

Изучение характеристик фотодиссоциации карбоксигемоглобина

В.В.Кузьмин, В.В.Салмин, А.Б.Салмина, А.С.Проворов

На установке с перекрещивающимися пучками методом лазерного флэш-фотолиза изучены общие закономерности фотодиссоциации карбоксигемоглобина (HbCO) в буферных растворах цельной человеческой крови. Показано, что эффективность фотоиндуцированной диссоциации комплекса HbCO практически линейно зависит от интенсивности фотолитического облучения при средней плотности мощности, не превышающей 45 мВт/см². Общая диссоциация комплекса HbCO в нативных условиях осуществляется в более узком диапазоне значений степени насыщения, чем в модельных экспериментах с раствором препарата гемоглобина. В области длин волн 550–585 нм зависимость эффективности импульсного фотолиза HbCO от длины волны фотолитизирующего излучения имеет форму широкого колокола. Максимум эффективности соответствует электронному Q-переходу (порфириновое $\pi - \pi^$ -поглощение) в HbCO на длине волны 570 нм. При данных условиях эксперимента диссоциация комплекса при облучении растворов фотолитизирующим излучением с длиной волны свыше 585 нм не наблюдалась.*

Ключевые слова: карбоксигемоглобин, фотодиссоциация, естественные условия фотолиза.

1. Введение

Как известно, причиной отравления угарным газом – монооксидом углерода (СО) – является образование в крови стойкого соединения – карбоксигемоглобина (HbCO) [1, 2]. На сегодняшний день единственным эффективным способом снижения уровня HbCO является гипербарическая оксигенация [3]. Авторы работ [4–6] предлагают положить в основу альтернативного метода детоксикации при отравлениях угарным газом обратимое фотолитическое разрушение связи гем–СО в молекуле карбоксигемоглобина в совокупности с использованием захватчика молекул монооксида углерода. Ими же показано, что в качестве такого захватчика может выступать молекула гипохлорита натрия [6]. Естественно, что для разработки данного метода необходимо детально знать физические основы процесса фотолиза HbCO.

Гемоглобин и его производные из всех гемопротеинов являются, пожалуй, наиболее изученными объектами. Опишем вкратце процесс фотодиссоциации HbCO. Разрыв связи Fe–СО происходит в результате перестройки молекулярных орбиталей комплекса из связывающих в разрыхляющих [7]. В основе этих перестроек лежит $\pi - \pi^*$ -поглощение порфирином света с длиной волны 570 нм [8]. Оно приводит к тому, что связь Fe–СО может ослабиться за счет быстрого (50 фс) обратимого переноса заряда с d_{π} -орбитали железа, которая участвует в связи с СО, на вакантную орбиталь порфиринового кольца [9]. В

результате ослабления связи между атомами Fe и С кристаллическое поле атома углерода уменьшается так, что внутри атома железа происходит перераспределение электронов с орбиталей t_{2g} на орбитали e_g , в результате чего связь Fe–СО нейтрализуется окончательно. При этом обратный переход электрона с кольцевой орбитали порфирина осуществляется на одну из t_{2g} -орбиталей железа, уже не связанного с атомом углерода молекулы СО.

В контексте энергетических состояний системы Fe–СО диссоциация проходит следующие этапы: поглощение комплексом кванта света с длиной волны 570 нм, переход в первое возбужденное Q-состояние, «колебательное» увеличение расстояния Fe–СО и интеркомбинационная конверсия в диссоциативное состояние, в котором молекула СО отходит от атома Fe. Молекула СО может как заново связаться с атомом железа, так и диффундировать из гемового кармана [10–12]. Для удобства описания α -спираль каждой глобулы делят на участки от А до Н, а все аминокислоты последовательно нумеруют. Выделяют два наиболее вероятных пути диффузии: молекула СО может покинуть глобулу либо вследствие вращательных колебаний участка глобулы His64(E7), либо, что менее вероятно, через гидрофобный канал между участками В, G и Н [12, 13]. При температуре порядка комнатной диффузия СО происходит через так называемые дырки (флуктуации плотности) в глобуле, т. е. через полости, образующиеся благодаря микроскопическим колебаниям глобулярных цепей [14].

В то же время вслед за разрывом связи между Fe и СО уменьшается напряжение связи между железом и азотом имидазольного кольца проксимального гистидина. Благодаря этому проксимальный гистидин смещается в глубь спирали, что влечет за собой аллостерические превращения всего тетрамера. Происходит упрочнение межсубъединичных связей и перестройка соседней по димеру субъединицы из R-конформации в энергетически более выгодную T-конформацию, определяющие характер кри-

В.В.Кузьмин, В.В.Салмин, А.С.Проворов. Институт естественных и гуманитарных наук Сибирского федерального университета (Красноярский государственный университет), Россия, 660041 Красноярск, просп. Свободный, 79; e-mail: kuzmin_asp@lan.rambler.ru

А.Б.Салмина. Красноярская государственная медицинская академия, Россия, 660022 Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

Поступила в редакцию 5 марта 2007 г., после доработки – 28 ноября 2007 г.

вой насыщения карбоксигемоглобина [15–21]. Благодаря последовательному превращению субъединиц из «расслабленной» R-конформации в «напряженную» T-конформацию при фотолизе зависимость количества связанных тетрамеров от количества лигандов имеет характерную s-образную форму.

