

СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫЕ ФОТОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ТРИПТОФАНА С АЛИФАТИЧЕСКИМИ АМИНОКИСЛОТАМИ.

Исследованы фотохимические продукты, образующиеся в водном растворе триптофана с алифатическими аминокислотами при 77К. Показано, что вклад радикалов триптофана в спектры при больших концентрациях аминокислот отсутствует. Это объясняется сенсibilizированным характером фотореакций, при котором энергия возбуждения триптофана расходуется на диссоциацию молекул окружения без предварительной фотоионизации хромофора. Обсуждается механизм таких фотореакций.

Ключевые слова: *фотопизика, фотохимия, триптофан, аминокислоты, пептиды.*

Введение

В результате работ разных авторов [1] были сформулированы основные представления о механизме образования радикалов аминокислот при действии УФ-излучения. Основой для интерпретации данных по УФ индуцированному образованию радикалов в белках служат эксперименты с модельными системами. В качестве таких моделей, в частности, используются растворы аминокислот и пептидов, содержащие ароматическую аминокислоту, как правило, триптофан. Первичным фотохимическим актом считается фотоионизация триптофана с образованием его катион-радикала и эжектированного электрона. Все остальные продукты образуются в результате взаимодействия указанных первичных фотопродуктов с окружающими молекулами. Однако существуют данные, которые не согласуются с такими представлениями. В данной работе основное внимание было уделено именно таким результатам. В фотохимии известно представление о сенсibilizированных реакциях, в которых фотосенсibilizатор является посредником фотопревращений соседних молекул, при этом сам сенсibilizатор остается неповрежденным. По нашим предварительным результатам такие механизмы могут происходить и в растворах триптофана с другими аминокислотами. Целью данной работы

было выполнить соответствующие эксперименты с использованием методов ЭПР и оптической спектроскопии, найти условия для регистрации продуктов фотосенсибилизированных превращений исследуемых молекул и получить характеристики таких продуктов.

Материалы и методы

В работе использованы *L*-триптофан, глицин и *D,L*-аланин фирмы "Reanal". В качестве растворителей использовались дистиллированная вода и смесь вода-этиленгликоль. Для оптических измерений растворы наносили на кварцевую подложку (толщиной слоя 0,05-0,1 мм), замораживали до 77К и помещали кварцевый оптический криостат с жидким азотом. Для измерения спектров поглощения использовали модифицированный спектрометр "Specord UV-VIS", управляемый измерительно-вычислительным комплексом. Спектры флуоресценции измеряли с помощью флуороскопа, аналогичного описанному в [2]. Спектры Электронного Парамагнитного Резонанса (ЭПР) измеряли на 3-см радиоспектрометре отражательного типа. Образцы облучали фокусированным светом ртутной лампы высокого давления ДРШ-1000 через водный фильтр и систему светофильтров, выделяющих нужную спектральную область.

Результаты и обсуждение

На рисунке 1 представлены результаты, демонстрирующие характер изменения спектров поглощения образца в условиях, когда происходит фотоионизация триптофана, т.е. в растворах триптофана без примесей [3, 4]. На рисунке показаны разностные спектры (спектр после облучения *минус* спектр до облучения).

Кривая 1 на рисунке соответствует разности спектров поглощения образца после 60 с облучения светом 270-390 нм и спектра поглощения образца до облучения. Видно, что в результате облучения уменьшается полоса поглощения индольной группы триптофана в области 280 нм и появляются новые полосы поглощения в ближней УФ и видимой областях спектра. Широкая полоса поглощения с максимумом в области 550 нм соответствует поглощению гидратированного электрона [3, 4], а полосы в области 300 - 370 нм катион-радикалам триптофана [3]. Кривая 2 демонстрирует выцветание полосы поглощения гидратированных электронов после облучения образца светом видимого диапазона с $\lambda > 520$ нм. Представленные спектры хорошо согласуются с известными литературными данными о фотоионизации триптофана в щелочных растворах [3].

