

КВАНТОВЫЙ ВЫХОД ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОГО ОБРАЗОВАНИЯ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА ВИТАМИНАМИ ГРУППЫ В₆ И ИХ АДДУКТАМИ С АМИНОКИСЛОТАМИ И БЕЛКАМИ **

Б. М. Джагаров^{а*}, Н. Н. Крук^а, УДК 535.37+541.141+577.164.13
Н. В. Коновалова^б, А. А. Солодунов^б, И. И. Степуро^б

^а Институт молекулярной и атомной физики АН Беларуси,
220072, Минск, просп. Ф. Скорины, 70

^б Институт биохимии АН Беларуси, Гродно

(Поступила 10 декабря 1993)

The measurements of the singlet oxygen photosensitized formation quantum yield by vitamins B₆ and their aminoacid and protein derivatives were performed. For vitamins B₆ proper the value of quantum yield γ is ~ 0.5 , for stable adducts with aminoacid γ it decreases by a factor of 2-3, the greatest decrease of γ is revealed in aldimines (Schiff bases) of pyridoxal-P.

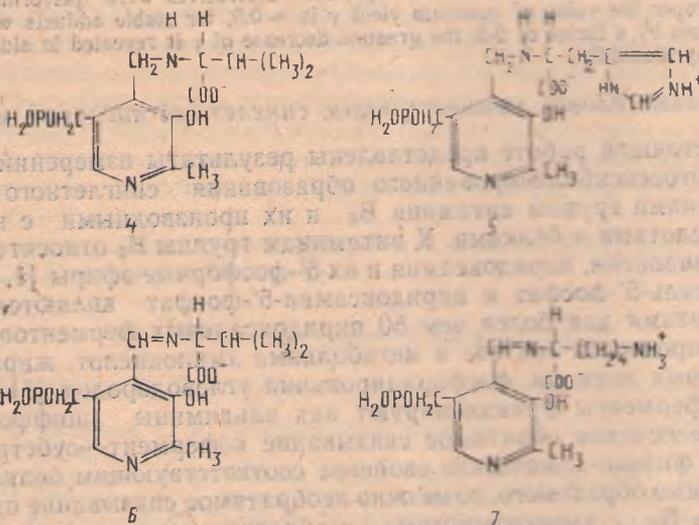
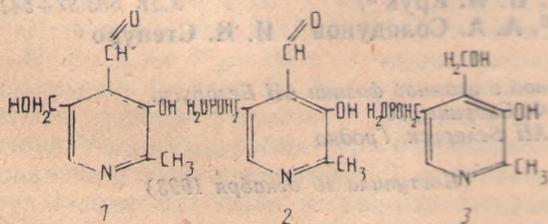
Ключевые слова: люминесценция, синглетный кислород, витамин В₆.

В настоящей работе представлены результаты измерений эффективности фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода соединениями группы витамина В₆ и их производными с некоторыми аминокислотами и белками. К витаминам группы В₆ относятся пиридоксаль, пиридоксин, пиридоксамин и их 5'-фосфорные эфиры [1, 2]. Именно пиридоксаль-5'-фосфат и пиридоксамин-5'-фосфат являются рабочими коферментами для более чем 50 пиридоксалевого ферментов, участвующих в процессах синтеза и метаболизма аминокислот, жирных кислот и некоторых липидов, фосфорилирования углеводов [1]. Как правило, коферменты функционируют как альдимины (шиффовы основания), обеспечивая обратимое связывание кофермент—субстрат и необходимые физико-химические свойства соответствующим белкам-ферментам. Помимо обратимого, возможно необратимое связывание производных витамина В₆ с аминокислотами с образованием стабильных аддуктов. Так, в крови человека обнаружена фракция гемоглобина, содержащая необратимо связанный пиридоксаль-5'-фосфат (далее в тексте пиридоксаль-Р) и имеющая отличные от нормального гемоглобина параметры оксигенации [3]. Обнаружено также заметное влияние свободного пиридоксаль-Р на параметры оксигенации гемоглобина [4]. Молекулы пиридоксаль-Р, как и другие небольшие молекулы-коферменты, могут служить в качестве удобных спектроскопических меток, позволяющих контролировать поведение белка [5]. Например, молекулы производных витамина В₆ могут использоваться для определения микроколичеств пиридоксалевого ферментов [6], вращательной подвижности поверхностей мембран и белков [7].

