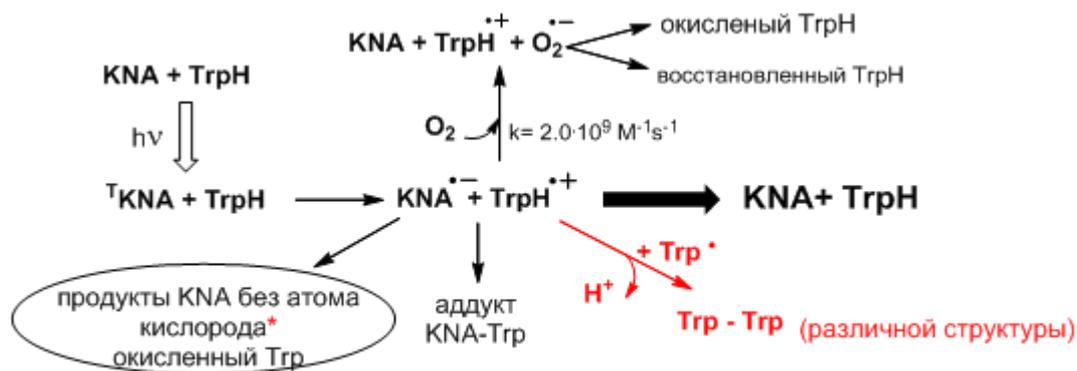
Стоит отметить, что фоторазложение $NTGrH$ в атмосфере воздуха происходит значительно быстрее, чем под кислородом (Рисунок 6 (А) и Таблица 4). Вероятно, этот эффект может быть объяснен тем, что под кислородом концентрация O_2 в растворе выше, чем концентрация аминокислоты, и образование радикалов в реакции 1KNA с $NTGrH$ в значительной степени подавляется реакцией 1KNA с O_2 . Таким образом, происходит уменьшение количества радикалов $NTGr^{\cdot}$ и $O_2^{\cdot -}$, что способствует уменьшению окисления аминокислоты. Следовательно, как 1O_2 , так и $O_2^{\cdot -}$ вносят значительный вклад в фотоокисление $NTGrH$ в аэробных условиях.

Реакция между двумя радикалами $NTGr^{\cdot}$ приводит к образованию димеров $NTGr$. По литературным данным известно, что ковалентная связь наиболее вероятно образуется между атомами C3 и N1. Домингес и соавторы [40] предположили, что связь между субъединицами Trp в димерах может образовываться в положениях C2, C4, C5 и C7 индольных колец. В наших экспериментах мы наблюдали, по меньшей мере, семь различных структур димеров $NTGr$, разделенных с помощью обратно-фазовой хроматографии (некоторые из них, вероятно, являются диастереоизомерами). Полученные данные указывают на то, что некоторые димерные структуры, вероятно, «менее стабильны», чем другие: при мягкой ионизации электро-спреем они подвергаются фрагментации с образованием иона с m/z 245.0920.

Кроме того, были определены количества образовавшихся продуктов по их оптическому поглощению. Окисленные формы $NTGr$ составляют приблизительно 20% и 10% от общего количества разложившегося $NTGrH$ на поздних стадиях фотолиз в стационарном и псевдо-стационарном фотолизе, соответственно. Уменьшение количества окисленных форм $NTGr$ при облучении лазером, вероятно, вызвано высокими концентрациями радикалов $NTGrH$ и KNA , которые быстро реагирует между собой, восстанавливаясь или образуя продукты, описанные выше. При аэробном стационарном фотолизе окисленные формы $NTGr$ составляют 90% продуктов фоторазложения $NTGrH$, что явно подтверждает предложенный механизм деградации $NTGrH$ в реакциях с синглетным кислородом и супероксидом. Как в случае стационарного фотолиза, так и при псевдо-стационарном в анаэробных условиях общая концентрация димеров $NTGr$ составляет $\sim 50\%$ от разложившегося $NTGrH$. Таким образом, димеризацию триптофана следует рассматривать как основной путь деградации аминокислоты при анаэробном УФА фотолизе, сенсibilизированном KNA .

