

МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ И ЛИПИДНОГО СОСТАВА ХРУСТАЛИКОВ КРЫС В ПРОЦЕССЕ ПОСТНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

УДК 577.15.2:612.015.1:617.741.001.6:612.64
Поступила 2.04.2012 г.



Д.И. Князев, младший научный сотрудник научной проблемной лаборатории физико-химических исследований НИИ ПФМ;

И.П. Иванова, д.б.н., зав. научной проблемной лабораторией физико-химических исследований НИИ ПФМ

Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1

Цель исследования — изучение возрастной динамики уровня посттрансляционных модификаций белков и изменений липидного состава мембран хрусталиков крыс, рассмотрение возможных механизмов влияния мембран на состав и выраженность белковых модификаций в хрусталике.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на крысах линии Wistar трех возрастных групп: 1, 12 и 24 мес. Уровень белка, концентрацию сульфгидрильных (SH) групп, уровень карбонильных производных белков оценивали спектрофотометрически, содержание триптофана, битирозина и продуктов неферментативного гликозилирования — по интенсивности флуоресценции. Разделение фосфолипидов и нейтральных липидов проводили методом тонкослойной хроматографии. Денситометрический анализ и количественная обработка хроматограмм выполнена с использованием программы NIH Image J.

Результаты. Установлено, что с увеличением возраста повышается содержание белка в гомогенате хрусталиков. Это свидетельствует о накоплении малорастворимых белковых агрегатов. В гомогенате наблюдается равномерное снижение концентрации SH-групп и уровня карбонильных производных белков. В то же время происходит накопление продуктов гликозилирования, битирозина и триптофана в водорастворимой фракции. Основные возрастные изменения липидного состава мембран хрусталиков — это увеличение доли сфингомиелинов и нейтральных липидов, что может быть связано с увеличением доли зрелых волокон, составляющих ядро хрусталика, по сравнению со слабо- и умеренно-дифференцированными волокнами и клетками эпителия. Главной составляющей нейтральных липидов явились холестерин и его эфиры.

Заключение. Обогащение мембран хрусталиков классами липидов, характеризующихся относительно высокой «упорядоченностью», ингибирует образование карбонильных производных белков хрусталика и в то же время может играть важную роль в разбалансировке межклеточной коммуникации, приводящей к протеолизу (и таким образом экспонированию триптофана) и накоплению продуктов неферментативного гликозилирования.

Ключевые слова: хрусталик; фосфолипиды; свободно-радикальные процессы; посттрансляционные модификации белков хрусталика.

English

Protein Modifications and Lipid Composition Changes in Rat Lenses in Postnatal Development

D.I. Knyazev, Junior Research Worker, Problem Scientific Laboratory of Physico-Chemical Researches, Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine;

I.P. Ivanova, D.Bio.Sc., Head of Problem Scientific Laboratory of Physico-Chemical Researches, Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine

Nizhny Novgorod State Medical Academy, Minin and Pozharsky Square, 10/1, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603005

The aim of the investigation is to study age dynamics of posttranslational protein modification level and the changes of rat lens membranes, and the consideration of possible mechanisms of membrane effect on the composition and intensity of protein modifications in lens.

Materials and Methods. The experiments were carried out on Wistar rats of three age groups: 1, 12 and 24 months. Protein level, sulfhydryl (SH) group concentration, and protein carbonyl derivatives level were measured spectrophotometrically. The content of tryptophan, bityrosine and advanced glycation end-products (AGEs) were assessed by fluorescence intensity. Phospholipids and neutral lipids were fractionated by thin-layer chromatography. Densitometric analysis and quantitative processing of chromatograms were performed using NIH Image J software.

Results. Protein content in lens homogenate was found to increase with age, indicating the accumulation of slightly soluble protein aggregates. There was uniform decrease of SH-group concentration and protein carbonyl derivatives in homogenate. On the other hand, there was observed the accumulation of AGEs, bityrosine and tryptophan in water-soluble fraction. The main age changes of lens membrane lipid

Для контактов: Князев Дмитрий Игоревич, тел. моб. +7 920-252-41-80; e-mail: Dmitry-Kn@yandex.ru

composition were the increasing ratio of sphingomyelin and neutral lipids. The changes could be caused by the growth of the proportion of mature fibers forming the nucleus of lens compared to poorly- and moderately-differentiated fibers and cells of epithelium. The principal component of neutral lipids was cholesterol and cholesterol esters.

Conclusion. Lens membrane enrichment by lipids characterized by relatively high “ordering” inhibits the formation of protein carbonyl derivatives, but at the same time, can disbalance intercellular communication resulting in proteolysis (and tryptophan exposure) and AGEs accumulation.

Key words: lens; phospholipids; free-radical processes; posttranslational modifications of lens proteins.

