

Хрусталик:

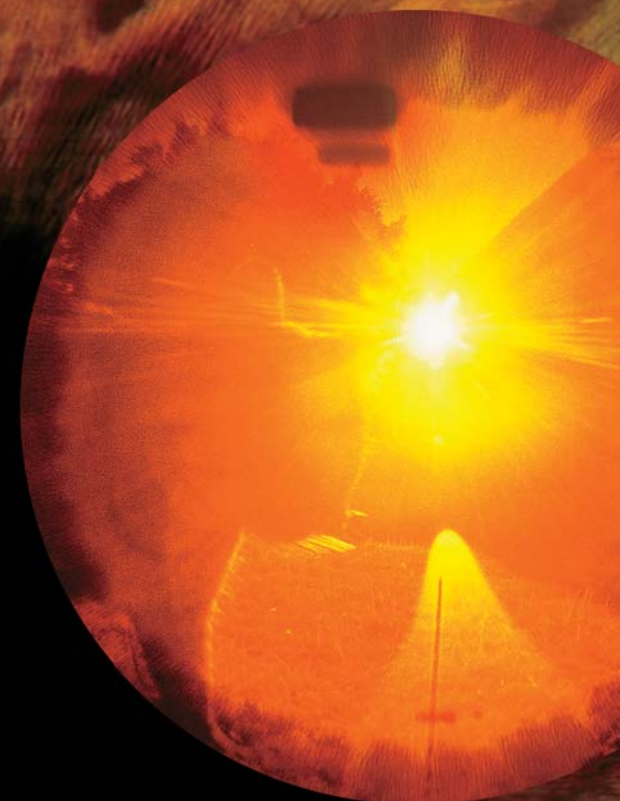
солнечное «затмение»

Фотофизические и фотохимические процессы в глазу

Солнечный свет играет важнейшую роль в жизни всех земных организмов: без реакций фотосинтеза, в результате которых из простых веществ создаются органические соединения, само существование жизни на планете было бы невозможно. Излучение Солнца нагревает атмосферу Земли и дарит нам хорошее настроение в погожий день. Но солнечный свет, в первую очередь его ультрафиолетовая составляющая, может воздействовать на организм человека и пагубным образом, вызывая солнечные ожоги и даже рак кожи. Кроме того, наши органы зрения, в отличие от кожи, которую можно защитить одеждой, неминуемо подвергаются регулярному и продолжительному воздействию солнечного УФ-излучения. Есть ли у наших глаз природная защита от этого злокозненного света, как она устроена и как меняется с возрастом?

Ключевые слова: хрусталик, катаракта, кинуренин, триплетное состояние, аскорбиновая кислота.
Key words: eye lens, cataract, kynurenine, triplet state, vitamin C

© MattysFlicks



ШЕРИН Петр Сергеевич – кандидат физико-математических наук, заведующий группой фотоиндуцированных процессов Международного томографического центра СО РАН (Новосибирск). Лауреат XXII конкурса Европейской академии для молодых ученых России (2016). Автор и соавтор 47 научных работ



ЦЕНТАЛОВИЧ Юрий Павлович – доктор химических наук, профессор, руководитель лаборатории протеомики и метабомики Международного томографического центра СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 108 научных работ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 18-73-10014)

© П. С. Шерин, Ю. П. Центалович, 2020

Почему ультрафиолетовое излучение представляет опасность для человека? Дело в том, что в результате поглощения света органической молекулой (например, белком) один из ее электронов (отрицательно заряженных элементарных частиц, «заселяющих» атомные орбитали с разной энергией) переходит на более высокий энергетический уровень. Такой процесс называют переходом из *основного* в *возбужденное* состояние. Сам по себе он не приносит вреда организму человека, но угрозу может представлять путь, по которому молекула будет возвращаться из такого крайне неустойчивого состояния в основное.