На схеме 1 представлен механизм фотохимических реакций между KNA и $NTGrH$ и продукты радикальных реакций, которые могут образовываться в водных растворах после

тушения ^1KNA аминокислотой. Вероятно, что эта схема справедлива и для других фотосенсибилизаторов, реагирующих с Trp посредством переноса электрона, включая кинуренины [41]. Хотя химическая природа фотосенсибилизатора может оказывать сильное влияние на константы скорости и эффективность реакций, принципиальная схема не должна меняться. Таким образом, мы предполагаем, что молекулярные УФ фильтры могут участвовать в радикальных реакциях в тканях хрусталика глаза, приводя к сшиванию белков, хотя и с небольшими выходами. С возрастом накопление этих сшитых белков может давать значительный вклад в общие возрастные изменения кристаллинов, ведущие к катарактогенезу.



Димеры Trp - основные продукты реакции!

Схема 1 Механизм фотоиндуцированных реакций между ^1KNA и Trp.

5. Выводы.

На основании проведенных экспериментов можно сделать следующие выводы:

1. Наиболее активными тушителями ^1KNA являются ароматические аминокислоты Trp и Tug, Cys, O₂ и антиоксидант Asc. Механизм тушения ^1KNA для аминокислот является перенос электрона с молекулы тушителя на молекулу кинуреновой кислоты с образованием соответствующих радикалов;

2. Для α -кристаллинов и β -кристаллинов было показано, что реакция тушения триплетного состояния KNA происходит за счет реакций с Trp и Tug. Для γ -кристаллина в нативном состоянии тушение ^1KNA происходит за счет взаимодействий с остатками Tug;

3. Фотолит кристаллинов в нативных и денатурирующих условиях приводит к (а) деградации Trp и Tug остатков белков, (б) образованию продуктов, поглощающих в диапазоне 300-350 нм, (в) деградации мономерных форм белков и (г) образованию димерных, тримерных и других мультимерных форм. Существенным отличием фотолита кристаллинов в денатурирующих условиях является увеличение вклада от «окрашенных» продуктов в общую модификацию белков;

4. Установлен механизм реакций между KNA и NTrpH при УФА фотолит в анаэробных условиях, согласно которому: (1) обратный перенос электронов является основным каналом гибели радикалов $\text{KNA}^{\bullet-}$ и NTrp^{\bullet} ; (2) основными продуктами фоторазложения аминокислоты являются димеры и окисленные формы; (3) фотодegradация KNA приводит к образованию 1,4-DHQ и 4HQH через отрыв атома кислорода от карбоксильной или карбонильной групп KNA.

5. Измерена константа скорости бимолекулярной реакции KNA^{\cdot} с O_2 ($k_{\text{O}_2} = (2.0 \pm 0.2) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) и определён коэффициент экстинкции радикала KNA^{\cdot} ($\epsilon_{\text{KNA}^{\cdot}}(510 \text{ nm}) = 2100 \pm 200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

В хрусталике могут происходить два основных типа повреждения белка: димеризация из-за радикальных реакций и окисление через реакции с остаточным O_2 . Антиоксиданты хрусталика эффективно предотвращают повреждение кристаллинов.