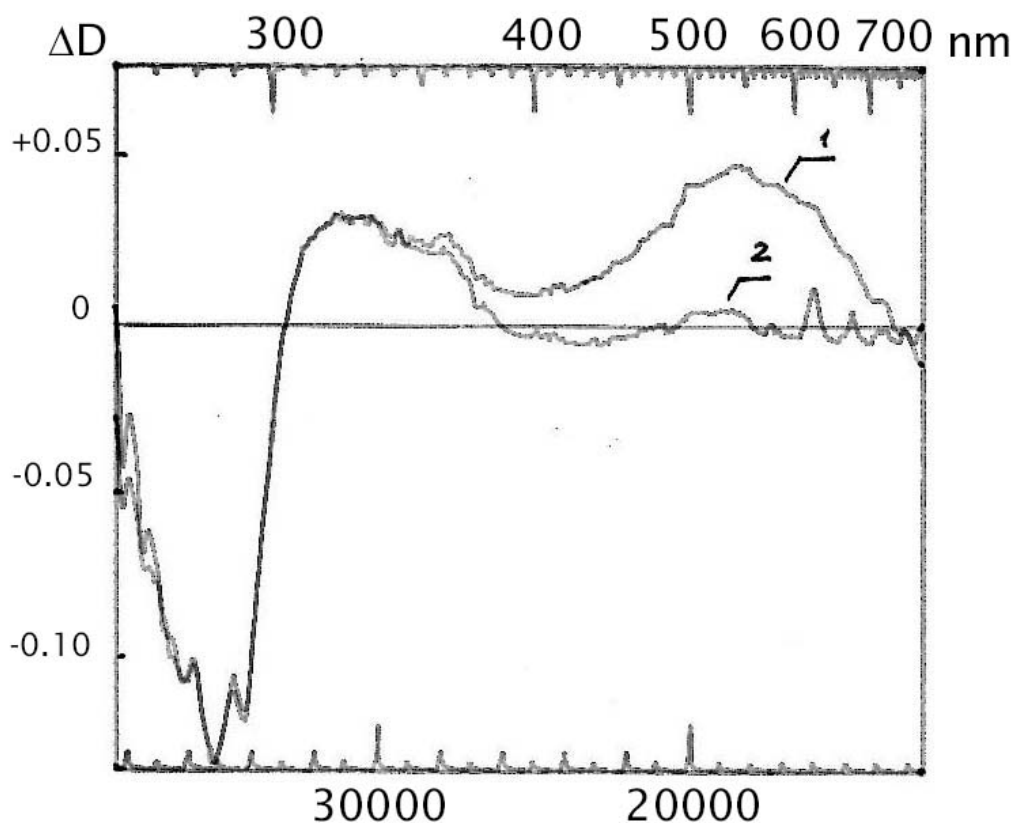


Рис. 1: Изменение спектра поглощения триптофана в стеклообразном растворе (вода-этиленгликоль) после 60 сек облучения УФ светом - кривая 1 и последующего облучения видимым светом - кривая 2. Внизу показаны волновые числа.

На рисунке 2 представлены результаты аналогичного эксперимента с водным щелочным раствором триптофана при 77К. Из-за низких оптических свойств замороженного водного раствора толщину слоя образца в этих экспериментах мы поддерживали не больше 0,1 мм. Результаты, полученные в таких условиях, позволяли уверенно регистрировать уменьшение поглощения триптофана (280 нм) и одновременное появление спектров радикалов триптофана (300 - 370 нм) и гидратированных электронов (широкая полоса с максимумом в области 550 нм).

На рисунке 3 демонстрируются наши результаты работы с образцами в водном растворе триптофана ($10^{-2}M$), содержащим алифатическую аминокислоту, глицин ($2M$). Сравнивая спектры на рис.2 и рис.3 можно видеть, что облучение такого образца УФ светом в диапазоне 270-390 нм привело к появлению в области 360 нм полосы поглощения на фоне широкого поглощения в дальней УФ области. Примечательно, что в области 280 нм не наблюдалось уменьшение поглощения триптофана. Это означает, что индоль-