Возбужденная светом молекула, как богатырь в русской сказке, оказывается на распутье: перед ней открываются три пути. Во-первых, она может вернуться к первоначальному состоянию благодаря *флуоресценции* – излучению энергии в виде кванта света. Она также может израсходовать избыточную энергию на разогрев окружающей среды – это так называемая *внутренняя конверсия*. Оба эти процесса для живых существ вполне безопасны, так как не инициируют никаких химических реакций. Но вот третий путь...

Прежде чем говорить о нем, вспомним о квантовом понятии *спин*, означающем *момент импульса*, внутренне присущий элементарным частицам, который не связан с их реальным перемещением (вращением) в пространстве и поэтому не имеет аналогии в классической механике. Благодаря своей квантовой природе спин может принимать лишь дискретные, строго определенные значения: к примеру, спин электрона равен $1/2$.

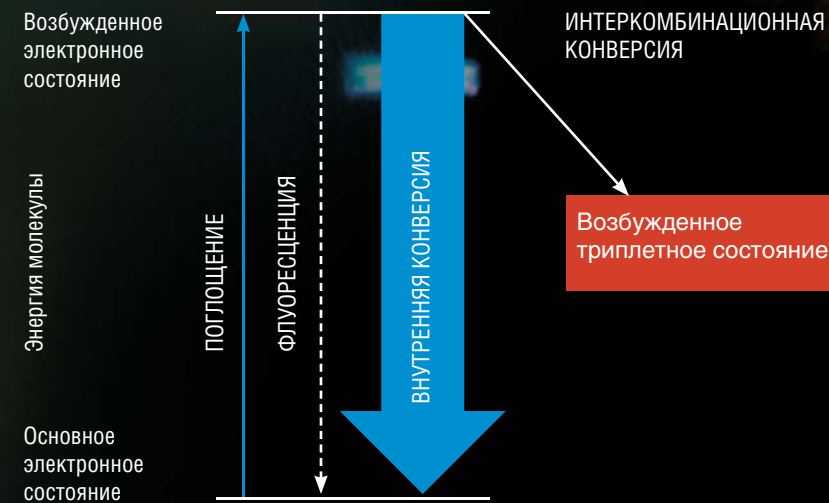
С наличием у электрона спина связано явление *мультиплетности* молекулы, которая рассчитывается на основе суммарного спина всех ее электронов плюс единица. В обычных условиях у абсолютного большинства молекул все электроны имеют пару и, соответственно, нулевой суммарный спин. Соответственно, их мультиплетность равна 1 – это так называемое *синглетное состояние* (S-состояние).

Однако когда один из электронов переходит на более высокий энергетический уровень, т.е. вся молекула оказывается в возбужденном состоянии, то образуется два электрона без пар. В этом случае мультиплетность молекулы зависит от проекции спинов и ее величина может принимать значение как 1, так и 3. Изменение мультиплетности с 1 на 3 означает переход молекулы из синглетного в *триплетное состояние* (Т-состояние), а сам процесс изменения спинового состояния молекулы называется *интеркомбинационной конверсией*.

Это и есть тот третий путь, на котором могут запускаться нежелательные реакции. Дело в том, что, согласно постулатам квантовой механики, переход из возбужденного триплетного состояния в основное синглетное запрещен, что позволяет Т-состоянию существовать долгое время. Такая молекула с избытком



Модель спина электрона в рамках классической физики. Спины равны $+1/2$ (слева) и $-1/2$ (справа)



Фотофизические процессы, происходящие в органической молекуле при поглощении света, наглядно представляет диаграмма, названная в честь ее автора – польского ученого А. Яблонского. Поглощение кванта света приводит к переходу молекулы из основного состояния в возбужденное, оба из которых являются синглетными. Если взаимная ориентация спинов электронов в возбужденном состоянии изменится, молекула перейдет в возбужденное триплетное состояние. Последующие реакции такой молекулы с другими именуют фотохимическими процессами

энергии становится опасной частицей, способной реагировать с большим числом своих соседей. Кстати, в S-состоянии молекула также способна запускать химические реакции, но время жизни такого состояния настолько коротко, что она, как правило, не успевает встретить партнера по реакции.