Функцией хрусталика является фокусировка света на сетчатке, и, соответственно, необходимыми его свойствами являются максимальное светопропускание и минимальное светорассеяние. В ходе дифференцировки волокон из клеток эпителия происходит утрата органелл и синтез специализированных белков — кристаллинов [1]. В процессе дифференцировки, а также с увеличением возраста белки хрусталика претерпевают множественные посттрансляционные модификации (ПТМ), часть из которых может вести к формированию высокомолекулярных нерастворимых агрегатов, обуславливающих возникновение помутнений в хрусталике [2–4]. Наряду с этим в процессе постнатального развития наблюдаются изменения состава и свойств мембран волокон хрусталика. Вопрос взаимовлияния мембран и внутриклеточных компартментов в контексте развития помутнений хрусталика является не до конца изученным. Есть сообщения об участии мембран в формировании высокомолекулярных белковых агрегатов [5], однако механизмы взаимодействий мембран с белками хрусталика остаются неясными.

Важной характеристикой, определяющей свойства и функции мембран, является липидный состав. Исследования, касающиеся изменений липидного состава хрусталиков различных видов млекопитающих (в т.ч. и человека), показали высокое содержание холестерина, также отмечено увеличение количества сфинголипидов с возрастом и в ходе созревания волокон [6]. Липидный состав во многом определяет интенсивность свободно-радикальных процессов, протекающих на мембранах, функциональное состояние межклеточных контактов и рецепторов, систем транспорта ионов и метаболитов [7]. Таким образом, структурно-функциональные изменения, обусловленные влиянием липидного состава хрусталиков, могут прямо или опосредованно участвовать в образовании и накоплении тех или иных ПТМ белков.

С другой стороны, в качестве основного движущего фактора накопления множественных ПТМ белков рассматривается действие активных форм кислорода (АФК) [8]. Среди ПТМ, ассоциированных с развитием помутнений в хрусталике, отмечены неспецифический протеолиз и неферментативное гликозилирование [9, 10], однако вопрос о механизмах формирования этих модификаций и участии в них АФК остается не до конца изученным, в связи с чем в их накоплении можно предположить значительную роль мембран.

Цель исследования — изучение взаимосвязи липидного состава мембран и уровня посттрансляцион-

ных модификаций белков хрусталика в ходе постнатального развития.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на крысах линии Wistar трех возрастных групп: 1, 12 и 24 мес, численность групп — 20, 16 и 20 особей соответственно. Продолжительность жизни крыс — 30–40 мес.

При проведении исследований неукоснительно соблюдались этические принципы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006).

Наркотизированных животных декапитировали и выделяли хрусталики, которые далее гомогенизировали на льду в стерильном физиологическом растворе в соотношении 1:25 (масса хрусталика к объему раствора). Для получения водорастворимой фракции гомогенат разводили в фосфатном буфере (17 ммоль/л KH_2PO_4 , 52 ммоль/л Na_2HPO_4 , pH=7,4) в объемном соотношении 1:3, перемешивали, центрифугировали при 3000 об./мин, супернатант использовали для дальнейших процедур.

Содержание белка определяли биуретовым методом с помощью набора «Общий Белок-Витал» («Витал Диагностикс СПб», Санкт-Петербург, Россия) и выражали в миллиграммах на грамм сырой массы. Концентрацию сульфгидрильных (SH) групп оценивали спектрофотометрически с использованием 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислоты [11]. Степень окислительной модификации белков оценивали спектрофотометрически по уровню карбонильных производных в составе окисленных аминокислотных остатков белков, реагирующих с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием производных 2,4-динитрофенилгидразона [12]. Уровень триптофана и битирозина оценивали по интенсивности флуоресценции при длинах волн возбуждения и эмиссии 295 и 340 нм — для триптофана, 325 и 415 нм — для битирозина. Уровень конечных продуктов неферментативного гликозилирования (КПНГ) оценивали спектрофлуориметрически [13]. Уровень карбонильных производных, триптофана, битирозина и КПНГ нормирован к количеству белка и выражен в относительных единицах. Спектральные измерения выполнены на спектрофлуориметре «Флюорат 02 Панорама» («Люмэкс», Санкт-Петербург, Россия).

Экстракцию и очистку липидов из гомогената хрусталиков проводили по методу Folch [14]. Для хроматографического анализа использовали пластины марки Sorbfil (Краснодар, Россия). Система растворителей

для разделения фосфолипидов — хлороформ:метанол:вода:гептан — 65:25:4:9 [15]; система растворителей для разделения нейтральных липидов — гексан:диэтиловый эфир:уксусная кислота — 70:30:1 [16]. Визуализацию зон липидов проводили обработкой пластин раствором фосфорно-молибденовой кислоты в этаноле с последующим инкубированием при 120°C в течение 10 мин. Денситометрический анализ и количественная обработка полученных хроматограмм выполнены с использованием программы NIH Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>).

