

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМЕНИ А.Н. БАХА**

На правах рукописи

БУГЛАК АНДРЕЙ АНДРЕЕВИЧ

ФОТОБИОХИМИЯ ПТЕРИНОВЫХ КОФЕРМЕНТОВ

03.01.04 Биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Т.А. Телегина

Москва – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Химические и фотохимические свойства птеринов.....	10
1.1.1. Классификация и биологическая роль разных групп птеринов	10
1.1.2. Биохимические функции и свойства 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина (H ₄ Бип). Аутоокисление H ₄ Бип.....	12
1.1.3. Фотофизические и фотохимические свойства птеринов	14
1.1.4. Участие окисленных птеринов в реакциях фотосенсибилизированного окисления	16
1.1.5. Генерация синглетного кислорода фотосенсибилизаторами. Параметры, определяющие величину квантового выхода генерации синглетного кислорода (Φ _Δ)	20
1.1.6. Генерация синглетного кислорода птеридинами.....	23
1.2. Фотохимические свойства и биологическая роль родственных групп гетероциклических соединений.....	26
1.2.1. Роль флавинов в работе флавопротеиновых фоторецепторов	26
1.2.2. Фотохимия азотистых оснований нуклеиновых кислот	29
1.3. Значение фотохимических реакций тетрагидровосстановленных птеринов для биологических процессов	35
1.3.1. Свидетельства участия птеринов в фоторецепции	35
1.3.2. Роль птеринов в патогенезе заболевания витилиго	37
1.3.3. Эволюционные аспекты фотохимии птеридинов	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	44
2.1. Материалы и оборудование	44
2.1.1. Реактивы.....	44
2.1.2. Установка для облучения образцов.....	44
2.2. Методы.....	44
2.2.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография и масс-спектрометрия.....	44
2.2.2. Расчет квантового выхода фотореакций.....	45
2.3. Квантово-химические расчеты	46
2.3.1. Оптимизация равновесной геометрии	46
2.3.2. Расчеты термодинамических параметров.....	47
2.3.3. Расчет электронных спектров поглощения и оптимизация геометрии возбужденных состояний методом TD-DFT	47
2.3.4. Расчет физико-химических свойств на основании оптимизированных геометрий .	48
2.3.5. Оптимизация геометрии конических пересечений ¹ ππ*/S ₀ H ₄ Гмп.....	48
2.4. Поиск количественных соотношений структура-свойство (QSPR)	48
2.4.1. Конформационный анализ и оптимизация геометрии	49
2.4.2. Молекулярные дескрипторы.....	49
2.4.3. Статистические параметры	50

2.4.4. Проверка достоверности моделей	51
2.4.5. Согласованность данных в анализируемой выборке.....	51
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	53
3.1. Фотоокисление тетрагидробиоптерина: возможные пути и механизмы.....	53
3.1.1. Окисление H ₄ Бип в водном растворе под действием широкополосного УФ-излучения	53
3.1.2. Окисление H ₄ Бип в растворе под действием монохроматического ультрафиолета с длиной волны $\lambda = 300$ нм.....	56
3.1.3. Окисление H ₄ Бип в растворе под действием монохроматического ультрафиолета с длиной волны $\lambda = 350$ нм.....	59
3.1.4. Фотосенсибилизированное биоптерином окисление H ₄ Бип	60
3.1.5. Влияние D ₂ O и супероксиддисмутазы на фотоокисление H ₄ Бип	63
3.1.6. Возможные механизмы сенсибилизированного биоптерином окисления H ₄ Бип, по данным квантово-химических расчетов	66
3.1.7. Расчет кинетических характеристик фотосенсибилизированного окисления H ₄ Бип	69
3.1.8. Оценка реакционной способности молекулы H ₄ Бип и отдельных атомов в ее составе на основе данных об индексах Фукуи	71
3.2. Исследование фотохимических свойств тетрагидровосстановленных птеринов методами квантовой химии	76
3.2.1. Оптимизация геометрии основного состояния	77
3.2.2. TD-DFT расчет энергии вертикальных электронных переходов 5,6,7,8-тетрагидрогидроксиметилптерина (H ₄ Гмп)	78
3.2.3. Геометрия возбужденных состояний H ₄ Гмп	82
3.2.4. Сканирование поверхности потенциальной энергии возбужденных состояний H ₄ Гмп	87
3.2.5. Геометрия конических пересечений ¹ ππ*/S ₀	90
3.2.6. Оценка возможности фототаутомеризации и вращения бокового заместителя в возбужденном состоянии H ₄ Гмп	91
3.2.7. Конформационный анализ нейтральной молекулы H ₄ Гмп и катион-радикала H ₄ Гмп ⁺	93
3.3. Влияние природы бокового заместителя на сенсибилизирующую активность окисленных форм птеринов	97
3.3.1. Оценка возможности реакций сенсибилизированной генерации активных форм кислорода.....	97
3.3.2. QSPR анализ генерации синглетного кислорода птеридинами	105
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114
ВЫВОДЫ	115
СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	118

