

*На правах рукописи*

**Буглак Андрей Андреевич**

**ФОТОБИОХИМИЯ ПТЕРИНОВЫХ КОФЕРМЕНТОВ**

**Специальность 03.01.04 Биохимия**

**Автореферат**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата химических наук**

**Москва 2016**

Работа выполнена в лаборатории экологической и эволюционной биохимии Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

**Научный руководитель:** кандидат биологических наук, старший научный сотрудник  
**Телегина Таисия Александровна**

**Официальные оппоненты:** **Кузьмин Владимир Александрович**  
доктор химических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля Российской академии наук, лаборатория процессов фотосенсибилизации, заведующий лабораторией  
**Векшин Николай Лазаревич**  
доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук, лаборатория внутриклеточной сигнализации, ведущий научный сотрудник

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г. в \_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на сайте <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Птерины (2-амино-4-оксоптеридины) представляют собой класс гетероциклических соединений, функционирующих в живых организмах в качестве коферментов. Ряд соединений (5,6,7,8-тетрагидроцианооптерин, 5,10-метенилтетрагидрофолат) обладают фоторецепторными свойствами. Фотофизика и фотохимия этих соединений изучены в гораздо меньшей степени, чем у таких групп универсальных фоторецепторных молекул как, например, порфирины и каротиноиды. Исследование фотохимии птеринов важно с точки зрения анализа их фоторецепторных функций в живых организмах, в связи с возможной ролью птериновых коферментов как регуляторов ферментативного катализа, а также в связи с применением птеридинов в качестве фотогенераторов синглетного кислорода. Последние два аспекта важны, в том числе, в контексте биомедицинских проблем.

**Цель** диссертационной работы заключалась в исследовании фотохимических свойств восстановленных коферментных форм птеринов и анализе фотосенсибилизирующей активности их окисленных производных.

Достижение поставленной цели связано с решением следующих **задач**, определяющих структуру исследования:

- идентифицировать продукты фотохимического окисления кофермента 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина (Н<sub>4</sub>Бип);
- предложить механизм фотохимического окисления Н<sub>4</sub>Бип;
- оценить фотостабильность тетрагидровосстановленных птеринов;
- проанализировать, какие характеристики тетрагидровосстановленных птеринов могут быть ответственны за их фоторецепторные функции;
- методами квантовой химии оценить способность окисленных форм птеринов участвовать в реакциях переноса энергии и электрона;
- методом QSPR проанализировать зависимость между значением квантового выхода генерации синглетного кислорода птеридинов и их структурой.

**Научная новизна работы.** Впервые изучен процесс фотоокисления кофермента 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина (Н<sub>4</sub>Бип) под действием ультрафиолета в водном растворе в присутствии кислорода воздуха. Показано, что при фотоокислении Н<sub>4</sub>Бип наиболее эффективно воздействие монохроматического ультрафиолета с длиной волны 350 нм, что экспериментально обосновано возможностью реакций фотосенсиблизованного окисления Н<sub>4</sub>Бип продуктами его темновой деградации. Методами квантовой химии оценена возможность протекания реакций, составляющих основу фотосенсиблизованного окисления Н<sub>4</sub>Бип, также оценена фотостабильность тетрагидровосстановленных форм птеринов. Впервые методами квантовой химии показано сходство фотохимии тетрагидровосстановленных форм птеринов с фотохимией гуанина - пуринового основания, характеризующегося коротким временем жизни возбужденных состояний и фотостабильностью.

Впервые с помощью QSPR анализа показано, что квантовый выход генерации синглетного кислорода ( $\Phi_{\Delta}$ ) птеридинов в значительной степени коррелирует со

значениями потенциала ионизации и электроотрицательности, а также с рядом других, второстепенных параметров. Построены QSPR модели, предсказывающие порядок величины  $\Phi_{\Delta}$  птеринов и флавинов.

**Научно-практическая ценность:**

- установлено, что 5,6,7,8-тетрагидробиоптерин (действующее вещество фармацевтического препарата «Куван») подвержен фотосенсибилизированному окислению продуктами собственной деградации, что необходимо учитывать при использовании и хранении данного лекарственного препарата;

- предложена гипотетическая модель участия фотоокисления H<sub>4</sub>Бип в развитии дерматологического заболевания витилиго;

- создан ряд QSPR моделей для предварительной оценки величины квантового выхода генерации синглетного кислорода флавиновыми и птериновыми сенсибилизаторами;

- с помощью квантово-химических расчетов для молекул окисленных птеринов показано, что они не генерируют супероксид-анион радикал, что позволяет рекомендовать птерины в качестве потенциальных фотодинамических агентов.

**Основные положения диссертации, выносимые на защиту.**

1. Установлены продукты фотоокисления кофермента 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина в водном растворе.

2. Показана возможность фотосенсибилизированного окисления 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина продуктами его деградации и предложен механизм этого процесса.

3. С помощью квантово-химических расчетов показана возможность быстрой внутренней конверсии возбужденных состояний тетрагидровосстановленных птеринов.

4. Построен ряд QSPR моделей, позволяющих проводить виртуальный скрининг и предсказание квантового выхода генерации синглетного кислорода птеридинами.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Все исследования и расчёты проведены корректно. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения.

Основные результаты работы были представлены соискателем и обсуждены на заседании кафедры биофизики МГУ им. М.В. Ломоносова, на совместном семинаре лабораторий Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, а также в ходе ряда конференций и симпозиумов: III международная конференция по кофакторам (ISC-03), Турку, Финляндия, 2011 г.; VI Съезд Российского фотобиологического общества, пос. Шепси, Краснодарский край, 2011 г.; III международный симпозиум «Молекулярная фотоника», Санкт-Петербург, 2012 г.; IV съезд биофизиков России, Нижний Новгород, 2012 г.; XV Конгресс Европейского фотобиологического общества (ESP), Льеж, Бельгия, 2013 г.; VI Всероссийская молодежная школа-конференция «Квантово-механические расчеты: структура и реакционная способность

органических и неорганических молекул», Иваново, 2013 г.; XI Съезд белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, Минск, 2014 г.; XVI Международный конгресс по фотобиологии (ICP), Кордоба, Аргентина, 2014 г.; Международная конференция "Проблема происхождения жизни" и молодежная научная школа "Молекулярные и клеточные основы ранней эволюции жизни", Москва, 2014 г.

Решением Ученого Совета Института биохимии им. А.Н. Баха РАН в 2013 г. соискатель удостоен стипендии имени чл.-корр. РАН В.Л. Кретовича.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе 6 статей, из них 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, и 9 тезисов в материалах отечественных и международных конференций.

**Структура и объём диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы (203 ссылки). Работа изложена на 137 страницах, включает 47 рисунков, одну схему, 20 таблиц и два приложения.

**Сокращения, принятые в тексте.** АФК – активные формы кислорода, УФ – ультрафиолет, ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография, Бип – 6-биоптерин, Н<sub>2</sub>Бип – 7,8-дигидробиоптерин, Н<sub>4</sub>Бип – 5,6,7,8-тетрагидробиоптерин, Птр – птерин, Н<sub>2</sub>Птр – 7,8-дигидроптерин, Гмп – 6-гидроксиметилптерин, Н<sub>4</sub>Гмп – 5,6,7,8-тетрагидрогидроксиметилптерин, Н<sub>2</sub>Ксп – дигидроксантоптерин, Фоп – 6-формилптерин, Кап – 6-карбоксихптерин, Дмп – 6,7-диметилптерин, СОД – супероксид-дисмутаза, ППЭ – поверхность потенциальной энергии, С1 – коническое пересечение, НОМО – верхняя занятая молекулярная орбиталь, LUMO – нижняя вакантная молекулярная орбиталь, R<sub>y</sub> – ридберговское состояние, IC – внутренняя конверсия, ISC – интеркомбинационная конверсия, Ф<sub>Δ</sub> квантовый выход генерации синглетного кислорода, QSPR – количественное соотношение структура-свойство (Quantitative Structure-Property Relationship).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Обзор литературы.** Обзор литературы включает в себя описание биохимических функций и фотохимических свойств птеринов. Отмечено, что в зависимости от характера бокового заместителя и степени восстановленности птеридиновой структуры, физико-химические свойства и биохимические функции птеринов существенно отличаются. Рассмотрены реакции фотосенсибилизированной генерации АФК птеринами. Отмечено, что фотохимические реакции птеринов могут играть существенную роль на начальных стадиях меланогенеза. Проведен анализ данных литературы относительно фоторецепторных функций птеринов в живых организмах. Дана характеристика фотобиохимических функций родственной группы соединений – флавинов (бензоптеридины), а также пуриновых оснований, в первую очередь, гуанина. Проанализирована роль птеридинов в эволюции.

### **Материалы и методы.**

Птерины (содержание основного вещества не менее 99%) получены в Schirks

Laboratories (Швейцария).  $K_2HPO_4$ , цитрат натрия, KI, и прочие реактивы получены в Sigma-Aldrich Co.

**Экспериментальная часть.** Для облучения ультрафиолетом широкого спектра применяли ртутную лампу высокого давления ДРК-120 (Россия) со светофильтром УФС-6 (область пропускания 300-380 нм). Спектрофлюориметр RF-5301 («Shimadzu», Япония) с ксеноновой лампой использовали как источник монохроматического света с длиной волны 300 нм или 350 нм со спектральной шириной щели 20 нм. Интенсивность излучения измеряли с помощью радиометров Hamamatsu C9386 (Япония) и «Аргус 04» (ФГУП «ВНИИОФИ», Россия).

Для фракционирования продуктов реакций использовали градиентный жидкостный хроматограф «Стайер» производства НПФ «Аквилон» (Россия). Фракционирование птеринов проводилось на катионообменной колонке Partisil SCX (5 мкм, 250 × 4,6 мм; «Phenomenex», США). Мобильная фаза представляла собой насыщенный аргоном 25мМ цитрат натрия pH 2,7. Для регистрации и идентификации веществ использовали три детектора, подключенных последовательно: фотометрический (поглощение при длине волны 267 нм), флюориметрический (длина волны возбуждения флюоресценции - 330 нм, длина волны эмиссии - 440 нм) и амперометрический (потенциал рабочего электрода +700 мВ).

Хромато-масс-спектрометрию (MS/MS) проводили методом HPLC-ESI-qTOF, используя ВЭЖХ систему, состоящую из бинарной помпы, термостата и фотометрического детектора VWD серии 1260, и масс-спектрометр высокого разрешения: тандемный квадруполь-времяпролетный Agilent 6520 (США).

**Квантово-химические расчеты** выполнены с помощью программ Orca 3.0.1 (Германия) и Firefly 8.0.0 (Россия). Расчеты для основного электронного состояния проводили в рамках метода теории функционала плотности (DFT) с использованием гибридного трехпараметрического функционала Беке-Ли-Янга-Парра (B3LYP). Расчет электронных спектров поглощения проводили в рамках метода нестационарной теории функционала плотности (TD-DFT). Для учета влияния  $H_2O$  использовали континуальную модель COSMO с параметрами диэлектрической проницаемости  $\epsilon = 80$  и показателем преломления среды  $n = 1.33$ . Для оптимизации геометрии возбужденных состояний  $H_4Гмп$  также применяли метод TD-DFT. Расчет вертикального потенциала ионизации и энергии сродства к электрону окисленных птеринов проводили на основе B3LYP/6-31+G(d,p) оптимизированной геометрии с использованием более высокого уровня теории B3LYP/6-311++G(2d,2p).

