

ВЛИЯНИЕ СОРБИТОЛА НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИЮ АЛЬФА-КРИСТАЛЛИНА

© 2022 Ch.U. Kumar¹, U. Suryavanshi¹, V. Sontake¹, P.Y. Reddy¹,
R.S. Sankhala², M.J. Swamy², G.B. Reddy^{1*}

¹ *Biochemistry Division, National Institute of Nutrition, Hyderabad 500007, India;*
e-mail: reddyg.bp@icmr.gov.in; geereddy@yahoo.com

² *School of Chemistry, University of Hyderabad, Hyderabad 500046, India*

Поступила в редакцию 21.09.2021

После доработки 13.01.2022

Принята к публикации 29.01.2022

Потеря прозрачности хрусталика глаза вследствие катаракты является основной причиной слепоты во всем мире. В то время как агрегация кристаллинов хрусталика является самой распространенной конечной точкой развития различных типов катаракты, шапероноподобная активность («chaperone-like activity», CLA) α -кристаллина, предотвращающая агрегацию белков, считается важной для поддержания прозрачности хрусталика глаза. Полагают, что осмотический стресс является одним из механизмов развития диабетической катаракты вследствие повышенного накопления сорбитола в условиях гипергликемии. Кроме того, сообщалось о нарушении CLA α -кристаллина при диабетической катаракте. Однако влияние сорбитола на структуру и функцию α -кристаллина еще не исследовано. Поэтому в настоящем пилотном исследовании мы описали влияние различных концентраций сорбитола на структуру и функцию α -кристаллина. Очищенный α -кристаллин, полученный из хрусталика крысы, инкубировали с различными концентрациями сорбитола в темноте в стерильных условиях до 5 дней. В конце инкубации оценивали структурные свойства и CLA с помощью спектроскопических методов анализа. Стоит отметить, что разные концентрации сорбитола показали различные результаты: при низких концентрациях (5 и 50 мМ) наблюдалось снижение CLA и незначительные изменения вторичной и третичной структуры, а при более высоких концентрациях (500 мМ) таких эффектов отмечено не было. Полученные результаты проливают свет на влияние сорбитола в контексте структуры и функций α -кристаллина, тем не менее необходимы дальнейшие исследования, чтобы понять механизм наблюдаемых эффектов и их влияние на катарактогенез.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: альфа-кристаллин, катаракта, шапероноподобная активность, сорбитол, структура.

DOI: 10.31857/S0320972522030083

ВВЕДЕНИЕ

Катаракта (помутнение хрусталика глаза) является основной причиной слепоты во всем мире [1, 2]. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в области хирургии катаракты, эта болезнь продолжает оставаться проблемой общественного здравоохранения и главной причиной ухудшения зрения [3]. Среди многих факторов риска, ускоряющих развитие катаракты, основными остаются диабет и старение [4]. Сообщалось, что степень гипергликемии и продолжительность диабета ассоциированы с повышением риска развития катаракты [2, 4]. В настоящее время сахарный диабет — одна из самых сложных проблем со здоровьем, с которой стал-

живается весь мир. Сейчас около 470 млн взрослых во всем мире страдают диабетом, при этом ожидается, что к 2045 г. их число возрастет до 700 млн [5]. С ростом заболеваемости сахарным диабетом пропорционально увеличилась и частота его осложнений, в том числе диабетической катаракты, которые вносят весомый вклад в статистику заболеваемости и смертности во всем мире.

Кристаллины являются основными структурными белками хрусталика глаза; структура кристаллинов, их стабильность и короткодействующие взаимодействия чрезвычайно важны для обеспечения прозрачности хрусталика [6, 7]. Примерно 90% всех растворимых белков хрусталика состоят из трех различных кристаллинов: α -, β - и γ -кристаллинов [6, 8]. α -Кристаллин, член семейства малых белков теплового шока, составляет основную часть цитоплазмы хрусталика глаза и существует в виде гетероолигомера с двумя субъединицами, αA и αB [7, 9]. Несмотря на то что α -кристаллин первоначально счита-

Принятые сокращения: АР — альдозоредуктаза; КД — круговой дихроизм; ДСК — дифференциальная сканирующая калориметрия; CLA — шапероноподобная активность.

* Адресат для корреспонденции.

ли структурным белком, подобно другим кристаллинам, во многих последующих исследованиях сообщалось, что он также действует как шаперон, предотвращая в различных условиях агрегацию многочисленных белков-клиентов, включая другие кристаллины хрусталика [7, 10]. Считается, что шапероноподобная активность (CLA) α -кристаллина играет незаменимую роль в поддержании прозрачности хрусталика глаза [7, 10]. В поддержку этого предположения можно привести результаты исследований, показывающие, что катаракта может быть результатом снижения CLA α -кристаллина [11–15].

С возрастом белки хрусталика, в том числе α -кристаллин, претерпевают различные посттрансляционные модификации, большинство из которых приводит к их агрегации [10, 16, 17]. Многие из этих модификаций, которые, как было показано, зависимы от возраста, ускоряются в условиях гипергликемии вследствие диабета. Среди них неферментативное гликирование считается одним из механизмов, ответственных как за возрастную, так и за диабетическую катаракту [18, 19]. Ранее мы описали влияние гликирования на структуру и CLA α -кристаллина и его вклад в формирование диабетической катаракты [10, 16, 20]. Окислительное повреждение, осмотический стресс и накопление конечных продуктов гликирования являются среди многих других основными механизмами, которые влияют на прозрачность хрусталика, что в конечном итоге приводит к формированию катаракты [21]. Аномальная или избыточная глюкоза при диабете преобразуется в ее спиртовую форму, сорбитол, под действием фермента альдозоредуктазы (АР) в полиольном пути [22]. Поскольку сорбитол не проникает через клеточные мембраны, его накопление внутри клеток приводит к нарушению метаболического гомеостаза, что приводит к изменению осмотического давления и окислительно-восстановительного состояния [22]. Следовательно, накопление сорбитола связано с развитием диабетической катаракты [22, 23]. Стоит отметить, что было показано снижение CLA α -кристаллина из хрусталиков крысы и человека, больных диабетом; данный факт указывает на то, что пониженная CLA α -кристаллина может быть вовлечена в формирование диабетических катаракт [14, 24, 25]. Хотя ранее сообщалось о влиянии различных катарактогенных повреждений, таких как окислительный стресс, конечные продукты гликирования и многие другие посттрансляционные модификации, на структуру и функцию α -кристаллина, прямое влияние сорбитола на α -кристаллин не изучалось. Таким образом, в настоящем пилотном исследовании мы сообща-

ем о влиянии сорбитола на структуру и функции α -кристаллина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Акриламид, бис-акриламид, персульфат аммония, 2-меркаптоэтанол, SDS, BSA и сорбитол были приобретены у компании «Sigma-Aldrich» (США). Набор для анализа белка BCA (бицинониновой кислоты) был приобретен в компании «Thermo Scientific» (США). Sephacryl S-300HR, Superose-6 10/30 и маркеры SDS/PAGE были приобретены в «GE Healthcare» (США). Все другие используемые химические реагенты обладали самой высокой степенью чистоты и были получены от местных поставщиков.

