

**ИЗУЧЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФОТОДИССОЦИАЦИИ
КАРБОКСИГЕМОГЛОБИНА ОТ ДЛИНЫ ВОЛНЫ ФОТОЛИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ****В. В. Кузьмин, В. В. Салмин,
А. Б. Салмина, А.С. Проворов***

На установке с перекрещивающимися пучками методом лазерного флэш-фотолиза показана зависимость эффективности фотодиссоциации HbCO в буферных растворах цельной человеческой крови от длины волны фотолизирующего излучения в области 550 – 585 нм. Форма полученной зависимости – широкий колокол с максимумом около 570 нм. Качественное объяснение характера экспериментальной зависимости заключено в рамки результатов работ Franzen et al. и Dunietz et al., в соответствии с которыми максимум эффективности диссоциации обеспечивается так называемым Q-переходом на 570 нм. В результате этого $\pi - \pi^$ перехода с Fe-Por - переносом заряда и последующего колебательного увеличения радиуса связи Fe-CO изменения геометрии электронной плотности представляются как перестройка ВЗМО системы Fe-CO из связывающей в разрыхляющую. Снижение эффективности диссоциации по обе стороны от максимума обусловлено, вероятно, с характерным для данной системы распределением населенности по колебательным подуровням основного электронного состояния.*

Моноксид углерода - причина более половины смертельных отравлений во всем мире [1],[2]. На сегодняшний день единственным эффективным способом снижения уровня HbCO в крови является лишь гипербарическая оксигенация [3]. Авторами [4] ранее уже рассматривался вопрос об использовании фотодиссоциации HbCO в качестве альтернативного метода детоксикации при отравлениях угарным газом. В настоящее время восстановлена полная структура тетрамера, исследована кинетика ассоциативно-диссоциативных реакций, в том числе и фотоиндуцированных. Изучена внутрибелковая динамика. В [5] описан исходный механизм диссоциации HbCO. Тем же методом позже Jensen и Rude исследовали природу связи кислород-железо в HbO₂ [6]. Среди большого количества научных данных (гемоглобин и его производные, пожалуй, наиболее изученные модели) в литературе практически отсутствует информация о связи эффективности реакции фотодиссоциации HbCO и длиной волны фотолизирующего излучения. В работе [7] изучалась спектральная зависимость лишь кинетических характеристик в спектре поглощения раствора, однако зависимость эффективности фотолиза HbCO от длины волны фотолизирующего излучения не найдена. При обсуждении вопроса использования фотолиза в качестве метода детоксикации при отравлении угарным газом необходимо наиболее полное знание процесса фоторазрушения HbCO. Сам собой напрашивается вопрос, существует ли зависимость эффективности фотодиссоциации от длины волны фотолизирующего излучения. А также насколько «далеко» можно сдвинуться в красную область видимого спектра фотолизирующего излучения, наблюдая при этом диссоциацию комплекса. Не вызывает сомнений, что при облучении непосредственно крови, насыщенной HbCO, использование длинноволнового излучения (с длиной вол-

* © В. В. Кузьмин, В. В. Салмин, А. Б. Салмина, А.С. Проворов, Красноярский государственный университет, 2006.

ны более 570 нм) позволит увеличить безопасную интенсивность лазерного излучения и минимизировать вероятность повреждения форменных элементов крови (эритроцитов) за счет снижения поглощения оксигемоглобином.

Dunietz, Drew. и Head-Gordon [5] показали, что ключевую роль при диссоциации связи гем – СО играет $\pi - \pi^*$ переход из основного состояния системы Fe – СО в первое возбужденное Q-состояние (так называемый Q-переход). Затем, благодаря колебаниям связи, возможна интеркомбинационная конверсия в неустойчивое диссоциативное состояние, у которого конфигурация молекулярной орбитали разрыхляющая. При этом, согласно приведенным в [5] потенциальным кривым атомы Fe и С расходятся до 2,5Å, после чего разрыв связи можно считать завершенным. Указанный исходный переход соответствует длине волны 570 нм. Данное значение приходится на максимум α -полосы спектра поглощения карбоксигемоглобина. Следовательно, роль скоро именно Q-переход приводит к разрыву связи Fe – СО, то резонным будет искать край эффективности фотолиза в районе α -полосы поглощения HbCO (560 – 600 нм).

В настоящей работе описано исследование эффективности фотолиза HbCO в растворе при воздействии импульсного лазерного фотолитического излучения в области длин волн 560 – 600 нм.