Оптимизацию геометрии конических пересечений (CI)  $H_4Гмп$  проводили методом самосогласованного поля в варианте полного активного пространства CASSCF (Complete Active Space Self-Consistent Field). В активное пространство включали 6 электронов, расположенных на 6 орбиталях  $\pi$  характера. Оптимизация проводилась без ограничений по симметрии. Усреднение по состояниям делалось для двух состояний ( $^1\pi\pi^*$  и  $S_0$ ) с одинаковыми весами.

Проводили конформационный анализ для катион-радикала  $H_4Гмп^{+}$  и нейтральной молекулы  $H_4Гмп$ . В рамках силового поля MMFF было получено 15

основных конформеров  $\text{H}_4\text{Гмп}$  и 12 конформеров  $\text{H}_4\text{Гмп}^{*+}$ . Полученные геометрии оптимизировались в рамках метода B3LYP/6-31G(d,p), для каждого конформера рассчитан гессиан (матрица вторых производных от потенциальной энергии по координатам) и установлена свободная энергия Гиббса.

**QSPR анализ.** Метод поиска количественных соотношений структура-свойство (QSPR) применяли для анализа фотосенсибилизирующей активности птеридинов. Квантовый выход генерации синглетного кислорода ( $\Phi_\Delta$ ), представленный в виде логарифма ( $\log \Phi_\Delta$ ), использовался в качестве зависимой переменной в ходе QSPR анализа. Поиск лучшей QSPR модели вели методом пошаговой регрессии. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения, разработанного в Джадавпурском Университете (Калькутта, Индия) и доступного по адресу <http://dtclab.webs.com/software-tools>. Лучшую модель выбирали на основе 9 статистических параметров, основными из которых были:  $R^2$  – коэффициент детерминации для тренировочной выборки,  $q^2$  ( $R^2$  по результатам внутренней перекрестной проверки тренировочной выборки по методу leave-one-out (LOO)), и  $\text{pred}_R^2$  ( $R^2$  для тестовой выборки из шести соединений, оценивающий предсказательную способность модели).

В ходе QSPR анализа использовали физико-химические, квантово-химические (рассчитывались полуэмпирическим методом AM1), конституционные дескрипторы – всего 128 дескрипторов. Использовали данные из нескольких публикаций, в которых определение  $\Phi_\Delta$  проходило в одинаковых условиях:  $^1\text{O}_2$  детектировался путем измерения разрешенной во времени люминесценции при длине волны 1270 нм в водных  $\text{D}_2\text{O}$  растворах в присутствии кислорода воздуха.

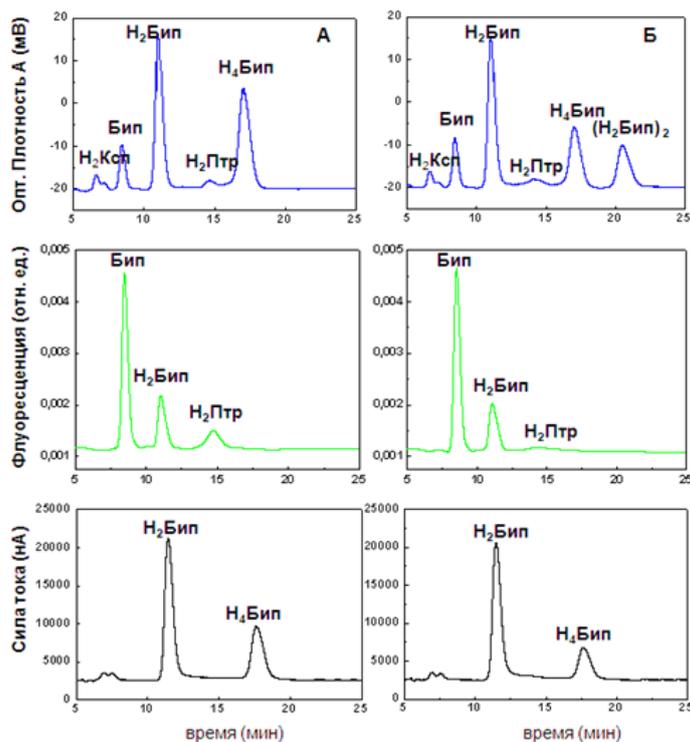
### Результаты и обсуждение.

#### ***1. Фотоокисление тетрагидробиоптерина в водном растворе***

(6R)-L-5,6,7,8-тетрагидробиоптерин ( $\text{H}_4\text{Бип}$ ), или 2-амино-4-оксо-5,6,7,8-тетрагидро-6R-(L-эритро-1,2-дигидроксипропил)птеридин, является полностью восстановленным соединением, которое подвержено окислению молекулярным кислородом. Проведена оценка влияния широкополосного УФ-излучения на ход окисления  $\text{H}_4\text{Бип}$  в водном растворе (0,1 М фосфатный буфер, pH 7,2) в присутствии кислорода воздуха. ВЭЖХ разделение продуктов, представленных как в облученных, так и в необлученных растворах, выявило 4 пика, соответствующих продуктам окисления  $\text{H}_4\text{Бип}$ : 6-биоптерину (Бип), 7,8-дигидроксантоптерину ( $\text{H}_2\text{Ксп}$ ), 7,8-дигидробиоптерину ( $\text{H}_2\text{Бип}$ ) и 7,8-дигидроптерину ( $\text{H}_2\text{Птр}$ ) (Рис. 1).

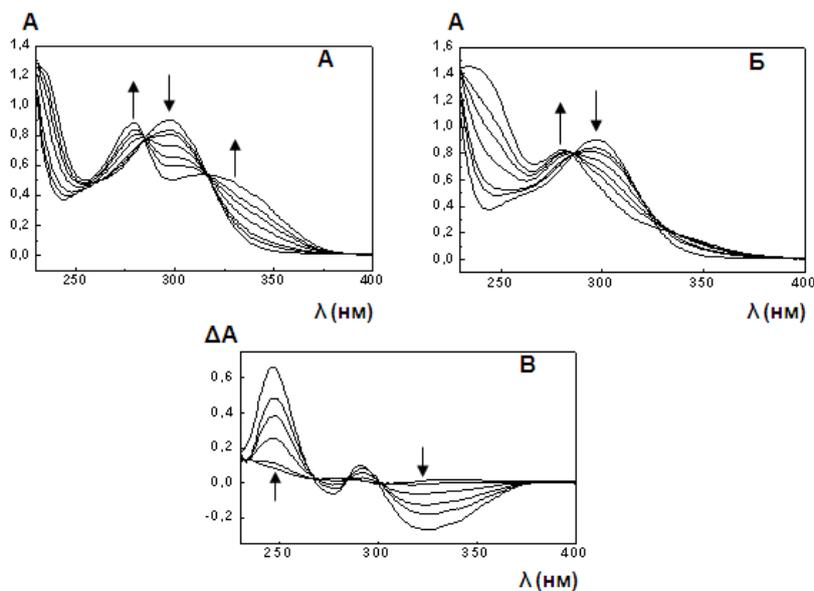
Хроматограммы УФ-облученных растворов отличались от хроматограмм необлученных растворов  $\text{H}_4\text{Бип}$  наличием еще одного пика (Рис. 1, Б), который был идентифицирован как димер дигидробиоптерина ( $\text{H}_2\text{Бип}$ )<sub>2</sub>, поскольку спектр поглощения данного соединения совпадает со спектром известного из литературы димера дигидробиоптерина, полученного при облучении  $\text{H}_2\text{Бип}$  ( $\lambda_{\text{max}} = 246$  нм и плечо при 280 нм) (Vignoni et al., 2010). Образование ( $\text{H}_2\text{Бип}$ )<sub>2</sub> было подтверждено

нами с помощью ВЭЖХ-MS/MS спектрометрии. В масс-спектре присутствует сигнал  $MH^+/z$  479, соответствующий массе димера  $(H_2\text{Бип})_2$  – 478 Да.



**Рис. 1.** Идентификация продуктов в инкубационной смеси (рН 7.2). Использовали три детектора: фотометрический, флуориметрический и амперометрический (см. Материалы и методы). Пробы для ВЭЖХ отбирали через 15 минут окисления;  $[H_4\text{Бип}]_0 = 570$  мкМ. А. Без облучения. Б. УФ-излучение с диапазоном 300-380 нм ( $63 \text{ мВ см}^{-2}$ ).

Одновременно с убылью тетрагидробиоптерина (полоса поглощения с максимумом при 298 нм) в необлученных растворах образовывался  $H_2\text{Бип}$  (полосы поглощения с максимумами при 232 нм, 280 нм и 330 нм) (Рис. 2, А).



**Рис. 2.** Изменение спектров поглощения  $H_4\text{Бип}$  в присутствии кислорода воздуха. Спектры записаны через 3, 5, 10, 15, 20 и 30 минут окисления. Стрелками показаны наблюдаемые изменения спектров.  $[H_4\text{Бип}]_0 = 177$  мкМ, рН = 7,2. А. Необлученный раствор. Б. УФ-излучение (300-380 нм,  $63 \text{ мВ см}^{-2}$ ). В. Разностные спектры (спектр Б минус спектр А).

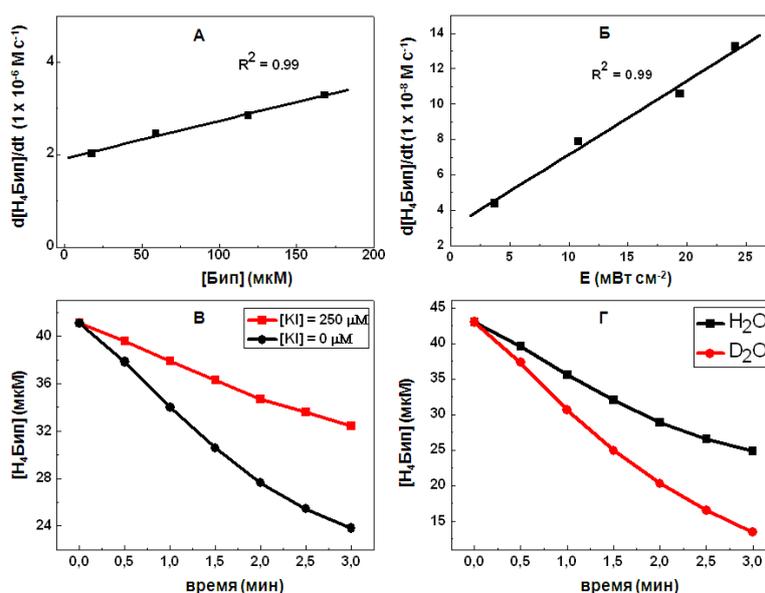
Предположение об образовании димера (Н<sub>2</sub>Бип)<sub>2</sub>, подтверждается, в том числе, анализом дифференциальных спектров (Рис. 2, В). Рост полосы поглощения с  $\lambda_{\text{max}} = 246$  нм (длина волны максимума в спектре поглощения димера) происходит одновременно с убылью полосы поглощения с максимумом при длине волны 330 нм, которая типична для спектра Н<sub>2</sub>Бип.

Для того чтобы подойти к исследованию механизма фотоокисления Н<sub>4</sub>Бип мы подвергали растворы Н<sub>4</sub>Бип (43 мкМ, рН 7,2) действию монохроматического излучения с длиной волны 300 нм (длинноволновый максимум Н<sub>4</sub>Бип находится при  $\lambda_{\text{max}} = 298$  нм) и 350 нм (длинноволновый максимум Бип находится при  $\lambda_{\text{max}} = 346$  нм). В обоих случаях набор продуктов при облучении монохроматическим УФ был тот же, что и при облучении широкополосным УФ: Бип, Н<sub>2</sub>Ксп, Н<sub>2</sub>Бип, Н<sub>2</sub>Птр и (Н<sub>2</sub>Бип)<sub>2</sub>.