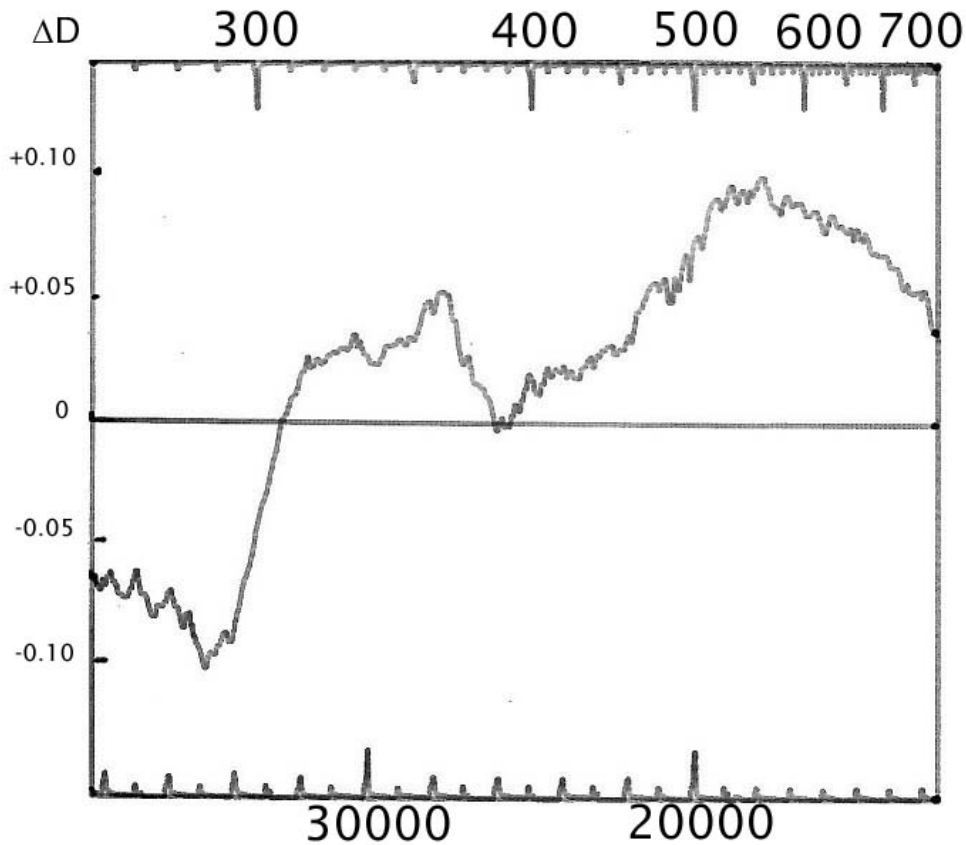


Рис. 2: Изменение спектра поглощения триптофана ($10^{-2}M$) в замороженном водном щелочном растворе после 20 сек облучения УФ светом. Внизу показаны волновые числа.

ная группа триптофана в процессе облучения УФ светом в данном образце не повреждалась. После размораживания образца до комнатной температуры и последующего повторного замораживания спектр поглощения образца полностью восстанавливался.

Увеличение полосы 360 нм по мере облучения полностью коррелировало с тушением флуоресценции триптофана и накоплением радикалов, регистрируемых методом ЭПР. После достаточно длительного облучения (до 20 мин) наблюдалось практически полное тушение флуоресценции и выход концентрации радикалов на предельный уровень. Отсутствие изменений спектра поглощения индольной группы триптофана при полном тушении его флуоресценции позволяет сделать вывод о том, что люминесценция тушится появившимися в окрестности неповрежденной молекулы триптофана радикалами с максимумом поглощения 360 нм. В самом деле, спектр флуоресценции триптофана в водных растворах с глицином имеет максимум излучения около 325 нм [5], хорошо перекрывающийся с обнаруженной нами полосой поглощения радикалов с $\lambda_{max} = 360$ нм. Такое перекрывание обеспечивает высокую

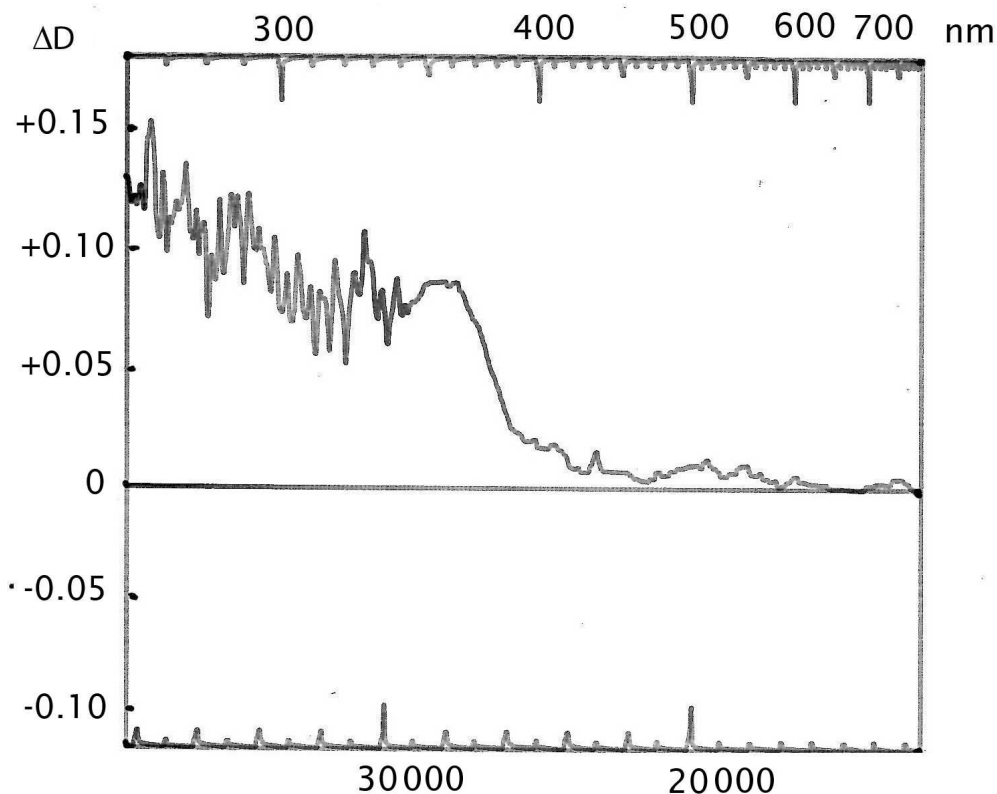
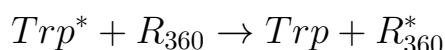