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

$^1\text{O}_2$	синглетный кислород
CI	коническое пересечение
H ₂ Бип	7,8-дигидро-6-биоптерин
H ₂ Ксп	дигидроксантиоптерин
H ₂ Птр	7,8-дигидроптерин
H ₄ Бип	5,6,7,8-тетрагидробиоптерин
H ₄ Гмп	5,6,7,8-тетрагидро-6-гидроксиметилптерин
HOMO	верхняя занятая молекулярная орбиталь
IC	внутренняя конверсия
ISC	интеркомбинационная конверсия
LUMO	нижняя вакантная молекулярная орбиталь
q-H ₂ Бип	6,7-дигидробиоптерин (хиноноид)
QSPR	Quantitative Structure-Property Relationship (количественное соотношение структура-свойство)
Ry	ридберговское состояние
Φ _Δ	квантовый выход генерации синглетного кислорода
АФК	активные формы кислорода
Бип	6-биоптерин
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
Дмп	6,7-диметилптерин
Кап	6-карбоксихптерин
КФ	код фермента
ППЭ	поверхность потенциальной энергии
Птр	птерин
СОД	супероксиддисмутаза
ТГ	тирозин-гидроксилаза
ТПГ	триптофан-гидроксилаза
УФ	ультрафиолет
ФАГ	фенилаланин-гидроксилаза
Фоп	6-формилптерин

ВВЕДЕНИЕ

Предметом нашего исследования были птерины и, в том числе, их коферментные формы. В основе строения птеринов лежит конъюгированная система пиразинового и пиримидинового колец, так называемый птеридин. Птеридиновая структура является базовой также для фолатов (производные фолиевой кислоты) и флавинов (бензоптеридины). Исследование свойств фотовозбужденных молекул птеринов – это новая область фотобиохимии, сформировавшаяся в начале 90-х г.г. XX столетия. До этого времени публикации, касающиеся исследования возбужденных птериновых молекул носили эпизодический характер [Galland, Senger, 1988]. Начало систематическим исследованиям было положено появлением двух новых направлений исследований. Во-первых, птериновое производное - 5,10-метенилтетрагидрофолат (МТГФ) было идентифицировано в качестве светособирающей антенны, т.е. участника межмолекулярного нерadiационного переноса энергии, в фотоферменте ДНК-фотолиазе у широчайшего круга организмов, а также (это выяснилось несколько позднее) в распространенном регуляторном фоторецепторе криптохроме [Malhotra et al., 1995; Sancar, 2000]. Отметим, что за исследование механизма работы ДНК-фотолиазы А. Санкар получил Нобелевскую премию по химии в 2015 г. Во-вторых, независимо от этих наблюдений было начато исследование базовых фотофизических и фотохимических свойств биологических птеринов. Было установлено, что (1) молекулы птеринов активны в процессах переноса электрона, в том числе за счет окисления высокопотенциальных доноров, и этот процесс проходит с участием свободнорадикальных форм [Kritsky et al., 1997; Kritsky et al., 2001]; и (2) были охарактеризованы свойства триплетно-возбужденных молекул и показано, что молекулы птеринов являются фотогенераторами синглетного кислорода с выходом, достигающим (для окисленных птеринов) десятков процентов [Neverov et al., 1996; Егоров и др., 1999]. В последующих работах был раскрыт механизм ряда фотоиндуцированных редокс реакций с участием возбужденных птеринов [Kritsky et al., 2009; Dantola et al., 2010c; Lorente et al., 2011]. Работы по исследованию фотохимии птеринов проводятся на сегодняшний день в странах Латинской Америки, ЕС и США [Castano et al., 2015; Dantola et al., 2015; Serrano et al., 2015; Soniat, Martin, 2015].

