



УДК 547.466+577.33/44

ИНИЦИАЦИЯ СВЕРХСЛАБЫМ УФ-ОБЛУЧЕНИЕМ ИЛИ ПЕРЕКИСЬЮ ВОДОРОДА ВЫРОЖДЕННО-РАЗВЕТВЛЕННОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЕЗАМИНИРОВАНИЯ ГЛИЦИНА

© 1996 г. В. Л. Воейков[#], И. В. Баскаков*, К. Кафкалиас, В. И. Налетов*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119899, Москва, Воробьевы горы;***Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

Поступила в редакцию 24.04.95 г.

Кратковременное облучение сверхслабым источником УФ-фотонов водного раствора глицина инициирует в нем процесс, сопровождающийся накоплением ионов аммония. Более интенсивный процесс дезаминирования развивается в водном растворе глицина в присутствии H_2O_2 . При этом кинетика накопления аммиака совпадает с кинетикой нарастания люминесценции, регистрируемой в присутствии люминофора бромистого этидия или тирозина. К моменту затухания процесса в системе расходуется менее 5% глицина. На начальном этапе реакции концентрация H_2O_2 в растворе достоверно увеличивается по сравнению с исходной, но затем начинает снижаться. Увеличение концентрации люминофора выше оптимальной приводит к замедлению нарастания скорости реакции и уменьшению выхода аммиака. Высказано предположение, что УФ-фотоны или H_2O_2 инициируют вырожденно-разветвленную цепную реакцию дезаминирования глицина.

Ключевые слова: дезаминирование, аммиак, глицин, хемиллюминесценция, цепная разветвляющаяся реакция, сверхслабое УФ-излучение.

Ранее [1] нами было показано, что в водных растворах глицина и ряда α -L-аминокислот в присутствии H_2O_2 развивается процесс, сопровождающийся люминесценцией добавляемого в систему бромистого этидия. Кинетика излучения была характерна для разветвленных цепных реакций: наблюдались индукционный период; фаза автоускорения, описываемая экспоненциальной функцией; критические параметры для развития реакции (объем реакционной смеси и концентрация аминокислоты); скорость реакции зависела от отношения объема реакционной смеси к площади поверхности сосуда [1]. Температурная зависимость скорости реакции, представленная в координатах Аррениуса, была нелинейна. При циклических изменениях температуры наблюдался гистерезис [2]. Было высказано предположение, что в данной реакционной системе H_2O_2 выступает в роли инициатора разветвленной цепной реакции, при которой происходит окислительное дезаминирование аминокислоты.

Сходные реакции были описаны А.Г. Гурвичем, который показал, что кратковременное (секунды – десятки секунд) облучение водных рас-

творов глицина УФ-светом с интенсивностью, не превышающей сотен фотонов/с, инициирует развитие процесса, обладающего свойствами цепной реакции [3 - 5]. Через 20 - 30 мин после облучения растворы сами начинали излучать УФ-свет сверхслабой интенсивности, регистрируемый с использованием разработанного А.Г. Гурвичем биотеста, в основе которого лежала способность такого излучения стимулировать клеточное деление. Было установлено, что в растворе образуется субстанция, по-видимому, полипептидной природы, катализирующая окислительное дезаминирование аминокислоты, и что именно этот процесс сопровождается УФ-излучением. Однако эти исследования не нашли продолжения, за исключением двух более поздних сообщений из лаборатории А.А. Гурвич [6, 7], которая показала, что раствор глицина после кратковременного облучения ртутной лампой с сильно ослабленной интенсивностью светового потока приобретает способность излучать УФ-свет, детектируемый с использованием фотоэлектронного умножителя [6]. Кроме того, они сообщили, что после введения в него перекиси водорода раствор глицина в течение нескольких часов излучает УФ-свет очень низкой интенсивности [7]. По мнению авторов, излучение

[#] Автор для переписки.

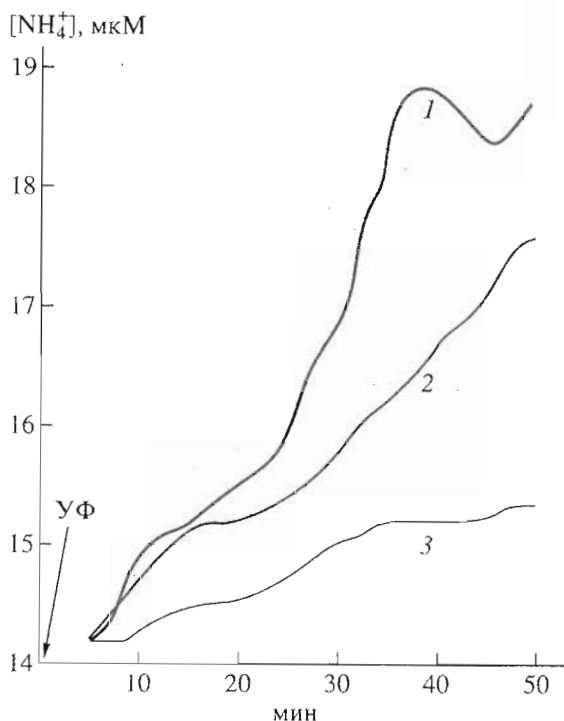


Рис. 1. Кинетика накопления ионов аммония в водных растворах глицина: 1 – УФ-облучение (1 мин) и инкубация при последующем освещении лампой накаливания; 2 – контроль (то же, но без УФ-облучения); 3 – УФ-облучение и инкубация в темноте.