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы Statistica 6.0. Погрешности, приведенные на рисунках, соответствуют стандартной ошибке среднего. Оценку межгрупповых различий проводили с использованием дисперсионного анализа ANOVA с post-hoc поправкой Бонферрони. Выборки считались принадлежащими к разным генеральным совокупностям при $p < 0,05$ [17].

Результаты. Концентрация белка в супернатанте,

что соответствует только растворимой фракции белков хрусталика, значительно не менялась, тогда как в гомогенате ткани относительный уровень белка с возрастом увеличивался (рис. 1, а). Эти данные свидетельствуют о накоплении малорастворимых белковых агрегатов. Концентрация SH-групп в обеих фракциях с возрастом равномерно уменьшалась (рис. 1, б), что свидетельствует о накоплении ковалентных связей с участием цистеина и метионина, а также об окислении SH-групп.

Уровень карбонильных производных в гомогенате также статистически значимо уменьшался с увеличением возраста, тогда как в супернатанте отмечено снижение только от 1 к 12 мес, далее, к 24 мес, карбонильные производные в водорастворимой фракции оставались на том же уровне (рис. 2). Это позволяет предположить, что снижение концентрации SH-групп в основном обусловлено образованием внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей, нежели окислением SH-групп.

Уровень триптофана, битирозина и КПНГ в водорастворимой фракции хрусталиков имел тенденцию к увеличению от одной возрастной группы к другой (рис. 3). Среди факторов, обуславливающих накопление триптофана, наиболее вероятными представляются протеолиз молекул кристаллинов, влекущий за собой высвобождение низко- и среднемoleкулярных пептидов, а также нарушение третичной структуры протеинов с переходом триптофана из скрытой формы в экспонированную. Исследованиями показано, что пептиды и подвергшиеся протеолизу «усеченные» молекулы кристаллинов являются центрами формирования высокомолекулярных нерастворимых белковых комплексов [9, 18].

Образование битирозина относят к окислительным модификациям белка, тогда как образование КПНГ может идти как с участием реакций окисления, так и без них. Один из исследованных механизмов образования КПНГ с участием аскорбиновой кислоты предполагает ее окисление до дегидроаскорбата с последующими неокислительными этапами, приводящими к образованию аддуктов с лизином и аргинином [19–21].

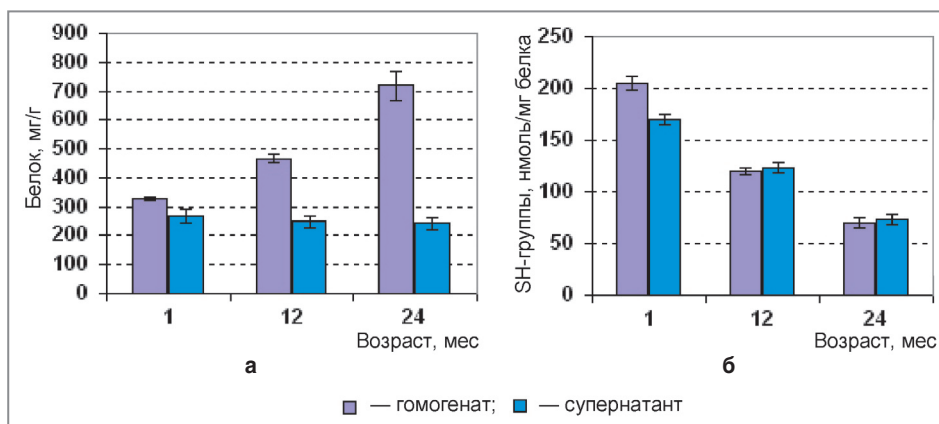


Рис. 1. Содержание белка (а) и SH-групп (б) в хрусталиках крыс. Все межгрупповые различия, кроме содержания белка в супернатанте, статистически значимы