Поэтому использование производных витамина В₆ в качестве люминесцентных меток требует знания их поведения в присутствии молекулярного кислорода и, в частности, возможности сенсибилизированной

** Материалы статьи доложены на Международной конференции «Современные проблемы лазерной физики и спектроскопии», 5—7 июля 1993, г. Гродно.

генерации синглетного кислорода $O_2(^1\Delta_g)$. Это представляется особенно интересным, так как в [8] показано, что производные витамина B_6 при фотовозбуждении способны генерировать гидратированный электрон e_{aq}^- , поэтому при условии одновременной генерации e_{aq}^- и $O_2(^1\Delta_g)$ возможно протекание различных окислительно-восстановительных реакций. В связи с тем что в литературе отсутствуют данные о фотогенерации $O_2(^1\Delta_g)$ соединениями группы витамина B_6 , нами были выполнены исследования в данном направлении для ряда производных витамина, включающего собственно витамин B_6 — пиридоксаль, его кофермент-



Структурные формулы исследованных соединений. Нумерация соединений та же, что и в таблице

ную форму — пиридоксаль-Р, ближайший аналог — пиридоксин-Р, стабильные аддукты — пиридоксаль-Р с аминокислотами (лизином, валином, гистидином) и транспортными белками (гемоглобином и сывороточным альбумином человека), а также шиффовы основания с некоторыми из вышеназванных аминокислот (рисунок).

Квантовый выход фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода γ измерялся на специально созданном для регистрации синглетного молекулярного кислорода лазерном флуорометре [9, 10]. Фотовозбуждение образцов производилось излучением второй гармоники ($\lambda = 347$ нм) рубинового лазера, работающего в режиме модулированной добротности и имеющего длительность импульса 30 нс. Кинетика затухания люминесценции регистрировалась с помощью ФЭУ-112 и цифрового осциллографа С9-27. Подробное описание методики измерения дано в [9, 10].

Измерение квантового выхода γ проводилось относительным методом. В качестве квантового выхода фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода γ исследуемым соединением принимается отношение числа молекул O_2 в $^1\Delta_g$ -состоянии, образовавшихся при тушении триплетного состояния молекул сенсибилизатора, к числу поглощенных квантов возбуждающего света молекулами сенсибилизатора в основном состоянии [10, 11].

Величина γ определялась по формуле:

$$\gamma = (I/I_0) \gamma_0 (\beta_0/\beta),$$

где I и I_0 — амплитуды люминесценции $O_2(^1\Delta_g)$ в максимумах кривых затухания для исследуемого и эталонного соединений; γ_0 — квантовый выход фотосенсибилизированного образования $O_2(^1\Delta_g)$ эталонным соединением; β_0 и β — доли поглощенного возбуждающего света эталонным и исследуемым соединениями.

Условия возбуждения образцов сохранялись строго идентичными для исследуемого и эталонного соединений. Оптические плотности образцов на длине волны возбуждения находились в интервале 0,5—1,0, что соответствует концентрациям $\approx 1 \cdot 10^{-4}$ — $1 \cdot 10^{-3}$ М. В качестве эталонного соединения использовался водно-растворимый мезо-тетра-(*n*-сульфофенил)порфин, для которого $\gamma_0 = 0,70 \pm 0,05$ [12]. Все измерения проведены в D_2O при $T = 293 \pm 2$ К. Длительности люминесценции $O_2(^1\Delta_g)$ составляли 50 ± 5 мкс. Синтез исследованных соединений проведен согласно методикам, описанным в [13, 14]. Гемоглобин получали из донорской крови с небольшим сроком консервации (не более 4 сут) по методу [15]. Результаты измерений приведены в таблице.

