



УДК 612.015.3:577.344.3

© 1992 г.

С. Ю. Егоров, Е. Г. Курелла, А. А. Болдырев,
А. А. Красновский, мл.

ТУШЕНИЕ СИНГЛЕТНОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА КАРНОЗИНОМ И АНЗЕРИНОМ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет

Тушение синглетного молекулярного кислорода ($^1\text{O}_2$) в водном растворе гистидина или его дипептидных производных — анзерина, карнозина, эрготионеина, исследовано с помощью регистрации собственной люминесценции $^1\text{O}_2$, сенсibilизируемой импульсным лазером. Константы скорости тушения $^1\text{O}_2$ указанными соединениями варьировали в пределах $(2-4) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ и оказались близкими по значению к аналогичной константе имидазола. По-видимому, дезактивация $^1\text{O}_2$ исследованными веществами обусловлена главным образом имидазольной группой, входящей в их состав.

Возбужденные молекулы кислорода в синглетном ($^1\Delta_g$) состоянии ($^1\text{O}_2$) относятся к наиболее вероятным инициаторам фотосенсibilизированного окисления органических компонентов химических и биологических систем, приводящего к нарушению жизнедеятельности и деструкции клеток и тканей [1]. Известно, что биологически активные гистидинсодержащие соединения карнозин и анзерин способны устранять мышечное утомление, защищать клеточные мембраны от разнообразных повреждений и проявлять антиоксидантную активность [2, 3]. Как было показано ранее, эти соединения эффективно тушат синглетный кислород, супероксид-радикал и активный гидроксил, что, по-видимому, играет ключевую роль в антиоксидантной активности указанных соединений [4-7].

Ранее для оценки эффективности тушения $^1\text{O}_2$ карнозином и анзерином использовались главным образом косвенные методы с применением химических акцепторов $^1\text{O}_2$ [5, 8-10]. Известно, что химические методы регистрации $^1\text{O}_2$ недостаточно надежны [1]. В настоящей работе проведено измерение констант скоростей тушения $^1\text{O}_2$ (K_q) в водной среде карнозином и анзерином, а также другими имидазолсодержащими соединениями прямым люминесцентным методом детектирования синглетного кислорода. Этот метод позволяет регистрировать $^1\text{O}_2$ по его собственной характерной люминесценции с максимумом 1270 нм и дает возможность непосредственного анализа кинетических параметров $^1\text{O}_2$ в исследуемой системе [11-13].

При освещении исследуемых водных растворов регистрировали люминесценцию с максимумом при 1270 ± 3 нм, соответствующую флуоресценции, сопровождающей излучательную дезактивацию возбужденных молекул $^1\text{O}_2$ (рис. 1) [11]. Кинетические кривые усредняли по сериям (1 на 100 тыс. лазерных вспышек). Время жизни люминесценции синглетного кислорода (τ_Δ) растворов карбоксиантрацена в D_2O соответствовало ~ 55 мкс. При добавлении исследуемых соединений к раствору фотосенсibilизатора наблюдали сокращение величины τ_Δ . Эксперименты показали, что зависимость τ_Δ^{-1} от концентрации тушителя (c_q) хорошо аппроксимируется прямой (рис. 2). Это позволяет применить для описания процесса

* Работа выполнена в Институте биохимии им. А. Н. Баха АН СССР при финансовой поддержке программы «Лазерные системы».

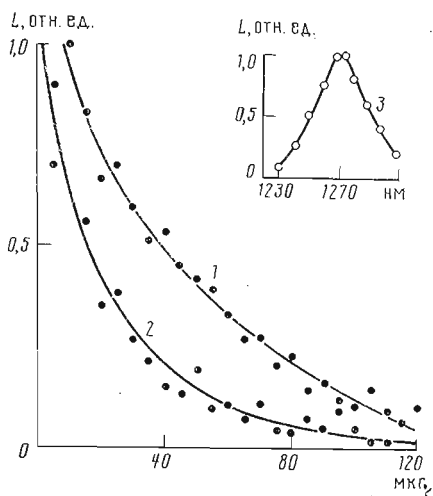


Рис. 1

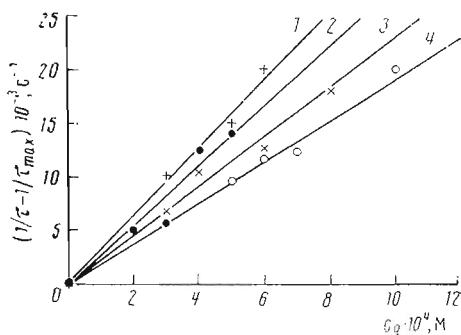


Рис. 2

Рис. 1. Кинетика затухания (1, 2) и спектр люминесценции (L) синглетного кислорода (3) в D_2O . 1, 3 – в фосфатном буфере без тушителей, 2 – в присутствии $5 \cdot 10^{-4}$ М карнозина. Сенсibilизатор – карбоксиантрацен

Рис. 2. Тушение люминесценции синглетного кислорода в D_2O карнозином (1), анзерином (2), гистидином (3) и имидазолом (4). Символами обозначены экспериментально полученные значения, прямые соответствуют усредненным значениям K_q для соответствующих тушителей. Сенсibilизатор – карбоксиантрацен

тушения 1O_2 уравнение Штерна-Фольмера:

$$\frac{\tau_{\Delta}^0}{\tau_{\Delta}} = K_q c_q \tau_{\Delta}^0 + 1,$$

где K_q – суммарная константа скорости тушения 1O_2 , τ_{Δ}^0 и τ_{Δ} – время жизни 1O_2 в растворе, не содержащем или содержащем соответствующие тушители. Найденные значения K_q для исследуемых соединений приведены в таблице. Эти данные подтверждают отсутствие существенных различий в значениях констант тушения для всех перечисленных соединений. Те различия в активностях карнозина и гистидина, которые были отмечены ранее в работе Дала с соавт. [5], нами не были обнаружены: значения K_q для производных имидазола в среднем близки величине аналогичной константы собственно имидазола. Это согласуется с предположением, что способность имидазолсодержащих биологически активных соединений тушить 1O_2 определяется главным образом свойствами входящего в их состав имидазола.