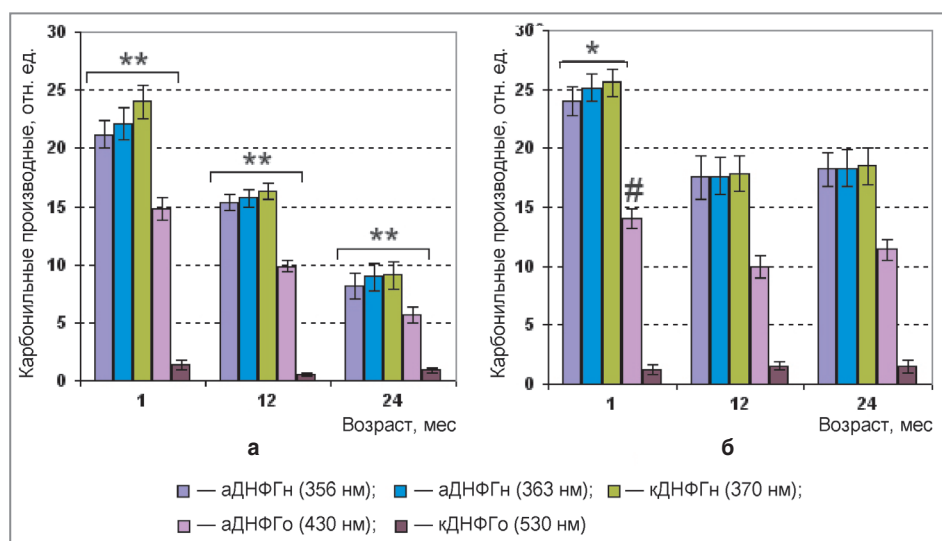


Рис. 2. Уровень карбонильных производных в гомогенате (а) и супернатанте (б): аДНФГ, кДНФГ — альдо- и кетодинитрофенилгидразоны; ДНФГн, ДНФГо — динитрофенилгидразоны нейтрального и основного характера; ** — статистически значимые различия между всеми группами; * — между группой 1 мес и остальными; # — между группами 1 и 12 мес

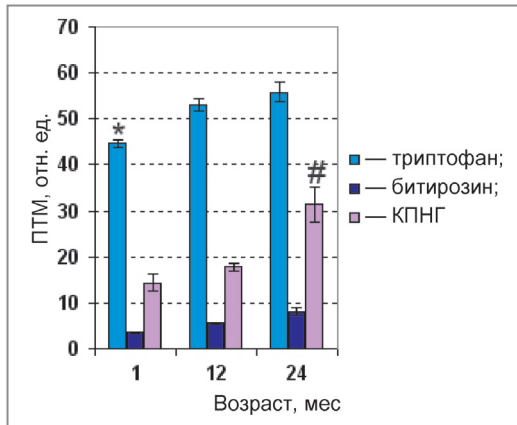


Рис. 3. Уровень посттрансляционных модификаций в водорастворимой фракции хрусталиков крыс. * — статистически значимые различия группы 1 мес от остальных; # — группы 24 мес от остальных. Межгрупповые различия по уровню битирозина статистически значимы между всеми группами

Состав фосфолипидов хрусталиков в возрастных группах представлен на рис. 4, а. Основной чертой возрастной динамики является увеличение доли сфингомиелинов. Главной составляющей нейтральных липидов явились холестерин и его эфиры (рис. 4, б). Молярное соотношение фосфолипидов к нейтральным липидам с возрастом уменьшалось от 1:3 до 1:4 (рис. 4, в). Повышение с возрастом доли сфингомиелинов и нейтральных липидов в целом объясняется увеличением доли зрелых волокон, составляющих ядро хрусталика, по сравнению со слабо- и умеренно-дифференцированными волокнами и клетками эпителия. Такой молекулярный состав мембран зрелых волокон обеспечивает их относительную физическую и химическую стабильность, в частности жесткость и устойчивость к перекисидации. Показано, что сфингомиелины и холестерин эффективно препятствуют процессам латерального транспорта кислорода по мембранам и окисления ненасыщенных жир-

