

СВЕТОИНДУЦИРОВАННАЯ ДЕЗАКТИВАЦИЯ ФОСФОРЕСЦЕНЦИИ ТРИПТОФАНА, РОЛЬ КАРБОНИЛЬНОЙ ГРУППЫ В МЕХАНИЗМЕ ЭТОГО ЯВЛЕНИЯ.

Показано, что эффект световой дезактивации фосфоресценции триптофана и его аналогов связан с наличием в молекуле карбонильной группы. Эффект отсутствует для индола, но появляется у производных индола, имеющих в своем составе фрагменты с $C=O$, либо при добавлении в раствор индола молекул, не являющихся хромофорами, но содержащими группу $C=O$. Предполагается, что за эффект ответственны нефосфоресцентные оксиплексы индольного кольца с карбонильной группой.

Ключевые слова: *фотофизика триптофана, триплетное возбужденное состояние, T-T переходы, световая дезактивация триплетного состояния.*

Введение

В наших работах [1-2] эффект обратимого фототушения фосфоресценции при действии света в области полосы триплет-триплетного (T-T) поглощения был обнаружен и исследован для триптофана в водно-этиленгликолевом стекле при 77К. Было показано, что спектр действия эффекта в области 350-500 нм совпадает со спектром (T-T) поглощения. В настоящей работе эффект тушения фосфоресценции исследован для растворов индола и его производных при 77К в различных растворителях.

Материалы и методы

В работе использованы L-триптофан, дипептид Gly-D,L-Trp фирмы "Reanal", индол, индолил-3-карбоновая кислота, индолил-3-пропионовая и индолил-3-масляная кислоты фирмы "Реахим". В качестве растворителей использовались хроматографически чистый этанол, особо чистый этиленгликоль и дважды дистиллированная вода. В качестве соединений, содержащих карбонильную группу, использованы хроматографически чистый ацетон и особо чистая уксусная кислота. Для изменения pH растворов применяли химически чистые HCl и NaOH. Дополнительной очистки препаратов не про-

изводили. Измерения проводили на фосфороскопической установке, управляемой ЭВМ и описанной в работе [1], в одинаковых для всех образцов условиях. Растворы помещали в кварцевую трубку с внутренним диаметром 2 мм и замораживали. В случае измерения эффекта для индола в этаноле с введением в раствор уксусной кислоты или ацетона измерения проводились в тонком слое на кварцевой подложке. Во всех случаях оптическая плотность образца не превосходила 0,2.

Образец, помещенный в кварцевый криостат с жидким азотом, облучали светом с $\lambda = 280$ нм, переводящим молекулу в синглетное возбужденное состояние с последующей интеркомбинационной конверсией в нижнее триплетное состояние (T_1), из которого молекула может перейти в исходное основное состояние с излучением фосфоресценции. Одновременно через вращающийся диск с вырезанным сектором образец облучали светом с $\lambda > 370$ нм, соответствующим спектру триплет-триплетного ($T_1 \rightarrow T_2$)-поглощения. Фосфоресценцию регистрировали в промежутки времени, когда свет с $\lambda > 370$ нм не попадал на образец.

Результаты и обсуждение

В работе [1] нами было обнаружено уменьшение стационарной заселенности фосфоресцентного T_1 - состояния триптофана в застеклованном водно-этиленгликолевом растворе (77К) при действии света в области триплет-триплетного ($T_1 \rightarrow T_2$)-поглощения. Эффект характеризовали степенью тушения фосфоресценции $\delta = (I - I^*)/I$, где I - стационарная интенсивность фосфоресценции при действии света с $\lambda = 280$ нм, а I^* - стационарная интенсивность фосфоресценции того же образца при одновременном облучении светом с $\lambda = 280$ нм и $\lambda > 370$ нм. В предварительных экспериментах было обнаружено, что эффект световой дезактивации фосфоресцентного состояния не обнаруживается для простейшего аналога триптофана - индола. Поскольку индольное кольцо триптофана собственно и является хромоформным фрагментом триптофана, ответственным за фосфоресценцию, необходимо было выяснить причины, по которым индольное кольцо в одних случаях участвует в процессах световой дезактивации фосфоресценции, а в других - не может участвовать в таких процессах.

С этой целью мы измеряли значение δ для ряда производных индола в разных матрицах. При этом мы учитывали, что в молекуле триптофана имеются боковая группа в C_3 - положении индольного кольца. В этой боковой группе имеется два фрагмента, способных влиять на фотофизические процессы индольного хромофора. Это группа $-NH_2$ и группа $-COOH$.

Обе эти группы являются ионизируемыми, способными изменяться в растворах с разными значениями pH . Группа $-NH_2$ в щелочном диапазоне pH испытывает обратимую диссоциацию. Равновесное состояние такой диссоциации наблюдается для pK ионизации 9,4: $(-NH_2 + H^+ \rightleftharpoons -NH_3^+)$.

