

И. И. САПЕЖИНСКИЙ, Е. Г. ДОНЦОВА

**О ФОТОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ РАСТВОРОВ
ГЛИЦИЛ-ТРИПТОФАНА. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЦЕНТРА СВЕЧЕНИЯ**

(Представлено академиком Н. М. Эмануэлем 20 XI 1969)

В предыдущих работах по фотохемилюминесценции растворов глицилтриптофана (¹⁻³) нами было проведено систематическое кинетическое исследование механизма процессов, изучена связь скорости распада пептида с параметрами хемилюминесценции. Выход свечения в расчете на одну распавшуюся молекулу пептида оказался равным $(1 \div 8) \cdot 10^{-8}$ в зависимости от экспериментальных условий. Однако в столь сложной системе может протекать много различных фотохимических превращений. В литературе имеется ряд работ по фотопревращениям триптофана (⁴⁻⁷), из которых следует, что при небольших степенях превращения основными продуктами при фотоокислении являются формилкинуруенин, кинуруенин, антралиловая кислота (процессы с разрывом пиррольного кольца) индуксусная кислота, аланин, аммиак.

У этих продуктов подходящие уровни испускания имеются у ортозамещенных ароматических кетонов типа кинуруенина, в отсутствие кислорода кинуруенин не образуется и не наблюдается хемилюминесценции. Поэтому было высказано предположение, что при фотохемилюминесценции центром свечения (эмиттером) является формилкинуруенин — возможный продукт диспропорционирования перекисных свободных радикалов (⁸). Задачей настоящей работы и было доказательство этого предположения.

Нами изучалась связь между интенсивностью хемилюминесценции и накоплением кинуруенина, спектрами хемилюминесценции и люминесценции продуктов фотоокисления, кинетикой люминесценции и накоплением продуктов.

Измерение интенсивности хемилюминесценции проводилось на проточной фотометрической установке. Раствор пептида (10^{-3} М, 0,01 М фосфатный буфер рН 7,25°С) облучался определенное время светом ртутной лампы СВД-120А (интенсивность поглощенного света порядка 10^{15} кванта/мл·сек.) при энергичном перемешивании, а затем быстро перекачивался в измерительную кювету, расположенную напротив катода фотоумножителя ФЭУ-36. На высокоомном потенциометре ЭППВ-60 регистрировались кинетические кривые послесвечения, которые представляли собой экспоненты. Фотометрическая установка была отградуирована в абсолютных единицах (⁹). Из кривых послесвечения рассчитывались две величины — значение интенсивности I (экстраполяция кривой в полулогарифмических координатах ко времени конца облучения) и величины константы скорости первого порядка спада свечения. Концентрация кинуруенина определялась фотометрически на фотоколориметре ФЭК-56 при длине волны 365 мμ в максимуме поглощения (коэффициент поглощения $4,5 \cdot 10^3$ (¹⁰)), в этой области поглощение остальных продуктов незначительно. Концентрация антралиловой кислоты определялась по поглощению при 313 мμ. Спектры хемилюминесценции получены на проточной фотометрической установке с граничными светофильтрами по методике (¹¹) по результатам 10 опытов. Интенсивность, квантовый выход и спектры люминесценции измерялись на спектрофлуометре, изготовленном на основе моно-

хроматора ЗМР-3, квантовая спектральная чувствительность была определена по раствору хиинисульфата.

На основании кинетических данных (1, 2) следует, что основные процессы при фотохемиллюминесценции растворов ГТ таковы: под действием у.-ф. света на пептид в присутствии кислорода со скоростью ω образуются перекисные свободные радикалы пептида R^{\cdot} (I), которые либо гибнут под лучом (II), либо изомеризируются во вторичные r^{\cdot} (III).

Диспропорционирование вторичных радикалов приводит к образованию продукта P, небольшая часть молекул которого оказывается в электронно-возбужденном состоянии (IV) и (V). С уровней возбужденного продукта происходит испускание света хемиллюминесценции (VI) (k_0, k_1, k_2 — константы скоростей соответствующих процессов, $\eta_{\text{возб}}$ и η_P — выходы возбуждения и испускания). Показано, что пептид и продукты фотоокисления не являются активаторами или тушителями хемиллюминесценции (1).