Для количественной оценки влияния УФ разного спектрального состава на окисление Н<sub>4</sub>Бип мы рассчитали скорость окисления и квантовый выход фотоокисления при воздействии монохроматического УФ с  $\lambda$  300 и 350 нм (Таблица 1). Кажущийся квантовый выход фотоокисления ( $\Phi_R$ ) Н<sub>4</sub>Бип при облучении УФ с  $\lambda = 300$  нм составил  $(2,7 \pm 0,4) \times 10^{-3}$ , при облучении УФ с  $\lambda = 350$  нм –  $(7,7 \pm 1,2) \times 10^{-3}$ .

**Таблица 1.** Количественные показатели окисления Н<sub>4</sub>Бип при различных условиях облучения; [Н<sub>4</sub>Бип]<sub>0</sub> = 43 мкМ.

	$d[\text{Н}_4\text{Бип}]/dt,$ $10^{-9} \text{ M c}^{-1}$	$\Phi_R$	% Н <sub>4</sub> Бип от исходного через 10 мин
Без облучения	$6,8 \pm 0,7$	-	$88,7 \pm 1,1$
$\lambda$ 300 нм, 6,9 мВт см <sup>-2</sup>	$18,1 \pm 1,0$	$(2,7 \pm 0,4) \times 10^{-3}$	$78,2 \pm 0,7$
$\lambda$ 350 нм, 26,6 мВт см <sup>-2</sup>	$16,3 \pm 1,6$	$(7,7 \pm 1,2) \times 10^{-3}$	$81,4 \pm 1,0$



**Рис. 3.** А. Зависимость скорости убыли Н<sub>4</sub>Бип от концентрации биоптерина (УФ 300-380 нм, 63 мВ см<sup>-2</sup>. [Н<sub>4</sub>Бип]<sub>0</sub> = 600-700 мкМ). Б. Зависимость скорости убыли Н<sub>4</sub>Бип от облученности (Здесь и далее:  $\lambda = 350$  нм, 26,6 мВ см<sup>-2</sup>; [Н<sub>4</sub>Бип]<sub>0</sub> = 43 мкМ, [Бип]<sub>0</sub> = 40 мкМ). В. Влияние KI на изменение концентрации Н<sub>4</sub>Бип под действием УФ ([KI]<sub>0</sub> = 250 мкМ). Г. Влияние D<sub>2</sub>O на ход фотоокисления Н<sub>4</sub>Бип.

Поскольку при облучении монохроматическим УФ с длиной волны  $\lambda = 350$  нм кажущийся квантовый выход фотоокисления Н<sub>4</sub>Бип был выше, чем при облучении УФ с  $\lambda = 300$  нм, мы предположили, что триплетное состояние 6-биоптерина (<sup>3</sup>Бип\*) может сенсibilизировать окисление Н<sub>4</sub>Бип. Во-первых, Бип образуется во время окисления Н<sub>4</sub>Бип (Рис. 1), во-вторых, единственный из продуктов окисления Н<sub>4</sub>Бип обладает значительной сенсibilизирующей активностью и, в-третьих, имеет максимум поглощения в области 350 нм. Для подтверждения данной догадки была проведена серия экспериментов. Нами была показана линейная зависимость скорости убыли Н<sub>4</sub>Бип от концентрации Бип (Рис. 3, А). Кроме того, скорость убыли Н<sub>4</sub>Бип линейно зависит от облученности (Рис. 3, Б). Это означает, что в одном акте сенсibilизированного окисления участвует одна молекула Бип.

Иодид ионы (I<sup>-</sup>) в микромолярных концентрациях эффективно и селективно тушат триплетные состояния птеринов (Kritsky et al., 1997; Dantola et al., 2010). В присутствии 250 мкМ KI скорость убыли Н<sub>4</sub>Бип была в 2,3 раза ниже чем, в отсутствие йодид ионов (Рис. 3, В): скорость фотоокисления Н<sub>4</sub>Бип составила  $(5,8 \pm 0,3) \times 10^{-8}$  М с<sup>-1</sup> и  $(13,6 \pm 0,2) \times 10^{-8}$  М с<sup>-1</sup>, соответственно. Ингибирование фотосенсibilизированного окисления йодидом свидетельствует о том, что молекулы 6-биоптерина вступают в реакции сенсibilизации, находясь в триплетном состоянии.

Участие <sup>3</sup>Бип\* в окислении возможно по 2 основным механизмам. Механизм типа I инициируется реакцией между <sup>3</sup>Бип\* и Н<sub>4</sub>Бип:



Механизм типа II связан с прямым переносом энергии с <sup>3</sup>Бип\* на молекулярный кислород с образованием синглетного кислорода <sup>1</sup>O<sub>2</sub>:



Очевидно, что образующийся в ходе Реакции 2 синглетный кислород, может вступать в реакцию окисления Н<sub>4</sub>Бип. Квантовый выход генерации <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 6-биоптеринном составляет 34% (Thomas et al., 2003). Время жизни <sup>1</sup>O<sub>2</sub> в D<sub>2</sub>O в отсутствие молекул-тушителей превосходит время жизни в H<sub>2</sub>O более чем в 20 раз (Krasnovsky et al., 1987). Вследствие этого скорости фотохимических реакций с участием <sup>1</sup>O<sub>2</sub> значительно выше в D<sub>2</sub>O, чем в H<sub>2</sub>O. Чтобы проверить предположение об участии <sup>1</sup>O<sub>2</sub> в окислении Н<sub>4</sub>Бип, мы сравнили скорость фотоокисления в H<sub>2</sub>O и в D<sub>2</sub>O (Рис. 3, Г).

**Таблица 2.** Скорость (в 10<sup>-9</sup> М с<sup>-1</sup>) окисления Н<sub>4</sub>Бип (43 мкМ) в H<sub>2</sub>O и D<sub>2</sub>O в присутствии Бип (40 мкМ), стимулирующий эффект D<sub>2</sub>O на скорость фотоокисления. Облученность УФ с длиной волны  $\lambda = 350$  нм составляла 26,6 мВ см<sup>-2</sup>.

Растворитель	[Бип] = 0 мкМ		[Бип] = 40 мкМ		Соотношение скоростей фотоокисления в D <sub>2</sub> O и H <sub>2</sub> O	
	Без УФ	УФ	Без УФ	УФ	[Бип] <sub>0</sub> = 0	[Бип] <sub>0</sub> = 40
H <sub>2</sub> O	6,8 ± 0,7	16,3 ± 1,6	7,7 ± 0,6	135,6 ± 2,2	1,8	1,9
D <sub>2</sub> O	6,7 ± 0,7	29,5 ± 1,1	7,0 ± 0,6	260,9 ± 2,2		

Из данных, приведенных в Таблице 2 видно, что УФ-излучение увеличивало скорость убыли Н<sub>4</sub>Бип в 2,4 раза по сравнению с необлученным контролем ( $(16,3 \pm 1,6) \times 10^{-9} \text{ М с}^{-1}$  и  $(6,8 \pm 0,7) \times 10^{-9} \text{ М с}^{-1}$ , соответственно). Когда в Н<sub>2</sub>О добавляли Бип (40 мкМ), скорость убыли Н<sub>4</sub>Бип возрастала в 17,7 раз по сравнению с необлученным контролем ( $(135,6 \pm 2,2) \times 10^{-9} \text{ М с}^{-1}$  и  $(7,7 \pm 0,6) \times 10^{-9} \text{ М с}^{-1}$ , соответственно) и в 8,3 раза по сравнению с УФ-облученными образцами без Бип. Скорость фотоокисления была выше в D<sub>2</sub>O на 90%. Данное наблюдение косвенно свидетельствует о том, что механизм типа II активен и <sup>1</sup>O<sub>2</sub> образуется. Квантовый выход фотосенсибилизированного биоптерином ([Бип]<sub>0</sub> = 40 мкМ) окисления Н<sub>4</sub>Бип составил  $(9,7 \pm 1,5) \times 10^{-3}$ . Тем не менее, реакция образования <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (Реакция 2) не является доминирующей, поскольку стимулирующий эффект D<sub>2</sub>O низок, несмотря на то, что время жизни <sup>1</sup>O<sub>2</sub> в D<sub>2</sub>O, как известно, увеличивается в >20 раз.

Кроме того были проведены эксперименты с СОД, в ходе которых было показано, что присутствие СОД не оказывало существенного влияния на ход фотоокисления Н<sub>4</sub>Бип. Это означает, что супероксид-анион радикал не играет существенной роли в фотоокислении Н<sub>4</sub>Бип.

Квантово-химические расчеты показали, что разница энергий S<sub>0</sub> и T<sub>1</sub> (E<sub>T1</sub>) биоптерина составила 2,48 эВ, что делает возможным генерацию как <sup>1</sup>Δg формы синглетного кислорода (0,98), так и <sup>1</sup>Σg+ формы (1,63 эВ).

Возможность реакции фотосенсибилизированного образования супероксид-анион радикала определяется значением потенциала ионизации триплетного биоптерина (IP<sub>T1</sub> = 3,89 эВ) и сродством к электрону O<sub>2</sub> (EA<sub>O2</sub> = -3,58 эВ). Прямой перенос электрона возможен в том случае, если сумма IP<sub>T1</sub> и EA<sub>O2</sub> имеет отрицательное значение. Рассчитанная сумма IP<sub>T1</sub> и EA<sub>O2</sub> составила 0,31 эВ, то есть генерация супероксид-анион радикала напрямую путем переноса электрона с T<sub>1</sub> невозможна. Сенсibilизированная генерация O<sub>2</sub><sup>•-</sup> возможна опосредованно через триплет-триплетное взаимодействие молекул биоптерина.

Для того чтобы количественно оценить вклад механизмов I и II в процесс окисления мы составили систему уравнений. Кинетическое уравнение для реакции образования синглетного кислорода (Реакция 2) выглядит как  $r_1 = \Phi_{\Delta} P_a$ , где  $\Phi_{\Delta}$  – квантовый выход образования синглетного кислорода,  $P_a$  – плотность потока поглощаемых фотонов.  $P_a = P (1-T)$ , где  $P$  – плотность потока фотонов,  $(1-T)$  – поглощение раствора).

Образовавшийся <sup>1</sup>O<sub>2</sub> дезактивируется за счет люминесценции:



$k_2 = 1 / \tau_0$ , где  $\tau_0$  – время жизни синглетного кислорода.