В других экспериментальных моделях исследуемые соединения проявляют неодинаковую антиоксидантную активность – так, гистидин не препятствует накоплению молекулярных продуктов перекисного окисления липидов [2], а имидазол, в отличие от дипептидов, весьма кратковременно увеличивает сократительную активность мышц [4]. Это предполагает,

Константы скорости тушения 1O_2 гистидином, имидазолом и их производными

Соединение	$K_q \cdot 10^{-7},$ $M^{-1} \cdot c^{-1}$	Соединение	$K_q \cdot 10^{-7},$ $M^{-1} \cdot c^{-1}$
Гистидин	4 ± 1	Анзерин	3 ± 1
Карнозин	3 ± 1	Эрготинонепн	2 ± 1
		Имидазол	2 ± 1

что биологическое значение дипептидов не исчерпывается продемонстрированной нами способностью нейтрализовать активные формы кислорода.

Экспериментальная часть

Люминесценцию $^1\text{O}_2$ возбуждали наносекундными импульсами азотного лазера ЛГИ-21 (длина волны 337,1 нм) и регистрировали через монохроматор МС-80 (ЦКБ АМН СССР) в области 1270 нм с помощью охлаждаемого жидким азотом до -60°C фотоумножителя ФЭУ-83 и многоканального анализатора NTA-1024 (Венгрия). Время жизни $^1\text{O}_2$ (τ_Δ) определяли из анализа кинетики затухания люминесценции синглетного кислорода после лазерной вспышки, что позволяло регистрировать кинетику свечения $^1\text{O}_2$ с временем жизни больше 0,5 мкс [12–13].

Измерения проводили в насыщенном воздухом 30 мМ фосфатном буфере (рН 7), приготовленном на D_2O (степень дейтерирования $\sim 99\%$, производство ЛМК В/О «Изотоп»). Применение D_2O позволило существенно повысить точность определения констант скорости тушения $^1\text{O}_2$ из-за ~ 20 -кратного увеличения τ_Δ в этой среде по сравнению с аналогичным значением в H_2O . В качестве фотосенсибилизатора использовали растворы карбоксиантрацена с оптической плотностью 0,3–0,4 при длине волны излучения лазера. Пробы, содержащие тушители в концентрации (10^{-3} – 10^{-5} М), подвергали облучению не более чем 20 000 вспышками лазера, что приводило к уменьшению исходной оптической плотности не более чем на 10%.

В качестве тушителей исследовали *L*-анзерин (β -аланил-3-метил-*L*-гистидин), *L*-карнозин (β -аланил-*L*-гистидин), эрготионеин (2-тиол-*L*-гистидин-бетаин), имидазол, *L*-гистидин фирмы Sigma Chemical Co. В ряде опытов использовали препаративный карнозин (чистота 99,5%, з. Медпрепаратов, Ленинград).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Foote C. S. // Singlet Oxygen/Eds H. H. Wasserman, R. W. Murray. N. Y.: Acad. Press, 1979. P. 139.
2. Boldyrev A. A., Severin S. E. // Adv. Enz. Reg. 1990. V. 30. P. 175–193.
3. Болдырев А. А. Биохимические аспекты электрохимического сопряжения. М.: МГУ, 1977.
4. Kohen R., Yamamoto J., Candy H. C., Ames R. N. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 86. P. 3175–3179.
5. Dahl T. A., Midden W. R., Hartman P. E. // Photochem. and Photobiol. 1988. V. 47. № 3. P. 357–362.
6. Hartman P. E., Hartman Z., Ault K. T. // Photochem. and Photobiol. 1990. V. 51. № 1. P. 59–66.
7. Павлов А. Р. и др. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1990. Т. 108. С. 391.
8. Lindig B. A., Rodgers M. A. J. // Photochem. and Photobiol. 1981. V. 33. № 5. P. 627–634.
9. Rougee M., Bensasson R. V. // C. r. Acad. sci. 1986. Ser. II. V. 302. P. 1223–1229.
10. Rougee M. e. a. // Photochem. and Photobiol. 1986. V. 47. P. 485–491.
11. Krasnovsky A. A., Jr. // Photochem. and Photobiol. 1979. V. 29. P. 29–36.
12. Егоров С. Ю., Краснооский А. А. (мл.) // Биофизика. 1983. Т. 28. С. 497–498.
13. Krasnovsky A. A. e. a. // Studia Biophys. 1988. V. 124. P. 123–142.

Поступила в редакцию 18.VI.1991

S. Yu. EGOROV, E. G. KURELLA, A. A. BOLDYREV, A. A. KRASNOVSKY (Jr).

THE QUENCHING OF SINGLET MOLECULAR OXYGEN BY CARNOSINE AND ANSERINE IN AQUEOUS SOLUTION

Department of Biology, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Quenching of singlet ($^1\Delta_g$) molecular oxygen by histidine and its derivatives – carnosine, anserine and ergothioneine as well as by imidazole has been studied via $^1\text{O}_2$ self-emission sensitized by pulsed laser excitation of pigment in aqueous solution. The rate constants of $^1\text{O}_2$ quenching by compounds tested were of the same order of magnitude and varied in the range of $(2\text{--}4)\cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. It is therefore the imidazole ring of the substances tested that is largely responsible for $^1\text{O}_2$ quenching.