Выделение кристаллинов из хрусталиков крыс. Двухмесячных самцов крыс линии Wistar (WNIN) получили из вивария института, работа с ними проводилась согласно соответствующим правилам ухода за животными и протоколам, одобренным Институциональным комитетом по работе с лабораторными животными. Хрусталики выделяли из глазных яблок с помощью заднего доступа. Из 6–8 хрусталиков готовили 10%-ный гомогенат в 0,025 М Tris-буфере, pH 8,0, содержащем 0,1 М NaCl, 0,5 мМ ЭДТА и 0,01% NaN₃, и центрифугировали при 10 000 g в течение 30 мин при 4 °C для получения супернатанта. Супернатант наносили на колонку для гель-фильтрации Sephacryl S-300 HR (100 см × 1,5 см), соединенную с системой очистки «Duo Flow» («Bio-Rad Laboratories», США). Колонку уравнивали вышеуказанным буфером, элюировали кристаллины тем же буфером со скоростью потока 0,25 мл/мин и отдельно собирали фракции, соответствующие α -, β - и γ -кристаллинам [16]. Объединенные фракции кристаллинов подвергали экстенсивному диализу против 20 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 7,4), чистоту анализировали с помощью SDS-PAGE. Концентрацию белка оценивали с использованием BCA; образцы белка хранили при температуре –80 °C до использования.

Инкубация α -кристаллина с сорбитолом. Очищенный α -кристаллин (полученный, как описано выше, из хрусталика крысы) инкубировали с различными концентрациями сорбитола (5–500 мМ) или без него в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 100 мМ NaCl, при 37 °C в темноте в стерильных условиях в течение 5 дней. По окончании инкубации образцы тщательно диализовали против 20 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 7,4) и оценивали содержание белка.

Шапероноподобная активность. Шапероноподобную активность нативного α -кристаллина или α -кристаллина, инкубированного с сорбитолом, измеряли по способности этих белков предотвращать индуцированную нагреванием агрегацию белков-субстратов, как описано ранее [14]. Вкратце, 0,25 мг/мл β_L -кристаллина или γ -кристаллина (очищенных из хрусталика крысы, как описано выше) в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 100 мМ NaCl, в отсутствие или в присутствии 0,025 мг/мл α -кристаллина (нативного или инкубированного с сорбитолом) подвергали нагреванию при 62 °C в течение 60 мин. С помощью спектрофотометра «Lambda-35» («Perkin Elmer», США) проводили контроль рассеяния света вследствие агрегации β_L -кристаллина при тепловой денатурации, измеряя видимое поглощение при длине волны 360 нм в зависимости от времени. Относительную шаперонную активность нативного α -кристаллина или α -кристаллина, инкубированного с сорбитолом, рассчитывали как процент защищенного от агрегации по формуле: % защиты = $((A_0 - A)/A_0) \times 100$, где A_0 и A представляют собой кажущееся поглощение насыщения (обычно через 50–60 мин) в отсутствие и в присутствии α -кристаллина соответственно.

Вторичная и третичная структура. Для оценки вторичных и третичных структурных изменений α -кристаллина, вызванных воздействием сорбитола, спектры кругового дихроизма (КД) в дальнем и ближнем УФ-диапазоне регистрировали при 25 °C на спектрополяриметре «Jasco J-810» («Jasco», Япония) [16]. Все спектры были получены усреднением 6 измерений и зарегистрированы с использованием ячеек с длиной оптического пути 0,1 и 0,5 см для КД дальнего и ближнего УФ соответственно. Концентрация белка, используемая для измерений КД в дальнем и ближнем УФ, составляла 0,15 и 1,0 мг/мл соответственно. Собственную флуоресценцию триптофана контролировали с использованием 0,15 мг/мл белка в 20 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,4, на спектрофлуориметре «Jasco FP-6500» с возбуждением при 280 нм, регистрируя эмиссию флуоресценции в диапазоне 300–400 нм.

Гидрофобность α -кристаллина. Для оценки поверхностной гидрофобности α -кристаллина (нативного или инкубированного с сорбитолом) белок (0,1 мг/мл) инкубировали с 50 мкМ 8-анилинонафталин-1-сульфоуксусной кислоты (АНС) в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте; флуоресценцию связанного с белком красителя измеряли при возбуждении на 390 нм, а эмиссию в диапазоне 450–550 нм на спектрофлуориметре «Jasco FP-6500» [16].

Гель-фильтрационная хроматография. Молекулярную массу α -кристаллина, инкубированного с сорбитолом или без него, определяли с использованием колонки для гель-фильтрации «Superose-6 10/30», соединенной с системой очистки белков «Duo Flow» («Bio-Rad Laboratories») при скорости потока 0,5 мл/мин.

Дифференциальная сканирующая калориметрия. Термическую стабильность α -кристаллина исследовали методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) на приборе «VP-DSC» («MicroCal LLC», США), как описано ранее [26]. α -Кристаллин инкубировали с различными концентрациями сорбитола (5–500 мМ) или без него, как описано выше. Образцы инкубированного белка подвергали интенсивному диализу против 20 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 100 мМ хлорида калия и 1 мМ ДТТ. И диализат, и белковые растворы перед сканированием тщательно дегазировали в вакууме при комнатной температуре. Термограммы ДСК образцов белка (1 мг/мл) регистрировали при температуре от 10 до 100 °C при скорости сканирования 60 °C/ч [26]. Также были получены термограммы при скорости сканирования 30 и 90 °C/ч для проверки зависимости скорости сканирования от теплового развертывания. Данные анализировали с использованием программного обеспечения для анализа ДСК «Origin 7.0 DSC», предоставленного производителем.

Статистический анализ. Если не указано иное, данные представлены как среднее значение трех экспериментов. Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения «SPSS» версии 19.0. Для количественной оценки шаперонной активности данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Статистическую значимость различия между контролем и кристаллином, обработанным сорбитолом, определяли с помощью t -критерия Стьюдента. Значения, характеризующие $p < 0,05$, определены как значимые.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Повышенная активность AP и повышенная выработка сорбитола вовлечены в катарактогенез у людей с диабетом и экспериментальных моделях диабета [22, 27]. Исследования *in vitro* и *in vivo* в целом подчеркнули значение α -кристаллина в биологии хрусталика глаза и, в частности, указали на то, что его CLA предотвращает агрегацию других белков в хрусталике и, как следствие, образование катаракты [10]. Следует также отметить нарушение шаперонной функ-

ции α -кристаллина у крыс и людей, больных диабетом [14, 24, 25]. Данные наблюдения предполагают наличие связи между снижением CLA α -кристаллина и диабетической катарактой. Кроме того, ряд исследований на экспериментальных животных показывает, что соединения, ингибирующие AP, могут быть эффективны для предотвращения диабетических осложнений, включая диабетическую катаракту [28–30]. Следует отметить, что исследований, в которых изучалось бы прямое влияние сорбитола на α -кристаллин, пока не опубликовано. Поэтому в настоящей работе мы изучили прямое влияние сорбитола на CLA α -кристаллина и связанные с этим структурные изменения при инкубации с сорбитолом.

Влияние шапероноподобной активности α -кристаллина, инкубированного с сорбитолом в течение 5 дней, на индуцированную нагрева-

нием агрегацию β_L -кристаллина зависело от концентрации сорбитола и оценивалось в сравнении с немодифицированным α -кристаллином (рис. 1). α -Кристаллин, инкубированный с сорбитолом в концентрации 5 и 50 мМ, показал снижение CLA, в то время как α -кристаллин, инкубированный с 500 мМ сорбитола, показал такое же или немного более высокое значение CLA по сравнению с α -кристаллином, инкубированным без сорбитола в тех же условиях. Таким образом, оказалось, что влияние сорбитола на активность шаперона может варьировать в зависимости от концентрации, что, вероятно, связано с тонкими структурными изменениями в белке-шапероне, о чем свидетельствуют наблюдаемые изменения вторичной и третичной структуры. Аналогичные результаты мы наблюдали при агрегации γ -кристаллина под воздействием тепла (данные не показаны).