Химические реакции в таких случаях могут быть очень разнообразными и зависят в первую очередь от самих соседей. Как правило, такие реакции необратимы и приводят к повреждению молекул, прежде всего белков и липидов, поскольку они наиболее представлены в живых клетках. Накопление дефектных молекул может со временем инициировать развитие различных патологий, таких как рак кожи и *катаракта* – помутнение хрусталика глаза.

Свет – в тепло

Глаз млекопитающих и человека – сложный орган, состоящий из нескольких сложноорганизованных частей. Основной оптический элемент – *хрусталик*, который пропускает и фокусирует свет на поверхности сетчатки. Но эта его функция не единственная.

В 1970-е гг. было установлено, что хрусталик одновременно играет и роль светофильтра, поглощая излучение в ближнем ультрафиолетовом диапазоне (*УФ-А-излучение*, 315–400 нм). Это излучение составляет около 95% всего УФ-излучения на поверхности Земли и не задерживается облаками и оконным стеклом. Более того, оно способно инициировать фотохимические реакции, приводящие к повреждению в первую очередь фоточувствительных клеток сетчатки.

Это открытие было сделано благодаря голландской исследовательнице Рут ван Хайнинген, которая

впервые показала, что хрусталик человека содержит большие количества *кинуренина* (промежуточного продукта ферментативного распада аминокислоты *триптофана*) и его производных. Уже первые исследования доказали, что кинуренины способны поглощать излучение в УФ-А-диапазоне, а сами его не излучают, т.е. служат молекулярными УФ-фильтрами. Однако механизм их «работы» оставался неизвестным до недавнего времени.

При изучении фотофизических и фотохимических свойств кинуренина в Международном томографическом центре СО РАН (Новосибирск) выяснилось, что в водных растворах под действием УФ-А-излучения эта молекула светится слабо (Sherin *et al.*, 2009) и производит крайне малое количество реакционно-активных триплетных состояний (Центалович, 2009). Это означает, что кинуренин возвращается из возбужденного состояния в обычное преимущественно путем преобразования энергии света в тепло, т.е. с помощью внутренней конверсии, причем очень быстро и эффективно.

Чтобы понять, как это происходит, поведение кинуренина исследовали в широком наборе растворителей. Оказалось, что скорость перехода этой молекулы из возбужденного состояния в основное напрямую зависит от способности растворителя образовывать межмолекулярные водородные связи, при которых атом водорода связывает между собой два электроотрицательных атома. Так, в водном растворе время перехода было равно 30 пс (1 пикосекунда = 10^{-12} секунды), в спиртовых – на порядок больше. В тех же растворителях, которые не могут быть донором водородной связи, эта величина возростала в 100 раз! Иными словами, именно межмолекулярные водородные связи

обеспечивают доминирование внутренней конверсии в фотофизике кинуренина.