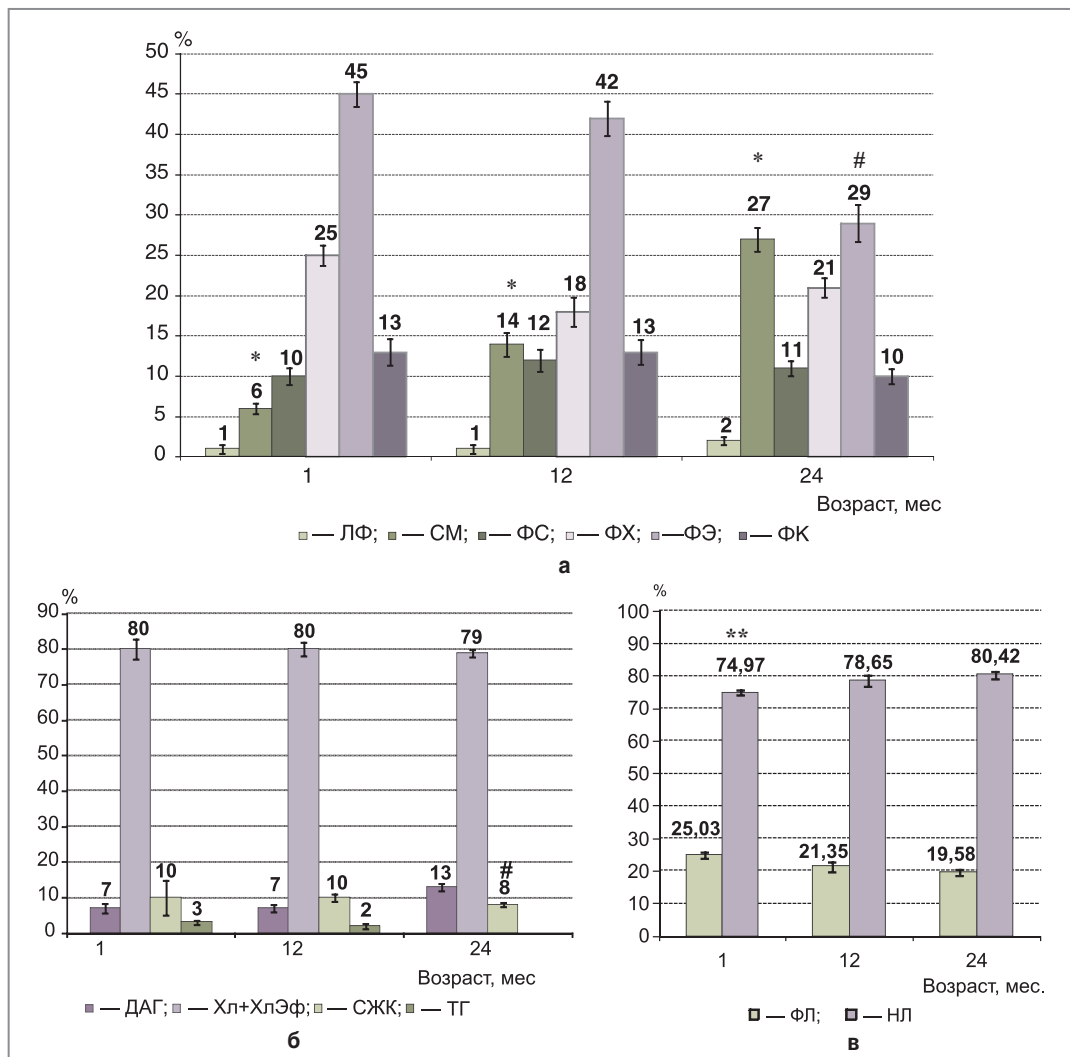


Рис. 4. Липидный состав хрусталиков крыс: а — фосфолипиды: ЛФ — лизоформы, СМ — сфингомиелины, ФС — фосфатидилсерины, ФХ — фосфатидилхолины, ФЭ — фосфатидилэтанолламины, ФК — фосфатидная кислота; б — нейтральные липиды: ДАГ — диацилглицерины, СЖК — свободные жирные кислоты, ТГ — триглицериды, Хл+ХлЭф — холестерин и эфиры холестерина; в — молярные доли фосфолипидов (ФЛ) и нейтральных липидов (НЛ). * — статистически значимые различия между всеми группами; # — группы 24 мес от остальных; ** — между группами 1 и 24 мес

ных кислот в составе фосфолипидов [22, 23]. С другой стороны, известно, что продукты метаболизма сфингомиелинов, и в частности церамиды, ингибируют пролиферацию [24]. Соответственно, возрастное увеличение содержания сфингомиелинов может быть ассоциировано со снижением числа пролиферирующих клеток эпителия и числа волокон коры хрусталика, находящихся в процессе созревания.

Не до конца выясненным является вопрос о механизмах возрастного накопления сфингомиелинов и нейтральных липидов в хрусталиках. В качестве одной из причин рассматривается деградация молекул фосфолипидов [6], отражением чего может являться тенденция к повышению уровня диацилглицеринов и снижению доли фосфатидилэтаноламинов в возрасте 24 мес (рис. 4, а, б). С другой стороны, может вносить вклад усиление синтеза нейтральных и сфинголипидов клетками эпителия и коры хрусталика, обусловленное факторами гуморальной регуляции.

Изменения свойств мембран, вызываемые повышением доли сфингомиелинов и нейтральных липидов, могут влиять на процессы межклеточного транспорта, что, в свою очередь, может вести к накоплению белковых модификаций. Известно избирательное распределение коннексинов (Cx) и аквапорина (AQP0) в мембранах хрусталика. Коннексины и аквапорин при низком содержании холестерина и сфингомиелина не являются рафтовыми резидентами, однако при обогащении мембран холестерином и сфингомиелином возможен частичный переход тетрамеров AQP0 в «упорядоченные» домены [25]. Переход в олигомерную форму и более «жесткое» липидное окружение может менять функциональный статус молекул AQP0 и вести к диссоциации комплексов AQP0–Cx50, что, в свою очередь, имеет следствием разобщение щелевых контактов, образуемых субъединицами Cx50 и Cx46 [26]. Результатом разбалансировки в работе щелевых контактов в зрелых волокнах хрусталика является накопление внутриклеточного кальция [27]. Повышенный уровень кальция вызывает активацию кальпаинов (кальцийзависимых протеаз). Показано, что избыточная активация кальпаина 2 и Lp82 (изоформы кальпаина, специфичной для хрусталика) ведет к протеолизу кристаллинов и белков цитоскелета и является одной из причин катаракты [28]. Таким образом, наблюдаемое увеличение уровня триптофана у групп 12 и 24 мес (см. рис. 3) может являться следствием повышенной активации кальцийзависимых протеаз в хрусталике.