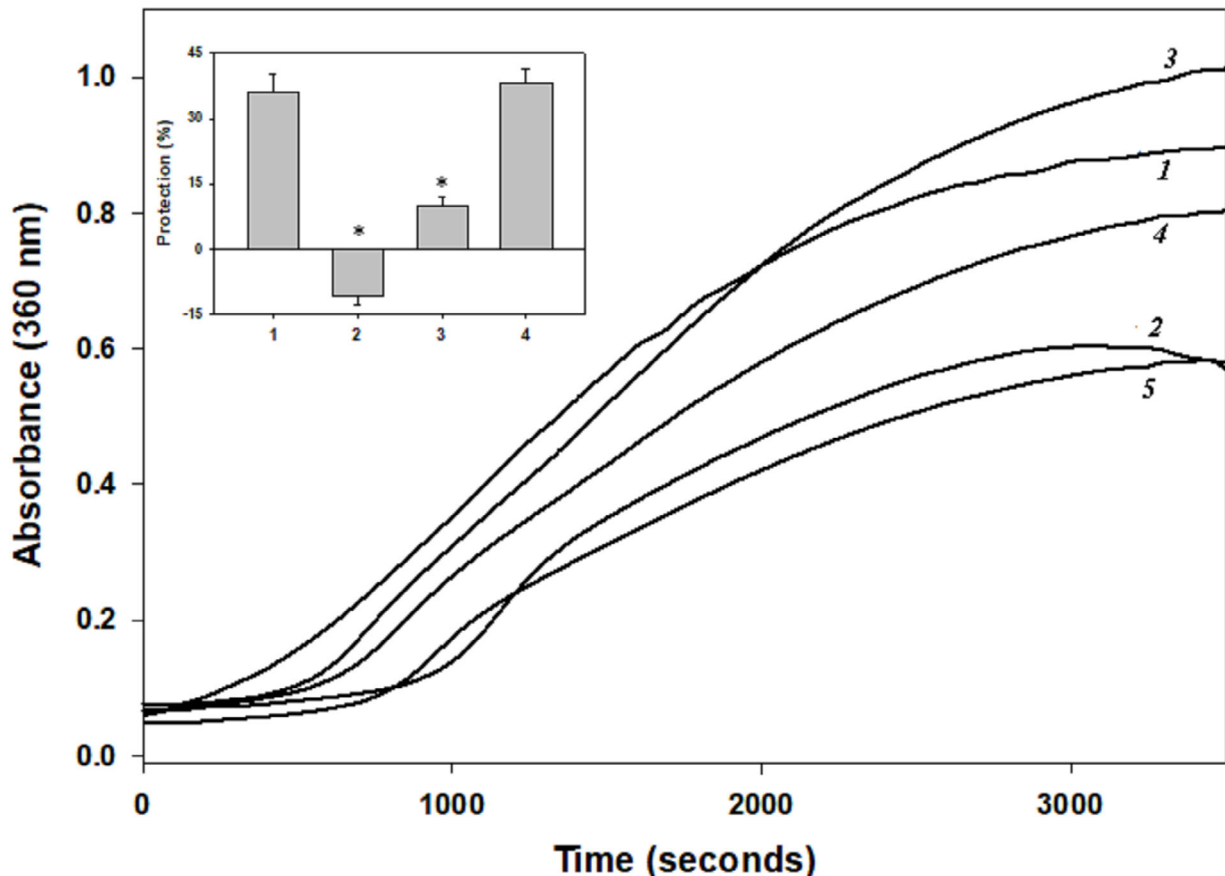


Рис. 1. Шапероноподобная активность α -кристаллина. Индуцированную нагреванием агрегацию β_L -кристаллина при 62 °С контролировали спектрофотометрически при 360 нм в отсутствие (1) или в присутствии 0,05 мг/мл нативного α -кристаллина (2) или α -кристаллина, инкубированного с 5 мМ (3), 50 мМ (4) и 500 мМ сорбитола (5). Врезка: относительная шаперонная активность α -кристаллина. Относительную шаперонную активность (процент защиты) определяли, принимая за 100% агрегацию β_L -кристаллинов в отсутствие α -кристаллинов. Столбцы: 1) нативный α -кристаллин, 2) α -кристаллин, инкубированный с 5 мМ сорбитола, 3) α -кристаллин, инкубированный с 50 мМ сорбитола, 4) α -кристаллин, инкубированный с 500 мМ сорбитола. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 3$). Звездочка над столбцами указывает на достоверное различие ($p < 0,05$) по сравнению с нативным α -кристаллином

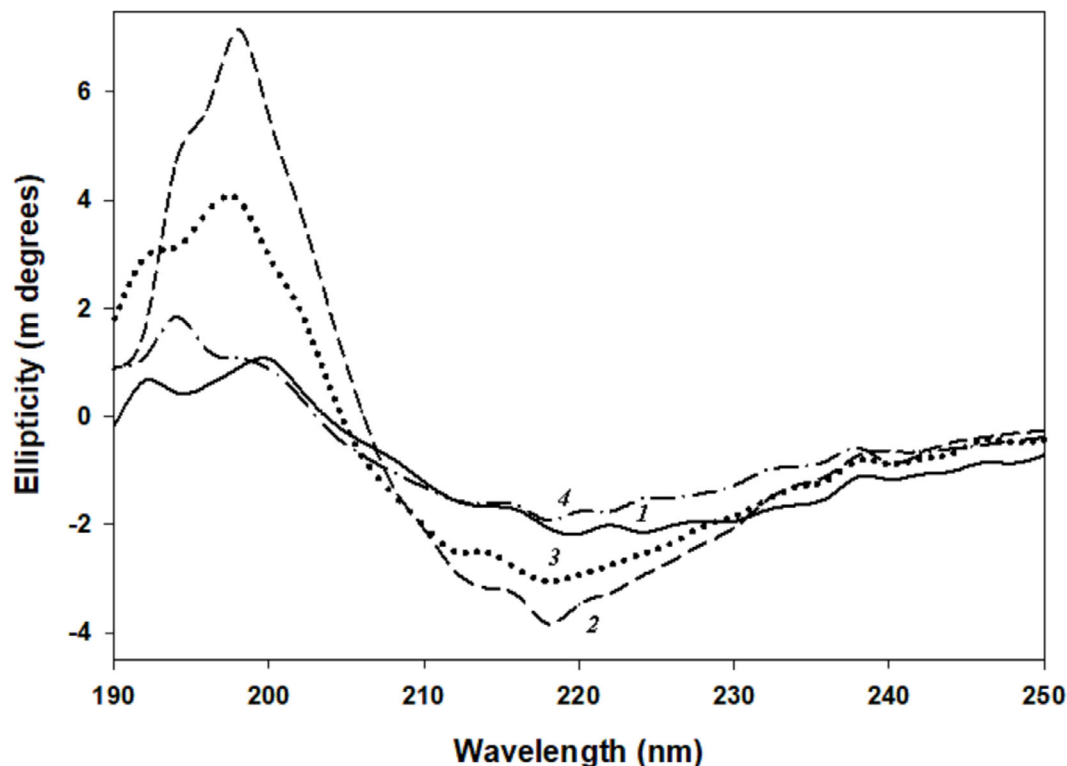


Рис. 2. Вторичная структура α -кристаллина, полученная с помощью кругового дихроизма в дальнем УФ. Кривые: 1 – нативный α -кристаллин; 2–4 – α -кристаллин, инкубированный с 5, 50 и 500 мМ сорбитолом соответственно. Данные представлены как среднее значение трех измерений