было связано с развитием в обеих реакционных системах процесса окислительного дезаминирования глицина, хотя это предположение не было подтверждено.

Целью настоящей работы было выяснение того, действительно ли сверхслабый УФ-свет инициирует в растворе глицина процесс дезаминирования, а также изучение химических превращений в растворе глицина после введения в него H_2O_2 .

После кратковременного облучения источником сверхслабого УФ-света (реактив Фентона,

см. “Экспериментальную часть”) свежеприготовленного раствора глицина в нем происходит накопление аммиака, регистрируемое как с использованием реактива Несслера, так и с помощью аммоний-селективного электрода (табл. 1). В первом случае пересчета значений оптической плотности в значения концентрации не проводили, поскольку столь низкие значения оптической плотности лежали вне линейной части калибровочной кривой для аммиака, полученной ранее. Относительные изменения оптической плотности, указывающие на достоверное увеличение концентрации аммиака, наблюдались как в необлученном контроле, так и в облученных пробах. Аналогичные результаты были получены и с использованием NH_4^+ -селективного электрода. В этом случае расчет абсолютных концентраций аммония был возможен, так как линейная шкала показаний, получаемых с электрода, начинается при 10^{-5} М NH_4^+ . Данные обоих методов свидетельствуют, что через 30 мин после начала эксперимента концентрация аммиака в облученных пробах с высокой степенью достоверности превышает его концентрацию в необлученных пробах.

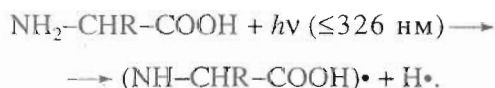
Из кинетических кривых (рис. 1) и табл. 1 видно, что в не инициированных УФ-облучением образцах концентрация аммиака также увеличивается, но существенно медленнее, чем в облученных (кривая 2). Если же облученные образцы инкубировали в темноте, концентрация аммиака в них менялась очень слабо (кривая 3). Концентрация аммиака не изменялась по сравнению с начальным уровнем лишь в необлученных образцах, инкубируемых в темноте и защищенных от внешних воздействий свинцовыми экранами. Полученные результаты подтверждают предположение о том, что кратковременное облучение раствора глицина УФ-фотонами ускоряет развитие реакции дезаминирования, которая протекает и в необлученных образцах на видимом свете при неполном их экранировании, хотя и гораздо менее интенсивно.

Таблица 1. Влияние сверхслабого УФ-облучения на изменение концентрации аммиака в растворах глицина

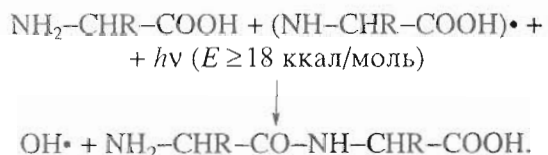
Методы измерения	Время после облучения, мин	Контроль (без облучения)	Опыт	<i>p</i>
Колориметрия (OE_{405})	До 5 мин*	0.043 ± 0.003	0.047 ± 0.004	>0.2
	30	0.052 ± 0.002	0.058 ± 0.003	<0.02
	50	0.055 ± 0.004	0.064 ± 0.004	<0.01
Потенциометрия ($[\text{NH}_4^+]$, мкМ)	30	16.5 ± 0.2	19.8 ± 0.7	<0.001
	50	19.5 ± 0.8	22.5 ± 1.1	<0.01

* Оптическое поглощение раствора Gly до облучения составляло $0.040 \pm 0.002 \text{ OE}_{405}$.

По расчетам А.Г. Гурвича, энергетического запрета для осуществления столь необычного процесса нет. Энергия УФ-фотона с длиной волны до 326 нм (≥ 88 ккал/моль) необходима для инициации процесса, заключающегося в разрыве связи Н-Н молекулы аминокислоты

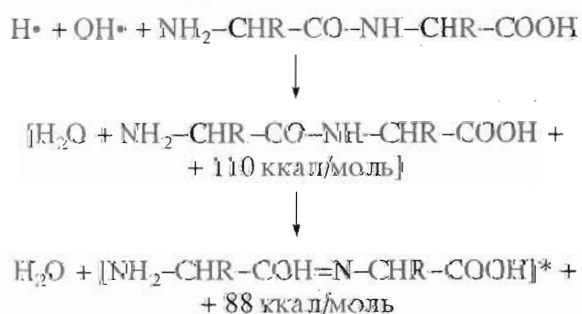


Энергия фотонов видимого света (не менее 18 ккал/моль) используется в качестве энергии активации в каждом цикле цепной реакции и необходима для продолжения цепного процесса



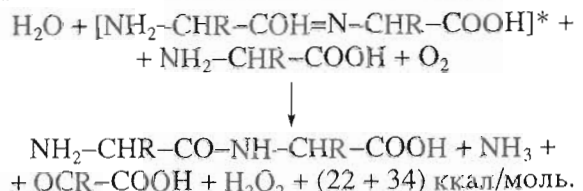
Гурвичем было показано [5], что если инициацию проводят в темноте, то процесс запускается только облучением фотонами с длиной волны ≤ 270 нм ($E \geq 106$ ккал/моль). В видимом свете верхняя граница длины волны иницирующих этот процесс фотонов увеличивается до 326 нм (88 ккал/моль). Было высказано предположение, что энергия, соответствующая разнице между УФ-фотонами, действующими в темноте и в видимом свете, используется в качестве энергии активации для замыкания пептидной связи между радикалом аминокислоты и молекулой другой аминокислоты, в результате чего освобождается радикал гидроксила. Поэтому при инициации реакции фотонами от света с длиной волны 270 - 326 нм требуется освещение видимым светом.