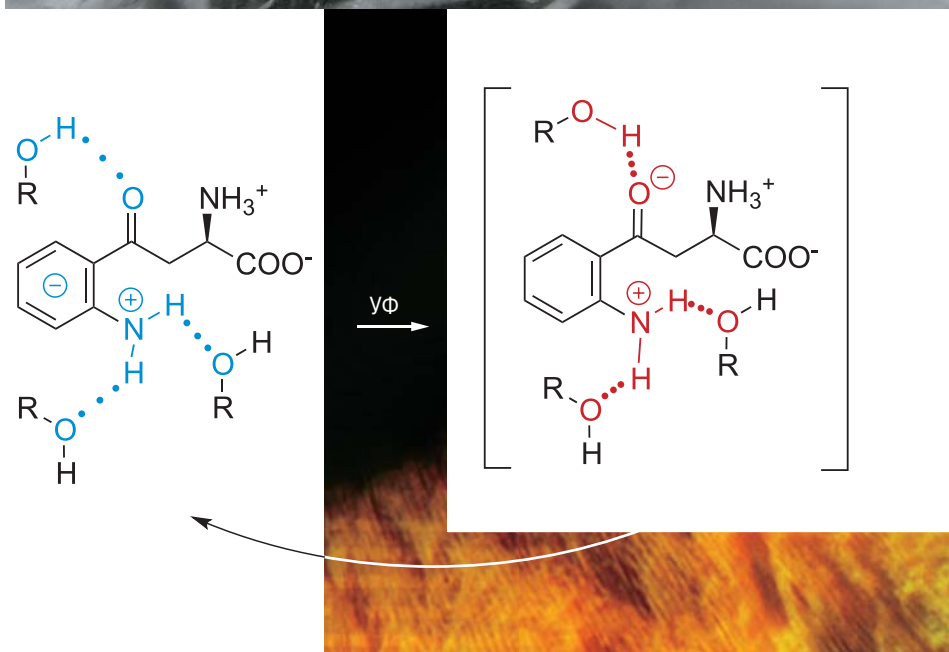
Установление механизма работы кинуренина в качестве молекулярного УФ-фильтра важно с точки зрения фотобиологии. Стало понятно, что ему требуется среда, насыщенная межмолекулярными водородными связями, например спирты или вода. В отсутствие водородных связей молекулы в синглетном возбужденном состоянии переходят в реакционно-активные триплетные состояния (Sherin, 2009). После этого светофильтр превращается в *фотосенсибилизатор*, который под действием света может повреждать молекулы из своего ближайшего окружения, в данном случае – белки хрусталика глаза.



Как стареет хрусталик

Как показали исследования австралийских ученых, с возрастом содержание кинуренинов в хрусталике человека существенно снижается (Bova *et al.*, 2001), во многом из-за их присоединения к белкам (Korlimbinis *et al.*, 2007). Это естественный процесс, в результате которого в хрусталике идет накопление белков, модифицированных кинуренином. Но чем является такой «присоединенный» кинуренин – эффективным УФ-фильтром или фотосенсибилизатором?

Эксперименты с использованием кинуренина, к которому были искусственно присоединены аминокислоты или белки, показали, что скорость «гибели» его возбужденного состояния зависит от объема присоединенной молекулы (Sherin *et al.*, 2010). Чем больший объем будет занимать молекула-заместитель, тем меньше возможностей остается для кинуренина установить межмолекулярные водородные связи. А это, в свою очередь, замедлит процесс внутренней конверсии поглощенной энергии.



Высокая чувствительность возбужденного светом кинуренина к межмолекулярным водородным связям объясняется его структурой – наличием в ароматической системе amino- и карбонильной групп. Именно эта «связка» приводит к переносу заряда с азота аминогруппы на кислород карбонильной группы в возбужденной молекуле. В итоге кислород приобретает дополнительный отрицательный заряд, а аминогруппа – положительный, по сравнению с основным состоянием. При наличии сильных водородных связей между кинуренином и молекулами растворителя такое перераспределение заряда приводит к быстрой и эффективной трансформации энергии кванта электронного возбуждения в энергию колебаний молекул растворителя

В случае белка важную роль играет и само расположение кинуренина внутри крупной и упорядоченной макромолекулы: чем глубже он будет находиться, тем дольше будет «жить» его возбужденное состояние и, соответственно, тем больше шансов для него перейти в реакционно-активное T-состояние. Таким образом, прочное связывание кинуренина с белками хрусталика усиливает его фотосенсибилизирующие свойства.

Образование триплетных состояний кинуренина является первым шагом на пути модификации белков внутри клеток хрусталика, к слову сказать, очень необычных. Они представляют собой прозрачные волокна длиной до 1 см, тянущиеся от переднего к заднему краю хрусталика и плотно прилегающие друг к другу на манер луковичных чешуй. Их отличительная особенность – отсутствие клеточных ядер и органелл, которые могли бы рассеивать свет и ухудшать параметры светопропускания ткани. Соответственно, в клетках хрусталика нет биохимической машины по синтезу, восстановлению и утилизации белков, поэтому его



Катаракта – солнечное «затмение» хрусталика.
© Rakesh Ahuja, MD; CC BY-SA 3.0

белки – *кристаллины* – не обновляются на протяжении всей жизни человека.