К настоящему времени стало ясно, что список участников фоторецепторного акта в белках не ограничивается МТГФ, а включает также и ряд так называемых неконъюгированных птеринов (т.е. соединений, не являющихся производными фолиевой кислоты): 5,6,7,8-тетрагидроцианоптерин [Moon et al., 2012] и 5,6,7,8-тетрагидробиоптерин [Takeda et al., 2014]. В области изучения фотофизических и

фотохимических свойств птеринов интерес сместился от окисленных молекул к восстановленным птеринам [Крицкий и др., 1996; Людникова и др., 2009; Dantola et al., 2010b; Vignoni et al., 2010; Vignoni et al., 2011; Vignoni et al., 2012; Thomas et al., 2013], поскольку именно восстановленные формы птеринов преимущественно и функционируют в клетке в качестве участников ферментативных реакций.

Участие птериновых коферментов в метаболических реакциях в сочетании с фотохимической активностью данных соединений наводит на мысль об их возможной роли регуляторов метаболических путей. При нарушении обмена птеринов возникают патологические состояния. Например, метаболическая цепь реакций биосинтеза меланина, начальной стадией которой является ферментативное гидроксирование ароматических аминокислот фенилаланина и тирозина, зависит от 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина (Н₄Бип) [Wood et al., 1995; Thony et al., 2000]. При нарушении функционирования этой цепочки реакций в клетках дермы прекращается синтез меланиновых пигментов, что приводит к возникновению заболевания витилиго. На основании экспериментальных исследований высказывалось мнение, что ключевое значение в развитии патологии принадлежит нарушению синтеза и регенерации Н₄Бип [Schallreuter et al., 1994b; Schallreuter et al., 2001]. Исследование фотопроцессов с участием Н₄Бип и других птеринов под действием ультрафиолета приобретает в данном контексте особый интерес как в связи с анализом этиологии заболевания, так и в плане перспектив терапии. Необходим детальный анализ последствий воздействия ультрафиолета на тетрагидробиоптерин, анализ продуктов его фотоокисления и их фотосенсибилизирующей активности. Исследования в этом направлении ранее не проводились.

Актуальность тематики диссертационной работы определяется тем, что птерины представляют собой класс фоторецепторных соединений, функционирующих у широкого круга организмов. Фотофизика и фотохимия этих соединений изучены гораздо слабее, чем такие группы 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 птерицинов в качестве фотогенераторов синглетного кислорода. Последние два аспекта важны, в том числе, в контексте биомедицинских проблем.

С учетом всего вышеизложенного **цель** настоящей работы состояла в исследовании фотохимических свойств восстановленных коферментных форм птеринов и анализе фотосенсибилизирующей активности их окисленных производных.

В соответствии с целью работы сформулированы следующие **задачи**:

- идентифицировать продукты фотохимического окисления кофермента 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина (Н₄Бип);
- предложить механизм фотохимического окисления Н₄Бип;
- 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 (Н₄Бип) под действием ультрафиолета в водном растворе в присутствии кислорода воздуха. Показано, что при фотоокислении Н₄Бип наиболее эффективно воздействие монохроматического ультрафиолета с длиной волны 350 нм, что экспериментально обосновано возможностью реакций фотосенсибилизированного окисления Н₄Бип продуктами его деградации. Методами квантовой химии оценена возможность протекания реакций, составляющих основу фотосенсибилизированного окисления Н₄Бип, 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 (Φ_{Δ}) птеридинов в значительной степени коррелирует со значениями потенциала ионизации и электроотрицательности, а также с рядом других, второстепенных параметров. Построены QSPR модели, предсказывающие порядок величины Φ_{Δ} птеринов и флавинов.