По завершении каждого цикла замыкания пептидной связи возможна рекомбинация атома водорода и радикала гидроксила, в результате чего освобождается 110 ккал/моль, что достаточно как для запуска следующего цикла, так и для перехода пептидной связи в имидольную форму (для этого необходимо затратить 22 ккал/моль [8]).



Имидольная форма пептидной связи обладает большей реактивностью, чем амидная, и, по предположению Гурвича, может проявлять некоторую дезаминазную активность, т.е. катализировать эк-

зотермическую реакцию окислительного дезаминирования аминокислоты ($\Delta H = -34$ ккал/моль) [5]:



Энергия, выделяемая при реакции окислительного дезаминирования, может использоваться для авторепродукции субстанции, обладающей каталитической активностью дезаминазы, что приводит к автокаталитическому ускорению процесса. Данный процесс сопровождается сверхслабым излучением УФ-фотонов. Показано, что во время ферментативных реакций окисления продуцируются в очень небольших количествах радикалы и атомы ($\text{OH}\cdot$, $\text{O}\cdot$, $\text{NH}\cdot$, $\text{HC=O}\cdot$ и др.), рекомбинация которых сопровождается выделением энергии, достаточной для возбуждения высокоэнергетичных электронных уровней продуктов рекомбинации, соответствующих энергиям УФ-фотонов [9]. Тем не менее вопрос о происхождении сверхслабого УФ-излучения из ферментативных систем пока остается открытым [10].

Все приведенные выше расчеты энергетического баланса предполагают, что выделяющаяся в процессе реакции энергия не переходит в кинетическую энергию молекул, а аккумулируется в виде энергии их электронного возбуждения. Такое явление возможно лишь в высокоупорядоченной системе. Как ранее нами было показано, подобными свойствами обладает реакционная система, представляющая собой водный раствор аминокислоты после введения в него H_2O_2 [1, 2]. Хотя на первый взгляд реакции, которые могут протекать в растворе аминокислоты в присутствии столь энергичного окислителя, как перекись водорода, должны иметь мало общего с процессами, инициируемыми в растворе глицина УФ-фотонами, представленные ниже результаты свидетельствуют о том, что между этими двумя процессами много общего.

Благодаря тому что в присутствии люминофора бромистого этидия в растворах аминокислот после введения в них H_2O_2 постепенно развивается хорошо детектируемая люминесценция [1, 2], было проведено сравнение кинетической кривой накопления аммиака с интегральной кривой хемилюминесценции раствора глицина после добавления в него H_2O_2 . Выяснилось, что скорость накопления аммиака не зависит от присутствия в растворе бромистого этидия, т.е. люминофор в используемой здесь концентрации (см. ниже) не влияет на ход дезаминирования (рис. 2). В присутствии бромистого этидия интенсивность излучения коррелирует со скоростью накопления аммиака: между накоплением аммиака и

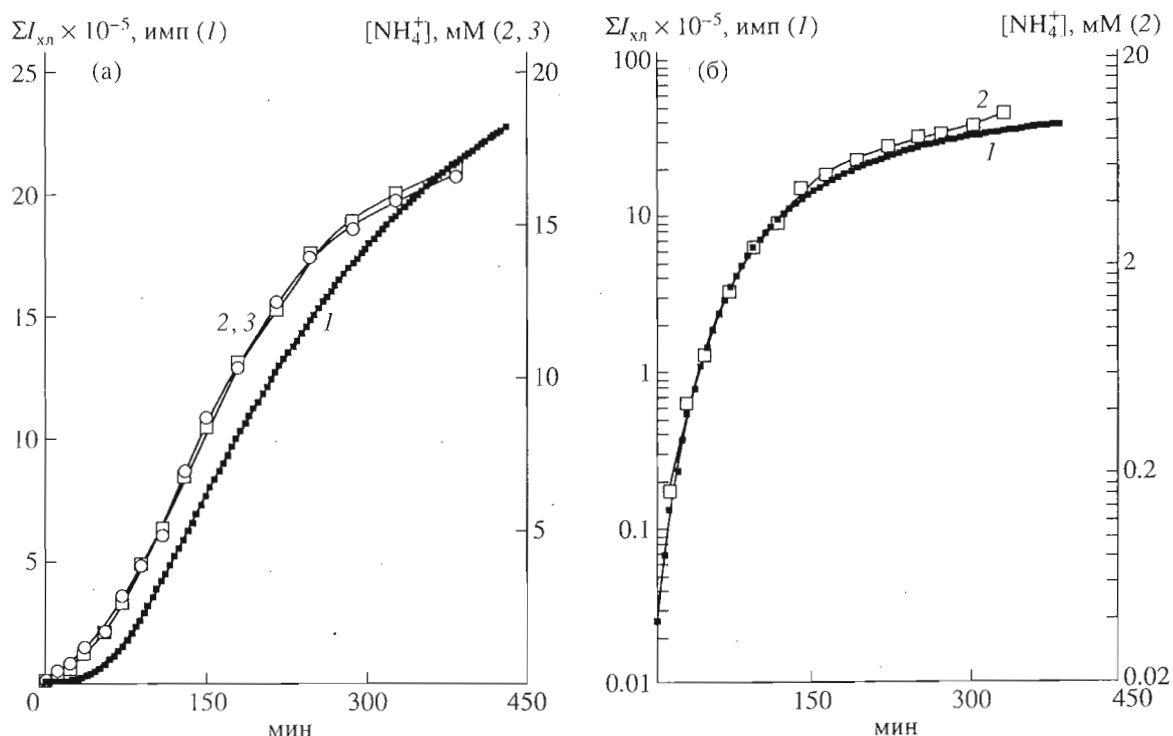


Рис. 2. Кинетика накопления аммиака в растворе 0.8 М глицина, 0.75 М перекиси водорода и 20 мкМ бромистого этидия (2) и интегральная кривая хемилюминесценции $\Sigma I_{\text{хл}}$ (1) в прямых (а) и полулогарифмических (б) координатах. Кривая 3 (а) – накопление аммиака в той же системе в отсутствие бромистого этидия.