Методика эксперимента

Ранее [8] было показано, что оптимальными параметрами для наблюдения фотолиза HbCO в условиях эксперимента, близких к нативным являются: использование раствора цельной (негемолизированной) человеческой крови, концентрация комплекса HbCO в растворе – около 50 %, регистрация изменений оптической плотности раствора на длине волны 453 нм. Таким образом, в данной работе материалом исследования служили буферные растворы цельной человеческой крови. Для получения раствора исходная донорская периферическая венозная кровь разбавлялась 0.1 М фосфатным буфером (рН= 7,4) до получения оптической плотности порядка единицы на длине волны 533 нм аналогично [8]. Для перевода всех окисленных форм Hb в дезоксиформу в раствор добавлялся дитионит натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) в количестве 0.1 мг/мл. Насыщение раствора монооксидом углерода осуществлялось продувкой раствора в темноте. Уменьшение концентрации HbCO в растворе достигалось разбавлением насыщенного раствора ненасыщенным согласно [8].

Измерение концентрации HbCO в растворе проводилось спектрофотометрически аналогично [8] и согласно [9]. Спектры поглощения растворов снимались на спектрофотометре СФ-26.

Для проведения обозначенных исследований была создана экспериментальная установка, аналогичная [8], основанная на типичной схеме с перекрещивающимися пучками [7],[10],[11], показанная на рис. 1.

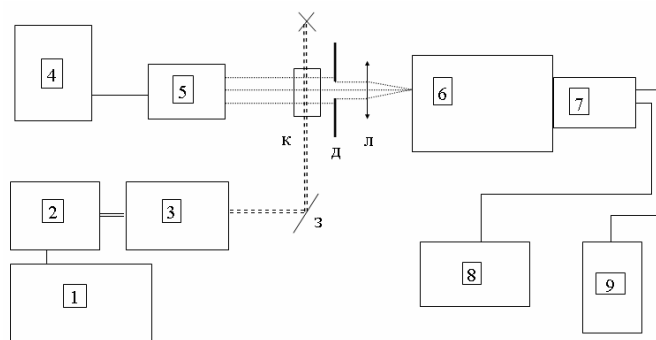


Рис. 1. Экспериментальная установка: 1 - источник питания и управления NdYAG-лазера накачки марки ЛТИ-404, 2 - блок излучения ($\lambda=532\text{нм}$) NdYAG-лазера ЛТИ-404, 3 - перестраиваемый лазер ЛКИ-301 с накачкой от ЛТИ-404, 4 - блок питания Б5-45 зондирующего осветителя, 5 - зондирующий осветитель - лампа накаливания мощностью 25 Вт, 6 - монохроматор МДР-2, 7 - фотоэлектроумножитель ФЭУ-39, 8 - высокостабильный источник питания фотоэлектроумножителя, 9 - цифровой вольтметр; К - стеклянная кювета с исследуемым раствором, Д - прямоугольная диафрагма (выделяет пучок зондирующего излучения, прошедший через область фотолитического облучения), Л - собирающая линза, З - поворотное зеркало

В качестве источника фотолитизирующего излучения использовался перестраиваемый импульсный твердотельный лазер марки ЛКИ-301 с оптической накачкой от импульсного Nd:YAG – лазера ЛТИ-404 (длина волны генерации 532 нм), обеспечивающего мощность импульса накачки 40 кВт при длительности импульса 25 нс и работающего в режимах повторения импульсов с частотами 1 Гц, 5 Гц, 10 Гц и 25 Гц. В лазере ЛКИ-301 активной средой были матрицы из полиметилметакрилата двух типов: с внедрением красителя родамина незамещенного и родамина 6G. При этом обеспечивалась стабильная генерация в диапазоне длин волн 544 - 600 нм. Максимальная мощность импульса на длине волны максимума интенсивности люминесценции родамина незамещенного достигала $P_{\text{имп}} = 3.7$ кВт.

Регистрация интегральных изменений оптической плотности раствора под действием фотолитического излучения осуществлялась по изменению фотонапряжения на фотоэлектроумножителе ФЭУ-39 (максимум спектральной катодной чувствительности соответствует длине волны 420 нм), на который падало зонди-

рующее излучение с длиной волны 435 нм. Выделяли нужную длину волны монохроматором МДР-2. Точность регистрации в единицах оптической плотности составила $\Delta D = 0,01 - 0,005$.