Перейдем к непосредственному анализу результатов. Максимальные значения γ обнаружены для фосфорных эфиров пиридоксала и пиридоксина, практически совпадающие в пределах погрешности измерений. Этот факт свидетельствует о том, что замена формильной группы на оксиметильную в 4'-положении пиридинового кольца не сказывается на фотосенсибилизирующих свойствах витамина. Значение $\gamma = 0,44$, полученное для пиридоксала, с учетом погрешности измерений близко к значению γ для его фосфорного эфира, хотя возможно ожидать реального уменьшения генерационной способности витамина B_6 при отсутствии в 5'-положении фосфатной группы. Включение в круг исследуемых соединений пири-

Квантовые выходы фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода витаминами группы B_6 и их аддуктами с аминокислотами и белками

Номер соединения	Сенсибилизатор	γ
1	Пиридоксаль	$0,44 \pm 0,06$
2	Пиридоксаль-Р	$0,56 \pm 0,07$
3	Пиридоксин-Р	$0,54 \pm 0,07$
4	Пиридоксил-Р-валин	$0,31 \pm 0,05$
5	Пиридоксил-Р-гистидин	$0,17 \pm 0,04$
6	Пиридоксил-Р-валин (шиффово основание)	$0,13 \pm 0,03$
7	Пиридоксил-Р-лизин (шиффово основание)	$0,17 \pm 0,04$
8	Пиридоксил-Р-апогемоглобин	$0,25 \pm 0,05$
9	Пиридоксил-Р-сывороточный альбумин	$0,22 \pm 0,05$

доксина и пиридоксамина сможет в дальнейшем дать окончательный ответ на этот вопрос.

К существенному уменьшению величины γ приводит переход от пиридоксаль-Р к его производным, образованным ковалентным присоединением аминокислот. Это присоединение осуществляется через связывание с формильной группой в 4'-положении пиридинового (см. рисунок) кольца. При этом возможно образование как обратимо связанных шиффовых оснований (альдиминов) пиридоксаль-Р с аминокислотами, так и стабильных аддуктов, вызванное добавлением в раствор NaBH_4 , приводящего к восстановлению альдиминной связи. Поэтому мы включили в круг объектов исследования ряд, включающий свободный пиридоксаль-Р, его стабильный аддукт с аминокислотой и шиффово основание с той же аминокислотой.

Анализ полученных результатов в рядах 1) пиридоксаль-Р \rightarrow пиридоксил-Р-валин \rightarrow пиридоксил-Р-валин (шиффово основание) и 2) пиридоксаль-Р \rightarrow пиридоксил-Р-сывороточный альбумин \rightarrow пиридоксил-Р-лизин (шиффово основание) показывает, что присоединение к аминокислотам приводит к существенному падению генерационной способности. Квантовый выход γ в этих рядах изменяется следующим образом: 1) 0,56 \rightarrow \rightarrow 0,31 \rightarrow 0,13; 2) 0,56 \rightarrow 0,22 \rightarrow 0,17, причем наибольшее падение наблюдается для шиффовых оснований, а промежуточные значения характерны для стабильных аддуктов. Стабильный аддукт пиридоксаль-Р с сывороточным альбумином рассматривается в данном ряду, так как в этом соединении пиридоксаль-Р связан с белком через лизин-199. Поэтому, исходя из данных, проанализированных выше, можно сделать вывод, что квантовый выход фотосенсибилизированного образования $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ уменьшается в ряду соединений: свободный пиридоксаль-Р \rightarrow пиридоксил-Р-аминокислота \rightarrow пиридоксил-Р-аминокислота (шиффово основание).

Величины γ , полученные для пиридоксил-Р-гистидина и пиридоксил-Р-апогеоглобина, также хорошо укладываются в предлагаемую нами схему. Последний к тому же можно рассматривать в проанализированном выше ряду с аминокислотой валином, так как связывание здесь происходит через $\alpha\text{-NH}_2$ -группу валина-1, однако необходимо отметить, что в связывании могут принимать участие не только валины-1 β - и α -цепей, но и лизин-82 β -цепи [16].