Динамика фотодиссоциации HbCO достаточно сложна [22–30]. Не вдаваясь в подробности, укажем лишь, что от момента поглощения света гемом отдельной субъединицы до релаксации в свободную T-глобулу проходит около микросекунды. При этом для каждой субъединицы существуют четыре схемы последовательностей превращений из шести промежуточных состояний.

Помимо имеющегося сегодня огромного количества сведений о процессе фотолиза HbCO, в нашем случае необходимы также и более конкретные данные, связанные с протеканием этой реакции в естественных условиях.

Показано, например, что в целом при воздействии УФ излучения фотохимические процессы для гемоглобина в модельных и нативных условиях различны [31]. В таком случае нам необходимо выявить различия в общих закономерностях фотодиссоциации для модельных и более близких к естественным условиям экспериментов. Наиболее показательными здесь являются, на наш взгляд, зависимость доза–эффект, несущая в себе информацию о линейности процесса, а также зависимость эффективности фотолиза от концентрации комплекса в исследуемом материале. Ранее было показано, что степень насыщения раствора – это параметр, в принципе определяющий возможность наблюдения реакции [4, 5]. А зависимость эффективности фотолиза от степени насыщения для нативных условий может отличаться от аналогичной зависимости для модельных экспериментов. Кроме того, эта зависимость, вообще говоря, должна показать пределы применимости фотолиза для детоксикации при разной степени отравления.

Открытым остается вопрос о том, существует ли зависимость эффективности фотодиссоциации от длины волны фотолизирующего излучения. А также о том, насколько далеко можно продвинуться в красную область видимого спектра фотолизирующего излучения, наблюдая при этом диссоциацию комплекса. Не вызывает сомнений, что при облучении крови, насыщенной HbCO, использование длинноволнового излучения ($\lambda > 570$ нм) позволит увеличить безопасную интенсивность лазерного излучения и минимизировать вероятность повреждения форменных элементов крови (эритроцитов) за счет снижения поглощения оксигемоглобином. Информация о зависимости эффективности фотолиза различных форм гемоглобина от длины волны фотолизирующего излучения невелика. В основном утверждается, что такая зависимость отсутствует. Однако, как было сказано выше, к разрыву связи Fe–CO приводит именно Q-переход. В этом случае резонно предположить, что красная граница эффективности фотолиза расположена в районе α -полосы поглощения HbCO (560–600 нм).

В настоящей работе описаны исследования фотолиза карбоксигемоглобина при воздействии импульсного лазерного излучения на насыщенные монооксидом углерода растворы крови человека. Задачи исследования фотодиссоциации карбоксигемоглобина в этих растворах мы определили следующим образом:

1. Создание экспериментальной установки для исследования фотодиссоциации комплекса HbCO. Нахождение

оптимальных параметров, при которых регистрация фотолиза комплекса наиболее достоверна.

2. Построение зависимости эффективности фотодиссоциации HbCO от интенсивности фотолизирующего излучения.

3. Построение зависимости эффективности фотодиссоциации HbCO от концентрации комплекса в исследуемом растворе. Сравнение полученных результатов с данными модельных исследований.

4. Построение зависимости эффективности фотодиссоциации HbCO от длины волны фотолизирующего излучения в области α -полосы спектра поглощения HbCO.

2. Материал и метод

В качестве исследуемого материала использовались образцы крови одного донора – здорового мужчины 23 лет. По данным анализа уровень Hb в крови составлял 155 г/л, уровень HbCO не превышал 10%. Для получения негемолизированного раствора исходная кровь разбавлялась фосфатным буфером (0.1 М, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$), поддерживающим постоянный уровень pH = 7.4 (в соответствии с работой [32]), до достижения оптической плотности раствора ~ 1 на длине волны фотолизирующего излучения (в соответствии с [4]). Конечное разбавление соответствовало концентрации белка 0.5×10^{-4} М по гемму. В полученный раствор добавлялся дитионит натрия (0.1 г/мл), который обеспечивал присутствие в растворе только HbCO и DoxHb (дезоксигемоглобин). Насыщение раствора монооксидом углерода осуществлялось его продувкой через раствор. Уменьшение исходной концентрации HbCO в растворе проводилось также продувкой аргона (для создания бескислородной атмосферы) или разбавлением ненасыщенным готовым раствором. В исследованиях использовались образцы только что приготовленных растворов при комнатной температуре.

Для проведения исследований была создана экспериментальная установка, основанная на схеме с перекрещивающимися пучками [29–31] (рис.1).

В работе использовались два источника фотолизирующего излучения. Для нахождения зависимости эффективности фотолиза от интенсивности облучения, а также зависимости эффективности фотолиза от концентрации карбоксигемоглобина использовался работающий в режиме модуляции добротности с удвоением час-

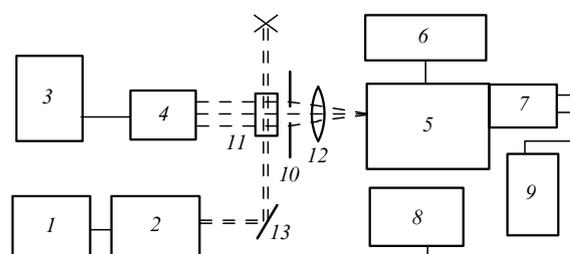


Рис.1. Схема экспериментальной установки:

1 – источник питания и управления лазера; 2 – излучатель лазера; 3 – блок питания зондирующего излучателя; 4 – зондирующий излучатель; 5 – монохроматор; 6 – блок питания и управления монохроматора; 7 – фотоумножитель; 8 – источник питания фотоумножителя; 9 – цифровой мультиметр; 10 – прямоугольная диафрагма; 11 – кварцевая кювета с исследуемым раствором; 12 – собирающая линза; 13 – поворотное зеркало.