количеством импульсов, суммированных с начального момента реакции, было обнаружено функциональное соответствие (рис. 2б), выражаемое соотношением

$$C = A(\Sigma I_{\text{хл}})^n, \quad (1)$$

где C – концентрация аммиака в данный момент времени, $\Sigma I_{\text{хл}}$ – сумма зарегистрированных к этому моменту времени импульсов, A – константа. Показатель n по результатам пяти экспериментов составлял 0.691 ± 0.055 . В каждом опыте коэффициент корреляции между величинами C и $\Sigma I_{\text{хл}}$ был не ниже 0.997. Таким образом, кинетика излучения в присутствии бромистого этидия отражает процесс накопления аммиака и позволяет

Таблица 2. Изменение концентрации глицина* и аммиака** в ходе реакции, инициируемой H_2O_2

Время, ч	Концентрация глицина, мМ		Концентрация аммиака, мМ
	А	Б	
0	800 ± 24	800 ± 34	0
4	787 ± 25	812 ± 24	6 ± 2
17	753 ± 28	806 ± 48	22 ± 2

* Определена методом ТСХ в системах растворителей А и Б (см. "Экспериментальную часть").

** Концентрацию аммиака определяли с использованием реактива Несслера.

точно следить за ходом процесса, развивающегося в растворе аминокислоты после введения в него H_2O_2 .

В присутствии H_2O_2 дезаминирование глицина идет интенсивнее, чем в процессе, инициированном внешним облучением. Если в первом случае прирост концентрации аммиака за все время измерения достигал 10 - 20 мМ, то во втором он составлял всего 3 - 5 мкМ. Однако кинетические закономерности этих двух процессов были сходными: в обоих случаях после инициирования реакции наблюдался индукционный период, затем она развивалась с ускорением до определенного максимума и затухала задолго до исчерпания субстрата дезаминирования. Проведенный нами ранее анализ кинетики излучения, сопровождающего реакцию после введения в раствор H_2O_2 [1], свидетельствует, что дезаминирование аминокислоты протекает по механизму цепной разветвленной реакции [11]. Весьма вероятно, что инициированное УФ-фотонами дезаминирование в растворах глицина в отсутствие добавленной перекиси водорода протекает по тому же кинетическому механизму.

Различие в концентрации глицина в реакционной смеси с H_2O_2 в начальный момент времени и по прошествии 17 ч нельзя определить достоверно, так как предложенный метод определения концентрации аминокислоты не позволяет

зафиксировать столь незначительные ее изменения в ходе процесса (табл. 2). Учитывая, что за это же время в реакционной смеси накапливается 22 ± 2 ммоль/л аммиака, можно предположить, что реакция дезаминирования, протекающая в водном растворе глицина в присутствии H_2O_2 , является доминирующим направлением превращения аминокислоты.

Таким образом, несмотря на высокое содержание H_2O_2 , в данной реакционной системе расходуется лишь незначительная часть аминокислоты. Сложившиеся представления о роли в биохимических процессах перекиси водорода, по-видимому, носят односторонний характер. В большинстве исследований H_2O_2 используется или выступает в роли сильного окислителя, которым она, конечно, является в присутствии пероксидаз или неорганических катализаторов ее распада [12]. В действительности функции H_2O_2 в химических реакциях могут быть чрезвычайно широки: она обладает как окислительными, так и восстановительными свойствами; способна инициировать высокоселективные реакции [13]; за счет энергии, выделяющейся при разложении H_2O_2 , могут протекать сопряженные реакции [14]. Например, показано, что разложение перекиси водорода сопряжено с реакцией синтеза глицина из формальдегида и гидроксилamina [15]. Было обнаружено, что при длительном облучении УФ-светом с максимумом излучения 253.7 нм раствора перекиси водорода и фенилаланина образуется строго ограниченный набор продуктов: Asp, Ser, Ala и Lys, причем снижения концентрации перекиси водорода не наблюдалось [16]. В последнее время появились свидетельства того, что H_2O_2 выступает в роли важного биорегулятора нормальных клеточных функций [17], а ее концентрация в клетке, приведенная к клеточной массе, может достигать 1.2 мМ (т.е. локальные концентрации могут быть существенно выше) [18].

Анализ изменения содержания H_2O_2 в растворе глицина обнаружил необычное явление. Через 5 - 20 мин после внесения перекиси водорода в раствор аминокислоты наблюдался прирост ее концентрации по сравнению с начальной. Прирост достигал максимума при переходе процесса в стадию экспоненциального роста интенсивности хемилюминесценции. В максимуме концентрация H_2O_2 достигала 105% от начальной, что соответствовало приросту в несколько десятков ммоль/л. По данным результатов пяти экспериментов, увеличение концентрации H_2O_2 по сравнению с исходной было достоверно ($p = 0.02$). Хотя механизм временного увеличения концентрации H_2O_2 пока неясен, сам этот факт не является необычным для разветвленных цепных реакций. Более того, он служит веским свидетельством в пользу того, что мы имеем дело с цепной реакцией с вырожденным разветвлением цепей [11].