Карбоксильная группа $-COOH$ диссоциирует в кислотном диапазоне pH . Равновесное состояние такой диссоциации наблюдается для pK ионизации 2,8: $(-COOH \rightleftharpoons -COO^- + H^+)$.

Можно было ожидать изменения эффекта в областях pH раствора, соответствующих pK ионизации указанных групп. Оказалось, что в диапазоне значений pH от 1 до 10,4 эффект светового тушения фосфоресценции остается неизменным. Таким образом, наши результаты позволяют заключить, что ионизируемые группы молекулы практически не влияют на эффект светового тушения фосфоресценции триптофана и указывают на существенную роль в этом эффекте фрагмента $C = O$ карбоксильной группы. Этот вывод подтверждается и результатами наших измерений фосфоресценции производных индола с заместителями в C_3 положении индольного кольца: индолил-3-карбоновая кислота ($-COOH$), индолил-3-пропионовая кислота ($-CH_2-CH_2-COOH$) и индолил-3-масляная кислота ($-CH_2-CH_2-CH_2-COOH$).

Из Таблицы видно, что для индолил-3-пропионовой и индолил-3-масляной кислот эффект светового тушения фосфоресценции наблюдался, причем его эффективность была близка к эффективности эффекта для триптофана.

Мы обнаружили, кроме того, интересный экспериментальный факт – отсутствие заметного эффекта для индолил-3-карбоновой кислоты. В этом соединении, как и в других исследованных производных индола имеется карбоксильная группа с соответствующим карбонильным фрагментом $C = O$. Важное отличие этого производного индола – минимальное расстояние между карбонильным фрагментом и индольным кольцом. При таком расстоянии, как оказалось, взаимодействие электронной π -системы индола с соответствующей системой карбонила отсутствует. На наш взгляд это однозначно свидетельствует о важной роли стерического фактора, т.е. важно не просто сближение фрагментов, но геометрическое расположение этих групп. Для индолил-3-карбоновой кислоты геометрические параметры группы $C = O$ и плоскости индольного кольца не позволяют взаимодействовать их π -системам. Увеличение длины цепочки $-CH_2-CH_2-$ в других исследованных соединениях приводит к возможности за счет вращения вокруг связей $C - C$ к стерически благоприятному для взаимодействия расположению.

Таблица. Параметр светового тушения фосфоресценции (δ) индола и его производных при 77К.

Образец	Растворитель	δ
Индол	Этанол	<0.01
Индолил-3-карбоновая кислота	Вода-этиленгликоль (1:1)	<0.01
Индолил-3-пропионовая кислота	Вода-этиленгликоль (1:1)	0.14
Индолил-3-масляная кислота	Вода-этиленгликоль (1:1)	0,18
Триптофан	Вода-этиленгликоль (1:1)	0,19
Глицил-Триптофан	Вода-этиленгликоль (1:1)	0.45
Триптофан + Гли $5 * 10^{-3}$	Вода	0,50
Триптофан + Гли $5 * 10^{-2}$	Вода	0,48
Триптофан + Ацетон $5 * 10^{-3}$	Вода	0,64

Интересный результат, хорошо согласующийся с нашей интерпретацией, получен для дипептида Глицил-Триптофан (таблица). Для этого дипептида эффект светового тушения был вдвое больше, чем для Триптофана. В этой молекуле имеется две карбонильные группы $C = O$, способных сблизиться с индольным кольцом. Одна из них, группа Глицина, вторая - группа пептидной связи, причем группа $C = O$ пептидной связи сблизена с индольным кольцом на расстояние, меньшее, чем для аналогичного фрагмента триптофанового аминокислотного остатка. Возможность такой ориентации пептидной связи подтверждается, например, данными Диллона [5].

В следующей серии измерений мы исследовали влияние на фосфоресценцию индола химических соединений типа ацетона и уксусной кислоты, а также глицина. Влияние акцепторов электрона на фосфоресценцию хромофоров различной природы была показана в работе [4]. Оказалось, что наши данные по измерению зависимости от концентрации ацетона или уксусной кислоты хорошо описываются законом Перрена. Радиус “черных сфер”, соответствующий квантовому выходу тушения, равному единице, полученный из наших данных, равен 4.6 Å, т.е. сравним с Ван-дер-Ваальсовским радиусом индола. Это показывает, что за эффект светового тушения фосфоресценции ответственно короткодействующее взаимодействие. Можно говорить о возникновении сильного взаимодействия индольного кольца, возбужденного в высокое триплетное состояние, с карбонильными группами локализованных рядом молекул акцептора электрона. По-видимому, для такого комплекса уместен термин “триплетный эксиплекс”. Уместность такого термина основана на важной роли триплетного состояния хромофора и на коротком времени жизни возбужденного комплекса *хромофор-акцептор электрона*.

