

с этими генами связано только около 10% всех случаев рака. Существуют другие гены и их полиморфы, имеющие отношение к наследственной предрасположенности к РМЖ, но их изменения связаны с меньшим риском развития заболевания по сравнению с генами *BRCA*. Эффективным инструментом для скрининга полиморфных сайтов генома является его анализ с использованием ДНК-микрочипов (технология микроэррей). Каждый микрочип может содержать до  $10^6$  индивидуальных элементов для параллельного анализа более 200 тыс. полиморфных ДНК-маркеров. Такие микрочипы «высокой плотности» будут использованы сотрудниками Института при проведении исследовательских работ по выявлению комбинации генов, предрасполагающих к развитию РМЖ. Для наибольшей эффективности и лучшей воспроизводимости результатов генотипирования предполагается формирование выборки пациентов и поиск генетических ассоциаций не по всей совокупности больных, а в зависимости от молекулярных подтипов РМЖ. Впоследствии обнаружение ограниченного числа генетических маркеров определенного заболевания позволит перейти к использованию микрочипов «низкой плотности», содержащих десятки (максимум 2 сотни) элементов для анализа. Результаты по изучению генетических изменений в популяции женщин Беларуси, страдающих РМЖ, будут положены в основу создания биочипов конкретной диагностической направленности для экспресс-анализа генетических онкомаркеров и прогнозирования недуга. Определение наследственной предрасположенности позволит своевременно принять профилактические меры, а регулярное наблюдение врача-онколога за носителями мутаций обеспечит раннюю диагностику в случае развития заболевания. ■

# Катаракта: обнаружение патологии на молекулярном уровне

Катаракта – помутнение хрусталика – одно из наиболее распространенных заболеваний органов зрения. Эффективность его профилактики и лечения на ранних стадиях во многом определяется возможностью выявления патологических изменений в тканях на молекулярном уровне.

Показано, что с возрастом в хрусталиках человека снижается концентрация УФ-фильтров: 3-hydroxykynurenine, O-β-D-glucoside (3ОНКГ), 4-(2-amino-3-hydroxyphenyl)-4-oxobutanoic acid O-β-D-glucoside (АНБГ), kynurenine (KN) и 3-hydroxykynurenine (3ОНКН), защищающих ткани глаза от повреждающего действия УФ-излучения. Главная причина возрастных посттрансляционных модификаций белков хрусталика – фрагментация содержащих кинуренин УФ-фильтров (3ОНКГ, KN и 3ОНКН) и их последующее присоединение посредством ковалентных связей к белкам [1] и восстановленному глутатиону (GSH) [2] с формированием, соответственно, связанных с белком кинуренинов и соединений GSH-KN, GSH-3ОНКН и GSH-3ОНКГ. Являясь более фотохимически активными по сравнению с исходными УФ-фильтрами, эти вещества обуславливают образование активных форм кислорода (АФК), что способствует развитию катаракты с возрастом [3].



**Владимир Мажуль,**  
заведовал лабораторией протеомики Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, член-корреспондент



**Инесса Галец,**  
научный сотрудник лаборатории протеомики Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, кандидат биологических наук



**Дмитрий Щербин,**  
завлабораторией протеомики Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, кандидат биологических наук



**Анна Чекина,**  
доцент кафедры глазных болезней Белорусского государственного медицинского университета, кандидат медицинских наук, врач высшей категории

Рис. 1. Трехмерные контуры ФКТ тканей коры (А, В) и ядра (Б, Г) прозрачного хрусталика быка в обычном (А, Б) и увеличенном (В, Г) масштабе и после инкубации при 100°С в течение 5 мин. (Д, Е). 0,15 М фосфатный буфер, рН 7,4; 22°С