Чтобы получить представление о влиянии разных концентраций сорбитола на CLA α -кристаллина мы оценили, есть ли какие-либо изменения во вторичной и третичной структуре, используя КД и флуоресцентную спектроскопию. Как сообщалось ранее [14, 16], нативный α -кристаллин имел типичную структуру β -листа с максимальной отрицательной эллиптичностью в диапазоне 215–218 нм (рис. 2). Следует отметить, что α -кристаллин, инкубированный с сорбитолом, демонстрировал изменения во вторичной структуре, такие как увеличение отрицательной эллиптичности при 215–218 нм и усиление положительного сигнала около 200 нм; при этом максимальные изменения были зарегистрированы при концентрации 5 мМ, меньшие – при 50 мМ, и минимальные изменения или их отсутствие наблюдались для образцов, инкубированных с 500 мМ сорбитола (рис. 2). Эти изменения вторичной структуры отражаются в уменьшении CLA α -кристаллина при более низкой концентрации сорбитола в отличие от более высокой концентрации.

Такие изменения были характерны и для третичной структуры, анализируемой с помощью КД в диапазоне 250–300 нм; самые серьезные изменения происходили при concentra-

ции 5 мМ, затем – при 50 мМ, а минимальные изменения наблюдались при концентрации сорбитола 500 мМ (рис. 3). Самые значительные изменения в третичной структуре были отмечены в ароматической области, что свидетельствует о конформационных изменениях на третичном структурном уровне за счет участия ароматических остатков. Аналогичный характер изменения флуоресценции триптофана при разных концентрациях сорбитола (рис. 4) дополнительно подтверждает характер изменений в третичной структуре после воздействия сорбитола.

В дополнение к другим определяющим факторам, CLA α -кристаллина в подавлении агрегации белков-клиентов, как полагают, опосредуется взаимодействием между гидрофобными участками на его поверхности и экспонированными гидрофобными участками частично развернутого белка-субстрата [7, 31, 32]. Поэтому мы также оценили гидрофобность α -кристаллина с точки зрения его связывания с АНС, гидрофобным зондом. Интенсивность флуоресценции АНС, связанного с α -кристаллином, была почти одинаковой для нативного белка и белка, инкубированного с 5–500 мМ сорбитола (данные не представлены). Эти наблюдения свидетельствуют о том, что сорбитол не влияет на гидрофобную

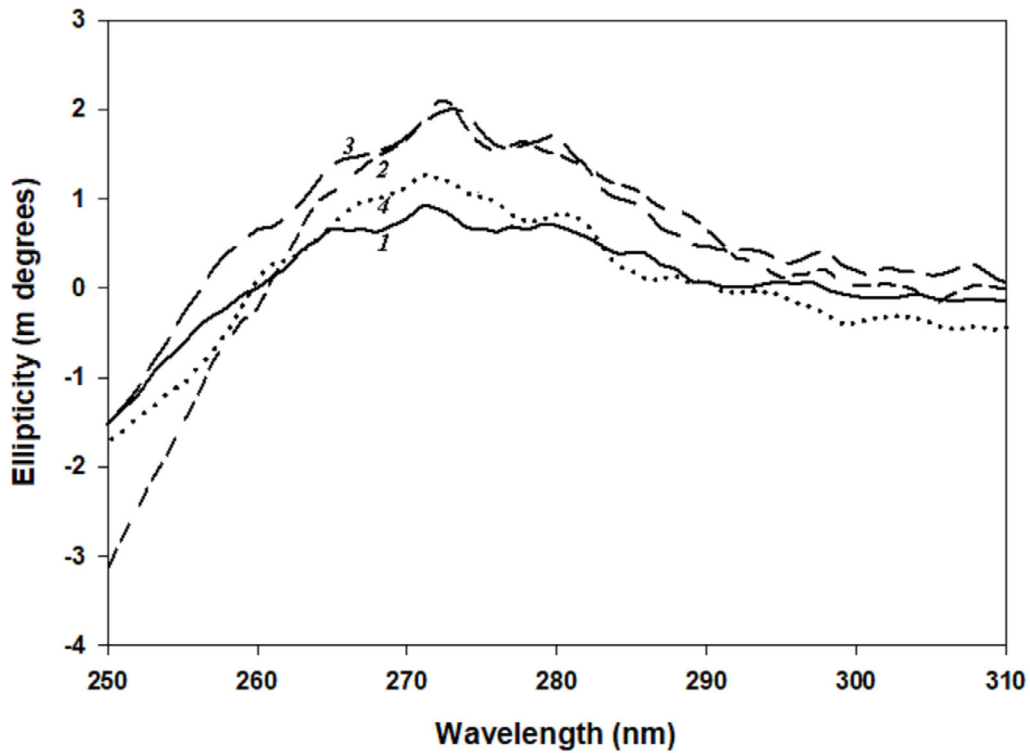


Рис. 3. Третичная структура α -кристаллина, полученная с помощью кругового дихроизма в ближнем УФ. Кривые: 1 – нативный α -кристаллин; 2–4 – α -кристаллин, инкубированный с 5, 50 и 500 мМ сорбитола соответственно. Данные представлены как среднее значение трех измерений

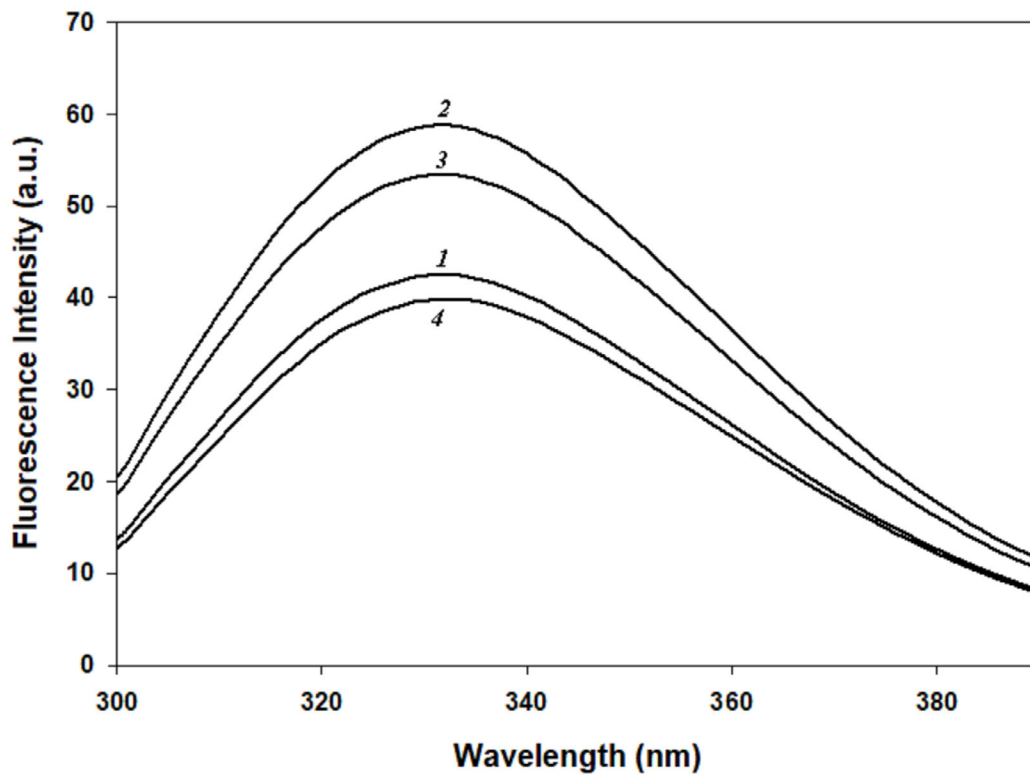


Рис. 4. Спектры флуоресценции триптофана в α -кристаллине. Кривые: 1 – нативный α -кристаллин; 2–4 – α -кристаллин, инкубированный с 5, 50 и 500 мМ сорбитолом соответственно. Данные представлены как среднее значение трех измерений

поверхность α -кристаллина ни при более низких, ни при более высоких концентрациях. Поскольку сообщалось, что размер олигомеров α -кристаллина влияет на его CLA [7, 16, 20], мы также определили молекулярную массу (размер олигомеров) α -кристаллина методом эксклюзионной хроматографии. Инкубация α -кристаллина с сорбитолом (5–500 мМ) не приводила к изменению размера его олигомеров (рис. 5).