тоты импульсный твердотельный Nd : YAG-лазер марки ЛТИ-404, излучающий на длине волны 532 нм. Параметры излучения: длительность импульса $\tau = 25$ нс, импульсная мощность $P_{\text{pulse}} = 60$ кВт, площадь сечения пучка $S = 0.5$ см². Изменение частоты следования импульсов генерации от 1 до 50 Гц и соответственно средней мощности от 1.5 до 42.5 мВт обеспечивало среднюю интенсивность фотолизирующего излучения 3–85 мВт/см².

Для нахождения зависимости эффективности фотолиза от длины волны фотолизирующего излучения в качестве источника последнего использовался перестраиваемый импульсный твердотельный лазер марки ЛКИ-301 с оптической накачкой от импульсного Nd : YAG-лазера ЛТИ-404. В лазере ЛКИ-301 активной средой являлись матрицы из полиметилметакрилата двух типов: с внедрением красителей родамина незамещенного и родамина 6G. При этом обеспечивалась стабильная генерация в диапазоне длин волн 544–600 нм. Максимальная импульсная мощность на длине волны максимума интенсивности люминесценции родамина незамещенного P_{pulse} достигала 4 кВт.

Интегральные изменения оптической плотности раствора под действием фотолизирующего излучения регистрировались цифровым мультиметром Ф-4800 по изменению напряжения на нагрузочном сопротивлении фотомультипликатора ФЭУ-39, на фотокатод которого падало зондирующее излучение. Заданная длина волны зондирующего излучения выделялась монохроматором МСД-2, работающим в режиме автоматического сканирования спектра. Точность регистрации оптической плотности ΔD составила 0.001 при уровне сигнала от исходной заставки ФЭУ $U_0 = 1$ В.

Относительная концентрация HbCO в растворе измерялась спектрофотометрически по формуле [33]

$$C_{\text{HbCO}} = \frac{D_{534} - 0.72D_{563}}{0.43D_{563}},$$

где D_{534} , D_{563} – оптические плотности раствора на длинах волн 534 и 563 нм.

При построении зависимости эффективности фотолиза HbCO от длины волны фотолизирующего излучения было необходимо учесть, что интенсивность лазерного излучения зависит от длины волны. Кроме того, поглощение раствора в исследуемой области длин волн уменьшается с увеличением длины волны. Понятно, что и эффективность фотолиза, напрямую связанная с поглощенной энергией, также зависит от длины волны. В связи с этим требуемая зависимость в общем виде определялась в результате нормировки экспериментальной зависимости перепадов напряжений на выходе ФЭУ для разных длин волн фотолизирующего излучения на поглощение раствора в данной спектральной области и на спектральную зависимость интенсивности генерации перестраиваемого лазера:

$$I(\lambda) = \frac{I_{\text{exp}}^{\text{rel}}(\lambda)}{I_{\text{sol}}^{\text{rel}}(\lambda)I_{\text{las}}^{\text{rel}}(\lambda)},$$

где $I(\lambda)$ – искомая эффективность в относительных единицах; $I_{\text{exp}}^{\text{rel}}(\lambda)$ – экспериментально полученная зависимость изменений напряжения от длины волны лазерного фотолизирующего излучения, нормированная на ее максимум; $I_{\text{sol}}^{\text{rel}}(\lambda)$ – спектр поглощения раствора, нормиро-

ванный на его максимум; $I_{\text{las}}^{\text{rel}}(\lambda)$ – зависимость мощности генерации лазера от длины волны, нормированная на ее максимум. Нормировка на поглощение кюветы не проводилась в связи с отсутствием в исследуемом диапазоне длин волн заметной спектральной зависимости поглощения.

Погрешности измерений находились как сумма экспериментальной ошибки и разброса значений набора измерений. За экспериментальную погрешность принималась величина минимального разряда цифрового мультиметра, равная 1 мВ.

3. Результаты и их обсуждение

При освещении растворов, не насыщенных монооксидом углерода, фотолизирующим излучением изменения сигнала на выходе ФЭУ (далее – выходного сигнала) зафиксировано не было, в то время как в насыщенных СО растворах четко фиксировалось изменение пропускания. Таким образом, изменение сигнала при облучении насыщенных СО растворов напрямую связано с присутствием в растворе карбоксигемоглобина.

При прекращении фотолитического освещения оптическая плотность раствора возвращалась к исходному значению и в отсутствие фотолизирующего излучения не менялась, что свидетельствует об обратимости реакции диссоциации и устойчивости белка к облучению (при данных интенсивностях фотолизирующего и зондирующего излучений).

Сканирование спектров пропускания раствора по длинам волн во время облучения фотолизирующим излучением показало, что наибольшие изменения пропускания при заданной средней интенсивности облучения происходят на длинах волн 540, 570, 555 и 435 нм. На указанные длины волн приходятся наибольшие изменения оптической плотности в спектрах поглощения растворов крови, что соответствует данным, приведенным в [34].