Кроме того <sup>1</sup>O<sub>2</sub> будет вступать в химические реакции с птеринами в растворе, и прежде всего с Н<sub>4</sub>Бип, который является наиболее восстановленным соединением в реакционной смеси. Совокупная константа физического и химического тушения <sup>1</sup>O<sub>2</sub> ( $k_q^{\Delta}$ ) для биоптерина равна  $2,4 \times 10^6 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ , поэтому в расчетах реакцией тушения синглетного кислорода биоптерином мы пренебрегаем. Для реакции окисления Н<sub>4</sub>Бип

синглетным кислородом (механизм сенсibilизации типа II) уравнение имеет следующий вид:

$$r_3 = k_3[H_4\text{Бип}][^1O_2]$$

Синглетный кислород и триплетный возбужденный  $^3\text{Бип}$  будут конкурировать между собой за  $H_4\text{Бип}$ , и параллельно с окислением  $H_4\text{Бип}$  синглетным кислородом будет идти Реакция 1 (механизм сенсibilизации типа I), для которой уравнение выглядит как:

$$r_4 = k_4[H_4\text{Бип}][^3\text{Бип}]$$

Квантовый выход образования синглетного кислорода биооптерином  $\Phi_{\Delta}$  равен 0,34 (Thomas et al., 2003). Можно с высокой степенью вероятности утверждать, что квантовый выход интеркомбинационной конверсии S-T ( $\Phi_{ISC}$ ) биооптерина приближенно равен  $\Phi_{\Delta}$  (Schweitzer, Schmidt, 2003). Квантовый выход образования синглетного кислорода в присутствии тушителя  $H_4\text{Бип}$  ( $\Phi_{\Delta}'$ ) должен удовлетворять следующему требованию:

$$\Phi_{\Delta}' = \Phi_{\Delta} v_2$$

где  $v_2$  – вклад  $^1O_2$  и механизма II в процесс сенсibilизированного окисления  $H_4\text{Бип}$ .

$$v_2 = \frac{r_3}{r_3 + r_4}$$

где  $r_4$  и  $r_3$  – скорости Реакций 1 и 2, соответственно; тогда вклад механизма сенсibilизации типа I в окисление  $H_4\text{Бип}$  можно выразить как:

$$v_1 = \frac{r_4}{r_3 + r_4}$$

Теперь распишем, как меняется концентрация  $^1O_2$  со временем:

$$\frac{d[^1O_2]}{dt} = r_1 - r_2 - r_3 = \Phi_{\Delta}' P_a - k_2[^1O_2] - k_3[^1O_2][H_4\text{Бип}]$$

Поскольку концентрация  $^1O_2$  не претерпевает серьезного изменения в течение короткого начального промежутка времени  $\Delta t$  ( $\Delta t \rightarrow 0$ ),  $\frac{d[^1O_2]}{dt} = 0$ . Отсюда выразим, чему будет равняться концентрация  $^1O_2$  в воде:

$$[^1O_2]_{H_2O} = \frac{\Phi_{\Delta}' P_a}{k_2^{H_2O} + k_3[H_4\text{Бип}]_0} \quad (\text{I})$$

То же самое выражение для концентрации  $^1O_2$  в дейтерированной воде:

$$[^1O_2]_{D_2O} = \frac{\Phi_{\Delta}' P_a}{k_2^{D_2O} + k_3[H_4\text{Бип}]_0} \quad (\text{II})$$

В ходе наших экспериментов мы определили скорость фотоокисления  $H_4\text{Бип}$  в  $H_2O$  и в  $D_2O$  (Таблица 2). Распишем выражение для скорости фотоокисления  $H_4\text{Бип}$  в  $H_2O$ :

$$\frac{d[H_4\text{Бип}]_{H_2O}}{dt} = -r_3 - r_4 = -k_3[^1O_2]_{H_2O}[H_4\text{Бип}]_0 - k_4[H_4\text{Бип}]_0[^3\text{Бип}] \quad (\text{III})$$

То же самое для фотоокисления в  $D_2O$ :

$$\frac{d[H_4\text{Бип}]_{D_2O}}{dt} = -r_3 - r_4 = -k_3[^1O_2]_{D_2O}[H_4\text{Бип}]_0 - k_4[H_4\text{Бип}]_0[^3\text{Бип}] \quad (\text{IV})$$

Теперь вычтем из уравнения III уравнение IV. Выражение  $k_4[H_4\text{Бип}]_0[^3\text{Бип}]$ , относящееся к  $r_4$ , при этом сократится. В получившееся уравнение подставим вместо  $[^1O_2]$  правые части уравнений I и II. Получившееся равенство будет содержать

единственную неизвестную  $k_3$ . Значения остальных переменных известны либо из литературы ( $k_2^{H_2O} = 3,2 \times 10^5 \text{ с}^{-1}$ ,  $k_2^{D_2O} = 1,5 \times 10^4 \text{ с}^{-1}$  (Егоров, Красновский, 1983), либо установлены нами ( $[H_4\text{Бип}]_0 = 43 \text{ мкМ}$ ,  $P = 26.6 \text{ мВт см}^{-2}$ , поглощение при  $\lambda 350$  и соответствующей концентрации Бип (40 мкМ) было равно  $(I-T) = 0,52$ ).

Таким образом, сопоставив скорости окисления  $H_4\text{Бип}$  в  $D_2O$  и  $H_2O$  и решив систему уравнений с четырьмя неизвестными, мы получили следующие результаты:

1) константа скорости реакции между  $^1O_2$  и  $H_4\text{Бип}$ , согласно нашим оценкам, равна  $5,4 \times 10^8 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ , что сопоставимо с константами для других соединений-антиоксидантов:  $H_2\text{Бип}$  ( $3,7 \times 10^8 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ ), глутатион ( $9,4 \times 10^8 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ ), NADH ( $4,3 \times 10^8 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ ); 2) установив время жизни  $^1O_2$  в присутствии тушителя  $H_4\text{Бип}$  (43 мкМ) в  $H_2O$  и в  $D_2O$ , нашли соотношение этих величин - стимулирующее действие  $D_2O$  на активность  $^1O_2$  ( $\alpha_\Delta = 8,9$ ); 3) оценили вклад механизмов сенсibilизации типа I и II в процесс фотоокисления (Таблица 3).

**Таблица 3.** Вклад механизмов сенсibilизации типа I и II в процесс фотосенсibilизированного окисления  $H_4\text{Бип}$ .

Растворитель	Вклад механизма I, %	Вклад механизма II, %
$H_2O$	88	12
$D_2O$	45	55

Отметим, что полученные нами данные носят оценочный характер, поскольку в произведенных расчетах содержится ряд допущений. Более точные значения констант скоростей реакций и их вклад в процесс фотоокисления могут быть получены методом спектроскопии фемтосекундного разрешения, а также в результате измерения люминесценции синглетного кислорода.

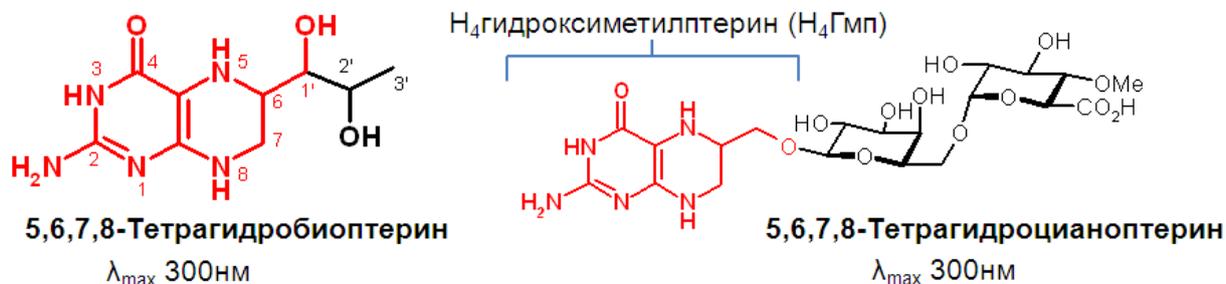
Таким образом, установлены продукты фотоокисления 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина ( $H_4\text{Бип}$ ) в водном растворе в присутствии кислорода воздуха. Основными продуктами фотоокисления являются 7,8-дигидробиоптерин ( $H_2\text{Бип}$ ), димер  $(H_2\text{Бип})_2$ , 7,8-дигидроптерин, 7,8-дигидроксантиоптерин и биоптерин. Показано, что  $H_4\text{Бип}$  подвержен сенсibilизированному окислению продуктами собственной деградации. По нашим оценкам, механизм типа I доминирует при сенсibilизированном окислении  $H_4\text{Бип}$ .

## **2. Исследование фотохимических свойств тетрагидровосстановленных птеринов методами квантовой химии**

Нами не было обнаружено экспериментальных свидетельств непосредственного участия  $H_4\text{Бип}$  в фотохимических реакциях. Известно, что тетрагидровосстановленные формы птеринов не флюоресцируют и не фосфоресцируют (Neverov et al., 1996), поэтому вероятным механизмом дезактивации их фотовозбужденных состояний представляется процесс внутренней конверсии. В данном разделе перед нами стояли следующие задачи: (1) оценить возможность внутренней конверсии молекул восстановленных птеринов; (2) проанализировать,

какие характеристики тетрагидровосстановленных птеринов могут быть ответственны за их фоторецепторные функции.

В основе строения тетрагидробиоптерина и тетрагидроцианоптерина лежит одна и та же функционально значимая структура 6-гидроксиметил-5,6,7,8-тетрагидроптерина (Н<sub>4</sub>Гмп) (Рис. 4). С целью снижения временных затрат расчеты проводились для модельной молекулы Н<sub>4</sub>Гмп.

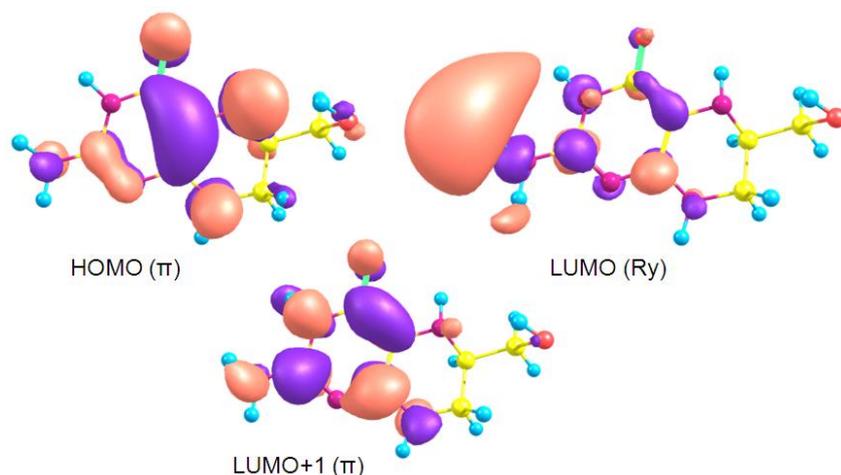


**Рис. 4.** Молекулярная структура 6-замещенных тетрагидроптеринов.

Требовалось установить природу и энергию основных переходов в электронном спектре поглощения Н<sub>4</sub>Гмп. С использованием функционала B3LYP и базиса 6-31G(d,p) была оптимизирована геометрия основного состояния S<sub>0</sub> Н<sub>4</sub>Гмп. Значения и природу основных вертикальных электронных переходов для равновесной геометрии установили в рамках метода TD-DFT/B3LYP/6-311G++(2d,2p) (Таблица 4).

**Таблица 4.** Энергия и сила осциллятора (f<sub>osc</sub>) электронных переходов в длинноволновой области спектра поглощения Н<sub>4</sub>Гмп. Расчет проведен методом B3LYP/6-311++G(d,p)//B3LYP/6-31G(d,p) для газовой фазы.