Образуя внутри- и межмолекулярные водородные связи, молекулы сфингомиелина эффективно препятствуют свободно-радикальным процессам на мембранах [29]. На основании сообщений о нековалентном связывании молекул кристаллинов с мембранами хрусталиков [30] можно предположить, что обогащение мембран холестерином и сфингомиелином ингибирует прямое окисление α -кристаллинов и таким образом снижает уровень карбонильных производных белков, что и наблюдалось в эксперименте (см. рис. 2). Несмотря на ингибирующее влияние сфингомиелинов и холестерина на свободно-радикальные процессы на мембранах,

возрастное снижение концентрации SH-групп и повышение уровня битирозина может являться индикатором действия активных форм кислорода в цитозоле волокон хрусталика. В виду утраты органелл (и, в частности, митохондрий) в ходе дифференцировки волокон хрусталика в качестве средства накопления активных форм кислорода можно рассматривать их поступление (диффузию) с вышележащих слоев хрусталика, клеток эпителия и жидкостей глазных камер.

Таким образом, возрастные изменения липидного состава хрусталиков и, в частности, обогащение мембран сфингомиелином и нейтральными липидами могут иметь как прямое, так и опосредованное влияние на характер и выраженность белковых модификаций. Прямое влияние связано с ингибированием интенсивного окисления белков, и в первую очередь α -кристаллинов, приводящего к образованию карбонильных производных. Тем не менее встречаются процессы, в которых АФК выступают в качестве минорных и промежуточных звеньев белковых модификаций, как, например, неферментативное гликозилирование. Опосредованное влияние липидного состава мембран может заключаться в разбалансировке работы щелевых контактов, водных и ионных каналов, что в итоге приводит к неконтролируемому протеолизу.

Заключение. Установлено возрастное увеличение содержания нейтральных липидов и сфингомиелинов в мембранах хрусталика. Уровень карбонильных производных белков равномерно снижался в гомогенате, тогда как в водорастворимой фракции уменьшение концентрации карбонильных производных наблюдалось от одного к 12 мес, оставаясь к 24 мес на прежнем уровне. Такая динамика содержания карбонильных производных, вероятно, напрямую связана с изменениями липидного состава. Повышение уровня триптофана, битирозина и конечных продуктов неферментативного гликозилирования белков, наблюдавшееся в эксперименте, может быть обусловлено механизмами, роль мембран в реализации которых заслуживает дальнейшего изучения.

Литература

1. Bassnett S. Fiber cell denucleation in the primate lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 1678–1687.
2. Sakthivel M., Elanchezhian R., Thomas P.A., Geraldine P. Alterations in lenticular proteins during ageing and selenite-induced cataractogenesis in Wistar rats. *Mol Vis* 2010; 16: 445–453.
3. Hanson S.R., Hasan A., Smith D.L., Smith J.B. The major in vivo modifications of the human water-insoluble lens crystallins are disulfide bonds, deamidation, methionine oxidation and backbone cleavage. *Exp Eye Res* 2000; 71: 195–207.
4. Kopylova L.V., Cherepanov I.V., Snytnikova O.A., Rumyantseva Y.V., Kolosova N.G., Tsentalovich Y.P., Sagdeev R.Z. Age-related changes in the water-soluble lens protein composition of Wistar and accelerated-senescence OXYS rats. *Mol Vis* 2011; 17: 1457–1467.
5. Friedrich M.G., Truscott R.J.W. Membrane association of proteins in the aging human lens: profound changes takes place in the fifth decade of life. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 4786–4793.
6. Yappert M.C., Rujoi M., Borchman D., Vorobyov I., Estrada R. Glycero-versus sphingo-phospholipids: correlations with human

and non-human mammalian lens growth. *Exp Eye Res* 2003; 76: 725–734.

7. Borchman D., Yappert M.C. Lipids and the ocular lens. *J Lip Res* 2010; 51: 2473–2488.

8. Truscott R.J.W. Age-related nuclear cataract-oxidation is the key. *Exp Eye Res* 2005; 80: 709–725.

9. Raju I., Kumarasamy A., Abraham C.E. Multiple aggregates and aggresomes of C-terminal truncated human α A-crystallins in mammalian cells and protection by β B-crystallin. *PLoS ONE* 2011; 6(5): e19876. doi:10.1371/journal.pone.0019876.

10. Luthra M., Balasubramanian D. Nonenzymatic glycation alters protein structure and stability. A study of two eye lens crystallins. *J Biol Chem* 1993; 268: 18119–18227.

11. Riddles P.W., Blakeley R.L., Zerner B. Reassessment of Ellman's reagent. *Methods Enzymol* 1983; 91: 49–60.

12. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения. *Вопросы медицинской химии* 1995; 1(41): 24–26.