Искомая зависимость эффективности фотолиза HbCO от длины волны фотолизирующего излучения в общем виде определялась как нормировка экспериментальной зависимости перепадов фотонапряжений на выходе ФЭУ для разных значений длин волн фотолизирующего излучения на поглощение раствора в данной спектральной области и на спектральную зависимость интенсивности генерации перестраиваемого лазера:

$$\sigma I(\lambda) = \frac{\sigma I_{\text{экс}}^{\text{норм}}(\lambda)}{\sigma I_{\text{раств}}^{\text{норм}}(\lambda) \times \sigma I_{\text{ген}}^{\text{норм}}(\lambda)},$$

где $\delta I(\lambda)$ - искомое значение эффективности в относительных единицах; $\sigma I_{\text{экс}}^{\text{норм}}(\lambda)$ - полученная экспериментально зависимость изменений фотонапряжений от длины волны лазерного фотолитического излучения, нормированная на максимум; $\sigma I_{\text{раств}}^{\text{норм}}(\lambda)$ - нормированный на максимум спектр поглощения раствора; $\sigma I_{\text{ген}}^{\text{норм}}(\lambda)$ - нормированная на максимум зависимость мощности генерации лазера от длины волны. Нормировки на поглощение кюветы не производилось в связи с отсутствием заметной спектральной зависимости поглощения в исследуемом диапазоне длин волн.

Результаты экспериментов и их обсуждение

Регистрация спектров поглощения образцов раствора в течение различных промежутков времени с момента приготовления показала, что раствор, насыщенный в темноте, можно считать стабильным в течение часа. Этому отвечает тот факт, что в спектре поглощения максимум полосы Core приходится на 420 нм, максимумы α - и β -полос соответствуют 570 нм и 540 нм, что четко согласуется с данными по поглощению HbCO [10], [11]. Здесь также присутствует размытая полоса с максимумом на 555 нм, отвечающая дезокси-гемоглобину [10], [11]. Таким образом, раствор является двухкомпонентным. Это замечание в данном случае, вообще говоря, важно, так как наблюдение увеличения оптической плотности раствора на 435 нм отвечает увеличению концентрации deoxyHb . В свою очередь концентрация deoxyHb однозначно обратно пропорциональна содержанию HbCO лишь при условии, что раствор двухкомпонентный. Спустя час в спектре проявлялись изменения, свидетельствующие о возникновении metHb в растворе. Максимум полосы Core сдвигался в коротковолновую область, а также становилась видной характерная для met -формы полоса с максимумом около 500 нм. Таким образом, длительно пребывающий на воздухе раствор в связи с окислением гема уже нельзя было считать двухкомпонентным. Происходило это, очевидно, по причине ограниченной продолжительности действия дитионита натрия. Однако увеличение содержания этого компонента в растворе не производилось, так как могло привести к изменению уровня pH и устойчивости тетрамеров [12],[13]. Поэтому в исследованиях использовали образцы только что приготовленных растворов при комнатной температуре.

Предварительное облучение растворов, не насыщенных CO , не изменяло их оптической плотности. Данный факт позволяет судить о том, что изменение сигнала при облучении растворов, насыщенных CO , напрямую связано с присутствием в растворе карбоксигемоглобина. Также изменений оптической плотности не замечено при облучении насыщенных растворов He-Ne лазером (633 нм) с плотностью мощности 10 мВт/см².

Как заявлено выше, наибольшие изменения сигнала с ФЭУ возникают при наблюдении диссоциации в данном растворе на 435 нм и при концентрации HbCO в растворе, близкой к 50 % [8]. Данный факт подтверждается зависимостью, показанной на рис. 2.

Видно, что увеличение степени насыщения раствора карбокси-формой Hb от 57 до 88 % уменьшает изменение уровня фотонапряжения примерно в шесть раз. Кроме того, показано, что при средней плотности мощности падающего фотолизирующего излучения не выше 45 мВт/см² насыщения эффективности реакции диссоциации не происходит. Таким образом, можно быть уверенными в точности результатов и при использовании лазера на красителях, средняя плотность мощности излучения которого не превышает 5 мВт/см².

Полученные экспериментально значения изменений пропускания растворов с разной степенью насыщения HbCO в зависимости от длины волны фотолизирующего излучения последовательно нормировались на относительный спектр поглощения растворов в данной области, а также на относительный спектр мощности генерации перестраиваемого лазера ЛКИ-301.