6. Список литературы

1. Bloemendal, H., De Jong, W., Jaenicke, R., Lubsen, N.H., Slingsby, C., Tardieu, A. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins // *Progress in Biophysics & Molecular Biology*. – 2004. – V. 86. – P. 407-485.
2. Truscott, R.J.W., Friedrich, M.G. The etiology of human age-related cataract. Proteins don't last forever // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2015. – V. 1860. – P. 192-198.
3. McNulty, R., Wang, H., Mathias, R.T., Ortwerth, B.J., Truscott, R.J.W., Bassnett, S. Regulation of tissue oxygen levels in the mammalian lens // *J. Physiol.* – 2004. – V. 559. – P. 883-898.
4. Heath, H. The distribution and possible functions of ascorbic acid in the eye // *Exp. Eye Res.* – 1962. – V. 1. – P. 362-367.
5. Bova, L.M., Sweeney, M.H., Jamie, J.F., Truscott, R.J.W. Major changes in human ocular UV protection with age // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2001. – V. 42. – P. 200-205.
6. Tsentalovich, Yu.P., Verkhovod, T.D., Yanshole, V.V., Kiryutin, A.S., Yanshole, L.V., Fursova, A.Z., Stepanov, D.A., Novoselov, V.P., Sagdeev, R.Z. Metabolomic composition of normal aged and cataractous human lenses // *Exp. Eye Res.* – 2015. – V. 134. – P. 15-23.
7. Pattison, D.I., Rahmanto, A.S., Davies, M.J. Photo-oxidation of proteins // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2012. – V. 11. – P. 38-53.
8. Sherin, P.S., Grilj, J., Tsentalovich, Y.P., Vauthey, E. Ultrafast Excited-State Dynamics of Kynurenine, a UV Filter of the Human Eye // *J. Phys. Chem. B*. – 2009. – V. 113. – P. 4953–4962.
9. van Heyningen, R. Fluorescent glucoside in the human lens // *Nature*. – 1971. – V. 230. – P. 393–394.
10. Tsentalovich, Y.P., Snytnikova, O.A., Sherin, P.S., Forbes, M.D.E. Photochemistry of kynurenine, a tryptophan metabolite: properties of the triplet state // *J. Phys. Chem. A*. – 2005. – V. 109. – P. 3565–3568.
11. Sherin, P.S., Tsentalovich, Y.P., Snytnikova, O.A., Sagdeev, R.Z. Photoactivity of kynurenine-derived UV filters // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* – 2008. – V. 93. – P. 127–132.
12. Zelentsova, E.A., Sherin, P.S., Snytnikova, O.A., Kaptein, R., Vauthey, E., Tsentalovich, Y.P. Photochemistry of aqueous solution of kynurenic acid and kynurenine yellow // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2013. – V. 12. – P. 546-558.
13. Pileni, M.P., Giraud, M., Santus, R. Kynurenic acid-I. Spectroscopic properties // *Photochemistry and Photobiology*. – 1979. – V. 30. – P. 251-256.

14. Pileni, M.P., Giraud, M., Santus, R. Kynurenic acid-II. Photosensitizing properties // *Photochemistry and Photobiology*. – 1979. – V. 30. – P. 257-261.
15. Zhuravleva, Y.S., Tsentalovich, Y.P. Acid-alkaline properties of triplet state and radical of kynurenic acid // *Journal of Photochemistry & Photobiology A: Chemistry*. – 2018. – V. 365. – P. 7–12.
16. Bassnett, S., Duncan, G. Direct measurement of pH in the rat lens by ion-sensitive microelectrodes // *Experimental Eye Research*. – 1985. – V. 40.– P. 585-590.
17. Rose, R.C., Richer, S.P., Bode, A.M. Ocular Oxidants and Antioxidant Protection // *Exp Biol Med (Maywood)*. – 1998. – V. 217. – P. 397-407.
18. Снытникова, О.А., Шерин, П.С., Копылова, Л.В., Центалович, Ю.П. Кинетика и механизм реакций фотовозбужденного кинуренина с молекулами биологических соединений // *Известия Академии наук. Серия химическая*. – 2007. – № 4. – P. 704-711.
19. Kawahara, K., Tanford, C. Viscosity and Density of Aqueous Solutions of Urea and Guanidine Hydrochloride *J. Biol. Chem.* – 1966. – V. 241. – P. 3228–3232.
20. Bryant, F.D., Santus, R., Grossweiner, L.I. Laser Flash Photolysis of Aqueous Tryptophan // *The Journal of Physical Chemistry*. – 1975. – V. 79. – N. 25. – P. 2711-2716.
21. Tsentalovich, Y.P., Snytnikova, O.A., Sagdeev, R.Z. Properties of excited states of aqueous tryptophan // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2004. – V. 162. – P. 371-379.
22. Andley, U.P. Effects of α -Crystallin on Lens Cell Function and Cataract Pathology // *Current Molecular Medicine*. – 2009. – V. 9. – P. 887-892.
23. Augusteyn, R.C., Stevens, A. Macromolecular structure of the eye lens // *Progress in Polymer Science*. – 1998. – V. 23. – P. 375-413.
24. Liu, B.-F., Liang, J.J.-N. Protein–protein interactions among human lens acidic and basic β -crystallins // *FEBS Letters*. – 2007. – V. 581. – P. 3936–3942.
25. Kubiak, K., Kowalska, M., Nowak, W. Molecular dynamics study of early events during photooxidation of eye lens protein γ B-crystallin // *Journal of Molecular Structure (Theochem)*. – 2003. – V. 630. – P. 315-325.
26. 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. – V. 18. – P. 8827-8839.
27. Balasubramanian, D., Du, X., Zigler, J.S. The Reaction Of Singlet Oxygen With Proteins, With Special Reference To Crystallins // *Photochemistry and Photobiology*. – 1990. – V. 52. – N. 4. – P. 761–768.
28. Davies, M.J., Truscott, R.J.W. Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2001. – V. 63. – P. 114–125.
29. Fang, X., Jin, F., Jin, H., von Sonntag, C. Reaction of the superoxide radical with the Ncentered radical derived from N-acetyltryptophan methyl ester // *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* – 1998. – V. 2. – P. 259-264.