На длине волны 540 нм во время облучения фотолизирующим излучением оптическая плотность уменьшалась, что свидетельствует о диссоциации комплекса HbCO. Примерно такое же уменьшение оптической плотности происходило на длине волны 570 нм, что также было вызвано фоторазрушением карбоксигемоглобина. На длине волны 555 нм имело место небольшое увеличение поглощения, связанное с появлением дезоксиформы во время фотолитического облучения. Наконец, на длине волны 435 нм (полоса Соре дезоксигемоглобина) увеличение поглощения было наиболее существенным – на порядок большим, чем абсолютные изменения на вышеперечисленных длинах волн.

На рис.2 показана зависимость амплитуды изменения (уменьшения) выходного сигнала на длине волны 435 нм от средней интенсивности фотолизирующего излучения при облучении растворов крови с концентрациями HbCO 57 % и 88 %. Измерения проводились при частотах следования импульсов фотолизирующего излучения 5, 10 и 25 Гц. Увеличение частоты приводило к пропорциональному росту средней интенсивности излучения. Погрешности, приведенные на графике – разброс результатов измерений, сложенный с приборной ошибкой ($\Delta I = 1$ мВ). Точки определяют среднеарифметические значения результатов измерений. Видно, что полученные зависимости можно аппроксимировать прямыми, пересекающимися начало координат, с достаточно высокой точностью, а сле-

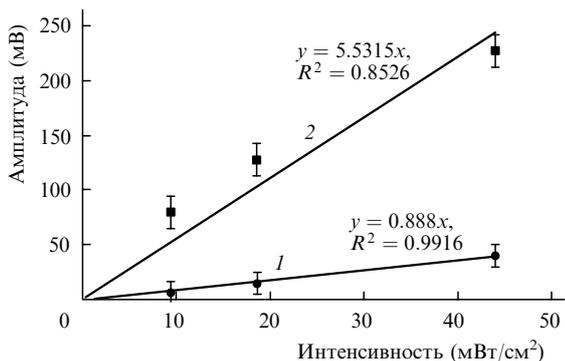


Рис.2. Зависимости амплитуды изменения (уменьшения) выходного сигнала с ФЭУ на длине волны 435 нм от средней интенсивности фотолизирующего излучения (532 нм) при облучении раствора цельной крови с концентрацией НbСО, равной 88 % (1) и 57 % (2). Для каждой зависимости приведены уравнения прямых и достоверности линейной аппроксимации.

довательно, даже максимальная интенсивность фотолизирующего излучения не приводит к насыщению изменения концентрации НbСО в объеме реакции. Это значит, что максимальная эффективность диссоциации, т. е. 100 %-ная диссоциация НbСО в объеме реакции, может быть достигнута при более высокой средней интенсивности фотолизирующего излучения, а также при условии изоляции объема, в котором протекает реакция, от общего раствора с целью исключения перемешивания свободных и связанных с лигандом глобул. Из рис.2 также видно, что при увеличении степени насыщения раствора карбоксиформой Нb с 57 % до 88 % изменение уровня выходного сигнала уменьшается примерно в шесть раз. Из полученных зависимостей становится ясно, что использование фотолизирующего излучения с частотой следования импульсов 25 Гц обеспечивает в нашем случае наибольший эффект.

Для нахождения зависимости эффективности фотодиссоциации НbСО от концентрации комплекса использовались образцы растворов цельной крови с разной концентрацией карбоксигемоглобина. Максимальная средняя интенсивность фотолизирующего излучения составляла 45 мВт/см² (что определялось частотой следования импульсов 25 Гц). Амплитуда изменения выходного сигнала регистрировалась на ранее определенных длинах волн 570, 540, 555 и 435 нм. Предварительные эксперименты показали, что на всех длинах волн, кроме 435 нм, при концентрациях НbСО в растворе меньше 40 % и больше 80 % диссоциация не фиксируется. Было приготовлено шесть групп образцов раствора с концентрациями НbСО от 40 % до 80 %. В каждом из образцов измерения проводились на всех четырех длинах волн. Усреднялись абсолютные значения изменений сигнала в каждой группе образцов (для данной концентрации). На рис.3 представлены полученные результаты. Точками показаны средние значения разброса экспериментальных данных. Погрешности здесь и далее – дисперсия результатов измерений, сложенная с приборной ошибкой.

На рис.4 показаны зависимости относительной (нормированной на максимум) амплитуды изменения сигнала на указанных длинах волн. Видно, что в пределах относительной погрешности данные зависимости практически одинаковы для всех длин волн зондирующего излучения. Этот факт является показателем того, что эффективность фотоиндуцированного разрушения НbСО

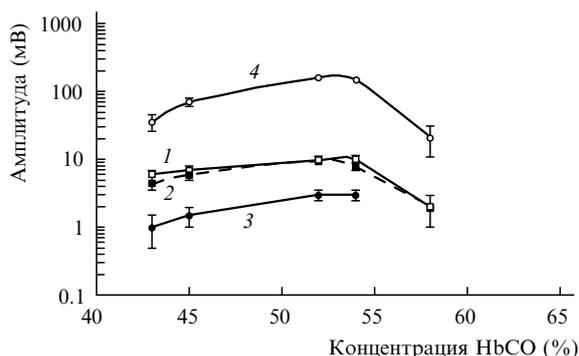


Рис.3. Зависимости амплитуды изменения выходного сигнала от концентрации НbСО на длинах волн 570 (1), 540 (2), 555 (3) и 435 нм (4) при облучении растворов цельной крови фотолизирующим излучением со средней интенсивностью 45 мВт/см².