В водном растворе триптофана при 77 К фосфоресценция не регистриру-

ется из-за образования агрегатов молекул триптофана. Добавление в раствор триптофана других веществ в концентрации на два-три порядка большей, чем концентрация триптофана, приводит к тому, что в возникающих крупных агрегатах молекулы триптофана оказываются "растворенными" в добавленном веществе. Нами были исследованы бинарные водные растворы ($pH 6$) триптофана с ацетоном и с глицином. В таких растворах триптофана при 77К наблюдается нормальная фосфоресценция. Эффективность светового тушения фосфоресценции в этих образцах в 2-3 раза выше, чем в растворе триптофана (таблица).

Это, видимо, связано с тем, что каждая молекула триптофана в бинарных растворах при 77К окружена молекулами, содержащими карбонильную группу. В растворе триптофана с ацетоном значение δ больше, чем в растворе с глицином. Это может быть связано с тем, что в сфере эффективного взаимодействия индольного кольца с карбонильной группой располагается больше молекул ацетона, чем молекул глицина.

Увеличение концентрации глицина на порядок не приводит к росту степени тушения (таблица). Это, по-видимому, связано с тем, что при формировании эвтектики, при концентрации глицина $5 \cdot 10^{-3}$ М сфера эффективного взаимодействия индольного ядра триптофана с С=О группами оказывается полностью занятой молекулами глицина. При увеличении концентрации глицина в исходном растворе, их число в сфере взаимодействия при 77 К не изменяется. В водно-этиленгликолевом растворе глицил-триптофана значение δ в 2,5 раза больше, чем в растворе триптофана при $pH 6$. Это связано с тем, что молекула Гли-Три содержит две карбонильные группы, причем расстояние от С=О группы пептидной связи до индольного ядра близко к такому расстоянию для карбонильной группы триптофана. Раствор Гли-Три был исследован при $pH 6$. В этом случае за счет электростатических взаимодействий возможно образование комплексов, что также приводит к возрастанию эффекта. Результаты нашей работы с дипептидом Глицил-Триптофан позволило нам предположить [6], а затем в ряде случаев и показать, что в молекулах белков эффект светового тушения фосфоресценции триптофаниловых остатков белка может проявляться с высокой эффективностью. Наблюдение деталей такого эффекта для разных молекул белка фактически означает еще один новый метод исследования фотофизики белков.

Выводы

Результаты, полученные в нашей работе, убедительно свидетельствуют о важной роли карбонильной группы в процессах дезактивации триплетного состояния исследованных молекул. Кроме того, результаты позволяют пред-

положить, что за обратимое световое тушение фосфоресценции триптофана и его аналогов ответственны нефосфоресцентные эксиплексы индольного кольца с карбонильной группой, сближенной с ним на расстояние порядка 4-5Å.

Литература

1. *Львов К.М.* Обратимое снижение интенсивности фосфоресценции триптофана при действии света в области триплетного поглощения при 77К / К.М. Львов, С.В. Кузнецов, А.П. Костиков // Биофизика. — 1993. — Т.38. — С. 568–573.
2. *Львов К.М.* Кинетическая модель обратимого снижения заселенности триплетного состояния триптофана при действии света / К.М. Львов, С.В. Кузнецов, А.П. Костиков // Биофизика. — 1993. — Т.38. — С. 574–579.
3. *Santus R.* Nature, identification and properties of intermediates produced by UV excitation of indole derivatives at low and room temperatures / R. Santus, M. Bazin, M. Aubailly // Reviews Chem. Intermediates. — 1980. — V. 3. — P. 231–283.
4. *Скворцов В.И.* Тушение фосфоресценции ароматических молекул через высоковозбужденные триплетные состояния в растворах при 77К акцепторами электронов / В.И. Скворцов, М.В. Алфимов // Доклады АН СССР. — 1982. — Т. 263. — С. 652–655.
5. *Dillon J.* The anaerobic photolysis of tryptophan containing peptides / J. Dillon // Photochem. Photobiol. — 1983. — V. 38. — P. 37–39.
6. *Kostikov A.P.* Light induced deactivation of tryptophan phosphorescence in proteins / A.P. Kostikov // Biophysical Journal. — 2003. — V. 84. — P. 500A.

Kostikov Alexander P.

Donbas State Pedagogical University, Sloviansk, Ukraine.

Light-induced deactivation of tryptophan phosphorescence, the role of the carbonyl group in the mechanism of this phenomenon.

It is shown that the effect of light deactivation of phosphorescence of tryptophan and its analogs is due to the presence of a carbonyl group in the molecule. The effect is absent for indole, but it appears for indole derivatives with $C = O$, or when molecules that are not chromophores but contain the group $C = O$ are added to the indole solution. It is assumed that non-phosphorescent exciplexes of the indole ring with a carbonyl group are responsible for the effect.

Keywords: *photophysics of tryptophan; triplet excited state; T-T transitions; light deactivation of the triplet state.*