30. Candeias, L.P., Wardman, P., Mason, R.P. The reaction of oxygen with radicals from oxidation of tryptophan and indole-3-acetic acid // *Biophys. Chem.*– 1997. – V. 67. – P. 229-237.
31. Posener, M.L., Adams, G.E., Wardman, P., Cundall, R.B. Mechanism of tryptophan oxidation by some inorganic radical-anions: a pulse radiolysis study // *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II.*– 1976. – V. 72. – P. 2231-2239.
32. Carroll, L., Pattison, D.I., Davies, J.B., Anderson, R.F., Lopez-Alarcon, C., Davies, M.J. Formation and detection of oxidant-generated tryptophan dimers in peptides and proteins // *Free Radical Biology and Medicine.* – 2017. – V. 113. – P. 132–142.
33. Wilkinson, F., Helman, W.P., Ross, A.B. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation // *J. Phys. Chem. Ref. Data.*– 1995. – V. 24. – P. 663-677.
34. Rousseva, L.A., Gaillard, E.R., Paik, D.C., Merriam, J.C., Ryzhov, V., Garland, D.L., Dillon, J.P. Oxindolealanine in age-related human cataracts // *Exp. Eye Res.*– 2007. – V. 85. – P. 861-868.
35. Ronsein, G.E., Oliveira, M.C., Miyamoto, S., Medeiros, M.H., Di Mascio, P. Tryptophan oxidation by singlet molecular oxygen [O₂(¹Δ_g): mechanistic studies using ¹⁸O-labeled hydroperoxides, mass spectrometry, and light emission measurements // *Chem Res Toxicol.*– 2008. – V. 21. – P. 1271-1283.
36. Ronsein, G.E., de Oliveira, M.C., de Medeiros, M.H., Di Mascio, P. Characterization of O₂(¹Δ_g)-derived oxidation products of tryptophan: a combination of tandem mass spectrometry analyses and isotopic labeling studies // *J Am Soc Mass Spectrom.*– 2009. – V. 20. – P. 188-197.
37. Gracanin, M., Hawkins, C.L., Pattison, D.I., Davies, M.J. Singlet-oxygen-mediated amino acid and protein oxidation: Formation of tryptophan peroxides and decomposition products // *Free Rad. Biol. Med.*– 2009. – V. 47. – P. 92-102.
38. Davies, M.J. Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen // *Photochem. Photobiol. Sci.*– 2004. – V. 3. – P. 17-25
39. Matheson, I.B.C., Etheridge, R.D., Kratowich, N.R., Lee, J. The quenching of singlet oxygen by amino acids and proteins // *Photochem. Photobiol.*– 1975. – V. 21. – P. 165-171.
40. Domingues, M.R., Domingues, P., Reis, A., Fonseca, C., Amado, F. M. Ferrer-Correia, A.J. Identification of oxidation products and free radicals of tryptophan by mass spectrometry // *J Am Soc Mass Spectrom.*– 2003. – V. 14. – P. 406-416.
41. Snytnikova, O.A., Sherin, P.S., Kopylova, L.V., Tsentalovich, Yu.P. Kinetics and mechanism of reactions of photoexcited kynurenine with molecules of some natural compounds // *Rus. Chem. Bull.* – 2007. – V. 56. – P. 732-738.