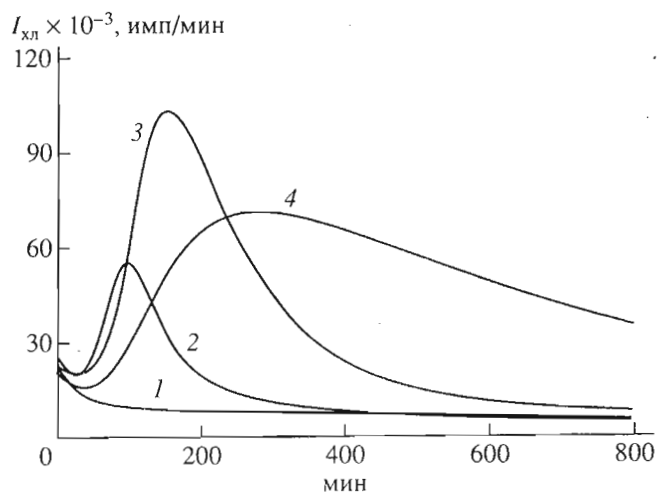


Рис. 3. Кинетика люминесценции растворов (0.8 М глицин с 0.75 М перекисью водорода) в присутствии тирозина в концентрациях 10 мкМ (2), 100 мкМ (3) и 1 мМ (4). 1 — контрольный образец без глицина, концентрация тирозина 100 мкМ. Кривые были получены в режиме счета одиночных фотонов.

Последующее снижение концентрации H_2O_2 по сравнению с исходной отмечалось в разных опытах не ранее чем через 3 - 4 ч после запуска реакции, когда интенсивность хемилюминесценции начинала снижаться. Следовательно, нарастающее дезаминирование аминокислоты не требует расхода H_2O_2 . Это позволяет предположить, что в данном процессе перекись водорода выступает в первую очередь в качестве инициатора процесса дезаминирования.

Излучение, сопровождающее дезаминирование глицина, можно наблюдать в присутствии других люминофоров помимо бромистого этидия, например в присутствии флуоресцирующих аминокислот (Tyr, Phe, Trp). Кинетика излучения в присутствии тирозина обнаруживает те же закономерности, что и в системе с бромистым этидием: имеется индукционный период, стадия экспоненциального роста интенсивности излучения, за которой следует затухание излучения (рис. 3). При этом абсолютные значения интенсивности излучения были существенно ниже. В контрольном эксперименте, когда H_2O_2 вводили в раствор тирозина, не содержащий глицина, увеличения излучения не наблюдалось. Это позволяет рассматривать ароматические аминокислоты в роли сенсibilизирующих люминофоров [19], а не в качестве участников реакции дезаминирования.

Люминесценция, сенсibilизированная различными люминофорами, используется для обнаружения электронвозбужденных состояний, генерируемых в процессе различных ферментативных и неферментативных реакций [19]. В основе данного явления лежат процессы безызлучательного переноса энергии с молекулы-донора на люминофор.

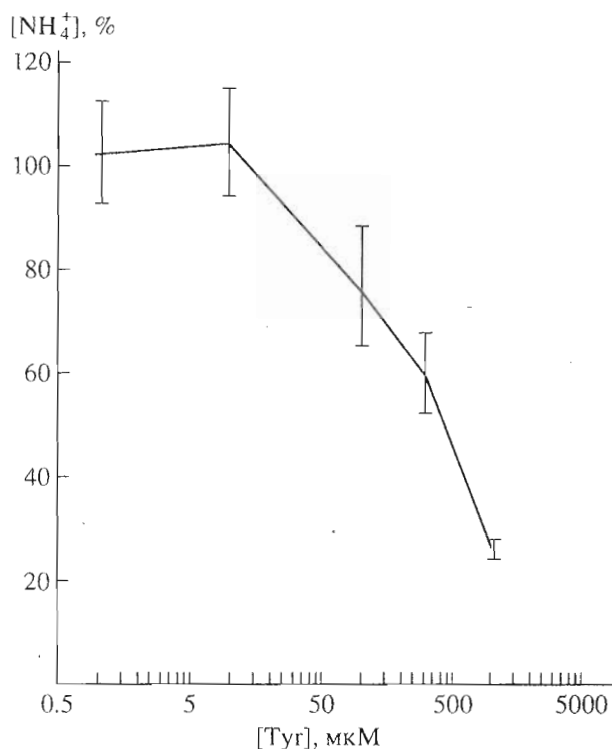


Рис. 4. Зависимость выхода аммиака, образующегося в течение 3 ч реакции в системе 0.8 М Gly, 0.75 М перекиси водорода от концентрации тирозина. Данные приведены в процентах относительно выхода аммиака в образце, не содержащем тирозина