прямо пропорциональна эффективности возникновения дезоксигемоглобина, и эти процессы одинаково зависят от степени насыщения раствора. Максимум амплитуды изменения сигнала для всех четырех зависимостей приходится на концентрацию, близкую к 50 %. Вопрос о характере подобной зависимости обсуждался в работе [35]. Укажем здесь только, что, по-нашему мнению, факторами, определяющими характер зависимости эффективности фотолиза НbСО от его концентрации, являются межмпульсное вторичное связывание СО и Нb (для молекул СО, находящихся вне глобулы) и быстрое (геминальное) связывания СО и Нb (для молекул СО, находящихся еще в гемовом кармане глобулы). Роль этих процессов, а точнее, конкуренция между ними, и зависит, на наш взгляд, от количества связанных тетрамеров НbСО и свободных молекул СО в растворе.

Таким образом, диссоциацию НbСО наиболее точно можно регистрировать по изменению уровня выходного сигнала на длине волны 435 нм при использовании раствора цельной крови с начальной относительной концентрацией НbСО, близкой к 50 %. Эффективность реакции увеличивается с ростом интенсивности облучения по крайней мере до 45 мВт/см². Сравним характер зависимостей эффективности фотолиза от концентрации НbСО, полученных в данных условиях, с такой же зависимостью для модельных экспериментов.

Для сравнения на рис.5 приведены данные из работы [4], где исследовались растворы препарата гемоглобина лошади. Здесь же приведена кривая, полученная в настоящей работе при наблюдении фотолиза на длине волны 435 нм (как наиболее показательная).

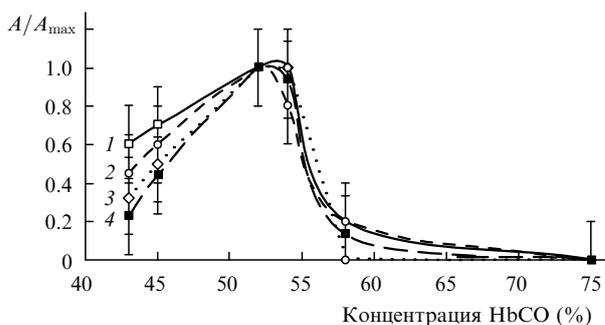


Рис.4. Зависимости относительных изменений выходного сигнала от концентрации НbСО на длинах волн зондирующего излучения 570 (1), 540 (2), 555 (3) и 435 нм (4) при облучении растворов цельной крови фотолизирующим излучением с интенсивностью 45 мВт/см².

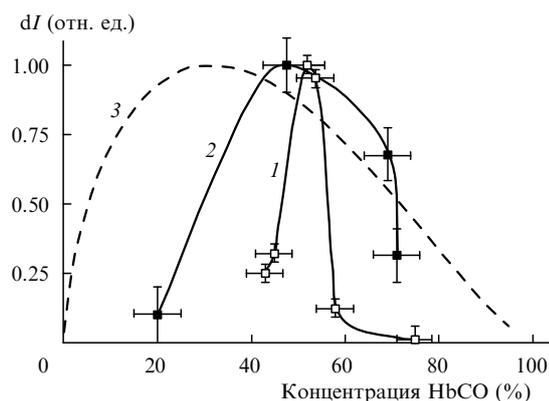


Рис.5. Экспериментальные зависимости относительной эффективности диссоциации от исходной концентрации НЬСО в буферном растворе цельной крови (1) и в растворе препарата гемоглобина лошади (2), а также модельная теоретическая зависимость для оксигемоглобина (3).

В работе [4] указано, и это видно из рис.5, что в пределах погрешности экспериментальные точки в области высоких степеней насыщения (при концентрациях НЬСО выше 45 %) можно аппроксимировать теоретической кривой для оксигемоглобина:

$$dI = \frac{nC_{\text{НЬСО}}^{n-1}}{(1 + C_{\text{НЬСО}}^n)^2}.$$

Здесь dI – относительный выход реакции диссоциации НЬСО; $C_{\text{НЬСО}}$ – относительная концентрация карбоксиформы в растворе; n – индекс кооперативности, принятый равным 2.7 (физиологические пределы составляют 2.5–3). Напомним, что индекс кооперативности (индекс Хилла) – это параметр, определяющий крутизну наклона кривой насыщения гемоглобина и степень его средства с лигандом.

В области малых степеней насыщения (точка кривой 2, соответствующая концентрации 20 %) однозначная аппроксимация даже при более высоких значениях индекса Хилла, чем 2.7, для оксигемоглобина невозможна. Видно, что экспериментальная зависимость эффективности диссоциации от концентрации НЬСО, полученная в настоящей работе, имеет более узкий пик возрастания амплитуды изменения сигнала по сравнению как с теоретической кривой, так и кривой, взятой из работы [4].