Рис. 3: Изменение спектра поглощения триптофана в замороженном водном растворе триптофана ($10^{-2}M$) с глицином ($2M$) после 100 сек облучения УФ светом. Внизу показаны волновые числа.

эффективность переноса энергии по индуктивно-резонансному механизму:



с последующей безызлучательной дезактивацией возбужденного состояния радикала R^{360} . Полагая, что:

- все молекулы триптофана в нашем образце окружены молекулами алифатической аминокислоты [5]
- радикалы R^{360} возникают в результате фотохимического акта в эквимольном с триптофаном количестве,
- каждый продукт R^{360} обеспечивает эффективную дезактивацию синглетного возбужденного состояния молекулы триптофана, в окрестности которой появился этот продукт.

можно оценить коэффициент экстинкции продукта R^{360} :

$$\varepsilon_{360}(R) = \frac{\Delta D_{360}}{D_{280}} \varepsilon_{280}(Trp) \simeq 2500 M^{-1} cm^{-1}.$$

Здесь D_{280} – оптическая плотность образца при 280 нм ($D_{280} = 0.27$), ΔD_{360} – изменение оптической плотности при 360 нм после длительного облучения, приведшего к полному тушению люминесценции триптофана, $\varepsilon_{280}(Trp) = 5600 M^{-1} cm^{-1}$ для триптофана. Сопоставляя наши результаты, полученные методом ЭПР, и полученные при измерении спектров поглощения, можно предположить, что за полосу поглощения 360 нм ответственны радикалы дезаминирования алифатической аминокислоты. Нужно отметить, что полоса с $\lambda_{max} = 360$ нм наблюдалась нами в предварительных экспериментах, при облучении водных замороженных до 77К растворов триптофана с пептидами Ала-Гли и Ала-Гли-Гли. Аналогичную полосу в диапазоне длин волн 310 – 380 нм с коэффициентом экстинкции $\varepsilon = 1000 - 2500 M^{-1} cm^{-1}$ наблюдали авторы [6], которые приписали ее радикалам $CR_1R_2-CO-NH-R$.

Интересно, что спектр, представленный на рис.3 можно было наблюдать только для нейтральных растворов. Если к исследуемому раствору добавляли щелочь ($pH \geq 9$), вместо спектра, показанного на рис.3 регистрировались спектральные изменения, представленные на рис.2. Это свидетельствует о том, что происходила только фотоионизация триптофана, при этом гидратированные электроны не реагировали с молекулами алифатической аминокислоты, несмотря на ее очень высокую концентрацию (до 2 М). В спектре ЭПР также наблюдалась только синглетная линия, в которую давали вклад катион-радикалы триптофана и гидратированные электроны. Радикалы дезаминирования или декарбоксилрования алифатической аминокислоты в этих условиях не наблюдались. Если в исследуемый раствор триптофана с алифатической аминокислотой добавлялась кислота или даже соль типа KCl, в спектре электронного поглощения и спектре ЭПР наблюдалась смешанная картина: можно было обнаружить изменение спектра поглощения триптофана и появление спектра ЭПР его катион-радикалов, а также обнаруживалась полоса 360 нм и спектр ЭПР соответствующего продукта.

Таким образом, представленные в этой работе данные позволяют сделать вывод о том, что в щелочной и кислой среде происходит фотоионизация триптофана, а в слабокислых и особенно в нейтральных растворах при 77К может проявляться другой механизм фотоиндуцированного образования радикалов. Детали этого механизма пока не ясны, однако его существенной особенностью является отсутствие каких-либо продуктов повреждения индольного кольца триптофана. Это следует из рис.3 и из отсутствия спектра ЭПР радикалов триптофана. Здесь нужно отметить, что можно говорить об отсутствии спектра ЭПР любых радикалов триптофана, поскольку не только катион-радикал $TrpH^+$ и индолилный радикал $Trp\cdot$, а также и радикалы дезаминирова-

ния или декарбоксилирования. боковой группы триптофана должны давать синглетный спектр ЭПР. Но вклада такого спектра нет в обсуждаемых условиях.