В результате после сведения полученных зависимостей на одну шкалу длин волн и приведения к общему максимуму получили искомую зависимость относительной эффективности фотодиссоциации HbCO в буферном растворе цельной человеческой крови (рис.3).

Видно наличие максимума эффективности реакции, который соответствует пику α -полосы спектра поглощения HbCO . Данный факт наталкивает на мысль о том, что главенствующую роль в описании такого характера полученной зависимости можно отдать полученному Dunietz et. al механизму диссоциации. То

есть, коль скоро Q-переход в системе Fe – CO является пусковым моментом диссоциации, резонно, что и эффективность реакции в целом будет наибольшей при данной длине волны фотолизирующего излучения.

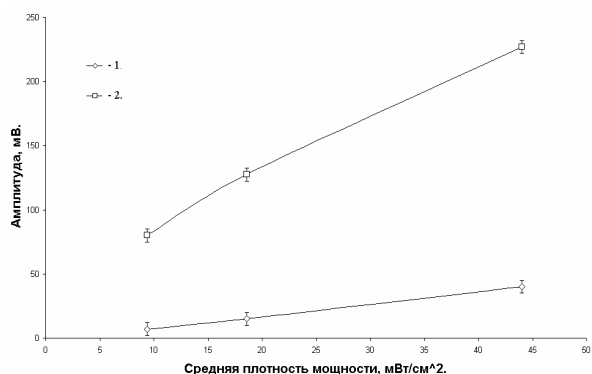


Рис. 2. Зависимость обратного изменения уровня фотонапряжения от средней плотности мощности фотолизирующего излучения ($\lambda=533$ нм) при концентрациях HbCO в растворе: 1 – 88 %, 2 – 57 %

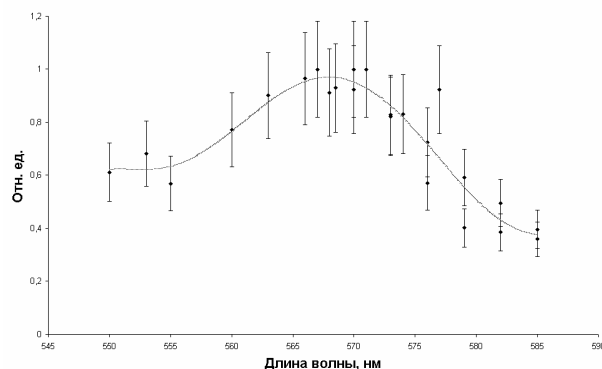


Рис. 3. Зависимость относительной эффективности фотодиссоциации комплекса HbCO от длины волны фотолизирующего излучения

Обратимся к рис. 4, базирующемуся на выводах работы [5]. В основном состоянии (GS) атомарной группы Fe-CO связывающая ВЗМО образована в результате смешения связывающей π -орбитали порфиринового кольца и гибридной пары из разрыхляющей внешней π -орбитали CO и d_z^2 - орбитали атома Fe. Первым после основного устойчивым состоянием группы Fe-CO считается так называемое Q-состояние (HBMО). В нем связь атомов поддерживается лишь смещением ($\pi^*_{CO-d_{Fe}}$), так как при поглощении энергии с длиной волны 570 нм электрон π_{por} -орбитали переходит на π^* -орбиталь порфирина и не участвует в связи с центральным атомом Fe. Происходит так называемый перенос заряда Fe – Por [14]. В этом состоянии равновесное расстояние Fe – CO немного увеличивается. После этого система Fe-CO может безызлучательно перейти в неустойчивое состояние (RS), в котором гибридная ($\pi^*_{CO-d_{Fe}}$)–молекулярная орбиталь уже разрыхляющая. Однако перекрещивание потенциальных кривых электронных состояний QS и RS приходится на расстояние Fe – CO примерно 1,96 ангстрем. Преодоление этого барьера высотой 0,2 эВ происходит благодаря колебаниям связи с частотой 480 см^{-1} , то есть согласно [14] спустя примерно 50 фс после Q-перехода. Затем атомы расходятся.