В целом можно сказать, что зависимость эффективности фотодиссоциации НЬСО от концентрации комплекса в растворе однозначно нельзя аппроксимировать теоретической зависимостью для оксигемоглобина, т. к. в отличие от кривой 2 на рис.5, даже точки, соответствующие концентрациям выше 45 %, не укладываются в пределах погрешности на кривую 3 этого рисунка.

Интегрирование данных кривых по сути должно привести к s -образной зависимости степени насыщения гемоглобина монооксидом углерода. Более узкий пик возрастания амплитуды изменения сигнала для растворов цельной крови говорит о том, что в этом случае кривая насыщения НЬСО монооксидом углерода имеет более крутой подъем, чем такая же кривая, соответствующая свободному гемоглобину, и, тем более, чем теоретическая кривая, соответствующая оксигемоглобину. Однако делать вывод о том, что степень кооперативности в случае раствора цельной крови более высока, чем в случае раствора чистого гемоглобина, нельзя. Это связано с

тем, что формула, полученная в [4], никак не отражает условий протекания реакции. В нашем же случае существенными факторами являются длительность и частота импульсов фотолизирующего излучения. Эти временные параметры определяют эффективности повторного связывания Fe и CO двух типов – быстрого геминального связывания в случае, когда лиганд еще не покинул гемовый карман, и межимпульсного связывания свободной молекулы CO с гемом. Кроме того ясно, что плотность тетрамеров, которую можно не учитывать для раствора свободных глобул, вносит существенный вклад в картину диссоциации в целом. Поэтому, вообще говоря, зависимость, полученная с использованием интеграла от экспериментальной кривой, не является истинной кривой насыщения гемоглобина монооксидом углерода.

Более «узкая» зависимость эффективности диссоциации в растворах крови по сравнению с той же зависимостью для растворов цельного гемоглобина означает, что интегральная эффективность фотодиссоциации в нативных условиях ниже, чем в модельных. Фотолиз в эритроците – это более «строгий» процесс, чем фотодиссоциация в свободном тетрамере. Такой результат согласуется с ранними данными, полученными в [36]. Авторы этой работы показали, что диссоциация НЬСО в эритроците двухфазна и в целом затруднена по сравнению с диссоциацией НЬСО в свободном виде. Первая фаза – это так называемая нормальная фаза реакции. Она идентична фотолизу НЬСО в растворе свободных тетрамеров. Кроме этого существует еще и так называемая медленная фаза реакции. Авторы [36] связывают ее с затруднением выхода молекулы CO из клетки, что в свою очередь обусловлено, помимо затрудненной диффузии сквозь эритроцитарную мембрану, плотной упаковкой тетрамеров и увеличением вероятности рекомбинации с соседями. При этом отношение интегральных скоростей реакции фотодиссоциации в растворе и эритроците равно 5 : 4.

В целом ясно, что в растворе препятствием для выхода прототипированной молекулы CO в растворитель является только глобула. В эритроците же молекула CO, находящаяся после разрыва связи с железом в гемовом кармане, с большей вероятностью, чем свободный тетрамер, вновь свяжется с железом. Это обусловлено тем, что плотная упаковка тетрамеров в клетке должна существенно снижать конформационную подвижность глобулярной цепи, а следовательно, вероятность диффузии CO из гемового кармана. Кроме того, даже те молекулы CO, которые покинули глобулу, могут заново связаться с соседними свободными тетрамерами. Наконец, последним препятствием для выхода CO из эритроцита является эритроцитарная липидная мембрана, которая также снижает общую эффективность диффузии CO в растворитель.

Для получения зависимости эффективности фотодиссоциации НЬСО от длины волны фотолизирующего излучения образцы растворов с относительными концентрациями карбоксигемоглобина 40 % и 60 % подвергались фотолитическому воздействию излучения перестраиваемого лазера ЛКИ-301 с частотой следования импульсов 25 Гц. Результаты представлены на рис.6. Из набора фиксируемых изменений выходного сигнала (обозначим их $I_{\text{exp}}(\lambda)$) для каждой длины волны генерации брались среднеарифметические значения. При измерениях значений $I_{\text{exp}}(\lambda)$ для уменьшения вероятности ошибки

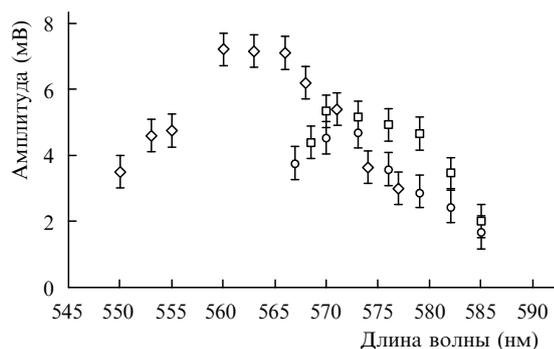


Рис.6. Зависимости амплитуды изменения (уменьшения) выходного сигнала на длине волны 435 нм от длины волны фотолизирующего излучения при облучении раствора с концентрацией HbCO 60 % излучением лазера на родамине незамещенном (\diamond) и лазера на родамине 6G (\square), а также при облучении раствора с концентрацией HbCO 40 % излучением лазера на родамине 6G (\circ).

длина волны генерации как монотонно увеличивалась или уменьшалась, так и устанавливалась на выбор. В итоге каждой длине волны генерации соответствовал набор значений $I_{\text{exp}}(\lambda)$, полученных на разных образцах раствора, которые впоследствии и усреднялись.