Состояние	Преобладающий переход	Природа возбужденного состояния	Е <sub>расч.</sub> , эВ (нм)	Е <sub>эксп.</sub> , эВ (нм)	f <sub>osc</sub>
S <sub>1</sub>	НОМО→LUMO	Ry	3,75 (331)	-	0,009
S <sub>2</sub>	НОМО→LUMO+1	ππ*	4,30 (289)	4,16 (298)	0,129

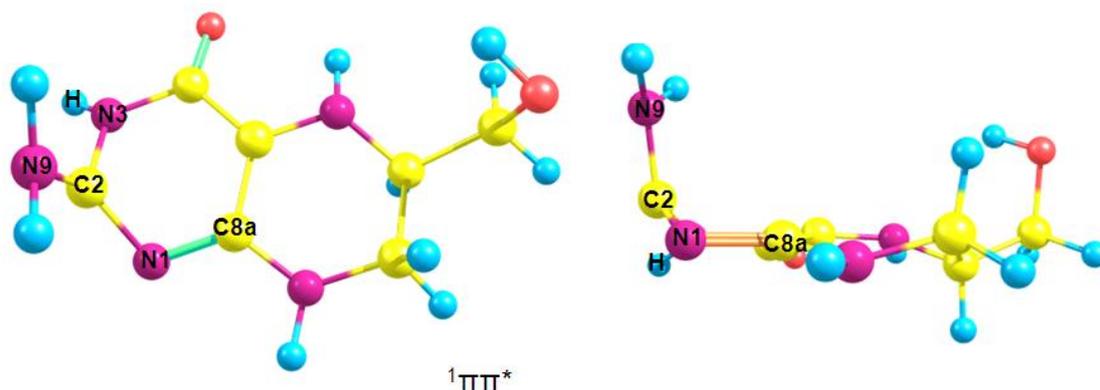


**Рис. 5.** Молекулярные орбитали Н<sub>4</sub>Гмп, участвующие в электронных переходах. НОМО - высшая занятая молекулярная орбиталь, LUMO – низшая вакантная молекулярная орбиталь.

Экспериментальный спектр поглощения имеет длинноволновый максимум при 298 нм. Исходя из природы переходов, а также значений силы осциллятора ( $f_{osc}$ ), данный пик может быть соотнесен с состоянием  $S_2$  (Таблица 4).  $S_0 \rightarrow S_2$  переход является разрешенным по правилам орбитальной симметрии  $\pi \rightarrow \pi^*$  переходом: орбитали НОМО и LUMO+1, относятся к молекулярным орбитальям  $\pi$ -типа (Рис. 5). Переход  $S_0 \rightarrow S_1$  имеет низкую интенсивность, поскольку данный электронный переход имеет ридберговскую ( $Ry$ ) природу и малоинтенсивен.

Для оптимизации геометрии нижних возбужденных синглетных состояний  $^1Ry$  и  $^1\pi\pi^*$  применяли функционал B3LYP в рамках метода нестационарной теории функционала плотности TD-DFT.

Геометрия минимума состояния  $^1\pi\pi^*$  (Рис. 6) характеризуется: 1) значительной внеплоскостной деформацией пиримидинового кольца: в основном состоянии двугранный угол  $D(C8a-N1-C2-N3) = -0,8^\circ$ , в минимуме  $^1\pi\pi^*$  состояния  $D(C8a-N1-C2-N3) = 58,2^\circ$ ; 2) выходом аминогруппы из плоскости пиримидинового кольца (в  $S_0$   $D(N9-C2-N3-C4) = 176,5^\circ$ , в  $^1\pi\pi^*$  состоянии  $D(N9-C2-N3-C4) = -86,3^\circ$ ). В ходе анализа литературы было обнаружено, что геометрия минимума состояния  $^1\pi\pi^*$   $H_4Gmp$  схожа с геометрией минимума состояния  $^1\pi\pi^*$  гуанина. Данная особенность связана с фундаментальными фотохимическими свойствами оксопиримидина, входящего как в состав гуанина, так и в  $H_4Gmp$ .



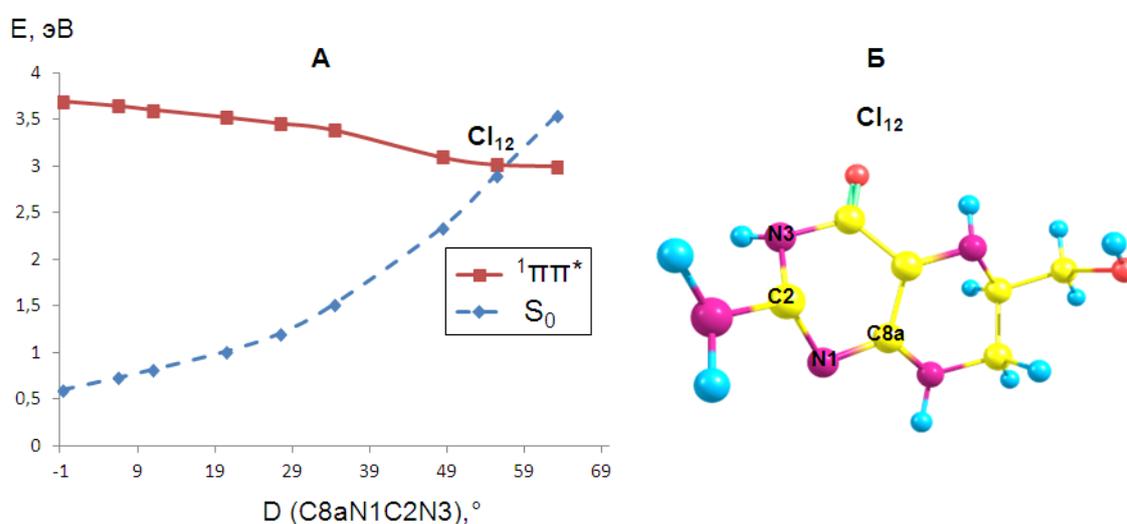
**Рис. 6.** Оптимизированная геометрия  $H_4Gmp$ , соответствующая минимуму возбужденного состояния  $^1\pi\pi^*$ .

Рассчитанная адиабатическая энергия состояния  $^1\pi\pi^*$  (2,96 эВ) ниже адиабатической энергии состояния  $^1Ry$  (3,26 эВ). Таким образом, в действительности состояние  $^1\pi\pi^*$  лежит ниже  $^1Ry$ , и именно  $^1\pi\pi^*$  является нижним возбужденным синглетным состоянием.

Для пуринового основания гуанина, было показано наличие конических пересечений (CI) возбужденного и основного состояний, связанных с внеплоскостной деформацией 6-членного пиримидинового кольца и характеризующихся вращением С-С и С-Н связей, которые в основном состоянии являются двойными. Для того чтобы показать наличие конического пересечения и возможность внутренней конверсии между возбужденным состоянием  $^1\pi\pi^*$  и основным состоянием  $S_0$ , требуется провести сканирование ППЭ состояния  $^1\pi\pi^*$   $H_4Gmp$ , оценить величину

энергетического барьера между областью Франка-Кондона и CI, определить геометрию CI. Если функция потенциальной энергии состояния  ${}^1\pi\pi^*$  вдоль соответствующей координаты реакции не имеет существенного энергетического барьера, то высока вероятность быстрой безызлучательной дезактивации состояния  ${}^1\pi\pi^*$  путем внутренней конверсии  ${}^1\pi\pi^*/S_0$ .

В основном состоянии  $N_4$ Гмп двойная связь расположена между атомами N1 и C2, поэтому мы предположили, что CI можно достичь путем вращения связи N1-C2. В этой связи мы провели сканирование ППЭ состояния  ${}^1\pi\pi^*$  по двугранному углу C8a-N1-C2-N3. Начиная с равновесной геометрии основного состояния, величина двугранного угла C8a-N1-C2-N3 фиксируется при различных значениях, по остальным внутренним координатам происходит оптимизация геометрии состояния  ${}^1\pi\pi^*$ . Результат сканирования представлен на Рисунке 7. Линией с квадратами показан профиль энергии состояния  ${}^1\pi\pi^*$ . Линией с ромбами показаны значения энергии состояния  $S_0$ , рассчитанные относительно  ${}^1\pi\pi^*$  оптимизированной геометрии. Была получена функция потенциальной энергии состояния  ${}^1\pi\pi^*$  вдоль координаты C8a-N1-C2-N3, ведущая к коническому пересечению  ${}^1\pi\pi^*/S_0$  и не имеющая энергетического барьера (Рис. 7, А). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что безызлучательное тушение происходит эффективно через коническое пересечение, что, в свою очередь, объясняет отсутствие флюоресценции и фосфоресценции у восстановленных форм птеринов.



**Рис. 7.** А. Профили потенциальной энергии возбужденного состояния  ${}^1\pi\pi^*$  и основного состояния  $S_0$   $N_4$ Гмп. Б. Геометрия конического пересечения состояний  ${}^1\pi\pi^*$  и  $S_0$ .

Геометрия конического пересечения  ${}^1\pi\pi^*/S_0$  была найдена методом CASSCF. На Рисунке 7Б представлена геометрия конического пересечения  $CI_{12}$ . Представляется интересным провести сравнение геометрии, полученного нами конического пересечения  $CI_{12}$  с описанным в литературе коническим пересечением гуанина (Yamazaki et al., 2008). Геометрия  $CI_{12}$  характеризуется значением двугранного угла  $D(C8a-N1-C2-N3) = 62,1^\circ$ . Аналогичная величина для геометрии CI гуанина составляет  $69,0^\circ$ . Кроме того,  $CI_{12}$  характеризуется значением двугранного угла  $D(N-$

N3-C2-N1) 78,8°, аналогичная величина для гуанина составляет 81,1°. Также отметим, что для C1<sub>12</sub> D(C8a-N1-C2-N9) = -146,6°. Отсюда видно, что конические пересечения гуанина и H<sub>4</sub>Гмп имеют схожую геометрию, оба характеризуются внеплоскостной деформацией пиримидинового кольца, оба имеют электронную конфигурацию <sup>1</sup>ππ\* и, очевидно, имеют одинаковую природу.

Функция потенциальной энергии (ПЭ) состояния <sup>1</sup>ππ\* вдоль координаты D(C8a-N1-C2-N3) не имеет энергетического барьера, вследствие чего можно предполагать, что скорость дезактивации <sup>1</sup>ππ\* крайне высока. Аналогичные профили потенциальной энергии подробно описаны в литературе для азотистых оснований нуклеиновых кислот, с помощью них объяснены высокая фотостабильность данных соединений и исключительно короткое время жизни их возбужденных состояний. Таким образом, можно предположить, что время жизни фотовозбужденного H<sub>4</sub>Гмп имеет такой же порядок, как и время жизни возбужденных азотистых оснований, то есть ~ 1 пс.

### *Сравнение конформаций H<sub>4</sub>Гмп и катион-радикала H<sub>4</sub>Гмп<sup>•+</sup>*

Сильные электрондонорные свойства тетрагидровосстановленных птеринов указывают на возможность переноса электрона при их возбуждении ультрафиолетом. Учитывая конформационную лабильность тетрагидровосстановленных птеринов, мы предположили, что изменение редокс-состояния может сопровождаться изменением конформации. Были отобраны 7 основных конформаций H<sub>4</sub>Гмп и H<sub>4</sub>Гмп<sup>•+</sup> с энергией Гиббса ΔG < 3,0 ккал/моль и ΔG < 2,4 ккал/моль относительно наиболее стабильной конформации, соответственно.

Наиболее стабильной для H<sub>4</sub>Гмп является аксиальная конформация **1** (Таблица 5), которая определяется, в первую очередь, величиной двугранного угла D (N5-C6-C1'-O') = 55,3°. Согласно больцмановскому распределению, доля конформера **1** составляет 89,1 %.

**Таблица 5.** Двугранные углы, относительная энергия Гиббса, заселенность и дипольный момент семи наиболее стабильных конформеров H<sub>4</sub>Гмп.