Стабильность α -кристаллина также имеет решающее значение для его CLA при исследовании агрегации. При использовании ДСК мы анализировали термостабильность α -кристаллина, инкубированного с сорбитолом. Анализ термограмм ДСК показал лишь незначительные изменения термостабильности α -кристаллина, инкубированного с различными концентрациями (5–500 мМ) сорбитола. Несмотря на то что для образцов, инкубированных с низкими концентрациями сорбитола, не наблюдалось значительных изменений термодинамических параметров, для образца, инкубированного с 500 мМ, все же наблюдалось небольшое увеличение T_m (~ 1 °С) и примерно 10%-ное увеличение энтальпии и энтропии перехода (рис. 6 и таблица). Кроме того, не наблюдалось существенных различий при проведении ДСК при 30 и

90 °С/ч, что указывает на то, что результаты не зависели от скорости сканирования (данные не показаны).

В совокупности эти результаты указывают на то, что α -кристаллин, инкубированный с различными концентрациями сорбитола, демонстрировал два различимых друг от друга, но все-таки разные результаты. В частности, инкубация с более низкими концентрациями (5 и 50 мМ) сорбитола приводила к потере CLA и изменениям вторичной и третичной структур. Напротив, не наблюдалось существенного влияния ни на CLA, ни на структуру, ни на стабильность образцов, инкубированных с более высокими концентрациями (500 мМ) сорбитола. Скорее наблюдался мягкий стабилизирующий эффект при концентрации сорбитола 500 мМ в отношении термического разворачивания. Следует отметить, что в то время как концентрация сорбитола в хрусталике глаза крыс с нормогликемией находится в диапазоне 0,1–0,2 мМ, у крыс с диабетом его уровень может повышаться до 0,5–10 мМ в зависимости от степени гипергликемии [29, 33, 34]. Следовательно, эффекты, наблюдаемые при 5 или 50 мМ сорбитола в настоящем исследовании, могут быть связаны с гипергликемическими состояниями в хрусталике

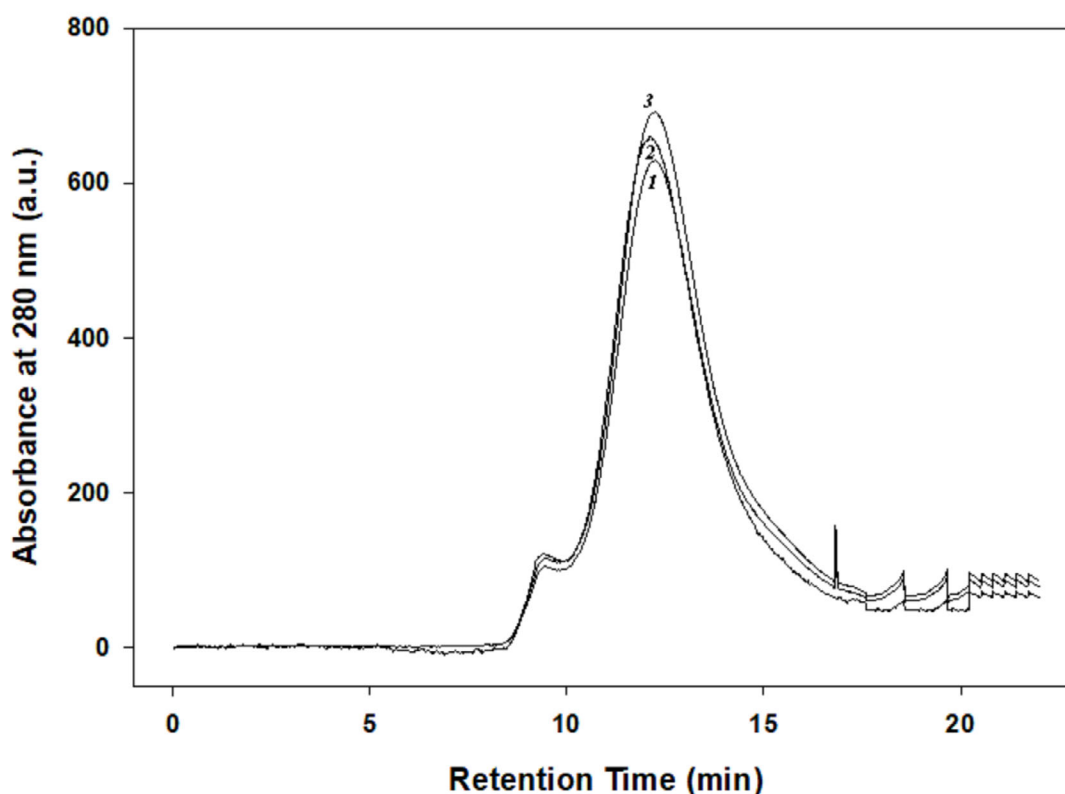


Рис. 5. Молекулярная масса α -кристаллина. Время удерживания при ВЭЖХ нативного (1) или α -кристаллина, инкубированного с 5 (2) и 500 мМ сорбитола (3)