Полученные экспериментально величины изменений выходного сигнала для растворов в зависимости от длины волны фотолизирующего излучения последовательно нормировались на относительный спектр поглощения растворов в данной области, а также на относительный спектр мощности генерации лазера ЛКИ-301. В результате была получена искомая зависимость относительной эффективности фотодиссоциации HbCO от длины волны фотолизирующего излучения (рис.7).

Максимум эффективности реакции соответствует пику α -полосы спектра поглощения HbCO. Данный факт согласуется с результатами, полученными в [6] и [7]. Согласно этим работам поглощение света с длиной волны 570 нм является «пусковым механизмом» фотолитизации HbCO.

На рис.8 приведены энергетические состояния атомарной группы Fe–CO, участвующие в фотолитизе, с указанием природы электронной связи [8]. Очевидно, что вероятность диссоциации (нахождения системы Fe–CO в RS-состоянии) напрямую связана с вероятностью заселения Q-состояния, т.е. с вероятностью Q-перехода. В свою очередь вероятность этого перехода определяется населенностью нижнего электронно-колебательного состояния системы.

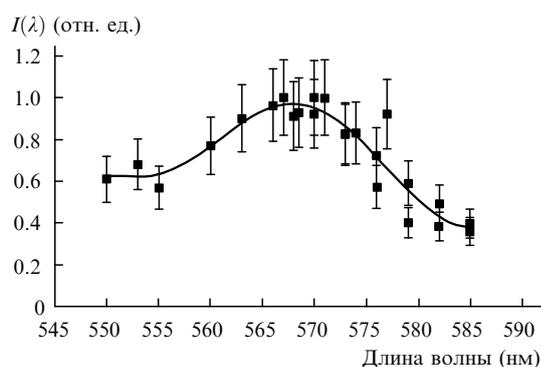


Рис.7. Зависимость относительной эффективности фотодиссоциации комплекса HbCO в буферном растворе человеческой крови от длины волны фотолизирующего излучения.

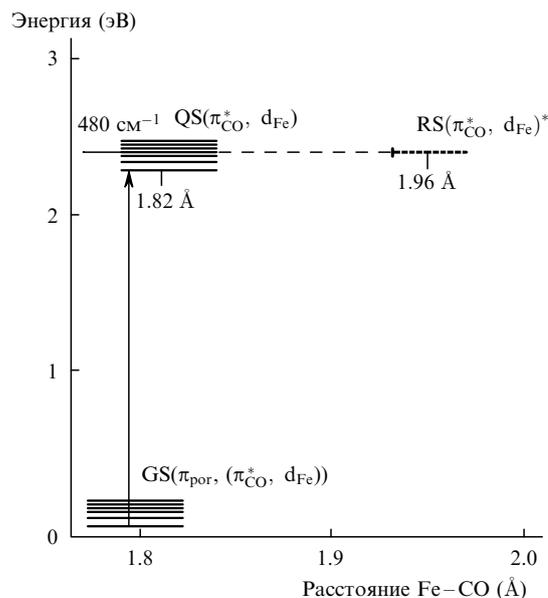


Рис.8. Энергетическая схема начального этапа диссоциации комплекса гем–CO (по результатам работы [8]); GS, QS и RS – основное (ground state), первое возбужденное (quintet state) и неустойчивое (repulsive state) состояния. Для состояний QS и RS приведены равновесные расстояния Fe–CO (1.82 и 1.96 Å); разность энергий этих состояний равна 480 cm^{-1} .

Известно, что в спектре гема отсутствует вращательная структура. Колебательные движения также сложны настолько, что в бесструктурных полосах электронного поглощения не разрешаются (см., напр., [37]). Однако можно выделить характерные движения отдельных групп в комплексе, в том числе и атомарной группы Fe–CO [38]. Будем считать, что для группы Fe–CO в геме Hb энергетическая структура, по крайней мере нескольких первых электронно-колебательных состояний, схожа с такой структурой для свободной двухатомной молекулы. Такое приближение допустимо в принципе, т.к. вид потенциальных кривых устойчивых состояний группы атомов Fe–CO, приведенных в [7, 8], близок к виду потенциала Морзе. При этом расстояния между колебательными подуровнями у группы Fe–CO малы, но колебательный спектр Fe–CO разрешается. Понятно, что левее максимума кривой эффективности диссоциации (при меньших длинах волн) реакция возможна, т.к. возможен и переход с любого заселенного колебательного подуровня системы основного электронного состояния (GS) на доступный колебательно-вращательный подуровень Q-состояния. При меньших длинах волн (как, например, для второй гармоники излучения Nd:YAG-лазера) диссоциация возможна благодаря тому, что система, очевидно, обладает высокоэффективными путями релаксации из вышележащих возбужденных состояний в Q-состояние. Правее максимума кривой эффективности, т.е. при поглощенных энергиях ниже энергии чисто электронного перехода, реакция по сути протекает аналогично возникновению антистоксовых областей в спектрах люминесценции и комбинационного рассеяния и определяется наличием заселенных ненулевых колебательных подуровней основного электронного состояния при температуре выше абсолютного нуля. Наконец, как и ожидалось, максимум кривой зависимости эффективности диссоциации от длины волны поглощенного света практически соответствует энергии Q-перехода, т.е. чисто

электронный переход обеспечивает максимально эффективную диссоциацию (очевидно, в связи с высокой заселенностью по крайней мере нижних колебательных подуровней основного электронного состояния системы Fe–CO).