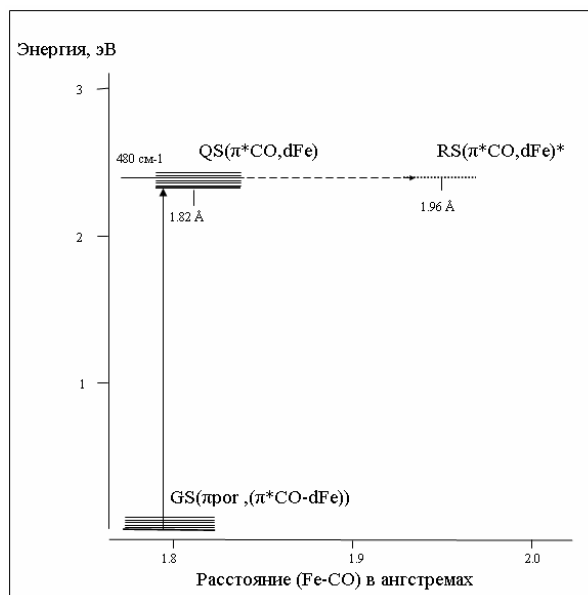


Рис. 4. Энергетическая схема начального этапа диссоциации комплекса гем-СО (по результатам работы Dunitz et. all). На рисунке обозначены состояния: GS – основное (ground), QS – первое возбужденное, RS – неустойчивое (repulsive). Снизу от “дна” электронного состояния показано равновесное расстояние (Fe-CO), соответствующее нулевому колебательно-вращательному подсостоянию

Очевидно, что вероятность диссоциации напрямую связана с вероятностью заселения Q-состояния, то есть с вероятностью Q-перехода. В свою очередь, вероятность этого перехода напрямую зависит от населенности нижнего электронно-колебательного состояния системы.

Известно, что в спектре гема отсутствует вращательная структура. Колебательные движения также сложны настолько, что в бесструктурных полосах электронного поглощения не разрешаются. Однако сегодня четко показаны характерные движения отдельных групп в комплексе, в том числе и связи Fe-CO [15]. 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. При этом расстояния между колебательными подуровнями у группы Fe-CO малы, но разрешены между собой.

Понятно, что левее максимума кривой эффективности диссоциации (при меньших длинах волн) реакция возможна, так как 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 Nd:YAG - лазера (532 нм) [8], диссоциация возможна, очевидно, благодаря тому, что система обладает путями релаксации из вышележащих возбужденных состояний в Q-состояние. Это означает, что, например, поглощение в области полосы Core, отвечающее чисто порфириновому $\pi - \pi^*$ переходу, приводит к такому изменению геометрии электронной плотности в комплексе, что возможным становится процесс переноса заряда с Fe на порфирин [14], и система может перейти в Q-состояние.

Допустим, что распределение населенностей по колебательным подуровням в простейшем случае больцмановское. Тогда правее максимума кривой эффективности, то есть при поглощенных энергиях ниже энергии чисто электронного перехода, вероятность заселения Q-состояния должна падать, так как с ростом энергии внутри данного электронного состояния (в нашем случае - G-состояния) уменьшается и населенность колебательных подсостояний при данной температуре. Вероятно, именно поэтому не удалось наблюдать диссоциацию комплекса при освещении раствора He-Ne лазером.

Такая картина должна наблюдаться лишь в том случае, когда температура системы ненулевая. При нуле температур в основном состоянии заселенным будет лишь нижний колебательный подуровень. Значит, возможным будет только чисто электронный Q-переход при поглощении света с длиной волны не больше 570 нм.

Наконец, максимум кривой зависимости эффективности диссоциации от длины волны поглощенного света практически соответствует энергии Q-перехода, как и ожидалось. То есть чисто электронный переход обеспечивает максимально эффективную диссоциацию, очевидно, в связи с высокой населенностью нижних колебательных подуровней основного электронного состояния системы Fe-CO.