Исходя из этой схемы, при условии квазистационарности радикалов r^{\cdot} при непрерывном облучении были получены следующие уравнения:

$$I = \eta k_0 [R^{\cdot}] \quad (1)$$

($\eta = \eta_{\text{возб}} \cdot \eta_P$ — общий выход хемиллюминесценции)

$$d[P]/dt = I/\eta; \quad (2)$$

$$\eta = \frac{1}{[P]_t} \int_0^t I dt; \quad (3)$$

$$[P]_t = \frac{k_0 \omega}{k_0 + k_1} \left[t - \frac{1}{k_0 + k_1} (1 - e^{-(k_0 + k_1)t}) \right]. \quad (4)$$

Из этих уравнений следует, что а) кинетика накопления продукта, являющегося центром свечения, должна иметь период индукции, определяемый временем достижения стационарности по концентрации $[R^{\cdot}]$; б) имеется количественное соотношение между концентрацией продукта P и интенсивностью хемиллюминесценции (2) и (3).

На рис. 1 приведены кинетические данные по сравнительному исследованию хемиллюминесценции (х.л.) и накоплению кинуренина. На рис. 1А представлена кинетика нарастания свечения; интенсивность х.л. сначала возрастает, достигает максимума, а затем монотонно убывает (снижение скорости инициирования за счет расходования пептида); значение константы скорости послесвечения изменяется мало, как и наблюдалось в (1). На рис. 1Б представлены данные по кинетике накопления кинуренина (темные точки), из графика видно, что накопление этого продукта происходит вначале с малой скоростью, а затем, спустя примерно минуту после начала облучения, начинается линейный рост концентрации кетона. Для количественного сравнения хемиллюминесценции и накопления кинуренина был рассчитан выход хемиллюминесценции по формуле (3) в зависимости от времени облучения (рис. 1В). В пределах возможного экспериментального разброса значение выхода не изменяется. Среднее значение оказалось равным $0,66 \cdot 10^{-6}$ квантов х.л./молек., на основании этого была рассчитана ки-

нетическая кривая накопления кинуренина (рис. 1Г, светлые точки), которая мало отличается от экспериментальной.

Кинетика накопления антрапиловой кислоты не имеет периода индукции, т. е. этот продукт не может претендовать на роль центра свечения.

Были проведены также опыты с добавлением в систему цистеина — эффективного акцептора перекисных радикалов этого пептида (12). Оказалось, что интенсивность свечения резко убывает, пропорционально падает и скорость накопления кинуренина, выход хемилюминесценции при небольших временах облучения $(0,5-0,7) \cdot 10^{-6}$ — мало отличается от выхода в опытах без добавки (при длительном облучении за счет влияния вторичных продуктов фотоокисления самого цистеина выход уменьшается).

На основании приведенных данных следует, что возбужденный продукт может быть молекулой кинуренина в электронновозбужденном состоянии.

Кроме сравнительного кинетического исследования, было проведено изучение спектральных характеристик хемилюминесценции и люминесценции продуктов фотоокисления пептида (рис. 2). Спектр хемилюминесценции (рис. 2, точки) представляет собой широкую полосу от 380 до 560 м μ с максимумом 460—470 м μ . Спектр люминесценции облученного раствора при возбуждении длиной волны 365 м μ представляет собой широкую

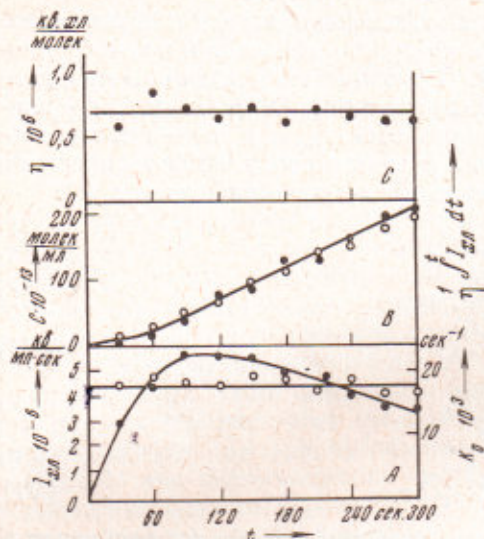


Рис. 1. А — кинетическая кривая нарастания свечения, В — рост концентрации кинуренина в зависимости от времени облучения (темные точки) и расчетная кривая, построенная на основании значения интенсивности и выхода хемилюминесценции (светлые точки), В — значения выхода хемилюминесценции при разных временах облучений

полосу от 360 до 620 м μ с максимумом около 500—530 м μ . Спектр возбуждения люминесценции имеет три максимума 305, 365 и 410—420 м μ . Максимум возбуждения около 305 м μ принадлежит антрапиловой кислоте, 365 — кинуренину (13) и 410—420 какому-то неидентифицированному продукту фотоокисления. Антрапиловая кислота (максимум флуоресценции 400—410 м μ) была удалена из раствора многократной экстракцией бензолом. Кроме того, в спектр люминесценции были введены поправки на флуоресценцию неизвестного продукта с максимумом 520 м μ (возбуждение 435 м μ). После таких манипуляций и нормировки спектр люминесценции стал близок (рис. 2, сплошная кривая) спектру хемилюминесценции. Была проведена оценка квантового выхода люминесценции продукта по сравнению с выходом хининсульфата (0,55) при возбуждении длиной волны 365 м μ , значение выхода оказалось равным примерно $2 \cdot 10^{-3}$.