4. Выводы

В настоящей работе исследовалась фотодиссоциация комплекса карбоксигемоглобина в буферных растворах цельной человеческой крови. Получены зависимости эффективности фотолиза от средней интенсивности фотолизирующего излучения, от степени насыщения раствора карбоксиформой гемоглобина, а также от длины волны фотолизирующего излучения. Согласно результатам работы, применение фотолиза в качестве способа снижения содержания HbCO в крови должно быть наиболее эффективным для степени насыщения HbCO 40 % – 60 % при использовании фотолизирующего излучения с длиной волны 570 нм.

1. Raub J.A., Mathieu-Nolf M., Hampson N.B., Thom S.R. *Toxicology*, **145**, 1 (2000).
2. Sanborn M.D., Jessiman B.J. *Can. Med. Assoc. J.*, **166**, 1685 (2002).
3. Thom S.R. *New Engl. J. Med.*, **347**, 1105 (2002).
4. Salmin V.V., Stavitskaya E.Yu., Egorova A.B. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **3914**, 62 (2000).
5. Provorov A.S., Salmin V.V., Stavitskaya E.Yu., Egorova A.B. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **4749**, 245 (2001).
6. Салмин В.В., Ставицкая Е.Ю., Егорова А.Б. *Матер. IX Междунар. симп. «Реконструкция гомеостаза»* (Россия, Красноярск, 1998, с. 64).
7. Dreuw A., Dunietz B.D., Head-Gordon M. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 12070 (2002).
8. Dunietz B.D., Dreuw A., Head-Gordon M. *J. Phys. Chem. B*, **107**, 5623 (2003).
9. Franzen S., Kiger L., Poyart C. *Biophys. J.*, **80**, 2372 (2001).
10. Andersen M.E., Moffat J.K. *J. Biol. Chem.*, **246**, 2796 (1970).
11. Esquerra R.M., Goldbeck R.A. *Biophys. J.*, **78**, 3227 (2000).
12. Лепешкевич С.В., Позняк А.Л., Джагаров Б.М. *ЖПТС*, **72**, 670 (2005).
13. Olson J.S., Phillips Jr G.N. *J. Biol. Chem.*, **271**, 17593 (1996).
14. Huang J., Ridsdale A., Wang J. *Biochemistry*, **36**, 14353 (1997).
15. Friedman J. M., Stepnoski R.A., Stavola M., et al. *Biochemistry*, **21**, 2022 (1982).
16. Balakrishnan G., Case M.A. *J. Mol. Biol.*, **340**, 843 (2004).
17. Маринов Б.С., Рузиева Р.Х. *Биохимия*, **55**, 1616 (1990).
18. Adachi S., Park S., Tame J.R. *Prot. Nat. Acad. Sci.*, **100**, 7039 (2003).
19. Mihailescu M.R., Russu I.M. *Prot. Nat. Acad. Sci.*, **98**, 3773 (2001).
20. Koshland D.E., Hamadani K. *J. Biol. Chem.*, **277**, 46841 (2002).
21. Monod J. *J. Mol. Biol.*, **12**, 88 (1965).
22. Longa S.D., Pin S., Cortes R. *Biophys. J.*, **75**, 3154 (1998).
23. Rothberg L., Jedju T.M. *Biophys. J.*, **57** 369 (1990).
24. Noe L.J., Eisert W.G. *Prot. Nat. Acad. Sci.*, **75**, 573 (1978).
25. Guest C.R., Noe L.J. *Biophys. J.*, **52**, 885 (1987).
26. Berg R., Sayed M.A. *Biophys. J.*, **58**, 931 (1990).
27. Janes S.M., Dalickas G.A. *Biophys. J.*, **54**, 545 (1988).
28. Лепешкевич С.В., Коновалова Н.В., Джагаров Б.М. *Биохимия*, **68**, 676 (2003).
29. Lepeshkevich S.V., Dzhagarov B.M. *Biochemistry*, **43**, 1675 (2004).
30. Lepeshkevich S.V., Dzhagarov B.M. *Chem. Phys. Lett.*, **390**, 59 (2004).
31. Тарасьев М.Ю., Рыльков В.В. *Биохимия*, **56**, 1296 (1991).
32. Barksdale A.D., Rosenberg A. *J. Biol. Chem.*, **253**, 4881 (1978).
33. Букина Л.П., Ушакова Л.И. *Судебно-медицинская экспертиза*, **12**, 39 (1979).
34. Тарасьев М.Ю., Рыльков В.В. *Биохимия*, **56**, 273 (1991).
35. Stavitskaya E.Yu., Salmin V.V., Egorova A.B. *Proc. 3d Russian-Chinese Symposium on Laser Physics and Laser Technology* (Russia, Krasnoyarsk, 1996, p. 113).
36. Parkhurst J.L., Gibson Q.H. *J. Biol. Chem.*, **242**, 5762 (1967).
37. Sagnella D.E., Straub J.E. *Prot. Nat. Acad. Sci.*, **96**, 14324 (1999).
38. Das T.K., Lee H.C. *J. Biol. Chem.*, **274**, 4207 (1999).