Научно-практическая ценность работы:

- 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 Н₄Бип в развитии дерматологического заболевания витилиго;

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

- 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.

Методы исследования. В ходе выполнения диссертационного исследования были использованы следующие экспериментальные методы: УФ-видимая спектрофотометрия, ВЭЖХ и хромато-масс-спектрометрия (MS/MS). Квантово-химические расчеты выполнены методами DFT, TD-DFT и CASSCF. QSPR анализ выполнен методом множественной линейной регрессии.

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.

Все исследования и расчёты проведены корректно. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения.

Апробация результатов

По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе 6 статей и 9 тезисов в материалах отечественных и международных конференций.

Основные результаты работы были представлены соискателем и обсуждены в ходе ряда конференций и симпозиумов: III международная конференция по кофакторам (ISC-03), Турку, Финляндия, 2011; VI Съезд Российского фотобиологического общества, пос. Шепси, Краснодарский край, 2011; III международный симпозиум «Молекулярная фотоника», Санкт-Петербург, 2012; IV съезд биофизиков России, Нижний Новгород, 2012; XV Конгресс Европейского фотобиологического общества (ESP), Льеж, Бельгия, 2013; VI Всероссийская молодежная школа-конференция «Квантово-механические расчеты: структура и реакционная способность органических и неорганических молекул», Иваново, 2013; XI Съезд белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков,

Минск, 2014; XVI Международный конгресс по фотобиологии (ICP), Кордоба, Аргентина, 2014; Международная конференция "Проблема происхождения жизни" и молодежная научная школа "Молекулярные и клеточные основы ранней эволюции жизни", Москва, 2014.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Химические и фотохимические свойства птеринов

1.1.1. Классификация и биологическая роль разных групп птеринов

Птерины – низкомолекулярные гетероциклические соединения, которые широко распространены в живых организмах, в первую очередь, в виде восстановленных коферментных форм. В основе строения птерина лежит птеридин с карбонильной группой (-C=O) в С4 положении и аминогруппой (-NH₂) в С2 положении (Рис. 1, А). Птеридин представляет собой конденсированную систему пиримидина и пиазина. Птерины делятся на две обширные группы: производные фолиевой кислоты, или «конъюгированные» птерины, и «неконъюгированные» птерины (производные птерина). В состав фолатов помимо птерина входит остаток пара-амино-бензойной кислоты (п-АБК) и от 1 до 5 остатков глутаминовой кислоты (Глу) (Рис. 1, В). Кроме того, к птеринам относят и флавины (бензоптеридины) (Рис. 1, Б). В данной работе речь пойдет, в первую очередь, о «неконъюгированных» птеринах.