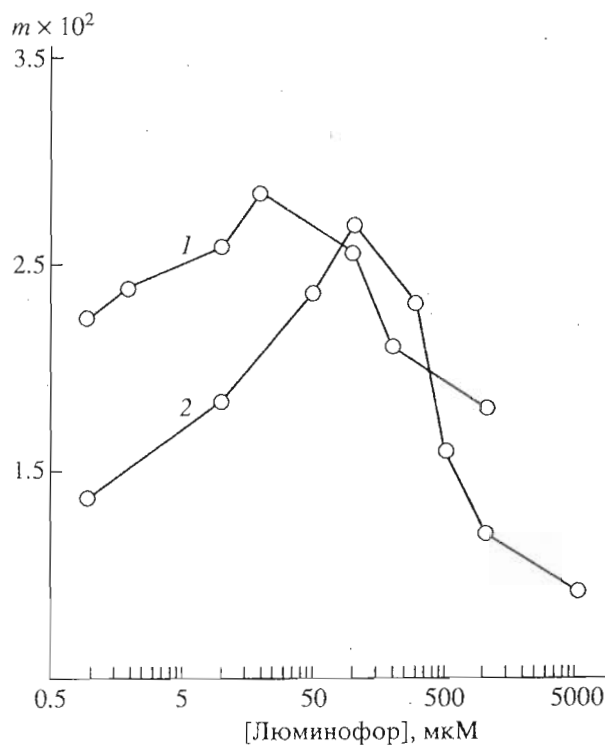


Рис. 5. Зависимость экспоненциального коэффициента m (уравнение 2; см. текст), определенного по кинетике люминесценции образцов, содержащих 0.8 М глицин и 0.75 М перекись водорода, от концентрации бромистого этидия (1) и тирозина (2).

Самый длинноволновый максимум поглощения тирозина – 274 нм, поэтому для его возбуждения необходима энергия не менее 105 ккал/моль. Очень часто в отсутствие люминофоров не удается обнаружить какого-либо превышения излучения над фоновым уровнем вследствие значительных эффектов тушения возбужденных состояний и/или утилизации энергии электронного возбуждения в сопряженных биохимических реакциях (“фотобиохимия без света”) [20]. Результаты нашей работы свидетельствуют, что освобождающаяся в ходе реакции энергия действительно превращается в энергию электронного возбуждения компонентов реакционной смеси, которая используется в качестве свободной энергии для продолжения и развития процесса. Если это так, то избыточное поглощение люминофорами энергии должно повлиять как на скорость реакции, так и на выход продукта, причем этот эффект должен максимально проявляться на первой стадии реакции – стадии автоускорения, когда увеличение скорости реакции (V), как было показано ранее [1], описывается экспоненциальной функцией

$$V = Ve^{mt}, \quad (2)$$

где V – константа, а экспоненциальный коэффициент m отражает ускорение реакции, обуслов-

ленное размножением активных центров. Действительно, как следует из рис. 4, увеличение концентрации тирозина выше 10 мкМ приводит к снижению концентрации аммиака, нарабатываемого в системе через 3 ч после инициирования. Увеличение концентраций бромистого этидия выше 20 мкМ и тирозина выше 100 мкМ приводит к снижению значений m (рис. 5). Таким образом, торможение развития процесса столь разными по химической структуре люминофорами в концентрациях, превышающих оптимальные, указывает на существенную роль высокоэнергетических электронно-возбужденных состояний продуктов реакции в развитии процесса. При концентрациях люминофоров ниже оптимальных интенсивность излучения и значение параметра m также уменьшаются. Например, максимум излучения при концентрации тирозина 10 мкМ ниже, чем при его концентрации 100 мкМ, а интенсивность излучения начинает снижаться существенно раньше (рис. 3). Аналогично изменялся ход кривых излучения и в присутствии бромистого этидия при его концентрациях менее 20 мкМ. В этом диапазоне их концентраций кинетика излучения уже не отражает кинетики дезаминирования (рис. 4). В процессе реакции люминофоры подвергаются деструкции [21], скорость которой

тем больше, чем интенсивнее протекает основная реакция, что было показано по уменьшению максимума поглощения соответствующих люминофоров (данные не приведены). Поэтому при слишком низкой их концентрации излучательная способность реакционной системы быстро снижается, что приводит к заниженной регистрации максимальной интенсивности и продолжительности процесса. Последнее можно было проверить, внося бромистый этидий в реакционную смесь в разные моменты после инициирования реакции (рис. 6). Во всех образцах H_2O_2 вносили в раствор глицина в $t = 0$, а бромистый этидий – в моменты времени, указанные стрелками. Из сопоставления кинетических кривых можно сделать два существенных вывода. Во-первых, чем позднее бромистый этидий вносили в реакционную систему, тем далее от нулевой точки сдвигалась нисходящая ветвь кинетической кривой. Во-вторых, излучение из системы в случае внесения в нее бромистого этидия после инициирования реакции достигает максимальной для данного этапа процесса интенсивности не сразу. Такое явление можно объяснить постепенным увеличением квантового выхода сенсibilизированной люминесценции.

Полученные результаты указывают на то, что реакционную систему, в которой наблюдается инициированное H_2O_2 дезаминирование Gly, нельзя рассматривать как обычный водный раствор с высоким окислительным потенциалом, в котором происходят независимые и достаточно редкие статистические акты окисления аминокислоты. Напротив, в совокупности данные свидетельствуют, что инициированный УФ-фотонами или перекисью водорода процесс, конечный результат которого – дезаминирование небольшой части присутствующей в растворе аминокислоты, подчиняется всем закономерностям, характерным для вырожденно-разветвленных цепных реакций, и является упорядоченным во времени.