№	D (C <sup>4a</sup> -N <sup>5</sup> -C <sup>6</sup> -C <sup>1'</sup> ), °	D (N <sup>5</sup> -C <sup>6</sup> -C <sup>1'</sup> -O'), °	D (C <sup>6</sup> -C <sup>1'</sup> -O'-H'), °	ΔG, ккал моль <sup>-1</sup>	Заселенность, %	μ, Д
<b>1</b>	-168,7	55,3	-42	0	89,1	4,7
<b>2</b>	-171,1	-179	67,5	2,08	2,7	3,6
<b>3</b>	-174,3	-58,8	-66,5	2,27	1,9	4,7
<b>4</b>	-73,2	-55,2	72,6	2,32	1,8	4,9
<b>5</b>	-168,4	-53,5	78,4	2,38	1,6	4,9
<b>6</b>	-173,2	-63,4	165,7	2,40	1,5	3,9
<b>7</b>	-171,6	182	181	2,45	1,4	2,8

Основной конформер H<sub>4</sub>Гмп<sup>•+</sup> характеризуется двугранным углом D (N5-C6-C1'-O') = -45,6°. Наиболее стабильная конформация H<sub>4</sub>Гмп<sup>•+</sup> **1'** (Таблица 6) соответствует конформации **6** нейтральной молекулы. Если для катион-радикала доля конформации **1'** составляет 61,5%, то для нейтральной молекулы доля соответствующей конформации равна 1,5%.

**Таблица 6.** Двугранные углы, относительная энергия Гиббса, заселенность и дипольный момент семи наиболее стабильных конформеров катион-радикала  $H_4Gmp^{+\bullet}$ .

№	D (C <sup>4a</sup> -N <sup>5</sup> -C <sup>6</sup> -C <sup>1'</sup> ), °	D (N <sup>5</sup> -C <sup>6</sup> -C <sup>1'</sup> -O'), °	D (C <sup>6</sup> -C <sup>1'</sup> -O'-H'), °	ΔG, ккал моль <sup>-1</sup>	Заселенность, %	μ, Д
1'	-159,7	-51,6	177	0	61,5	4,1
2'	-158,6	-46,3	-90,9	0,77	16,7	5,0
3'	-157,5	60,4	178,5	0,96	12,1	3,2
4'	-92,9	-53,7	-176,2	1,82	2,8	4,8
5'	-88,8	64	-174,1	1,84	2,7	2,6
6'	-90,4	-179,5	170,7	1,96	2,2	3,5
7'	-158,9	180,7	177,6	2,07	1,9	3,1

Таким образом, с помощью квантово-химических расчетов для  $H_4$ птеринов показано: 1) природа возбужденных состояний  $H_4$ птеринов схожа с природой возбужденных состояний гуанина, известного своей фотостабильностью; 2) возможность быстрой безызлучательной дезактивации возбужденных синглетных состояний; 3) при образовании катион-радикальной формы  $H_4$ -восстановленного птерина возможно изменение конформации молекулы.

### **3. Влияние строения окисленных птеринов на фотосенсибилизированную генерацию АФК**

Для молекул-сенсibilизаторов важно оценить возможность протекания реакции генерации синглетного кислорода, а также вероятность образования побочного продукта – супероксид-анион радикала  $O_2^{\bullet-}$ . Особенно это важно для сенсibilизаторов, применяемых в фотодинамической терапии. Вероятность протекания фотохимических реакций, связанных с переносом энергии и электрона на молекулярный кислород, можно оценить с помощью квантово-химических расчетов, сопоставив значения энергии возбужденного состояния сенсibilизатора  $T_1$  ( $E_{T1}$ ), его потенциала ионизации ( $IP_{T1}$ ), энергии сродства к электрону ( $E_{AT1}$ ), а также энергию синглетного возбужденного состояния  $^1O_2$  молекулярного кислорода и относительную энергию  $O_2^{\bullet-}$ .

Фотофизические характеристики рассчитаны нами для шести птериновых молекул (Таблица 7). Вычисления проведены для нейтральных форм, характерных для кислых и нейтральных значений рН, и для анионных форм птеринов, преобладающих в щелочных растворах. Средняя ошибка при расчете длинноволнового максимума в спектре поглощения и максимума в спектре фосфоресценции птеринов составила 0,08 эВ и 0,07 эВ, соответственно. Таким образом, расчетные данные хорошо согласуются с данными эксперимента.

Энергия синглетного состояния кислорода  $^1\Delta_g$ , согласно нашим расчетам, составила 0,89 эВ, а энергия состояния  $^1\Sigma_g^+$  равна 1,65 эВ. Энергия супероксид-анион радикала, или энергия сродства к электрону молекулярного кислорода, составила -3,58 эВ. Все величины хорошо согласуются с экспериментальными данными. Перенос энергии на молекулярный кислород возможен, если энергия триплетного состояния птериновой молекулы больше 0,89 эВ. Прямой перенос электрона на молекулярный

кислород возможен, если  $IP_{T_1}$  птериновой молекулы и относительная энергия  $O_2^{\bullet-}$  при суммировании дают отрицательное значение.

**Таблица 7.** Фотофизические характеристики нейтральных ( $P_{tr}$ ) и анионных ( $P_{tr}^-$ ) форм птеринов по данным расчета методом B3LYP/6-311G++(2d,2p)//B3LYP/6-31G+(d,p) в эВ. Энергия сродства к электрону ( $E_{A_{S_0}}$ ) и потенциал ионизации ( $IP_{S_0}$ ), рассчитанные на основании геометрии основного состояния; экспериментальный максимум фосфоресценции ( $E_{T_1}^{exp}$ ); адиабатическая разница энергий  $T_1$  и  $S_0$  ( $E_{T_1}^{adia}$ ); энергия сродства к электрону  $T_1$  ( $E_{A_{T_1}}$ ) и потенциал ионизации  $T_1$  ( $IP_{T_1}$ ), рассчитанные на основании геометрии  $T_1$ .

	$E_{A_{S_0}}$	$IP_{S_0}$	$E_{T_1}$	$E_{T_1}^{exp}$	$E_{A_{T_1}}$	$IP_{T_1}$
<b>Птр</b>	-2,60	6,41	2,59 (478 нм)	2,52 (492 нм) <sup>c</sup>	-5,23	3,89
<b>Птр<sup>-</sup></b>	-2,09	5,69	2,44 (508 нм)	2,46 (505 нм) <sup>a</sup>	-4,54	3,33
<b>Бип</b>	-2,60	6,38	2,48 (500 нм)	-	-5,20	4,02
<b>Бип<sup>-</sup></b>	-2,14	5,72	2,30 (539 нм)	-	-4,55	3,51
<b>Гмп</b>	-2,62	6,34	2,48 (499 нм)	-	-5,16	3,95
<b>Гмп<sup>-</sup></b>	-2,13	5,65	2,33 (531 нм)	2,41 (515 нм) <sup>a</sup>	-4,49	3,39
<b>Фоп</b>	-2,97	6,59	2,50 (496 нм)	-	-5,50	4,22
<b>Фоп<sup>-</sup></b>	-2,55	5,92	2,32 (534 нм)	2,41 (515 нм) <sup>a</sup>	-4,92	3,72
<b>Кап</b>	-2,97	6,62	2,50 (495 нм)	2,52 (492 нм) <sup>c</sup>	-5,52	4,26
<b>Кап<sup>-</sup></b>	-2,50	5,95	2,55 (486 нм)	2,46 (505 нм) <sup>a</sup>	-5,05	3,63
<b>Дмп</b>	-2,33	6,19	2,60 (477 нм)	2,46 (505 нм) <sup>b</sup>	-4,98	3,67
<b>Дмп<sup>-</sup></b>	-1,84	5,49	2,47 (503 нм)	-	-4,32	3,12

<sup>a</sup> Parker et al., 1979; <sup>b</sup> Neverov et al., 1996; <sup>c</sup> Song et al., 2007

Поскольку все формы птеринов имеют значения  $E_{T_1} \gg 1,65$  эВ (Таблица 7), все они способны в триплетном состоянии генерировать как  $^1\Delta_g$ , так и  $^1\Sigma_g^+$  состояние синглетного кислорода, что согласуется с литературными данными.

Для участия в реакции переноса электрона на  $O_2$  триплетное состояние должно иметь потенциал ионизации выше 3,58 эВ. Как следует, из Таблицы 7, анионные формы всех птеринов, кроме Кап и Фоп, способны участвовать в переносе электрона ( $IP_{T_1} + E(O_2^{\bullet-}) < 0$ ). Все нейтральные формы, напротив, в переносе электрона не участвуют ( $IP_{T_1} + E(O_2^{\bullet-}) > 0$ ). Наиболее высокое значение  $IP_{T_1}$  имеют соединения с наиболее электроотрицательными боковыми заместителями (-формил, -карбоксил). Таким образом, в кислых и нейтральных растворах триплеты птеринов при взаимодействии с  $O_2$  не образуют  $O_2^{\bullet-}$ .

Исходя из вышеизложенного, окисленные птерины, прежде всего 6-карбокситерин и 6-формилптерин, могут быть рекомендованы для применения в качестве фотодинамических агентов.

### Результаты QSPR анализа

На основе анализа данных для 29 птеридиновых молекул получены 4 линейные регрессионные модели, предсказывающие квантовый выход генерации синглетного кислорода птеридинами (Рис. 8).

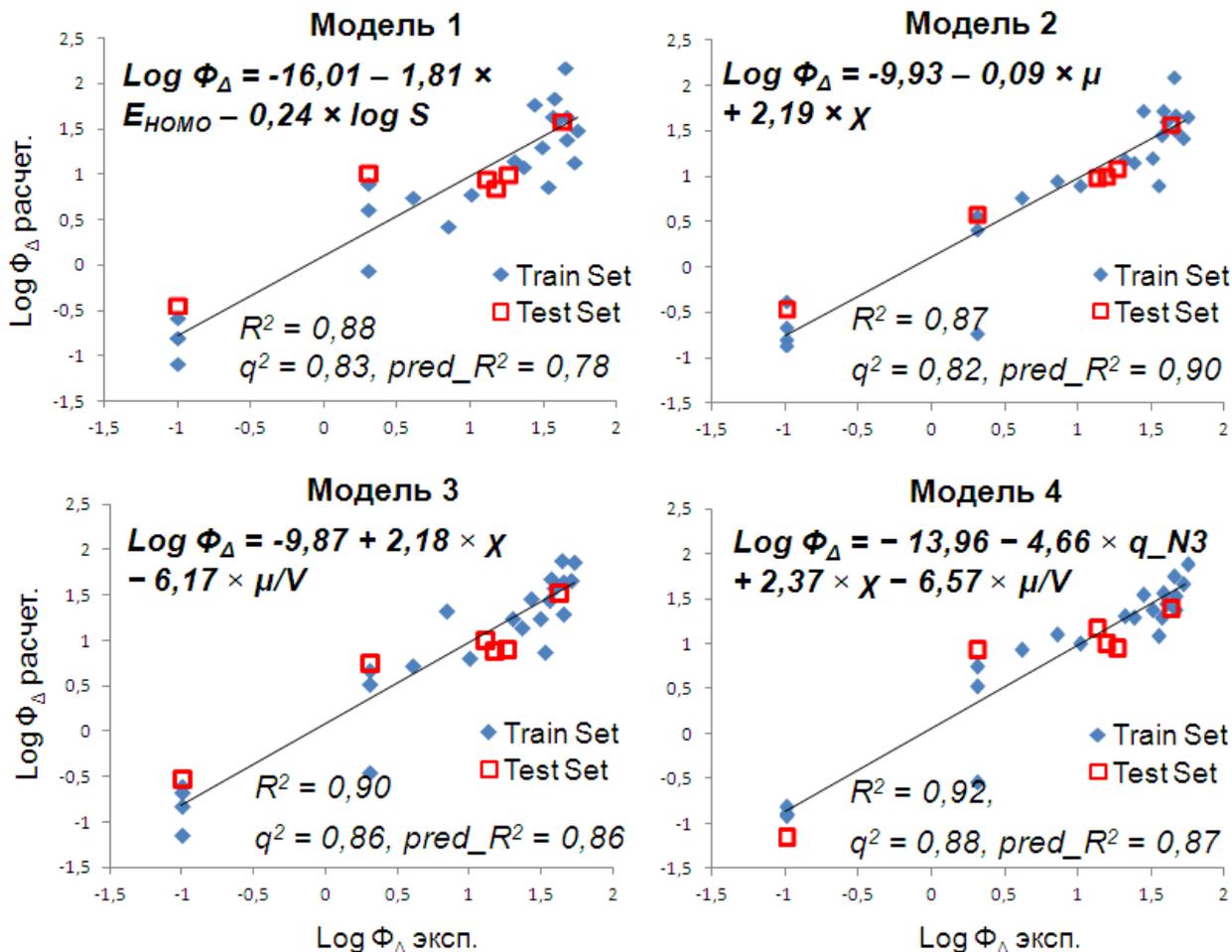
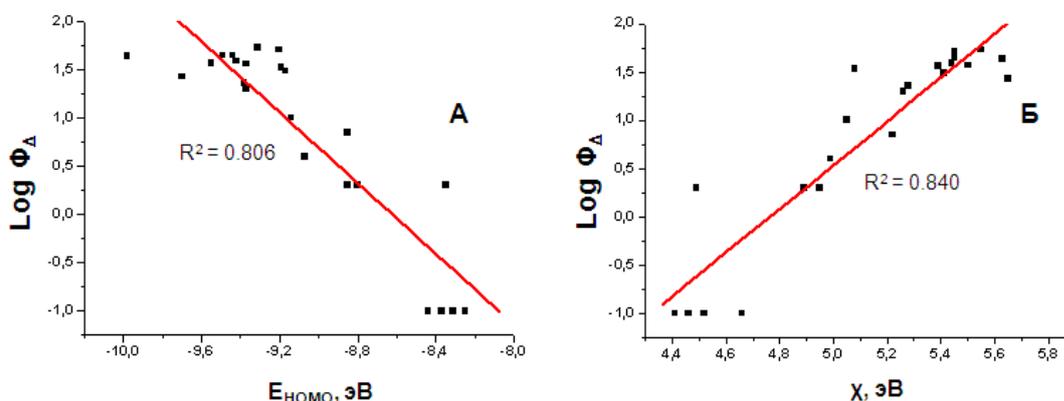