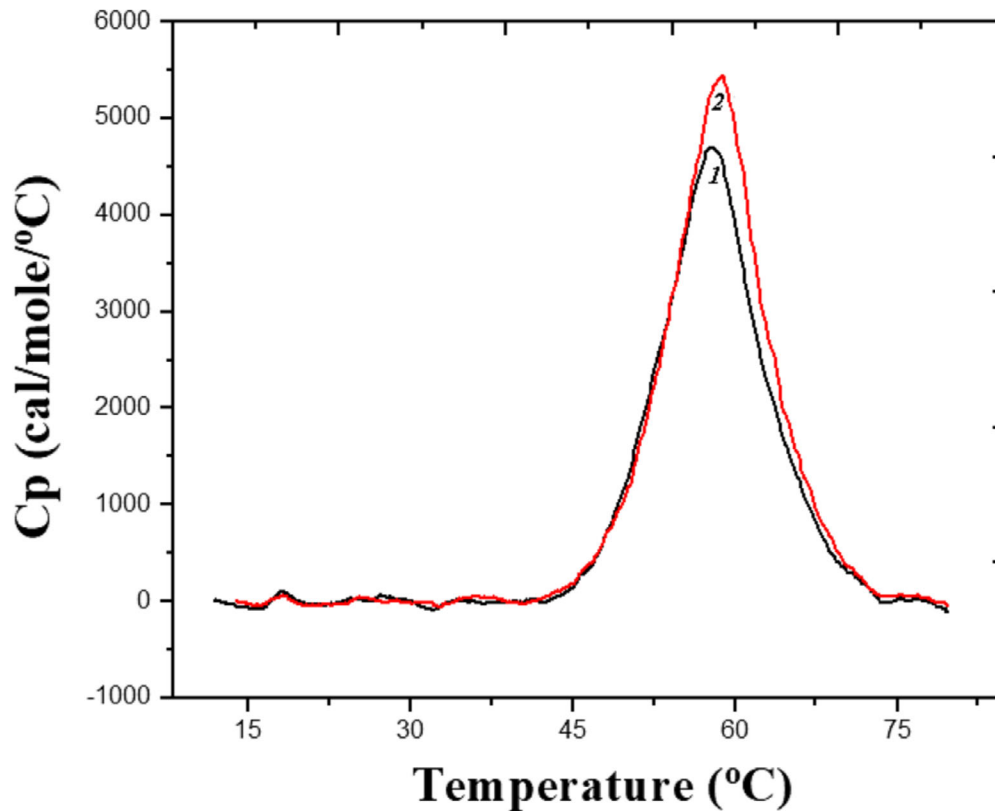


Рис. 6. Влияние обработки сорбитолом на термостабильность α -кристаллина. Дифференциальная сканирующая калориметрическая термограмма нативного α -кристаллина (1) и после воздействия 500 мМ сорбитола (2)

диабетических крыс, тогда как супрафизиологическая концентрация 500 мМ связана с концентрациями типичных осмолитов (0,5–1,0 М), используемых в качестве агентов, стабилизирующих белок, или в качестве консервирующих агентов.

Известно, что низкомолекулярные осмолиты, в том числе сахарные спирты, такие как сорбитол, стабилизируют трехмерную структуру многих белков в нестабильных или жестких условиях за счет изменения структуры белка и движения молекул воды, что приводит к большей стабильности [35, 36]. Помимо применения в промышленности и фармацевтике, осмолиты накапливаются *in vivo* в условиях стресса и влияют на стабильность белков в живых клетках [37]. Осмолиты контролируют стабильность белка, влияя на стерические, ван-дер-ваальсовы, гидрофобные и электростатические взаимодействия белка с самим собой и со всеми компонентами раствора [38]. Напротив, накопление сорбитола в хрусталике глаза связано с развитием катаракты, которая является преимущественно нарушением агрегации белков. Было показано, что гипергликемия, вызванная хроническим неконтролируемым диабетом, усугуб-

ляет диабетические осложнения, включая диабетическую катаракту, которая, как полагают, в основном связана с осмотическим стрессом (накопление сорбитола внутри клеток) через полиоловый путь и связанный с ним окислительный

Термодинамические параметры, полученные при исследовании α -кристаллина методом ДСК до и после инкубации с сорбитолом

Образец	T_m (°C)	ΔH_t (ккал/моль)	ΔS_t (кал/моль/К)
α -кристаллин	57,9	$55,2 \pm 0,1$	$167 \pm 1,8$
α -кристаллин, инкубированный с 5 мМ сорбитолом	58,2	$58,5 \pm 0,2$	$174 \pm 1,8$
α -кристаллин, инкубированный с 50 мМ сорбитолом	58,4	$60,1 \pm 0,3$	$180 \pm 2,1$
α -кристаллин, инкубированный с 500 мМ сорбитолом	58,7	$61,3 \pm 0,2$	$185 \pm 2,2$

Примечание. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 3$).

стресс [39, 40]. В дополнение к полиоловому пути и связанному с ним окислительному стрессу преобладающим биохимическим механизмом, приписываемым диабетической катаракте, является неферментативное гликирование. Исследования, проведенные в нашей и других лабораториях, показали, что неферментативное гликирование α -кристаллина *in vitro* приводит к снижению CLA [16, 20, 41, 42]. Также было показано, что окислительный стресс приводит к снижению CLA α -кристаллина [41, 43, 44]. Однако исследований, в которых изучалось прямое влияние сорбитола на α -кристаллин, до сих пор не проводилось.

Количество сорбитола, накапливающегося в диабетическом хрусталике глаза, в частности, крысы, не превышает 5–10 мМ, что значительно ниже концентраций (100–1000 мМ) осмолитов, используемых в качестве стабилизаторов белка. Поэтому в этом исследовании мы изучали влияние различных концентраций сорбитола (0,5–500 мМ) на α -кристаллин. Интересно, что лишь при относительно низких концентрациях (5 и 50 мМ) сорбитола наблюдалось снижение CLA по сравнению с более высокими (500 мМ) концентрациями. Фактически в концентрациях, которые обычно используются для стабилизации белка или в качестве консерванта, сорбитол не влиял на CLA α -кристаллина. Одновременно со снижением CLA наблюдались незначительные, но воспроизводимые изменения вторичной и третичной структуры после инкубации с 5 мМ и 50 мМ сорбитола, тогда как после инкубации с 500 мМ сорбитола изменения во вторичной и третичной структуре отсутствовали или были минимальны. Кроме того, ни при каких концентрациях сорбитола (5–500 мМ) заметных различий в молекулярной массе, размере олигомеров и стабильности α -кристаллина продемонстрировано не было.

Хотя известно, что осмолиты стабилизируют нативную конформацию глобулярных белков, их влияние на стабильность и агрегацию внутренне неупорядоченных белков находится в стадии тщательного изучения [45, 46]. Стабилизирующий эффект осмолитов на белки при высоких концентрациях объясняется гидратацией (исключением осмолита из белка), как правило, без изменения структуры нативного белка или в пользу естественно неупорядоченной структуры по сравнению с нативной структурой, в то время как при более низких концентрациях предпочтительными могут быть взаимодействия с белками, приводящие к изменению структурных и функциональных свойств [36]. Тем не менее действие осмолита может быть реализовано только в присутствии самого осмолита. Поэтому

мы также исследовали структурно-функциональные свойства α -кристаллина в прямом присутствии различных концентраций сорбитола (без диализа), но результаты были практически аналогичны результатам, полученным после удаления сорбитола с помощью диализа. Это очень интригующе, потому что теоретически после диализа эффекты низких и высоких концентраций сорбитола не должны различаться. Однако даже после анализа данных, полученных в настоящем исследовании, не ясно, каким образом более низкие концентрации сорбитола оказывают некоторое влияние на α -кристаллин, а высокие концентрации сорбитола — не оказывают даже после диализа. Поэтому необходимы дополнительные углубленные исследования для определения вероятного механизма наблюдаемых эффектов.

Что еще более важно, необходимо изучить влияние осмолитов, включая сорбитол, на агрегацию β - и γ -кристаллинов, которые используются не только в качестве белков-субстратов при исследовании CLA, но также являются основными мишенями защитного действия α -кристаллина в хрусталике. В этом контексте следует отметить, что индуцированная теплом и УФ-излучением агрегация растворимой фракции (всех трех основных кристаллинов) из хрусталика глаза крысы со спонтанным ожирением была выше по сравнению с их стройными собратьями [47], что было в основном связано с гипераккумуляцией сорбитола в хрусталике глаза у крыс с ожирением по сравнению с контрольной группой, состоящей из худых особей [33]. Однако мало что известно о влиянии сорбитола на кристаллины в отдельности, исследования в этом направлении ведутся в настоящее время. Несмотря на обширные исследования касательно вклада сорбитола в развитие диабетической катаракты, не было предпринято никаких попыток проанализировать влияние сорбитола на структурные и функциональные аспекты кристаллинов. Предварительные результаты, представленные в настоящем исследовании, позволяют с большой долей уверенности предположить, что хроническое воздействие сорбитола на белки хрусталика, включая α -кристаллин, при диабете делает их более восприимчивыми к агрегации и снижению CLA, тем самым предрасполагая хрусталик к образованию катаракты наряду с осмотическим стрессом.