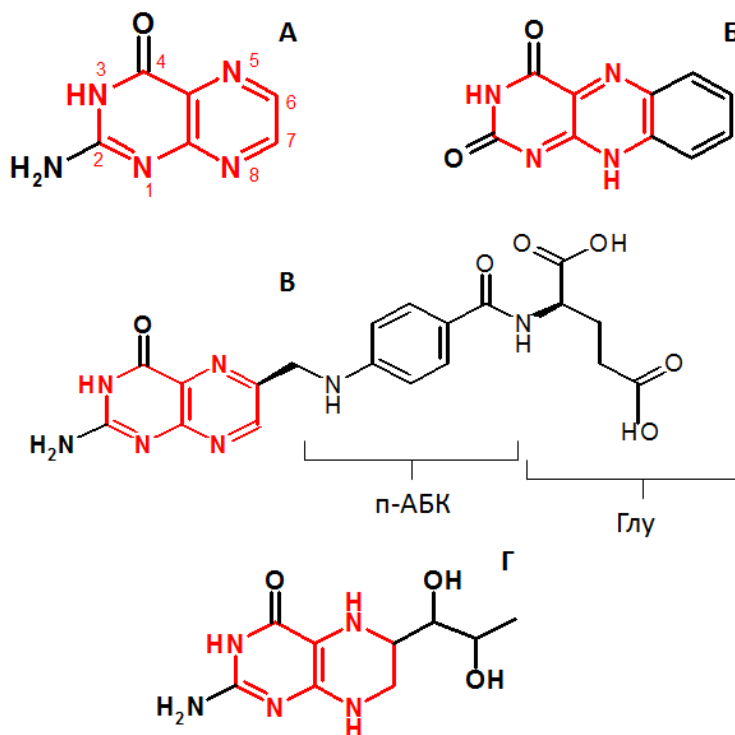


Рис. 1. Химическая структура птеринов (птеридиновая система показана красным): птерин (А), флавин (Б), фолиевая кислота (В), тетрагидробиоптерин (Г).

Птерины различаются по положению и характеру боковых групп. Разнообразие структур птеринов, в первую очередь, обусловлено вариацией заместителя в С6

положении (Рис. 1). Также птерины различаются по степени восстановленности как полностью восстановленные, или тетрагидро-восстановленные, дигидро-восстановленные и окисленные формы птеринов. Тетрагидровосстановленные птерины играют роль ключевых биологических коферментов. В первую очередь, речь идет о (6R)-L-5,6,7,8-тетрагидробиоптерине (H₄Бип) (Рис. 1, Г). Биологическая роль H₄Бип состоит в участии в работе NO-синтаз, алкилглицерол-монооксигеназы и гидроксилаз ароматических аминокислот. Помимо H₄Бип к тетрагидро-восстановленным неконъюгированным птеринам относятся: молибдоптерин - кофермент ксантин-оксидазы, нитрат-редуктазы и ряда других ферментов [Kisker et al., 1998], кофермент метаногенных бактерий тетрагидрометаноптерин [Escalante-Semerena et al., 1984], а также тетрагидроцианоптерин (Рис. 2), сравнительно недавно обнаруженный в цианобактериях [Lee et al., 1999] и участвующий в рецепции ультрафиолета [Moon et al., 2010b].