Публикации по теме работы

Статьи:

1. P. S. Sherin, E. A. Zelentsova, **E. D. Sormacheva**, V. V. Yanshole, T. G. Duzhak, Yu. P. Tsentalovich, Aggregation of crystallins in kynurenic acid sensitized UVA photolysis under anaerobic conditions, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18 (2015), 8827-8839. Impact Factor: 3.567

2. **E. D. Sormacheva**, P. S. Sherin, Yu. P. Tsentalovich, Dimerization and oxidation of tryptophan in UV-A photolysis sensitized by kynurenic acid, *Free Radical Biology and Medicine*. 113 (2017), 372-384. Impact Factor: 5.657

Тезисы:

1. **Е.Д. Сормачева**, Исследование реакций фотовозбужденной кинуреновой кислоты с кристаллинами // Сборник тезисов VIII Всероссийский с международным участием Конгресс молодых ученых-биологов Симбиоз-Россия 2015, 5-9 октября 2015 г. - Новосибирск. Устный доклад

2. **E. D. Sormacheva**, P.S. Sherin, Kynurenic acid-sensitized photolysis of lens proteins under anaerobic conditions // Book of Abstracts Tenth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\ Systems Biology (BGRS\SB), 29 august- 2 september 2016. – Novosibirsk, Russia. Oral presentation.

3. **Е.Д. Сормачева**, П.С. Шерин, Агрегация белков хрусталика в результате сенсibilизированного фотолиза в анаэробных условиях // Сборник тезисов Съезд физиологов СНГ, V Съезд биохимиков России, Конференция ADFLIM - ACTA NATURAE/ Спецвыпуск, 4- 8 октября 2016.- Сочи- Дагомыс, Россия.

4. **E. D. Sormacheva**, P.S. Sherin, Mechanisms of aromatic amino acid modifications in anaerobic photolysis sensitized with kynurenic acid // Book of Abstracts IX International Voevodsky Conference Physics and Chemistry of Elementary Chemical Processes (VVV-100), Конференция, 25-30 июня 2017 г., Новосибирск, Россия. Poster presentation.

5. **Е.Д. Сормачева**, П.С. Шерин, Исследование механизмов димеризации и окисления аминокислот триптофана и тирозина при анаэробном фотолизе, сенсibilизированном кинуреновой кислотой // Сборник тезисов Международной научной конференции по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» и VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды», 18-22 сентября 2017 г., Москва, Россия. Постер.

6. **E. D. Sormacheva**, P.S. Sherin, Yu.P. Tsentalovich, Mechanisms of dimerization and oxidation of tryptophan and tyrosine in UVA photolysis sensitized by kynurenic acid // Book of Abstracts Central European Conference on Photochemistry (CECP), 4-8 February 2018, Bad Hofgastein, Austria. Oral presentation.

7. **E. D. Savina**, P.S. Sherin, Photodamage to lysozyme via Type I and Type II reactions sensitized by eye lens chromophores // Тезисы на конференцию: 17th Congress of the International Union of Photobiology, Барселона, 25-30 августа 2019 г. Oral presentation.

Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: Новопашина Дарья Сергеевна danov@niboch.nsc.ru / ID: 7007712
Проверяющий: Новопашина Дарья Сергеевна (danov@niboch.nsc.ru / ID: 7007712)
 Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <https://users.antiplagiat.ru>

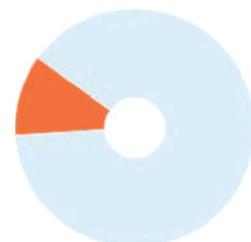
ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 5
 Начало загрузки: 06.09.2019 05:47:15
 Длительность загрузки: 00:00:05
 Имя исходного файла:
 СавинаЕД_научный_доклад
 Размер текста: 831 кБ
 Символов в тексте: 53694
 Слов в тексте: 6856
 Число предложений: 666