Благодарности. Работа GBR поддерживается грантами Индийского совета медицинских исследований, Департамента биотехнологии и Совета по научным и инженерным исследованиям правительства Индии. Исследования, проведен-

ные в Университете Хайдарабада, были поддержаны Комиссией по университетским грантам (Индия) в рамках программ UPE-II и CAS, а также Министерством науки и технологий (Индия) в рамках программ PURSE и FIST. Работа СУК и US поддерживается исследовательской стипендией Индийского совета медицинских исследований, а VS — исследовательской сти-

пендией Совета научных и промышленных исследований правительства Индии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Соблюдались все применимые международные, национальные и/или институциональные рекомендации по уходу и использованию животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pascolini, D., and Mariotti, S. P. (2012) Global estimates of visual impairment: 2010, *Br. J. Ophthalmol.*, **96**, 614-618, doi: 10.1136/bjophthalmol-2011-300539.
- Congdon, N. G., Friedman, D. S., and Lietman, T. (2003) Important causes of visual impairment in the world today, *JAMA*, **290**, 2057-2060, doi: 10.1001/jama.290.15.2057.
- Asbell, P. A., Dualan, I., Mindel, J., Brocks, D., Ahmad, M., et al. (2005) Age-related cataract, *Lancet*, **365**, 599-609, doi: 10.1016/S0140-6736(05)17911-2.
- Drinkwater, J. J., Davis, W. A., and Davis, T. M. E. (2019) A systematic review of risk factors for cataract in type 2 diabetes, *Diabetes Metab. Res. Rev.*, **35**, e3073, doi: 10.1002/dmrr.3073.
- International Diabetes Federation (2019) *IDF Diabetes Atlas 2019*, 9th Edn., World Health Organisation, URL: https://diabetesatlas.org/upload/resources/material/20200302_133351_IDFATLAS9e-final-web.pdf.
- Wistow, G. J., and Piatigorsky, J. (1988) Lens crystallins: The evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue, *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 479-504, doi: 10.1146/annurev.bi.57.070188.002403.
- Reddy, G. B., Kumar, P. A., and Kumar, M. S. (2006) Chaperone-like activity and hydrophobicity of alpha-crystallin, *IUBMB Life*, **58**, 632-641, doi: 10.1080/15216540601010096.
- Reddy, V. S., and Reddy, G. B. (2016) Role of crystallins in diabetic complications, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 269-277, doi: 10.1016/j.bbagen.2015.05.009.
- Srinivas, P. N., Reddy, P. Y., and Reddy, G. B. (2008) Significance of alpha-crystallin heteropolymer with a 3 : 1 alphaA/alphaB ratio: Chaperone-like activity, structure and hydrophobicity, *Biochem. J.*, **414**, 453-460, doi: 10.1042/BJ20080544.
- Kumar, P. A., and Reddy, G. B. (2009) Modulation of alpha-crystallin chaperone activity: A target to prevent or delay cataract? *IUBMB life*, **61**, 485-495, doi: 10.1002/iub.176.
- Horwitz, J. (2003) Alpha-crystallin, *Exp. Eye Res.*, **76**, 145-153, doi: 10.1016/s0014-4835(02)00278-6.
- Yan, H., Harding, J. J., Hui, Y. N., and Li, M. Y. (2003) Decreased chaperone activity of alpha-crystallin in selenite cataract may result from selenite-induced aggregation, *Eye*, **17**, 637-645, doi: 10.1038/sj.eye.6700419.
- Kelley, M. J., David, L. L., Iwasaki, N., Wright, J., and Shearer, T. R. (1993) alpha-Crystallin chaperone activity is reduced by calpain II *in vitro* and in selenite cataract, *J. Biol. Chem.*, **268**, 18844-18849.
- Kumar, P. A., Suryanarayana, P., Reddy, P. Y., and Reddy, G. B. (2005) Modulation of alpha-crystallin chaperone activity in diabetic rat lens by curcumin, *Mol. Vis.*, **11**, 561-568.
- Huang, F. Y., Ho, Y., Shaw, T. S., and Chuang, S. A. (2000) Functional and structural studies of alpha-crystallin from galactosemic rat lenses, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273**, 197-202, doi: 10.1006/bbrc.2000.2924.
- Kumar, P. A., Kumar, M. S., and Reddy, G. B. (2007) Effect of glycation on alpha-crystallin structure and chaperone-like function, *Biochem. J.*, **408**, 251-258, doi: 10.1042/BJ20070989.
- Bloemendal, H., de Jong, W., Jaenicke, R., Lubsen, N. H., Slingsby, C., et al. (2004) Ageing and vision: Structure, stability and function of lens crystallins, *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **86**, 407-485, doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2003.11.012.
- Abraham, E. C., Swamy, M. S., and Perry, R. E. (1989) Nonenzymatic glycosylation (glycation) of lens crystallins in diabetes and aging, *Progr. Clin. Biol. Res.*, **304**, 123-139.
- Brownlee, M., Vlassara, H., and Cerami, A. (1984) Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications, *Ann. Int. Med.*, **101**, 527-537, doi: 10.7326/0003-4819-101-4-527.
- Kumar, M. S., Reddy, P. Y., Kumar, P. A., Suroliya, I., and Reddy, G. B. (2004) Effect of dicarbonyl-induced browning on alpha-crystallin chaperone-like activity: Physiological significance and caveats of *in vitro* aggregation assays, *Biochem. J.*, **379**, 273-282, doi: 10.1042/BJ20031633.
- Chitra, P. S., Chaki, D., Boiroju, N. K., Mokalla, T. R., Gadde, A. K., et al. (2020) Status of oxidative stress markers, advanced glycation index, and polyol pathway in age-related cataract subjects with and without diabetes, *Exp. Eye Res.*, **200**, 108230, doi: 10.1016/j.exer.2020.108230.
- Kumar, P. A., and Reddy, G. B. (2007) Focus on molecules: Aldose reductase, *Exp. Eye Res.*, **85**, 739-740, doi: 10.1016/j.exer.2006.08.002.
- Varma, S. D., Kumar, S., and Richards, R. D. (1979) Light-induced damage to ocular lens cation pump: Prevention by vitamin C, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3504-3506, doi: 10.1073/pnas.76.7.3504.
- Thampi, P., Zarina, S., and Abraham, E. C. (2002) alpha-Crystallin chaperone function in diabetic rat and human lenses, *Mol. Cell. Biochem.*, **229**, 113-118, doi: 10.1023/a:1017980713089.
- Cherian, M., and Abraham, E. C. (1995) Diabetes affects alpha-crystallin chaperone function, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **212**, 184-189, doi: 10.1006/bbrc.1995.1954.
- Srinivas, P., Narahari, A., Petrash, J. M., Swamy, M. J., and Reddy, G. B. (2010) Importance of eye lens alpha-crystallin heteropolymer with 3:1 alphaA to alphaB ratio: Stability, aggregation, and modifications, *IUBMB Life*, **62**, 693-702, doi: 10.1002/iub.373.
- Snow, A., Shieh, B., Chang, K. C., Pal, A., Lenhart, P., et al. (2015) Aldose reductase expression as a risk factor for cataract, *Chem. Biol. Interact.*, **234**, 247-253, doi: 10.1016/j.cbi.2014.12.017.
- Pfeifer, M. A., Schumer, M. P., and Gelber, D. A. (1997) Aldose reductase inhibitors: the end of an era or the need for different trial designs? *Diabetes*, **46 Suppl. 2**, S82-S89, doi: 10.2337/diab.46.2.s82.
- Suryanarayana, P., Saraswat, M., Petrash, J. M., and Reddy, G. B. (2007) *Embllica officinalis* and its enriched