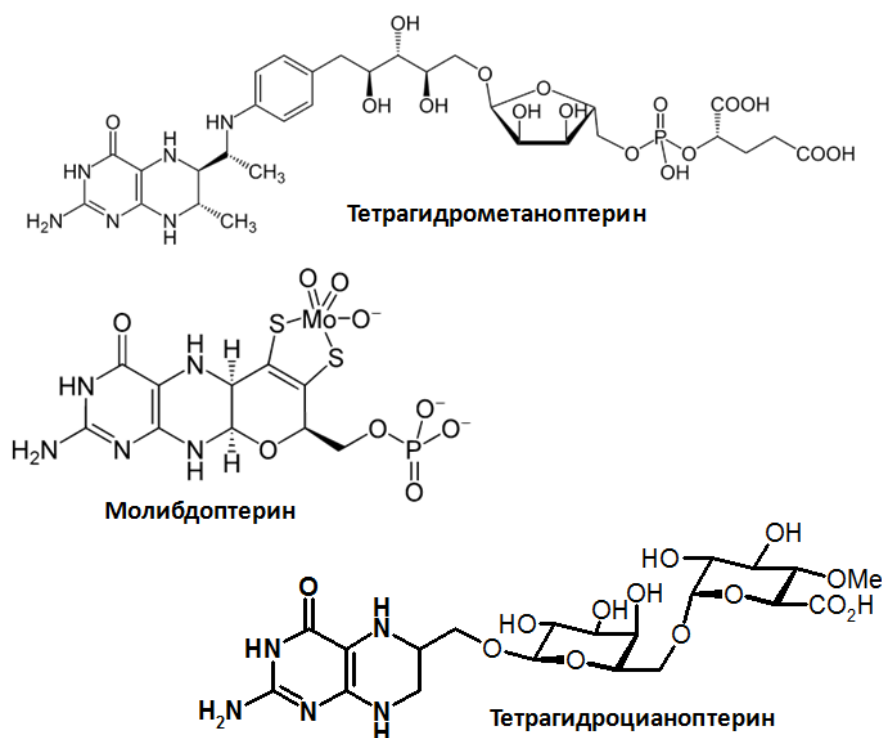


Рис. 2. Химические формулы тетрагидровосстановленных, коферментных форм птеринов.

Дигидроптерины, в отличие от тетрагидровосстановленных форм, как правило, не являются коферментами, и образуются как промежуточные соединения в ходе каталитического акта ряда ферментов (например, фенилалан-гидроксилазы, тирозин-гидроксилазы). Для ряда ферментов дигидроптерины являются субстратом: это сепиаптеринредуктаза (код фермента (КФ) 1.1.1.153) [Thony et al., 2000], дигидрофолатредуктаза (КФ 1.5.1.3) [Schnell et al., 2004] и другие.

Окисленные птерины присутствуют в живых организмах по большей части как продукты распада тетра- и дигидровосстановленных форм и используются в медицине как маркеры окислительного стресса, воспаления и активации иммунной системы, сердечно-сосудистых заболеваний, синтеза нейротрансмиттеров [Murr et al., 2002; Свиридов, Телегина, 2005; Pacileo et al., 2007; Firth et al., 2008].

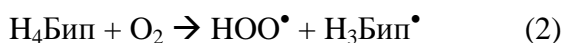
1.1.2. Биохимические функции и свойства 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина (Н₄Бип). Аутоокисление Н₄Бип

(6R)-L-5,6,7,8-Тетрагидробиоптерин (Н₄Бип) является коферментом. Структура (Н₄Бип) характеризуется наличием 1,2-дигидроксипропильного заместителя в С6 положении (Рис. 1, Г). Данная структура может находиться в полностью окисленном состоянии (6-L-биоптерин, Бип), дигидро-восстановленном состоянии (7,8-дигидро-L-биоптерин, Н₂Бип) и тетрагидровосстановленном состоянии (Н₄Бип). По-видимому, Н₄Бип является одним из важнейших коферментов высших организмов [Thony et al., 2000]. Н₄Бип в качестве донора электронов участвует в работе NO-синтазы [Scott-Burden, 1995; Werner et al., 2003] (код фермента 1.14.13.39). В качестве восстанавливающего агента Н₄Бип участвует в работе алкилглицерол-монооксигеназы [Tietz et al., 1964; Watschinger et al., 2010] (КФ 1.14.16.5) и гидроксилаз ароматических аминокислот [Kaufman, 1958; Hufton et al., 1995; Fitzpatrick, 2003]: фенилаланин-4-гидроксилазы (ФАГ; КФ 1.14.16.1), тирозин-гидроксилазы (ТГ; КФ 1.14.16.2) и триптофан-гидроксилазы (ТПГ; КФ 1.14.16.4). В ходе каталитического акта в гидроксилазах ароматических аминокислот Н₄Бип трансформируется в хиноноидный 6,7-дигидро-L-биоптерин (q-Н₂Бип). Во время каталитического акта NO-синтазы Н₄Бип проходит через одноэлектронный редокс цикл [Wei et al., 2008; Daff, 2010].