13. Muthenna P., Akileshwari C., Saraswat M., Reddy G.B. Inhibition of advanced glycation end-product formation on eye lens protein by rutin. *Br J Nutr* 2011. doi:10.1017/S0007114511004077.

14. Folch P.J., Lees M., Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 1957; 226: 497–509.

15. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. Ч. 2. Пер. со словац. М: Мир; 1980; с. 536–540.

16. Хроматография. Практическое приложение метода. Ч. 1. Пер. с англ. Под ред. Э. Хефтмана. М: Мир; 1986; 336 с.

17. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М: Практика, 1998; 459 с.

18. Santhoshkumar P., Murugesan R., Sharma K.K. α A-Crystallin peptide 66SDRDKFVIFLDVKHF80 accumulating in aging lens impairs the function of α -crystallin and induces lens protein aggregation. *PLoS ONE* 2011; 6(4): e19291. doi:10.1371/journal.pone.0019291.

19. Nemet I., Monnier V.M. Vitamin C degradation products and pathways in the human lens. *J Biol Chem* 2011; 286(43): 37128–37136.

20. Fan X., Zhang J., Theves M., Strauch C., Nemet I., Liu X., Qian J., Giblin F.J., Monnier V.M. Mechanism of lysine oxidation in human lens crystallins during aging and in diabetes. *J Biol Chem* 2009; 284: 34618–34627.

21. Sell D.R., Monnier V.M. Ornithine is a novel amino acid and a marker of arginine damage by oxoaldehydes in senescent proteins. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1043: 118–128.

22. Raguz M., Widomska J., Dillon J., Gaillard E.R., Subczynski W.K. Characterization of lipid domains in reconstituted porcine lens membranes using EPR spin-labeling approaches. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778: 1079–1090.

23. Oborina E.M., Yappert M.C. Effect of sphingomyelin versus dipalmitoyl-phosphatidylcholine on the extent of lipid oxidation. *Chem Phys Lipids* 2003; 123: 223–232.

24. Morales A., Lee H., Goni F., et al. Sphingolipids and cell death. *Apoptosis* 2007; 12: 923–939.

25. Tong J., Briggs M.M., Mlaver D., Vidal A., McIntosh T.J. Sorting of lens aquaporins and connexins into raft and nonraft bilayers: role of protein homo-oligomerization. *Biophys J* 2009; 97: 2493–2502.

26. Liu J., Xu J., Gu S., Nicholson B.J., Jiang J.X. Aquaporin 0 enhances gap junction coupling via its cell adhesion function and interaction with connexin 50. *J Cell Sci* 2011; 124: 198–206.

27. Mathias R.T., White T.W., Gong X. Lens gap junctions in growth, differentiation and homeostasis. *Physiol Rev* 2010; V90: 179–206.

28. Biju P.G., Rooban B.N., Lija Y., Gayathri D.V., Sahasranamam V., Abraham A. Drevogenin D prevents selenite-induced oxidative stress and calpain activation in cultured rat lens. *Mol Vis* 2007; 13: 1121–1129.

29. Yappert M.C., Borchman D. Sphingolipids in human lens membranes: an update on their composition and possible biological implications. *Chem Phys Lipids* 2004; 129: 1–20.

30. Grami V., Marrero Y., Huang L., Tang D., Yappert M.C., Borchman D. α -Crystallin binding in vitro to clear human lenses. *Exp Eye Res* 2005; 81: 138–146.

References

1. Bassnett S. Fiber cell denucleation in the primate lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 1678–1687.

2. Sakthivel M., Elanchezian R., Thomas P.A., Geraldine P. Alterations in lenticular proteins during ageing and selenite-induced cataractogenesis in Wistar rats. *Mol Vis* 2010; 16: 445–453.

3. Hanson S.R., Hasan A., Smith D.L., Smith J.B. The major in vivo modifications of the human water-insoluble lens crystallins are disulfide bonds, deamidation, methionine oxidation and backbone cleavage. *Exp Eye Res* 2000; 71: 195–207.

4. Kopylova L.V., Cherepanov I.V., Snytnikova O.A., Rumyantseva Y.V., Kolosova N.G., Tsentlovich Y.P., Sagdeev R.Z. Age-related changes in the water-soluble lens protein composition of Wistar and accelerated-senescence OXYS rats. *Mol Vis* 2011; 17: 1457–1467.

5. Friedrich M.G., Truscott R.J.W. Membrane association of proteins in the aging human lens: profound changes takes place in the fifth decade of life. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 4786–4793.

6. Yappert M.C., Rujoi M., Borchman D., Vorobyov I., Estrada R. Glycero-versus sphingo-phospholipids: correlations with human and non-human mammalian lens growth. *Exp Eye Res* 2003; 76: 725–734.