Тем самым с возрастом белки хрусталика накапливают многочисленные химические модификации, которые приводят к существенному изменению свойств хрусталика: увеличению его жесткости, появлению желтой окраски и возрастанию светорассеяния. Однако до недавнего времени оставалось неясным, какие именно изменения в структуре белков могут вызывать возбужденные светом молекулы кинуренинов.

Как свет «сшивает» белки

Мощным фотосенсибилизатором является одно из производных кинуренина – *кинуреновая кислота*. Однако эксперименты по длительному облучению белков в присутствии этого вещества дали неожиданные результаты. Несмотря на то что под действием света кинуреновая кислота образует триплетные состояния почти со 100% эффективностью (1 квант света – 1 молекула), лишь малая часть дальнейших реакций приводит к модификации белков (Sherin *et al.*, 2016).

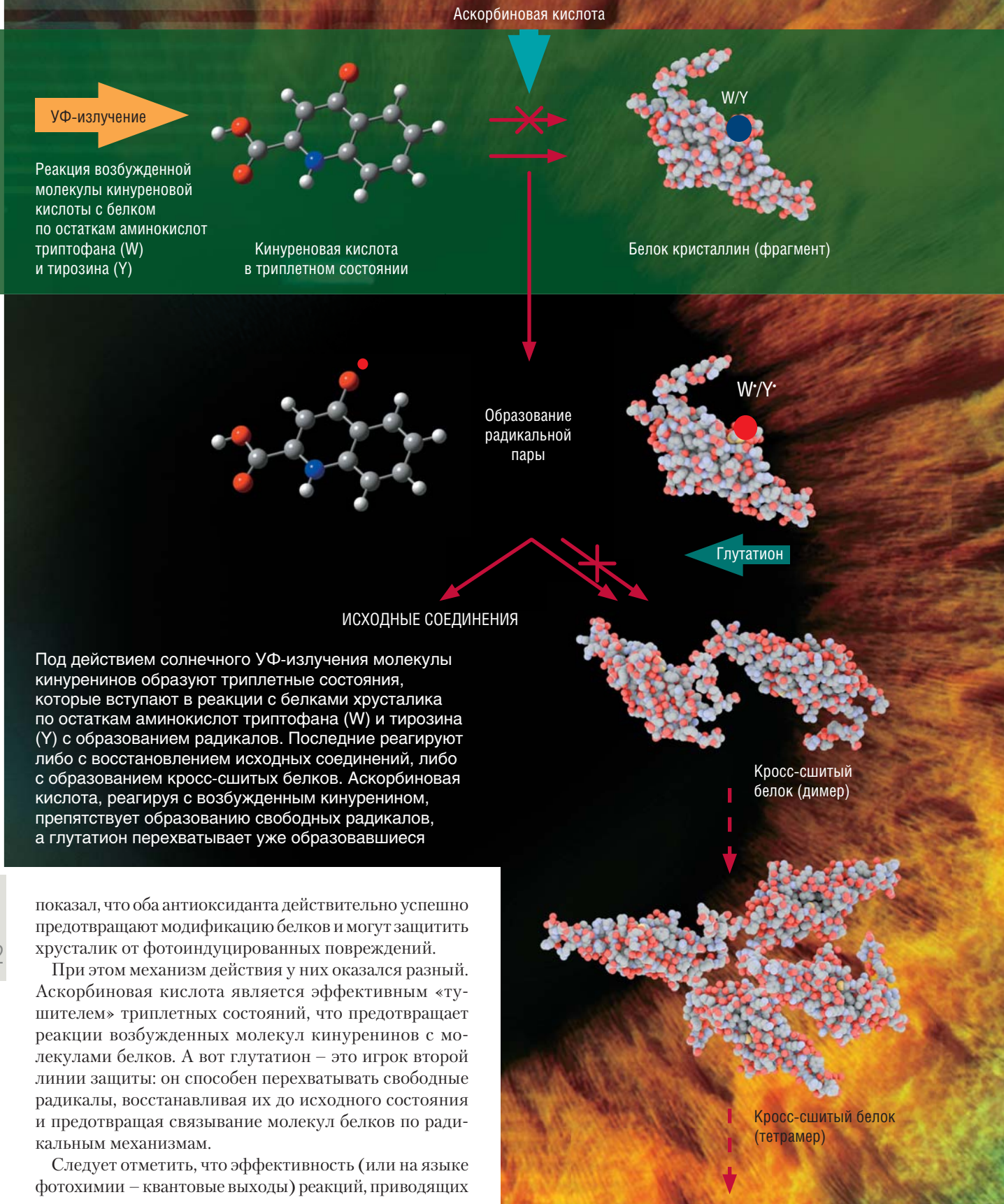
Оказалось, что в триплетном состоянии кинуреновая кислота охотно отбирает электрон у белков с образованием свободных радикалов и не менее охотно отдает его обратно при следующей встрече. В итоге в растворе преимущественно идут быстрые обратные реакции с образованием исходных веществ, а не реакции, приводящие к повреждению белков (Sormacheva *et al.*, 2020).