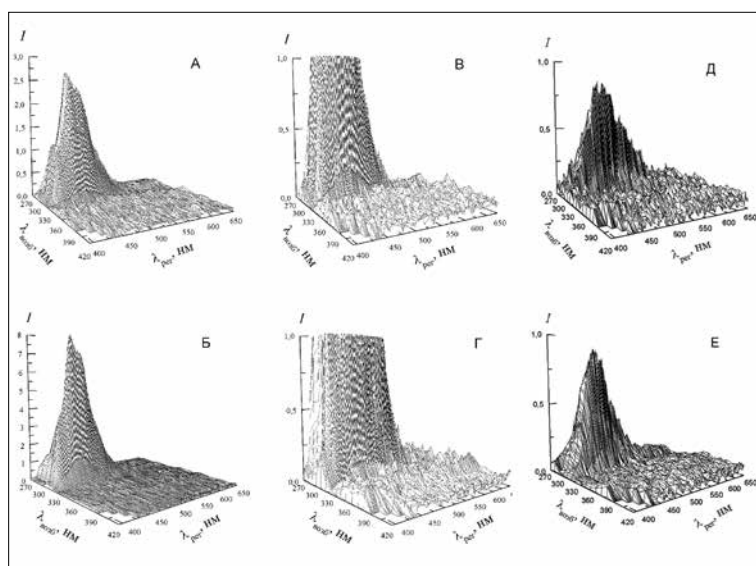
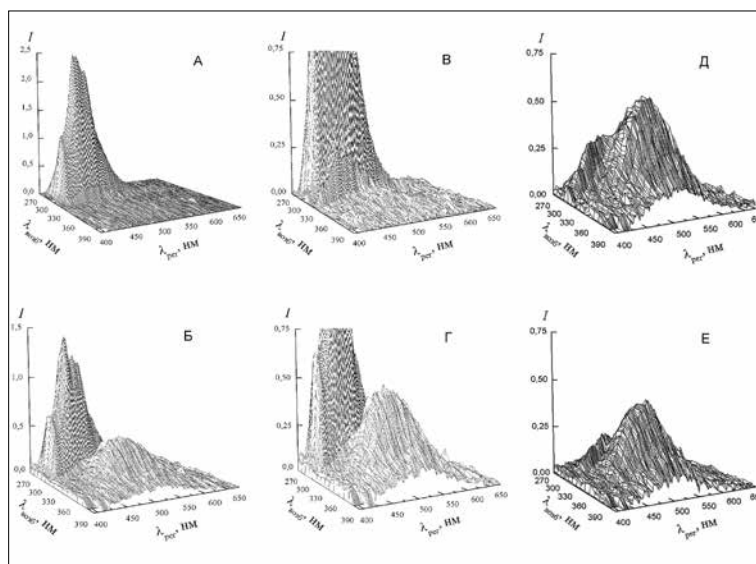


Рис. 2. Трехмерные контуры ФКТ тканей коры (А, В) и ядра (Б, Г) окрашенного в желтый цвет хрусталика человека (возраст 55 лет) в обычном (А, Б) и увеличенном (В, Г) масштабе и после инкубации при 100°С в течение 5 мин. (Д, Е)



Сотрудники Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси с помощью метода фосфоресценции при комнатной температуре (ФКТ) обнаружили способность продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) переходить в иммобилизованное состояние [4]. Развитие катаракты, как известно, сопровождается также аккумулярованием в тканях хрусталика продуктов ПОЛ, поглощающих УФ-свет в диапазоне длин волн 300–450 нм [5]. Образование ковалентных и нековалентных взаимодействий ПОЛ с белками может приводить к нарушению структуры последних, проявляющемуся в изменении частоты и амплитуды их внутримолекуляр-

ных движений. Таким образом, мониторинг перехода продуктов ПОЛ в иммобилизованное состояние может послужить основой для проведения анализа глубины повреждения тканей хрусталика при катаракте, а также для разработки мер ее профилактики.

Были проанализированы спектральные характеристики ФКТ тканей изолированных прозрачных хрусталиков человека (возраст 40–55 лет) и быка (возраст 1,5 года), катарактальных хрусталиков больных (возрастная катаракта, 73–83 года). Препараты для исследований были предоставлены кафедрой глазных болезней Белорусского государственного медицинского университета.

Спектры ФКТ измеряли с помощью созданного в лаборатории протеомики Института биофизики и клеточной инженерии автоматизированного спектрофосфориметра в бескислородных условиях [6]. Кислород удаляли из образцов с помощью сульфита натрия.

Основные поглощающие УФ-свет хромофоры белков тканей коры и ядра прозрачного бесцветного хрусталика – остатки триптофана (крыса в возрасте 3 месяцев) [7]. В спектрах поглощения тканей хрусталиков, более длительное время экспонированных ультрафиолетовому свету (бык в возрасте 1,5 года), кроме полосы с максимумом при 280 нм (соответствует триптофану) в диапазоне длин волн от 310 до 450 нм присутствуют полосы, максимальное значение интенсивности которых составляет 10 и 25% интенсивности полосы при 280 нм в тканях коры и ядра соответственно. Поглощение света тканями коры и ядра прозрачного, слабо окрашенного в желтый цвет хрусталика человека в области длин волн 310–450 нм, увеличивается, что проявляется в существенном уширении и возрастании интенсивности полос (70% – в ткани коры и 40% – в ткани ядра).