Естественно, что кинетика накопления кинуренина, измеренная по поглощению, должна быть такой же и по люминесценции, если это свечение действительно принадлежит продукту типа кинуренина. Были получены кинетические кривые роста интенсивности люминесценции и оптической плотности при 365 м μ в зависимости от времени облучения (интенсивность люминесценции измерялась при 500 м μ с тем, чтобы не учитывать свечение антрапиловой кислоты без ее экстракции). На рис. 3 приведены результаты опытов (кинетические кривые совмещены при времени 6 мин.), из которых видно, что кинетика накопления продукта по поглощению и люминесценции совпадают.

Таким образом, на основании кинетических и спектральных данных можно считать, что центром свечения при фотохемилюминесценции растворов глицил-триптофана является молекула ароматического кетона кинуренинподобного типа.

По-видимому, речь может идти не о самом кинуренине, а о формилкинуренине, но для такого заключения необходимы дальнейшие исследования люминесцентных свойств этого соединения, получение сравнительных данных по физическим и химическим свойствам возбужденного со-

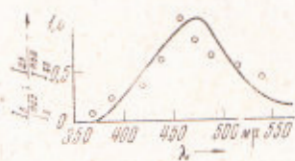


Рис. 2

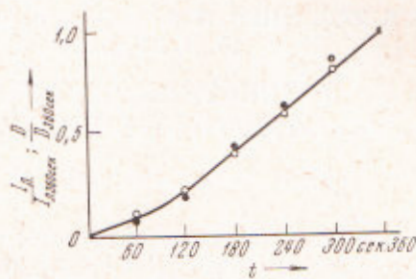


Рис. 3

Рис. 2. Спектр хемилюминесценции (точки) и люминесценции фотооксида (сплошная кривая) при возбуждении длиной волны 365 мμ

Рис. 3. Рост оптической плотности при 365 мμ и люминесценции (500 мμ, возбуждение 365) в зависимости от времени облучения

стояния, образованного путем оптического и химического возбуждения. Пока неясно, с какими уровнями и переходами связано испускание кинуренина — литературные данные по этому вопросу практически отсутствуют. Интересно еще отметить, что предварительные данные говорят о том, что и при фотохемилюминесценции белков центрами свечения являются также группы типа кинуренина, но это предмет дальнейших исследований.

Авторы признательны акад. Н. М. Эмануэлю за интерес к этой работе.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
12 XI 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. И. Сапежинский, Е. Г. Донцова, Тез. симпозиума МОИП, Сверхслабые свечения в биологии, М., 1969, стр. 54. ² И. И. Сапежинский, Е. Г. Донцова, Хим. высоких энергий, 4, 77 (1970). ³ И. И. Сапежинский, Е. Г. Донцова, Тез. симпозиума МОИП, Сверхслабые свечения в биологии, М., 1969, стр. 54. ⁴ G. Matsuda, Nagasaki Igakkai Zassi, 28, 438 (1953). ⁵ Z. Yoshida, M. Kato, J. Am. Chem. Soc., 76, 311 (1954). ⁶ J. H. Leaver, F. G. Lennox, Photochem. and Photobiol., 4, 491 (1965). ⁷ Ю. А. Владимиров, Н. И. Перрасе, Биофизика, 11, 578 (1966). ⁸ И. И. Сапежинский, ДАН, 175, 1167 (1967). ⁹ Р. Ф. Васильев, Г. Ф. Федорова, Оптика и спектроскопия, 24, 419 (1968). ¹⁰ O. Hajashi, Biochem. Preparations, 5, 108 (1953). ¹¹ Р. Ф. Васильев, В сборн. Биолуминесценция, «Наука», 1965, стр. 170. ¹² И. И. Сапежинский, Е. Г. Донцова, Биофизика, 12, 794 (1967). ¹³ D. E. Duggan, R. L. Bowman et al., Arch. Biochem. and Biophys., 68, 1 (1957).