Тем не менее белок в форме радикала «страдает», имея неспаренный электрон, и при встрече с себе подобным «с удовольствием» им делится с формированием полноценной электронной пары. В результате белковые молекулы образуют прочную и крепкую ковалентную связь, сшиваясь друг с другом навечно.

Процесс такого «сшивания» белков небыстрый, ведь им нужно найти на поверхности друг у друга радикальные центры, при том что сами молекулы представляют собой большие глобулы. Зато маленькая и подвижная молекула кинуреновой кислоты делает это гораздо быстрее, нейтрализуя радикальные центры белков. Тем не менее некоторые белки успевают «сшиться», образуя глобулы из двух, трех молекул и более. На каком-то этапе они могут терять водорастворимость и выпадать в осадок. Так в хрусталике глаза появляются светорассеивающие области – развивается катаракта.

Другим любопытным результатом этих экспериментов стало выяснение роли молекулярного кислорода в фотохимических реакциях (Sormacheva *et al.*, 2020). Оказалось, что когда радикал кинуреновой кислоты вступает в реакцию с остаточным кислородом, то первый возвращается в исходное состояние, а второй, захватив «лишний» электрон, превращается в *супероксид-анион*. Несмотря на то что супероксид-анион широко известен как очень опасная реакционная форма кислорода, его образование, напротив, способствует возвращению кинуреновой кислоты и белков в исходные состояния. Так был обнаружен удивительный эффект, когда кислород выполняет защитную функцию, существенно снижая количество необратимых модификаций аминокислот.

Известно, что хрусталик человеческого глаза в больших концентрациях содержит антиоксиданты – *глутатион* и *аскорбиновую кислоту*. Фотолит кинуреновой кислоты с белком в присутствии этих соединений



Под действием солнечного УФ-излучения молекулы кинуренинов образуют триплетные состояния, которые вступают в реакции с белками хрусталика по остаткам аминокислот триптофана (W) и тирозина (Y) с образованием радикалов. Последние реагируют либо с восстановлением исходных соединений, либо с образованием кросс-сшитых белков. Аскорбиновая кислота, реагируя с возбужденным кинуренином, препятствует образованию свободных радикалов, а глутатион перехватывает уже образовавшиеся

показал, что оба антиоксиданта действительно успешно предотвращают модификацию белков и могут защитить хрусталик от фотоиндуцированных повреждений.

При этом механизм действия у них оказался разный. Аскорбиновая кислота является эффективным «тушителем» триплетных состояний, что предотвращает реакции возбужденных молекул кинуренинов с молекулами белков. А вот глутатион – это игрок второй линии защиты: он способен перехватывать свободные радикалы, восстанавливая их до исходного состояния и предотвращая связывание молекул белков по радикальным механизмам.