Проведенное исследование ставит ряд новых вопросов, ответы на которые могут быть получены в ходе дальнейшего изучения этой системы. Требуют проверки данные А.Г. Гурвича об образовании в системе полипептида, обладающего дезаминазной активностью. Остается пока непонятным, по какой причине процесс дезаминирования начинает тормозиться в условиях значительного избытка как аминокислоты, так и перекиси водорода. Неясно, какие факторы обеспечивают самоорганизацию в системе после инициирования цепной реакции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: глицин (analytical grade, ICN, США); L-тирозин (analytical grade, Merck, ФРГ); H_2O_2 (х. ч., "Реахим"), этидийбромид (research grade, Serva, ФРГ); реактив Несслера

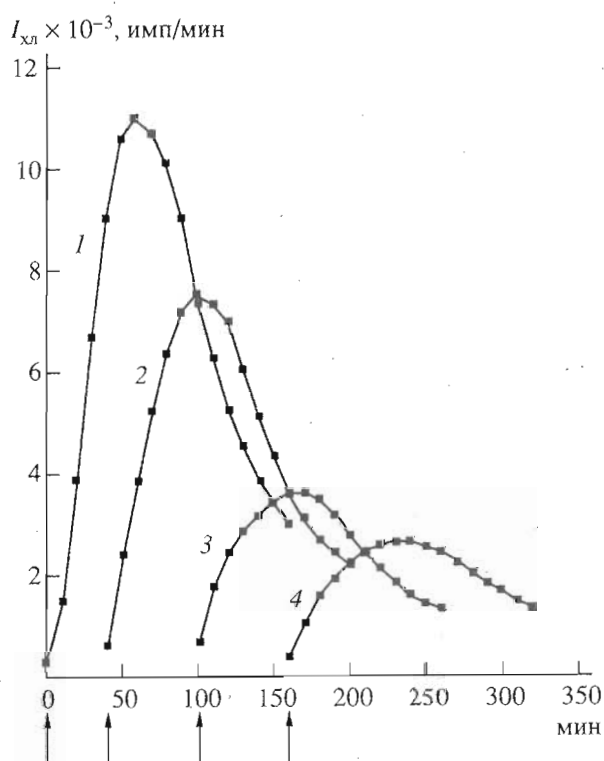


Рис. 6. Кинетика люминесценции растворов (0.8 М глицин с 0.75 М перекисью водорода) при внесении в них бромистого этидия (20 мкМ) через различные промежутки времени после иницииации реакции.

(Sigma ammonia color reagent), пероксидазу хрена, 2,2-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновую кислоту), ацетат натрия (Sigma, США); $[2-^{14}C]$ глицин (2020 ГБк/моль, г. Обнинск); 2,2-дигидроксииндан-1,3-дион (Lachema, Чехо-Словакия); сцинтиллятор Supersolve X (Koch-Light, Англия). Другие реактивы отечественного производства имели квалификацию х. ч. или ос. ч. Все растворы аминокислот готовили непосредственно перед экспериментом.

Оптическое поглощение измеряли на приборе Microelisa Autireader MR 580 (Dynatech, США).

Хемилюминесценцию детектировали на жидкостных сцинтилляционных счетчиках радиоактивности Rack-Beta 1217 (ЛКВ, Швеция) и Mark II (Nuclear Chicago, США) в режиме счета совпадающих для реакционной системы с бромистым этидием или общего количества импульсов для системы с тирозином [22]. Интенсивность излучения представлена числом импульсов за 1 мин (имп/мин). В качестве реакционных сосудов использовали стандартные стеклянные флаконы для жидкостного сцинтилляционного счета объемом 20 мл. В эксперименте, проведенном в стандартных условиях, к раствору аминокислоты и бромистого этидия или тирозина в дистиллированной воде добавляли 35% раствор H_2O_2 до конечной концентрации

0.75 М и сразу после этого начинали измерение излучения образца. Реакция проводилась при 20 - 22°C. Температура реакционной смеси в ходе эксперимента оставалась постоянной. рН образца определялся буферной емкостью глицина и соответствовал 6.0.

Определение аммиака. Из реакционной смеси отбирали пробы по 20 мкл, добавляли 360 мкл воды и 20 мкл реагента Несслера. После 10 мин инкубации при 20°C измеряли оптическое поглощение при 405 нм. Калибровочная кривая была построена с использованием NH_4Cl в растворе 40 мМ глицина. Измерения проводили в шести повторностях для каждой точки.

Ионы аммония определяли с использованием комбинированного аммоний-селективного электрода с диапазоном линейности электродной характеристики 10^{-5} - 5×10^{-1} М NH_4^+ . Растворы глицина (60 мМ) были приготовлены на воде, очищенной в системе Milli-Q (Millipore, США). рН растворов составлял 6.0. Эксперименты проводили в термостатируемой камере при 22°C в объеме 20 мл. Реакционный сосуд защищали от космического излучения свинцовыми экранами. При освещении реакционной системы использовали лампу накаливания 60 Вт, находящуюся на расстоянии 25 см от реакционного сосуда. На пути светового потока устанавливали фильтры, предохраняющие от инфракрасного и ультрафиолетового излучения. В случае изучения кинетики накопления ионов аммония сигнал с аммоний-селективного электрода поступал на самописец.

Источником сверхслабого УФ-излучения служила химическая реакция окисления ионов двухвалентного железа в системе 1 М H_2O_2 —100 мкМ FeSO_4 в 3 мл дистиллированной воды в кварцевой кювете. Растворы глицина облучали этим источником в течение 30 с. Интенсивность УФ-излучения определяли путем регистрации излучения раствора из стеклянной и кварцевой кюветы в сцинтилляционном счетчике Mark II. Излучение из кварцевой кюветы превышало таковое из стеклянной кюветы на 50 - 200 имп./с см^2 .