7. Borchman D., Yappert M.C. Lipids and the ocular lens. *J Lip Res* 2010; 51: 2473–2488.

8. Truscott R.J.W. Age-related nuclear cataract-oxidation is the key. *Exp Eye Res* 2005; 80: 709–725.

9. Raju I., Kumarasamy A., Abraham C.E. Multiple aggregates and aggresomes of C-terminal truncated human α A-crystallins in mammalian cells and protection by β B-crystallin. *PLoS ONE* 2011; 6(5): e19876. doi:10.1371/journal.pone.0019876.

10. Luthra M., Balasubramanian D. Nonenzymatic glycation alters protein structure and stability. A study of two eye lens crystallins. *J Biol Chem* 1993; 268: 18119–18227.

11. Riddles P.W., Blakeley R.L., Zerner B. Reassessment of Ellman's reagent. *Methods Enzymol* 1983; 91: 49–60.

12. Dubinina E.E., Burmistrov S.O., Hodov D.A., Porotov I.G. *Voprosy meditsinskoj khimii — Medical Chemistry Issues* 1995; 1(41): 24–26.

13. Muthenna P., Akileshwari C., Saraswat M., Reddy G.B. Inhibition of advanced glycation end-product formation on eye lens protein by rutin. *Br J Nutr* 2011. doi:10.1017/S0007114511004077.

14. Folch P.J., Lees M., Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 1957; 226: 497–509.

15. Sharshunova M., Shvarc V., Mihalec Ch. *Tonkosloynaya khromatografiya v farmatsii i klinicheskoy biokhimi.* Ch. 2 [Thin layer chromatography in pharmacy and clinical biochemistry. Part 2]. Moscow: Mir; 1980; p. 536–540.

16. *Khromatografiya. Prakticheskoe prilozhenie metoda* Ch. 1. [Chromatography. Practical application of the technique. Part 1]. Pod red. Kheftmana E. [Kheftman E. (editor)]. Moscow: Mir; 1986; 336 p.

17. Glants C. *Mediko-biologicheskaya statistika* [Biomedical statistics]. Moscow: Praktika, 1998; 459 p.

18. Santhoshkumar P., Murugesan R., Sharma K.K. α A-Crystallin peptide 66SDRDKFVIFLDVKHF80 accumulating in aging lens impairs the function of α -crystallin and induces lens protein aggregation. *PLoS ONE* 2011; 6(4): e19291. doi:10.1371/journal.pone.0019291.

19. Nemet I., Monnier V.M. Vitamin C degradation products and pathways in the human lens. *J Biol Chem* 2011; 286(43): 37128–37136.

20. Fan X., Zhang J., Theves M., Strauch C., Nemet I., Liu X., Qian J., Giblin F.J., Monnier V.M. Mechanism of lysine oxidation in human lens crystallins during aging and in diabetes. *J Biol Chem* 2009; 284: 34618–34627.

21. Sell D.R., Monnier V.M. Ornithine is a novel amino acid and a marker of arginine damage by oxoaldehydes in senescent proteins. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1043: 118–128.

22. Raguz M., Widomska J., Dillon J., Gaillard E.R., Subczynski W.K. Characterization of lipid domains in reconstituted porcine lens membranes using EPR spin-labeling approaches. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778: 1079–1090.
23. Oborina E.M., Yappert M.C. Effect of sphingomyelin versus dipalmitoyl-phosphatidylcholine on the extent of lipid oxidation. *Chem Phys Lipids* 2003; 123: 223–232.
24. Morales A., Lee H., Goni F., et al. Sphingolipids and cell death. *Apoptosis* 2007; 12: 923–939.
25. Tong J., Briggs M.M., Mlaver D., Vidal A., McIntosh T.J. Sorting of lens aquaporins and connexins into raft and nonraft bilayers: role of protein homo-oligomerization. *Biophys J* 2009; 97: 2493–2502.
26. Liu J., Xu J., Gu S., Nicholson B.J., Jiang J.X. Aquaporin 0 enhances gap junction coupling via its cell adhesion function and interaction with connexin 50. *J Cell Sci* 2011; 124: 198–206.
27. Mathias R.T., White T.W., Gong X. Lens gap junctions in growth, differentiation and homeostasis. *Physiol Rev* 2010; V90: 179–206.
28. Biju P.G., Rooban B.N., Lija Y., Gayathri D.V., Sahasranamam V., Abraham A. Drevogenin D prevents selenite-induced oxidative stress and calpain activation in cultured rat lens. *Mol Vis* 2007; 13: 1121–1129.
29. Yappert M.C., Borchman D. Sphingolipids in human lens membranes: an update on their composition and possible biological implications. *Chem Phys Lipids* 2004; 129: 1–20.
30. Grami V., Marrero Y., Huang L., Tang D., Yappert M.C., Borchman D. α -Crystallin binding in vitro to clear human lenses. *Exp Eye Res* 2005; 81: 138–146.