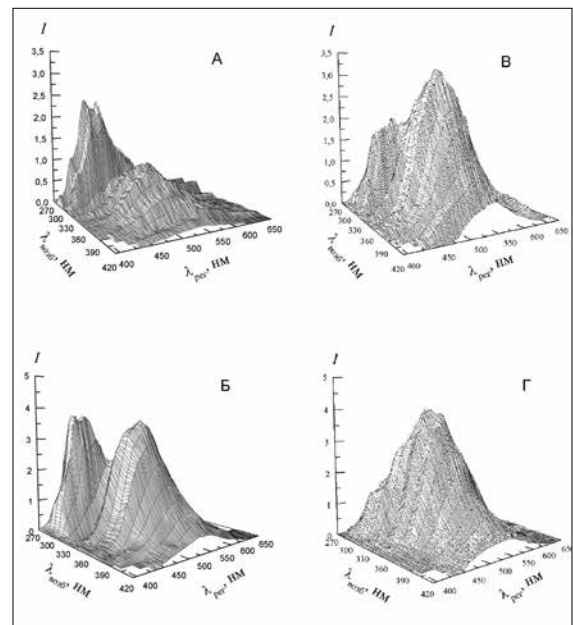
Спектры ФКТ тканей коры и ядра прозрачного бесцветного хрусталика быка независимо от длины волны возбуждающего света локализируются в области 400–560 нм и имеют максимумы при 415, 441 и 465 нм, характерные для других триптофаносодержащих объектов. При возбуждении ФКТ тканей хрусталика в диапазоне 320–420 нм вклад поглощающих в этой области хромофоров в свечение (интервал длин волн регистрации 400–650 нм) отсутствует. Эти результаты свидетельствуют о том, что ФКТ тканей коры и ядра прозрачных бесцветных хрусталиков в миллисекундном и секундном диапазонах определяется остатками триптофана, а другие потенциальные хромофоры в этих условиях практически не фосфоресцируют (рис. 1, А–Г). ФКТ продуктов ПОЛ хорошо проявляется при их иммобилизации (в усло-

виях ограничения молекулярной подвижности и снижения процессов бимолекулярной дезактивации триплетов) [4]. Кратковременная (в течение 5 минут) обработка тканей хрусталика при 100° С не привела к появлению ФКТ продуктов ПОЛ в тканях коры и ядра прозрачных бесцветных хрусталиков быка при возбуждении в диапазоне 320–420 нм, что свидетельствует об их отсутствии (рис. 1, Д, Е).

Трехмерные контуры спектров миллисекундной ФКТ тканей прозрачного бесцветного хрусталика быка и прозрачного слабо окрашенного в желтый цвет хрусталика человека по своим спектральным характеристикам близки между собой. Однако, в отличие от тканей бесцветного хрусталика быка, спектр ткани ядра слабо окрашенного в желтый цвет хрусталика человека кроме белковой (триптофановой) полосы в интервале 400–560 нм содержит достаточно большую интенсивности (30% интенсивности полосы при 441 нм) в длинноволновой части спектра с максимумом при 530 нм ( $I_{530}$ ), которая соответствует фосфоресценции окрашенных в желтый цвет продуктов (рис. 2, Б, Г). Вклад этих хромофоров в фосфоресценцию ткани коры прозрачного слабо окрашенного в желтый цвет хрусталика практически отсутствует (рис. 2, А, В). Предынкубация тканей коры хрусталика человека приводила к появлению интенсивной полосы (20% интенсивности полосы при 441 нм) в длинноволновой части спектра, что свидетельствует об эффекте иммобилизации имеющихся в ткани продуктов ПОЛ (рис. 2, Д). В случае ткани ядра хрусталика термообработка не вносила изменений в интенсивность длинноволновой части спектра ее ФКТ (рис. 2, Е). Отсутствие различий в длинноволновой части спектра ФКТ ткани ядра прозрачного хрусталика до и после термообработки можно объяснить физиологической иммобилизацией продуктов ПОЛ на жестких матрицах, предшествующей термической.