Следует отметить, что эффективность (или на языке фотохимии – квантовые выходы) реакций, приводящих

к фотоповреждениям белков хрусталика, очень мала: выход триплетных состояний для большинства кинуренинов не превышает 1%, причем даже в самых «бескислородных» растворах уровень общего распада белка составлял всего 1–2% от поглощенных квантов света (Sherin *et al.*, 2016; Savina *et al.*, 2020).

Таким образом, общая эффективность фотоиндуцированных радикальных реакций в хрусталике не превышает 0,01%. А природные антиоксиданты, глутатион и аскорбиновая кислота, многократно снижают эффективность этих реакций, «перехватывая» реакционно-активные частицы, и практически полностью предотвращают фотоиндуцированные модификации белков.

Чтобы сохранить целостность хрусталика глаза, природа использует уникальный каскад процессов трансформации энергии опасного для живых организмов УФ-излучения света в тепло. Как результат, ткани глаза остаются эффективно защищенными от пагубного солнечного излучения в молодом и среднем возрасте. С годами эффективность транспорта малых молекул в хрусталике снижается, что приводит к накоплению продуктов распада и замедлению поступления нужных веществ, включая антиоксиданты. В результате модификация белков ускоряется и накопление таких необратимых изменений может дать начало развитию катаракты.

Тем не менее катаракта не является неизбежным следствием старения: у многих людей хрусталики остаются прозрачными даже в очень преклонном возрасте. Самые частые вопросы, которые задают на эту тему: «Почему у большинства людей до 50 лет хрусталик остается прозрачным, а потом вдруг начинает мутнеть?» и «Можно ли что-нибудь сделать уже сейчас, чтобы замедлить развитие катаракты?».

Мы полагаем, что возникновение катаракты в первую очередь обусловлено не многолетним накоплением модифицированных белков, а ослаблением природной антиоксидантной защиты хрусталика. Отсюда следуют достаточно тривиальные рекомендации: наилучшей профилактикой катаракты является здоровый

и активный образ жизни, поддерживающий защитные системы организма в хорошем состоянии.

Заметим, что человеческий организм не способен синтезировать аскорбиновую кислоту, играющую важную роль в защите белков хрусталика. Следовательно, очень важно в течение всего года получать в пищу достаточное количество свежих фруктов и других продуктов, содержащих этот антиоксидант. А так как содержание УФ-фильтров в хрусталиках людей старшего возраста значительно уменьшается, для них намного более актуальным, чем для молодежи, становится использование в повседневной жизни солнцезащитных очков.

Литература

- Центалович Ю. П., Снытникова О. А., Сагдеев Р. З. Фотохимические и термические реакции кинуренинов // *Успехи химии*. 2008. Т. 77. № 9. С. 844–853.
- Bova L. M., Sweeney M. H., Jamie J. F. and Truscott R. J. Changes in Human Ocular UV Protection with Age // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001. V. 42. N. 1. P. 200–205.
- Korlimbinis A., Aquilina J. A., Truscott R. J. W. Protein-bound and free UV filters in cataract lenses. The concentration of UV filters is much lower than in normal lenses // *Exp. Eye Res.* 2007. V. 85. P. 219–225.
- Savina E. D., Tsentlovich Yu. P., Sherin P. S. UV-A induced damage to lysozyme via Type I photochemical reactions sensitized by kynurenic acid // *Free Rad. Biol. Med.* 2020. V. 152. P. 482–493.
- Sherin P. S., Grilj J., Tsentlovich Yu. P. and 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.
- Sherin P. S., Grilj J., Kopylova L. V. et al. Photophysics and photochemistry of UV filter kynurenine covalently attached to amino acids and to a model protein // *J. Phys. Chem. B.* 2010. V. 114. P. 11909–11919.
- Sherin P. S., Zelentsova E. A., Sormacheva E. D. et al. Aggregation of α -crystallins in kynurenic acid-sensitized UVA photolysis under anaerobic conditions // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2016. V. 18. P. 8827–8839.
- R. van Heyningen. Fluorescent Glucoside in the Human Lens // *Nature*. 1971. N. 230. P. 393–394.