По нашему мнению, различие в значениях γ должно быть в первую очередь обусловлено различием в квантовых выходах образования молекул сенсибилизатора в триплетном состоянии. Однако такие данные в литературе отсутствуют (см., например, [17]), хотя в то же самое время имеются обширные данные о люминесцентных характеристиках. Попытка разобраться в причинах весьма разнообразного люминесцентного поведения витаминов B_6 предпринята в [18]. В [17] показано, что квантовые выходы флуоресценции γ_f шиффовых оснований пиридоксаль-Р на порядок выше, чем свободного пиридоксаль-Р. В [4] отмечается, что оксимы пиридоксаль-Р, которые рассматриваются как модель шиффовых оснований пиридоксала с аминокислотами, обладают γ_f на два порядка выше, чем исходные соединения. Поэтому в случае отсутствия у этих соединений внутренней конверсии следует ожидать более низких значений квантовых выходов интеркомбинационной конверсии γ_t и, следовательно, более низких значений γ . Учитывая указанное в литературе отсутствие данных о заселении триплетного состояния [например, 17], полученные нами значения γ дают как минимум нижнюю границу величины квантового выхода интеркомбинационной конверсии для всех исследованных соединений.

Представленные нами результаты подтверждают предположение

[17] о том, что, по крайней мере, образование некоторых фотопродуктов витаминов В₆ связано с участием молекулярного кислорода. Так, обнаружено, что квантовый выход фотосенсибилизированного образования О₂ (¹Δ_g) при переходе от свободного пиридоксаль-Р к основанию Шиффа снижается симбатно с уменьшением скорости образования 5-фосфорно-4-пиридоксовой кислоты [19], в виде которой из организма выводится около 90% витамина В₆.

Работа выполнена по проекту Б5-338, финансируемому Фондом фундаментальных исследований Республики Беларусь.

Список цитируемой литературы

1. Ю. А. Овчинников. Биоорганическая химия, Москва (1987) 815
2. А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит, Р. Хилл, И. Леман. Основы биохимии, пер. с англ. под ред. Ю. А. Овчинникова, Москва, 3 (1981) 1878
3. И. И. Степуро, Н. В. Коновалова, А. А. Солодунов, А. С. Тыщенко. Молекулярная биология, 27 (1993) 790—797
4. A. Chanutin, R. R. Curnish. Arch. Biochem. Biophys., 121 (1967) 96
5. Ч. Кантор, П. Шиммель. Биофизическая химия, пер. с англ., Москва, 1 (1984) 336
6. В. А. Боковой, Н. П. Бажулина, Ю. В. Морозов, В. О. Чехов. Биофизика, 34 (1989) 741—752
7. F. T. Greenaway, J. W. Letbetter. Biophys. Chem., 28 (1987) 265—271
8. F. T. Greenaway, R. W. Redmont, J. W. Letbetter. Photochem. Photobiol., 54 (1991) 667—672
9. К. И. Салохиддинов, И. М. Бытева, Б. М. Джагаров. Опт. и спектр., 47, (1979) 881—886
10. Б. М. Джагаров, Г. П. Гуринович, В. Е. Новиченков и др. Хим. физика, 6 (1987) 1069—1078
11. M. A. J. Rodjers. Singlet Oxygen Quantum Yields, in «Light-Activated Pesticides»/ ACS Symp. Series, Washington (1987) 76—97
12. А. А. Красновский, мл., С. Ю. Егоров, О. В. Назарова и др. Биофизика, 32 (1987) 982—993
13. И. И. Степуро, А. А. Солодунов, Л. И. Нефедов. Молек. биология, 16 (1982) 1284—1293
14. А. Р. Мороз, В. И. Кондаков, И. И. Степуро, М. А. Ярошевич. Биохимия, 4 (1986) 561
15. R. E. Benesh, R. Benesh, R. D. Rental, N. Maeda. Biochem., 11 (1972) 3576—3582
16. M. J. Mc. Garrity, S. S. Er, J. C. Hsia. J. of Chromatography, 419 (1987) 37—50
17. Ю. В. Морозов, Н. П. Бажулина. Электронное строение. спектроскопия и реакционная способность молекул, Москва (1989) 288
18. Yu. V. Morozov, L. P. Clurkashina. Mol. Photochem., 8 (1977) 45—88
19. И. И. Степуро, А. А. Солодунов, Б. М. Джагаров, Н. Н. Крук. Тез. докл. Междунар. конф. «Современные проблемы лазерной физики и спектроскопии», июль 1993, Гродно