В целом можно заключить следующее. В области длин волн 550 – 585 нм зависимость эффективности импульсного фотолиза HbCO в буферном растворе человеческой крови от длины волны имеет форму широкого колокола. Максимум эффективности соответствует электронному Q-переходу в комплексе на 570 нм. При данных условиях эксперимента диссоциация комплекса не наблюдалась при облучении растворов фотолизирующим излучением с длиной волны большей, чем 585 нм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Raub J.A. Carbon monoxide poisoning – a public health perspective/ J.A.Raub, M.Mathieu-Nolf, N.B.Hampson, S.R.Thom // *Toxicology*. - 2000. - V. 145. - №1. – P. 1-14.
2. Townsend C.L. Effect on health of prolonged exposure to low concentration of carbon monoxide/ C.L.Townsend, R.L.Maynard // *Occupational and Environmental Medicine*. – 2002. - V. 59. – P. 708-711.
3. Thom S.R. Hyperbaric-oxygen therapy for acute carbon monoxide poisoning// *NEJM*. - 2002. – V. 347. - №14. – P. 1105-1106.
4. Provorov A.S. Laser detoxication of acute poisonings with carbon monoxide/ A.S.Provorov, V.V.Salmin, E.Yu.Stavitskaya, A.B.Egorova// *Proc. SPIE*. – 2001. - V.4749. - P. 245-248.
5. Duniets B.D. Initial step of the photodissociation of the CO ligated heme group/ B.D.Duniets, A.Drew, M.Head-Gordon // *J. Phys. Chem. B*. – 2003. – V. 107. - P 5623-5629.
6. Jensen P.K. How O₂ binds to heme/ P.K.Jensen, U.Ryde // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – V. 279. - №15. – P. 14561-14569.
7. Sono M. Effects of Chemical Modifications of Heme on Kinetics of Carbon Monoxide Binding to Free Heme/ M.Sono, J.A.McCray // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1977. – V. 252. - №21. – P. 7475-7482.
8. Kuzmin V.V. Study of carboxyhemoglobin photodissociation with laser flash-fotolysis/ V.V.Kuzmin, V.V.Salmin, A.B.Salmina // *Proc. SPIE*. – 2004. - V. 5474. – P. 88-95.
9. Букина Л.П. Спектрофотометрическое определение карбоксигемоглобина/ Л.П.Букина, Л.И.Ушакова // *Судебно – медицинская экспертиза*. – 1979. – V. 12. - №2. – P. 39-42.
10. Рьльков В.В. Фотопревращения форм гемоглобина в буферных растворах под действием УФ и видимого излучений/ В.В.Рьльков, М.Ю.Тарасьев // *Биохимия*. – 1991. – Т. 56. - № 2. – С. 273-279.

11. Рыльков В.В. Особенности фотохимических свойств гемоглобина в нативных условиях/ В.В.Рыльков, М.Ю.Тарасьев // Биохимия. – 1991. – Т. 56. - №7. – С. 1296-1302.
12. Andersen M.E. The kinetics of ligand binding and of the association-dissociation reactions of human hemoglobin/ M.E.Andersen, J.K.Moffat, Q.H.Gibson // The Journal of Biological Chemistry. - 1971. – V. 246. - №9. – P. 2796-2807.
13. Barksdale A.D. Thermodynamic characterization of subunit association in liganded ferrohemeoglobin/ A.D.Barksdale, A.Rosenberg // The Journal of Biological Chemistry. – 1978. – V. 253. - №14. – P. 4881-4885.
14. Franzen S. Heme Photolysis Occurs by Ultrafast Excited State Metal to ring Charge Transfer/ S.Franzen, L.Kiger, C.Poyart // Biophysical Journal. – 2001. – V. 80. – P. 2327-2385.
15. Rovira C. The structure and dynamics of the Fe–CO bond in myoglobin/ C.Rovira // J. Phys.: Condens. Matter. – 2003. – V. 15. – P. 1809–1822.

STUDY OF CARBOXYHEMOGLOBIN PHOTODISSOCIATION EFFICIENCY DEPENDENCE ON WAVELENGTH OF PHOTOLIZING RADIATION

**V. V. Kuzmin, V. V. Salmin,
A. B. Salmina, A. S. Provorov**

Dependence of carboxyhemoglobin photodissociation efficiency on photolyzing light wavelength has been performed by flash - photolysis in buffered solutions of whole human peripheral blood. Photodissociation was registered on the experimental setup with crossing beams within the region of laser photolizing light wavelengths 550 – 585 nm. The shape of obtained dependence was found to be wide bell with maximum near to 570 nm. Qualitative explanation of experimental dependence was based on results of Franzen et al. and Dunitz et. al. According to them maximum of dissociation efficiency proves by so-called Q-transition at 570 nm. As result of $\pi - \pi^$ - transition with Fe – Por charge transfer and subsequent vibrational enlargement of Fe – CO bond changes in geometry of electron density represent rebuilding of HUMO of Fe – CO system from back – bonding to anti – bonding. Decreasing of dissociation efficiency at both sides of maximum connects, probably, with typical for that system distribution of population on vibrational subtotals within ground electron state.*