Рис. 8. QSPR модели, предсказывающие квантовый выход генерации  $^1\text{O}_2$ . Сравнение экспериментальных и расчетных значений  $\log \Phi_{\Delta}$ .

**Модель 1** показывает, что логарифм квантового выхода генерации синглетного кислорода зависит от растворимости и  $E_{\text{НОМО}}$ .  $E_{\text{НОМО}}$  (относительный вклад дескриптора в Модель 1 составляет -88,7%) - энергия НОМО орбитали. Корреляция между  $\log \Phi_{\Delta}$  и  $E_{\text{НОМО}}$  носит обратную зависимость (Рис. 9, А). Согласно теореме Купманса, энергия НОМО орбитали молекулы приближенно равна потенциалу ионизации, взятому с обратным знаком. Чем выше потенциал ионизации фотосенсибилизатора, тем выше значение  $f_{\Gamma}^{\Delta}$  (эффективность генерации  $^1\text{O}_2$ ) (Schweitzer, Schmidt, 2003). Молекулярная растворимость в воде (-11,3%) выражается как  $\log S$ , где  $S$  - растворимость в моль л<sup>-1</sup>. Корреляция между  $\log \Phi_{\Delta}$  и  $\log S$  носит обратную зависимость. Возможное объяснение роли параметра  $\log S$  связано с тем,

что слаборастворимые птеридины могут агрегировать в воде, что, в свою очередь, может снижать эффективность тушения  $^1\text{O}_2$ .



**Рис. 9.** А. Линейная зависимость экспериментального значения  $\log \Phi_{\Delta}$  от энергии НОМО орбитали ( $E_{НОМО}$ ). Б. Линейная зависимость экспериментального значения  $\log \Phi_{\Delta}$  от абсолютной электроотрицательности ( $\chi$ ).

Параметр абсолютной электроотрицательности ( $\chi = -(E_{НОМО} + E_{LUMO})/2$ , где  $E_{LUMO}$  – энергия нижней свободной молекулярной орбитали) в большей степени коррелирует с  $\log \Phi_{\Delta}$ , чем  $E_{НОМО}$ :  $R^2 = 0,840$  и  $R^2 = 0,806$ , соответственно (Рис. 9). Была построена Модель 2, связывающая величину  $\log \Phi_{\Delta}$  с электроотрицательностью и дипольным моментом.

$\chi$  (89,7%) вносит основной вклад в **Модель 2** (Рис. 8).  $\log \Phi_{\Delta}$  напрямую зависит от электроотрицательности. Параметр  $\chi$  является мерой способности молекулы притягивать электроны. Для ряда соединений показано, что логарифм  $k_q^A$  (суммарная константа физического и химического тушения  $^1\text{O}_2$ ) линейно зависит как от  $E_{НОМО}$ , так и от  $\chi$ . По-видимому, корреляция между  $f_T^A$  и электроотрицательностью также возможна, поскольку и  $k_q^T$  (константа тушения триплетов) и  $k_q^A$  обычно имеет обратную корреляцию с потенциалом ионизации,  $k_q^T$  имеет обратную зависимость с  $f_T^A$ , а  $f_T^A$  коррелирует с потенциалом ионизации (Schweitzer, Schmidt, 2003). Отметим, что, как следует из работы E. Oliveros с соавторами (Oliveros et al., 2011), константы тушения синглетного кислорода птеринами обратно пропорциональны значениям  $\Phi_{\Delta}$ . Это еще раз свидетельствует в пользу того, что  $f_T^A$  и  $k_q^A$  имеют обратную корреляцию.  $F_T^A$  определяет значение  $\Phi_{\Delta}$  согласно формуле:

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_T p_T^{O_2} f_T^A$$

где  $p_T^{O_2}$  – доля триплетных состояний, которые тушатся  $\text{O}_2$  ( $p_T^{O_2} \approx 1$ ),  $\Phi_T$  – квантовый выход генерации триплета. В свою очередь,  $f_T^A$  определяется по формуле:

$$f_T^A = \frac{k_{et}[\text{O}_2]}{k_{et}[\text{O}_2] + k_q^T[\text{O}_2] + k_p + k_{ISC}}$$

где  $k_{et}$  – константа скорости реакции переноса энергии;  $k_p$  и  $k_{ISC}$  – константы скорости фосфоресценции и безызлучательного тушения триплетного состояния сенсibilизатора, соответственно.

**Таблица 1.** Значения молекулярных дескрипторов птеридиновых молекул и экспериментальные значения  $\log \Phi_{\Delta}$ .

№	Соединение	Е <sub>НОМО</sub> (эВ)	log S	$\chi$ (эВ)	$\mu$ (Д)	$\mu / V$ (Кл м <sup>-2</sup> )	q <sub>N3</sub>	log $\Phi_{\Delta}$
1	6-Метил-аллоксазин	-9,44	-2,47	5,45	3,96	0,063	-0,639	1,65
2	7-Метил-аллоксазин	-9,40	-2,49	5,42	4,48	0,071	-0,638	1,62
3	8-Метил-аллоксазин	-9,55	-2,49	5,50	4,64	0,073	-0,639	1,57
4	9-Метил-аллоксазин	-9,42	-2,47	5,44	4,24	0,067	-0,636	1,59
5	6-Биоптерин	-9,19	-1,15	5,08	3,56	0,055	-0,725	1,53
6	6-Карбоксиптерин	-9,70	-1,09	5,65	8,35	0,161	-0,684	1,43
7	6,7-Диметилптерин	-9,07	-1,55	4,99	2,59	0,048	-0,729	0,60
8	ФАД	-8,85	-1,89	5,22	6,26	0,032	-0,624	0,85
9	ФМН	-9,20	-2,2	5,45	6,71	0,057	-0,665	1,71
10	Фолиевая кислота (ФК)	-8,89	-3,97	4,97	4,40	0,036	-0,719	0,30
11	6-Формилптерин	-9,49	-1,05	5,45	5,94	0,119	-0,689	1,65
12	6-Био-7,8-дигидро-Птр	-8,31	-0,87	4,46	7,25	0,110	-0,692	-1,00
13	7,8-Дигидро-ФК	-8,35	-3,62	4,47	6,92	0,057	-0,688	0,30
14	6-Формил-7,8-	-8,44	-0,78	4,66	7,54	0,148	-0,659	-1,00
15	7,8-Дигидронео-Птр	-8,37	-0,41	4,52	7,36	0,108	-0,657	-1,00
16	7,8-Дигидроксантоп-Птр	-8,25	-0,09	4,41	6,73	0,143	-0,762	-1,00
17	6-Гидроксиметил-Птр	-9,25	-0,60	5,15	4,08	0,080	-0,704	1,18
18	Люмазин	-9,98	-0,62	5,63	3,71	0,088	-0,631	1,64
19	Люмихром	-9,37	-2,98	5,39	4,97	0,072	-0,633	1,56
20	Люмифлавин	-9,17	-3,12	5,41	8,35	0,112	-0,697	1,49
21	12-N-Метил-ФК	-8,85	-3,79	4,89	2,45	0,019	-0,7	0,30
22	6-Метилптерин	-9,14	-1,14	5,05	2,75	0,056	-0,721	1,00
23	Неоптерин	-9,38	-0,63	5,28	5,51	0,083	-0,708	1,36
24	Птероевая кислота	-8,80	-2,98	4,95	5,61	0,065	-0,686	0,30
25	Птерин (Птр)	-9,31	-0,74	5,15	3,26	0,075	-0,687	1,26
26	Рамноптерин	-9,22	-1,20	5,12	3,61	0,050	-0,713	1,11
27	Рибофлавин	-9,31	-2,81	5,55	6,44	0,061	-0,667	1,73
28	Сепиаптерин	-8,45	-1,25	4,65	8,31	0,129	-0,569	-1,00
29	6-тетрагидроксиптерин	-9,37	-0,95	5,26	4,62	0,058	-0,686	1,30

Е<sub>НОМО</sub> – энергия НОМО орбитали, log S – растворимость в воде,  $\chi$  – абсолютная электроотрицательность,  $\mu$  – дипольный момент,  $\mu/V$  – плотность дипольного момента, q<sub>N3</sub> – электростатический заряд атома N3 птеридиновой структуры

Дипольный момент  $\mu$  (-10,3%) и log  $\Phi_{\Delta}$  имеют обратную корреляцию. Одно из возможных объяснений роли дипольного момента в Модели 2 связано с тем, что индуцированный при столкновении с птеридином дипольный момент перехода в молекуле кислорода может взаимодействовать с дипольными моментами переходов в растворителе или птеридине; данное взаимодействие определяет диполь-дипольный безызлучательный перенос энергии и тушение <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (Минаев, 2009).

Введение параметра плотности электрического дипольного момента ( $\mu/V$ ) способствовало улучшению статистических параметров Модели 2 и позволило построить **Модель 3** (Рис. 8).

Вклад параметра  $\chi$  в Модель 3 составляет 87,4%.

$\mu/V$  (-12,6%) - плотность электрического дипольного момента (дипольный момент молекулы, нормированный на ее объем). Корреляция между  $\log \Phi_A$  и  $\mu/V$  носит обратную зависимость.