Косвенным подтверждением альтернативного фотоионизации механизма фотопроцессов в образцах, содержащих триптофан и алифатическую аминокислоту являются результаты наших работ [2, 7], в которых сообщалось об обнаруженном эффекте обратимого светового тушения фосфоресценции при подсветке триптофана в триплетном возбужденном состоянии вторым источником света в области $T_2 \leftarrow T_1$ поглощения. Как оказалось, существенную роль в этом эффекте играет карбонильная группа либо самой молекулы триптофана, либо посторонней молекулы с такой же группой, оказавшейся в окрестности триптофана [8]. В частности, в наших экспериментах по наблюдению обратимого светового тушения фосфоресценции в образцах триптофана с глицином, обнаружилось, что для них эффект светового тушения фосфоресценции существенно выше, чем в образцах, не содержащих алифатическую аминокислоту. Нужно заметить, что эффект светового тушения фосфоресценции наблюдается при возбуждении $T_2 \leftarrow T_1$ переходов. В этих условиях радикалы в образце не появляются. Их появление удастся наблюдать, если длина волны излучения второго источника < 313 нм, что соответствует либо переходу на более высокий триплетный уровень молекулы ($T_3 \leftarrow T_1$), либо возбуждению высоких колебательных подуровней состояния T_2 .

Заметим, что особая роль карбонильных групп в обратимом световом тушении фосфоресценции и в фотохимических реакциях представляет большой интерес для понимания генерации и гибели радикалов в белках.

Выводы

Полученные результаты убедительно свидетельствуют о нескольких механизмах фотохимических реакций триптофана с алифатическими аминокислотами. Кроме хорошо изученных реакций фотоионизации триптофана можно наблюдать сенсибилизированное триптофаном образование радикалов аминокислот. Показана важная роль карбонильных групп самого триптофана или соседних алифатических молекул в механизме фотопроцессов с участием триптофана. Обсуждается роль высоких возбужденных триплетных состояний индольного кольца в фотофизических и фотохимических реакциях.

Литература

1. Каюшин Л.П., Грибова З.П., Азизова О.А. Электронный парамагнитный резонанс фотопроцессов биологических соединений. — М.: Наука,

1973. — 304 с.
2. *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.
 3. *Hase H.* Electronic spectrum of photoinduced transients in solution of tryptophan at 77K / H. Hase, T. Higashimura, T. Sidei // J. Phys. Soc. Japan. — 1967. — V. 23. — P. 658.
 4. *Пицаев А.К.* Сольватированный электрон в радиационной химии. — М.: Наука, 1989. — 457 с.
 5. *Ильясова В.Б.* Исследование фотосенсибилизированного разрушения глицина методами электронного парамагнитного резонанса и люминесценции / В.Б.Ильясова, Е.П.Бусел, Э.А.Бурштейн, О.А.Азизова // Биофизика. — 1970. — Т. 15. — С. 265.
 6. *Dillon J.* The anaerobic photolysis of tryptophan containing peptides / J. Dillon // Photochem. Photobiol. — 1983. — V. 38. — P. 37–39.
 7. *Kostikov A.P.* Light induced deactivation of tryptophan phosphorescence in proteins / A.P. Kostikov // Biophysical Journal. — 2003. — V. 84. — P.500A.
 8. *Костиков А.П.* Светоиндуцированная дезактивация фосфоресценции триптофана, роль карбонильной группы в механизме этого явления / А.П. Костиков // Збірник наукових праць фізико-математичного факультету ДДПУ. — 2018. — Випуск 8. — С. 65–70.
-

Kostikov Alexander P.

Donbas State Pedagogical University, Sloviansk, Ukraine.

Sensitized photochemical reactions of tryptophane with aliphatic amino acids.

Photochemical products formed in an aqueous solution of tryptophan with aliphatic amino acids at 77K were studied. It is shown that the contribution of tryptophan radicals to the spectra at high concentrations of amino acids is absent. This is explained by the sensitized nature of photoreactions, in which the excitation energy of tryptophan is consumed by the dissociation of surrounding molecules without preliminary photoionization of the chromophore. The mechanism of such photoreactions is discussed.

Keywords: *photophysics; photochemistry; tryptophan; amino acids; peptides.*