- tannoids delay streptozotocin-induced diabetic cataract in rats, *Mol. Vis.*, **13**, 1291-1297.
30. Akileshwari, C., Raghu, G., Muthenna, P., Mueller, N. H., Suryanaryana, P., et al. (2014) Bioflavonoid ellagic acid inhibits aldose reductase: Implications for prevention of diabetic complications, *J. Funct. Foods*, **6**, 374-383, doi: 10.1016/j.jff.2013.11.004.
 31. Kumar, M. S., Kapoor, M., Sinha, S., and Reddy, G. B. (2005) Insights into hydrophobicity and the chaperone-like function of alphaA- and alphaB-crystallins: An isothermal titration calorimetric study, *J. Biol. Chem.*, **280**, 21726-21730, doi: 10.1074/jbc.M500405200.
 32. Das, K. P., and Surewicz, W. K. (1995) Temperature-induced exposure of hydrophobic surfaces and its effect on the chaperone activity of alpha-crystallin, *FEBS Lett.*, **369**, 321-325, doi: 10.1016/0014-5793(95)00775-5.
 33. Reddy, P. Y., Giridharan, N. V., and Reddy, G. B. (2012) Activation of sorbitol pathway in metabolic syndrome and increased susceptibility to cataract in Wistar-Obese rats, *Mol. Vis.*, **18**, 495-503.
 34. Randazzo, J., Zhang, P., Makita, J., Blessing, K., and Kador, P. F. (2011) Orally active multi-functional antioxidants delay cataract formation in streptozotocin (type 1) diabetic and gamma-irradiated rats, *PLoS One*, **6**, e18980, doi: 10.1371/journal.pone.0018980.
 35. Haque, I., Singh, R., Moosavi-Movahedi, A. A., and Ahmad, F. (2005) Effect of polyol osmolytes on DeltaG(D), the Gibbs energy of stabilisation of proteins at different pH values, *Biophys. Chem.*, **117**, 1-12, doi: 10.1016/j.bpc.2005.04.004.
 36. Xie, G., and Timasheff, S. N. (1997) Mechanism of the stabilization of ribonuclease A by sorbitol: Preferential hydration is greater for the denatured than for the native protein, *Protein Sci.*, **6**, 211-221, doi: 10.1002/pro.5560060123.
 37. Khan, S. H., Ahmad, N., Ahmad, F., and Kumar, R. (2010) Naturally occurring organic osmolytes: From cell physiology to disease prevention, *IUBMB Life*, **62**, 891-895, doi: 10.1002/iub.406.
 38. Ferreira, L. A., Uversky, V. N., and Zaslavsky, B. Y. (2017) Role of solvent properties of water in crowding effects induced by macromolecular agents and osmolytes, *Mol. bioSystems*, **13**, 2551-2563, doi: 10.1039/c7mb00436b.
 39. Beeley, L. (1983) Assessing new drugs, *Practitioner*, **227**, 1527-1534.
 40. Williamson, J. (2012) Linking diabetic complications to sorbitol oxidation, oxidative stress and metabolic suppression, *J. Diab. Metab.*, **3**, 219, doi: 10.4172/2155-6156.1000219.
 41. Cherian, M., and Abraham, E. C. (1995) Decreased molecular chaperone property of alpha-crystallins due to post-translational modifications, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **208**, 675-679, doi: 10.1006/bbrc.1995.1391.
 42. Plater, M. L., Goode, D., and Crabbe, M. J. (1997) Ibuprofen protects alpha-crystallin against posttranslational modification by preventing protein cross-linking, *Ophthalm. Res.*, **29**, 421-428, doi: 10.1159/000268043.
 43. Peluso, G., Petillo, O., Barbarisi, A., Melone, M. A., Reda, E., et al. (2001) Carnitine protects the molecular chaperone activity of lens alpha-crystallin and decreases the post-translational protein modifications induced by oxidative stress, *FASEB J.*, **15**, 1604-1606, doi: 10.1096/fj.00-0727fje.
 44. Rajan, S., Horn, C., and Abraham, E. C. (2006) Effect of oxidation of alphaA- and alphaB-crystallins on their structure, oligomerization and chaperone function, *Mol. Cell. Biochem.*, **288**, 125-134, doi: 10.1007/s11010-006-9128-4.
 45. Verma, G., Singh, P., and Bhat, R. (2020) Disorder under stress: Role of polyol osmolytes in modulating fibrillation and aggregation of intrinsically disordered proteins, *Biophys. Chem.*, **264**, 106422, doi: 10.1016/j.bpc.2020.106422.
 46. Aravindan, S., Chen, S., Choudhry, H., Molfetta, C., Chen, K. Y., et al. (2020) Osmolytes dynamically regulate mutant Huntingtin aggregation and CREB function in Huntington's disease cell models, *Sci. Rep.*, **10**, 15511, doi: 10.1038/s41598-020-72613-3.
 47. Reddy, P. Y., Giridharan, N. V., Balakrishna, N., Validandi, V., Pullakhandam, R., et al. (2013) Increased risk of cataract development in WNIN-obese rats due to accumulation of intralenticular sorbitol, *IUBMB Life*, **65**, 472-478, doi: 10.1002/iub.1163.

EFFECT OF SORBITOL ON ALPHA-CRYSTALLIN STRUCTURE AND FUNCTION

**Ch. U. Kumar¹, U. Suryavanshi¹, V. Sontake¹, P. Y. Reddy¹,
R. S. Sankhala², M. J. Swamy², and G. B. Reddy^{1*}**

¹ *Biochemistry Division, National Institute of Nutrition, Hyderabad 500007, India;
e-mail: reddyg.bp@icmr.gov.in; geereddy@yahoo.com*

² *School of Chemistry, University of Hyderabad, Hyderabad 500046, India*

Loss of eye lens transparency due to cataract is the leading cause of blindness all over the world. While aggregation of lens crystallins is the most common endpoint in various types of cataracts, chaperone-like activity (CLA) of α -crystallin preventing protein aggregation is considered to be important for maintaining the eye lens transparency. Osmotic stress due to increased accumulation of sorbitol under hyperglycemic conditions is believed to be one of the mechanisms for diabetic cataract. In addition, compromised CLA of α -crystallin in diabetic cataract has been reported. However, the effect of sorbitol on the structure and function of α -crystallin has not been elucidated yet. Hence, in the present exploratory study, we described the effect of varying concentrations of sorbitol on the structure and function of α -crystallin. Alpha-crystallin purified from the rat lens was incubated with varying concentrations of sorbitol in the dark under sterile conditions for up to 5 days. At the end of incubation, structural properties and CLA were evaluated by spectroscopic methods. Interestingly, different concentrations of sorbitol showed contrasting results: at lower concentrations (5 and 50 mM) there was a decrease in CLA and subtle alterations in secondary and tertiary structure but not at higher concentrations (500 mM). Though, these results shed a light on the effect of sorbitol on α -crystallin structure–function, further studies are required to understand the mechanism of the observed effects and their implication to cataractogenesis.

Keywords: alpha-crystallin, cataract, chaperone-like activity, sorbitol, structure