**Модель 4** (Рис. 9) связывает значение  $\log \Phi_A$  с тремя дескрипторами:  $\chi$  (79,7%),  $\mu/V$  (-11,5%) и  $q_{N3}$  (-8,7%).  $Q_{N3}$  – электростатический заряд атома N3 птеридиновой структуры (см. Рис. 4). Чем ниже электростатический заряд атома N3, тем выше сенсibiliзирующая активность птеридина. Очевидно, что размер электростатического заряда атома N3 определяется, в первую очередь, характером заместителей в C2 и C4 положениях. Наиболее низкие значения электростатического заряда при N3 имеют дигидроксантиперин, диметилптерин и биоптерин, то есть соединений, относящиеся к птериновому ряду. В то же время флавины и люмазин имеют преимущественно высокие значения электростатического потенциала при N3. Возможное объяснение роли дескриптора  $q_{N3}$  связано с переносом заряда с неподеленной электронной пары азота на  $^1O_2$ , что ведет к тушению  $^1O_2$  (Minaev, 1984).

Считается, что QSPR модель обладает предсказательной способностью, если удовлетворяются следующие условия:  $R^2 > 0,6$ ,  $q^2 > 0,6$  и  $\text{pred}_R^2 > 0,5$ . Все 4 модели обладают хорошей внутренней и внешней предсказательной способностью (Рис. 8). Модель 4 демонстрирует лучшие показатели в предсказании активности соединений как для тренировочного ( $q^2 = 0,881$ ), так и для тестового набора соединений ( $\text{pred}_R^2 = 0,873$ ).

Способность птеридинов генерировать синглетный кислород в значительной мере коррелирует с энергией HOMO орбитали ( $R^2 = 0,806$ ) и электроотрицательностью ( $R^2 = 0,840$ ) (Рис. 9). Мы полагаем что энергия HOMO и электроотрицательность вносят основной вклад в Модели 1-4, поскольку молекулы имеют схожее строение (все имеют птеридиновую систему), и энергия триплета у разных птеридиновых молекул отличается незначительно. Таким образом, наши результаты, полученные методом QSPR, не противоречат известным данным о фотогенерации синглетного кислорода.

Таким образом, нами показано, что QSPR метод применим к исследованию процессов фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода, дает адекватные результаты и позволяет предсказывать квантовый выход генерации  $^1O_2$ . Можно полагать, что полученные нами модели могут быть полезны для виртуального скрининга и последующего синтеза птеридиновых сенсibiliзаторов с высокой эффективностью генерации  $^1O_2$ .

### Заключение.

Впервые изучена фотохимия восстановленных форм птеринов. Исследован процесс фотоокисления кофермента 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина (Н<sub>4</sub>Бип) под действием ультрафиолета в водном растворе. При фотоокислении Н<sub>4</sub>Бип наиболее эффективно воздействие монохроматического ультрафиолета с длиной волны 350 нм, что объяснено возможностью реакций фотосенсибилизированного окисления Н<sub>4</sub>Бип продуктами его деградации. Мы полагаем, что, поскольку при заболевании витилиго в депигментированных клетках эпидермиса происходит накопление как Н<sub>4</sub>Бип, так и Бип, описанный процесс фотосенсибилизированного окисления Н<sub>4</sub>Бип может вести к развитию патологии.

Методами квантовой химии фотостабильность тетрагидровосстановленных форм птеринов оценена как высокая: показана возможность быстрой внутренней конверсии их возбужденных синглетных состояний и схожесть данного процесса с процессом внутренней конверсии возбужденного гуанина. В то же время, показано, что в случае переноса электрона на молекулу-акцептор и образования катион-радикала возможно изменение конформации молекулы тетрагидровосстановленного птерина; по-видимому, Н<sub>4</sub>птерины, играющие роль фоторецепторных молекул в живых организмах, таким образом могут передавать сигнал о воздействии УФ излучения.

Впервые построена серия QSPR моделей, описывающих зависимость квантового выхода генерации синглетного кислорода ( $\Phi_{\Delta}$ ) от структуры птерицинов. Кроме того, методами квантовой химии рассчитаны и сравнены фотофизические характеристики шести птериновых молекул. Показано, что в нейтральных и кислых водных растворах в ходе реакции триплетного состояния птерина с O<sub>2</sub> фототоксичный супероксид-анион радикал не образуется. Данный аспект позволяет рекомендовать птерины в качестве фотодинамических агентов.

Еще один важный аспект фотохимии птеринов – эволюционный. В контексте гипотезы «РНК мира» фотокаталитические реакции птеринов могут играть существенную роль (Крицкий, Телегина, 2004). В условиях абиогенеза птерицины, по-видимому, могли синтезироваться при термоконденсации абиогенных аминокислот (Fox, Dose, 1972; Heinz et al., 1979). Птерины могли поглощать УФ и функционировать в качестве фотокатализаторов свободно-радикальных процессов. В неокислительных условиях предбиологической и ранней биологической эволюции показанное нами сходство электронной конфигурации восстановленных птеринов и гуанина и их однотипная фотоустойчивость, обусловленная внутренней конверсией энергии фотовозбуждения, возможно, позволяли птеринам включаться в состав прото-РНК. Конъюгированные в прото-РНК восстановленные птерины могли функционировать в качестве доноров электрона и водорода в различных процессах, связанных с запасанием свободной энергии.

## ВЫВОДЫ

1. Методами ВЭЖХ и ВЭЖХ-MS/MS-масс-спектрометрии установлены продукты, образующиеся при воздействии УФ на 5,6,7,8-тетрагидробиоптерин (Н<sub>4</sub>Бип) в водном растворе в присутствии кислорода воздуха. Основными продуктами являются 7,8-дигидробиоптерин (Н<sub>2</sub>Бип), димер (Н<sub>2</sub>Бип)<sub>2</sub>, 7,8-дигидроптерин, 7,8-дигидроксантоптерин и 6-биоптерин (Бип).

2. Впервые показана возможность фотосенсибилизированного окисления Н<sub>4</sub>Бип. В роли сенсибилизатора может выступать Бип - продукт окисления Н<sub>4</sub>Бип. Доминирующим является механизм сенсибилизации I типа.

3. С помощью квантово-химических расчетов показана возможность быстрой внутренней конверсии возбужденных состояний тетрагидровосстановленных птеринов. Впервые продемонстрировано, что природа возбужденных состояний тетрагидровосстановленных птеринов схожа с природой возбужденных состояний гуанина.

4. При образовании катион-радикальных форм возможно изменение конформации тетрагидровосстановленных птеринов, что может иметь значение в связи с их фоторецепторными функциями в живых организмах.

5. Впервые построена серия QSPR моделей, предсказывающих порядок величины квантового выхода генерации синглетного кислорода ( $\Phi_{\Delta}$ ) в зависимости от структуры птеридинов.

6. Методами квантовой химии для 6 птериновых сенсибилизаторов показано, что они не генерируют супероксид-анион радикал, что позволяет рекомендовать птерины в качестве потенциальных фотодинамических агентов.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых журналах:

1. **Buglak A.A.**, Telegina T.A., Kritsky M.S. A quantitative structure-property relationship (QSPR) study of singlet oxygen generation by pteridines. Photochemical and Photobiological Sciences. 2016. v. 15, p. 801-811.

2. **Buglak A.A.**, Telegina T.A., Lyudnikova T.A., Vechtomova Yu.L., Kritsky M.S. Photo-oxidation of tetrahydrobiopterin under UV-irradiation: possible pathways and mechanisms. – Photochemistry and Photobiology. 2014. v. 90, N 5, p. 1017-1026.

3. Kritsky M.S., Telegina T.A., Vechtomova Y.L., Kolesnikov M.P., Lyudnikova T.A., **Buglak A.A.** Photoexcited molecules of pteridine derivatives in prebiotic and biological evolution. Paleontological Journal. 2013. v. 47, N 9, p. 1074-1079.

4. Kritsky M.S., Telegina T.A., Vechtomova Yu.L., **Buglak A.A.** Why flavins are not competitors of chlorophyll in the evolution of biological converters of solar Energy. International Journal of Molecular Sciences. 2013. v. 14, N 1, p. 575-593.

### Статьи в сборниках:

1. **Буглак А.А.**, Телегина Т.А., Людникова Т.А., Вечтомова Ю.Л., Крицкий М.С. Фотоокисление тетрагидробиоптерина: возможные механизмы // Сборник статей. Международная научная конференция «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», 2014, Минск, Беларусь, стр. 245-247.

2. **Буглак А.А.**, Телегина А.А., Крицкий М.С. Теоретическое исследование механизма сенсibilизированного биоптерином окисления тетрагидробиоптерина // Сборник статей. Всероссийская научная конференция «Квантово-механические расчеты: структура и реакционная способность органических и неорганических молекул», 2013, Иваново, стр. 50-54.

#### **Материалы конференций:**

1. **Buglak A.A.**, Telegina T.A., Lyudnikova T.A., Vechtomova Y.L., Kritsky M.S. Redox reactions of tetrahydrobiopterin: the effects of light and possible relation to vitiligo treatment. The Third International Conference on Cofactors, Turku, Finland, July 10-15, 2011. Book of abstracts, p. 111.

2. **Буглак А.А.**, Людникова Т.А., Телегина Т.А., Вечтомова Ю.Л., Крицкий М.С. Фотохимические реакции тетрагидробиоптерина в контексте метаболических нарушений при витилиго и подходов к фототерапии этого заболевания. – VI Съезд Российского фотобиологического общества, пос. Шепси, Краснодарский край, 15-22 сентября, 2011 г. Материалы съезда, с. 102.

3. **Buglak A.A.**, Telegina T.A., Lyudnikova T.A., Vechtomova Y.L., Kritsky M.S. Photooxidation of tetrahydrobiopterin upon UV-irradiation: possible pathways and mechanisms. The 3-rd International Symposium «MOLECULAR PHOTONICS» dedicated to academician A.N. Terenin, Saint-Petersburg, June 24-29, 2012. Book of abstracts, p. 49.

4. **Буглак А.А.**, Телегина Т.А., Людникова Т.А., Вечтомова Ю.Л., Крицкий М.С. Действие ультрафиолета на процесс окисления тетрагидробиоптерина: возможные механизмы. – Материалы докладов IV съезда биофизиков России, симпозиум II «Физические основы физиологических процессов», г. Нижний Новгород, 20-26 августа, 2012, с. 28.

5. **Buglak A.A.**, Telegina T.A., Lyudnikova T.A., Vechtomova Y.L., Kritsky M.S. Study of Tetrahydrobiopterin Photochemistry: in Vitro and in Silico. The 15th Congress of the European Society for Photobiology, Liege, Belgium, September 02-06, 2013. Book of abstracts, p. 127.

6. **Buglak A.A.**, Telegina T.A., Lyudnikova T.A., Vechtomova Y.L., Kritsky M.S. Conformational Changes of 6-Substituted Tetrahydropterins: Possible Relation to Photoreception. 16th International Congress on Photobiology, Cordoba, Argentina, September 08-12, 2014. Book of abstracts, p. 516.

7. **Buglak A.A.**, Telegina T.A., Kritsky M.S. Photo-oxidation of Tetrahydrobiopterin under UV Irradiation. 16th International Congress on Photobiology, Cordoba, Argentina, September 08-12, 2014. Book of abstracts, p. 192.

8. **Buglak A.A.**, Telegina T.A., Kritsky M.S. 6-Substituted tetrahydropterins: possible relation to molecular evolution of photoreception. International Conference "The Problem of the Origin of Life" and Youth Scientific School "Molecular and Cellular Basis of the Early Evolution of Life", Moscow, September 22-26, 2014. Book of abstracts, p.40-41.

9. **Buglak A.A.**, Telegina T.A., Kritsky M.S. Modelling Primary Reactions of Reduced Pterins under UV. 16th Congress of the European Society for Photobiology, Aveiro, Portugal, August 31 – September 4, 2015. Programme and book of abstracts, p. 82.