Таким образом, процесс накопления в хрусталике продуктов, полосы поглощения которых локализируются в интервале длин волн 310–450 нм, характеризуется появлением в спектрах ФКТ интенсивной длинноволновой полосы с максимумом в области 530 нм. Нами показано, что при возрастной катаракте ее интенсивность резко возрастает. Так, на стадии развития незрелой катаракты в спектрах ФКТ тканей коры и ядра хрусталика значение  $I_{530}$  относительно невелико, но достаточно резко выражено в спектре ФКТ ткани ядра хрусталика при почти зрелой катаракте. При переходе к стадии развития зрелой катаракты интенсивность этой полосы ФКТ резко возрастает как в ткани коры, так и в ткани ядра хрусталика (40 и 100% соответственно интенсивности полосы при 441 нм) (рис. 3, А, Б). После процедуры кратковременной термообработки тканей катарактального хрусталика интенсивность фосфоресценции продуктов ПОЛ усиливалась в ткани коры хрусталика (приблизительно в 3 раза) (рис. 3, В). Обработка теплом ткани ядра практически не приводила к дополнительному увеличению интенсивности длинноволновой полосы спектра ФКТ с максимумом в области 530 нм (рис. 3, Г).

Таким образом, результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о том, что продукты ПОЛ, накапливающиеся с возрастом в тканях хрусталика человека, в ткани прозрачного хрусталика находятся преимущественно в высокоподвижном молекулярном окружении и, вследствие высокой эффективности столкновительной релаксации триплетных уровней, в миллисекундном диапазоне не фосфоресцируют. Развитие катаракты сопровождается иммобилизацией продуктов ПОЛ, вследствие чего эти хромофоры приобретают выраженную способность к ФКТ. Обнаруженная с помощью метода ФКТ способность продуктов ПОЛ иммобилизоваться на белках в процессе их накопления в тканях хрусталика может приводить к нежелательным изменениям в структуре кристаллинов и мем-



бранных белков и, как следствие этого, нарушать физиологический уровень их медленных внутримолекулярных движений. Модификация структурно-динамического состояния кристаллинов хрусталика может увеличивать тенденцию этих белков к агрегации, повышая, таким образом, вероятность возрастной катаракты.

Результаты исследований существенно проясняют механизмы ее развития и способствуют разработке мер профилактики этого заболевания. ■

### Литература

- Hood B.D., Garner B., Truscott R.J.W. Evidence for crystalline modification by the major ultraviolet filter, 3-Hydroxykynurenine O-β-D-glucoside // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 32547–32550.
- Taylor L.M., Aquilina J.A., Jamie J.F., Truscott R.J.W. Glutathione and NADH, but not ascorbate, protect lens proteins from modification by UV filters // *Exp. Eye Res.* 2002. Vol. 74. P. 503–511.
- Sherin P.S., Grilj J., Kopylova L.V., Yanshole V.V., Tsentlovich Y.P., Vauthey E. Photophysics and photochemistry of the UV filter kynurenine covalently attached to amino acids and to a model protein // *J. Phys. Chem. B.* 2010. Vol. 114. P. 11909–11919.
- Мажуль В.М. Фосфоресцентный анализ продуктов перекисного окисления липидов in vitro и in situ / В.М. Мажуль, Д.Г. Щербин // *Фотобиология и мембранная биофизика / Колл. моногр. под ред. акад. И.Д. Вологовского. Гл. 10. – Мн., 1999. С. 175–194.*
- Truscott R.J.W. Human cataract: the mechanisms responsible; light and butterfly eyes // *Intern. J. Biochem. Cell Biol.* 2003. Vol. 35. P. 1500–1504.
- Мажуль В.М., Ивашкевич Л.С., Щербин Д.Г. и др. Люминесцентные свойства гуминовых веществ // *Журн. прикл. спектроскоп.* 1997. Т. 64, №4. С. 489–493.
- Мажуль В.М., Зайцева Е.М., Щербин Д.Г., Чекина А.Ю., Голуб О.М. Фосфоресцентный анализ ткани хрусталика в норме и при катаракте // *Белорусский офтальмологический журнал.* 2003, №2–3. С. 13–16.

Рис. 3. Трехмерные контуры ФКТ тканей коры (А, В) и ядра (Б, Г) хрусталика человека на стадии зрелой катаракты (корковая диффузная возрастная) (возраст 78 лет) до (А, Б) и после (В, Г) инкубации при 100° С в течение 5 мин