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)
 Начало проверки: 06.09.2019 05:47:21
 Длительность проверки: 00:00:03
 Комментарии: не указано
 Модули поиска: Цитирование, Модуль поиска Интернет

ЗАИМСТВОВАНИЯ 11,34%  **ЦИТИРОВАНИЯ** 0%  **ОРИГИНАЛЬНОСТЬ** 88,66% 



Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
 Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.
 Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
 Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
 Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.
 Заимствования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.
 Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска
[01]	1,7%	Полный текст Диссертации	http://ibp.ru	25 Окт 2018	Модуль поиска Интернет
[02]	1,03%	Химические реакции кинуренина и его производных - молекулярных УФ-фильтров.	http://fizmathim.com	18 Мая 2016	Модуль поиска Интернет
[03]	1,22%	https://esu.citis.ru/dissertation/5J7UTMYVMSLIQDX5BLXYM378	https://esu.citis.ru	21 Мар 2018	Модуль поиска Интернет
[04]	0,76%	Metabolomic composition of normal aged and cataractous human lenses	https://doi.org	23 Авг 2019	Модуль поиска Интернет
[05]	0,78%	Tryptophan oxidation photosensitized by pterin	https://doi.org	06 Сен 2018	Модуль поиска Интернет
[06]	0,8%	"Фотохимические реакции триптофана и его природного метаболита кинуренина"	http://kinetics.nsc.ru	20 Окт 2014	Модуль поиска Интернет
[07]	0,68%	Characterization of O2(1Δg)-derived oxidation products of tryptophan: A combination o...	https://doi.org	03 Сен 2018	Модуль поиска Интернет
[08]	0,35%	Photophysics and Photochemistry of the UV Filter Kynurenine Covalently Attached to A...	https://doi.org	24 Авг 2019	Модуль поиска Интернет
[09]	0,42%	Автореферат	http://ibp.ru	25 Окт 2018	Модуль поиска Интернет
[10]	0,38%	Сведения об оппоненте	http://kinetics.nsc.ru	19 Янв 2018	Модуль поиска Интернет
[11]	0,33%	Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis	https://doi.org	11 Мая 2018	Модуль поиска Интернет
[12]	0,28%	The influence of ultrasound on the fluoroquinolones antibacterial activity	https://doi.org	11 Мая 2018	Модуль поиска Интернет
[13]	0,19%	Диссертация на тему «Фотодинамическая инактивация микроорганизмов: фундам...	http://dissercat.com	16 Фев 2019	Модуль поиска Интернет
[14]	0,5%	The etiology of human age-related cataract. Proteins don't last forever	https://doi.org	11 Окт 2018	Модуль поиска Интернет
[15]	0,32%	(1/3)	https://doi.org	24 Июл 2018	Модуль поиска Интернет
[16]	0,64%	Forum Shedule	http://ibch.ru	29 Ноя 2017	Модуль поиска Интернет
[17]	0,05%	RTF	http://sydney.edu.au	21 Ноя 2016	Модуль поиска Интернет
[18]	0,41%	Развитие новых методов исследования радикальных реакций, моделирующих био..	http://fizmathim.com	18 Мая 2016	Модуль поиска Интернет
[19]	0,51%	Label-free and Multi-parametric Monitoring of Cell-based Assays with Substrate-embedd.	https://d-nb.info	15 Авг 2019	Модуль поиска Интернет
[20]	0%	Oxygen Uptake in the Vitamin B2-sensitized Photo-oxidation of Tyrosine and Tryptopha...	https://doi.org	29 Июл 2018	Модуль поиска Интернет

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Отчет о проверке текста научно-квалификационной работы на
объем заимствования

Савина Екатерина Дмитриевна

«Исследование фотохимических реакций кинуреновой кислоты с
аминокислотами и белками хрусталика»

Оригинальность работы составляет ___88.66___ %, что соответствует требованиям порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на итоговом заседании Государственной итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь ГЭК - к.х.н. Д.С. Новопашина