Для определения концентрации глицина в реакционную смесь добавляли [$2\text{-}^{14}\text{C}$]глицин (0.33 МБк/мл). Затем отбирали пробы, разбавляли в 5 раз и наносили на пластинку в объеме 0.5 мкл (80 нмоль) в точку. Разделение проводили на сорбенте Kieselgel 60 F₂₅₄DC-Alufolien (Merck, Германия) в системах этанол-вода, 7 : 3 (по объему), R_f 0.43 (система А); *n*-бутанол-уксусная кислота-вода, 4 : 1 : 1 (по объему), R_f 0.18 (система Б) [23]. Для идентификации глициновых пятен трек, не подлежащий в дальнейшем количественному анализу, обрабатывали 0.25% раствором нингидрина в ацетоне и выдерживали 5 мин при 105°C. Сорбент из областей, соответствующих положению глицина в остальных треках, соскабливали

и помещали в сцинтилляционную смесь (5 мл). Радиоактивность регистрировали в жидкостном сцинтилляционном счетчике Rack-Beta 1217 (LKB, Швеция).

Концентрацию H_2O_2 определяли спектрофотометрически, используя ферментативную реакцию с пероксидазой хрена. Из реакционной смеси отбирали пробы, разбавляли в 30000 раз в 0.1 М натрий-ацетатном буфере, рН 4.1, и добавляли 2,2-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновую кислоту) до конечной концентрации 60 мкМ и пероксидазу до концентрации 1.25 мкг/мл. Оптическое поглощение (λ 405 нм) измеряли через 4 мин (по достижении ее максимальной величины). Воспроизводимость результатов при повторных считываниях поглощения в одних и тех же пробах была не ниже 0.002 ОЕ.

Авторы выражают благодарность Ю.Г. Молотковскому за ценные советы и обсуждение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воейков В.Л., Баскаков И.В. // Биофизика. 1995. Т. 40. Вып. 6. С. 1150 - 1157.
2. Баскаков И.В., Воейков В.Л. // Биофизика. 1995. Т. 40. Вып. 6. С. 1141 - 1149.
3. Gurwitsch A.G., Gurwitsch L.D. // Enzymologia. 1938. V. 5. P. 17 - 25.
4. Gurwitsch A.G., Gurwitsch L.D. // Acta. Physicochim. URSS. 1940. V. 13. P. 690 - 696.
5. Гурвич А., Гурвич Л. Митогенетическое излучение. М.: Медгиз, 1945.
6. Гурвич А.А., Куфаль Г.Э., Батъянов А.П., Лазуркина Н.Н. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1987. Т. 12. С. 683.
7. Gurwitsch A.A., Eremeyev V.F., Karabchievsky Yu.A. // Nature (London). 1965. V. 206. P. 20 - 22.
8. Pauling L. // J. Chem. Phys. 1933. V. 1. P. 606.
9. Stauff G., Schmidkunz H., Hartmann G. // Nature. 1963. V. 198. P. 281 - 282.
10. Slawinski J. // Experientia. 1988. V. 44. P. 559 - 571.
11. Семенов Н.Н. Цепные реакции. М.: Наука, 1986.
12. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. Основы биохимии: Пер. с англ. М.: Мир., 1981. С. 476.
13. Долгопосок Б.А., Тинякова Е.И. Генерирование свободных радикалов и их реакции. М.: Наука, 1982.
14. Нагиев Т.М. Химическое сопряжение. М.: Наука, 1989. С. 79.
15. Матомов Ю.И., Руденко А.П. // Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия. 1977. Т. 18. С. 451 - 455.
16. Ansari A.S., Tahib S., Rashid Ali // Experientia. 1976. V. 15. P. 573 - 574.

17. Chen Z., Silva H., Klessig D.F. // *Science*. 1993. V. 262. P. 1883 - 1886.
18. Legendre L., Rueter S., Heinzen P.F., Low P.S. // *Plant Physiol.* 1993. V. 102. P. 233 - 240.
19. Murphy M.E., Sies H. // *Methods Enzymol.* 1990. V. 186. P. 595 - 610.
20. Cilento G. // *Experientia*. 1988. V. 44. P. 572 - 576.
21. Barnard M.L., Gurdian S., Diep D., Ladd M., Turrens J.E. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1993. V. 300. P. 651 - 656.
22. Baskakov I.V., Voeikov V.L. // *Biophotonics* / Eds L.V. Belousov, F.A. Popp. M.: Bioinform Service, 1995. P. 447 - 456.
23. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография: Пер. с англ. М.: Мир, 1981. С. 480.

Initiation of Degenerate-branched Chain Reaction of Glycine Deamination with Ultraweak UV Irradiation or Hydrogen Peroxide

V. L. Voeikov*,¹ I. V. Baskakov**, K. Kafkalias*, and V. I. Naletov*

* *Moscow State University, Biological Faculty, Vorob'evy Gory, Moscow, 119899 Russia*

** *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, V-437, GSP-7, Moscow, 117871 Russia*

Abstract—Short irradiation of an aqueous solution of glycine by an ultraweak source of UV photons initiates a process accompanied by the accumulation of ammonium ions. More intense deamination occurs in an aqueous solution of glycine in the presence of H₂O₂. The kinetics of the ammonia formation coincides with the kinetics of enhancement of luminescence, which was registered in the presence of a luminophore, ethidium bromide or tyrosine. When the process is completed, less than 5% glycine is consumed. At the initial step of the reaction, the concentration of H₂O₂ in the solution increases significantly in comparison with the starting concentration but then begins to decrease. If the luminophore concentration exceeds the optimum, the reaction rate enhancement decelerates and the ammonia yield decreases. UV photons and H₂O₂ are assumed to initiate the degenerate-branched chain reaction of glycine deamination.

Key words: deamination, ammonia, glycine, chemiluminescence, branched chain reaction, ultraweak UV irradiation.

¹ To whom correspondence should be addressed.