Поскольку Н₄Бип является полностью восстановленным соединением, он подвержен окислению. В водном растворе в присутствии молекулярного кислорода Н₄Бип подвержен аутоокислению, то есть самопроизвольному окислению при взаимодействии с молекулярным кислородом. Процесс аутоокисления инициируется реакцией переноса электрона с Н₄Бип на молекулярный кислород, которая приводит к образованию супероксид-анион радикала O₂^{•-} и тетрагидробиоптерин катион-радикала Н₄Бип^{•+} [Nishikimi, 1975]:



По другим данным, аутоокисление начнется с образования тригидробиоптерин радикала Н₃Бип[•] и гидропероксил радикала НОО[•] [Kirsch et al., 2003]:



Активные формы кислорода (АФК), образующиеся в том числе в ходе Реакций 1 и 2, участвуют в окислении $\text{H}_4\text{Бип}$. Из литературных источников известно, что процесс аутоокисления $\text{H}_4\text{Бип}$ имеет цепной радикальный характер [Blair, Pearson, 1974; Kirsch et al., 2003]. Промежуточным продуктом аутоокисления $\text{H}_4\text{Бип}$ является хиноноидный 6,7-дигидробиоптерин ($q\text{-H}_2\text{Бип}$), который изомеризуется в более стабильный 7,8-дигидробиоптерин, либо превращается в 7,8-дигидроптерин ($\text{H}_2\text{Птр}$) в результате отрыва бокового заместителя. $\text{H}_2\text{Птр}$ окисляется кислородом до 7,8-дигидроксантоптерина [Davis et al., 1988]. $\text{H}_2\text{Бип}$ может далее окисляться до Бип (Рис. 3). Реакция переноса электрона с $\text{H}_4\text{Бип}$ на молекулярный кислород с образованием супероксид-анион радикала (Реакция 1) и последующая реакция между $\text{H}_4\text{Бип}$ и O_2^\bullet являются начальными для цепного радикального процесса, включающего также восстановление O_2 свободно-радикальными производными $\text{H}_4\text{Бип}$. Поскольку $\text{H}_4\text{Бип}$ сам по себе может вызывать окислительный стресс, его избыток *in vivo*, и это подтверждается многими исследованиями, может быть ответственен за ускорение различных патологических процессов [Kirsch et al., 2003].

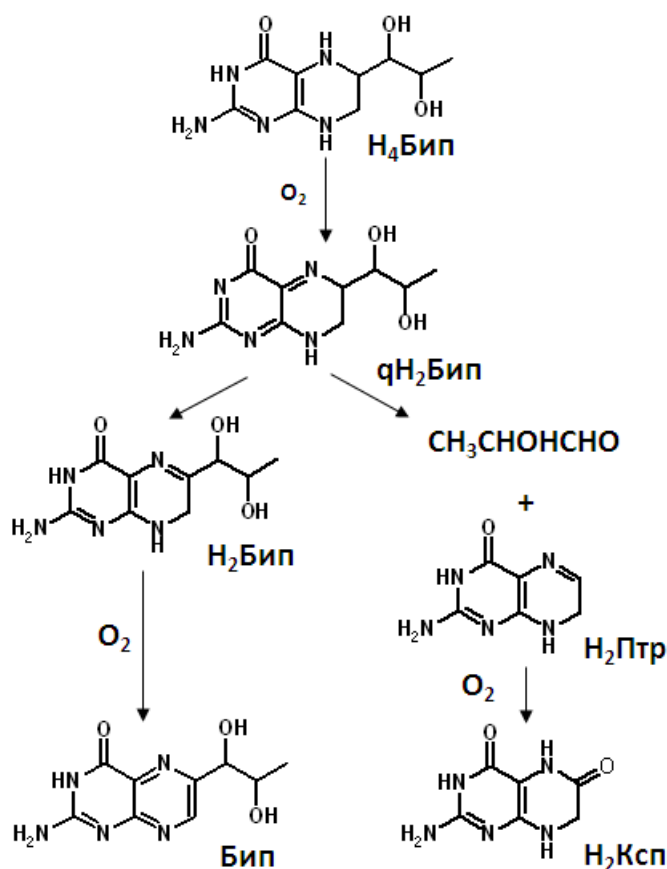


Рис. 3. Схема аутоокисления тетрагидробиоптерина [Davis et al., 1988].

Таким образом, важность восстановленных птериновых соединений-коферментов и, в частности, Н₄Бип для метаболических реакций сложно переоценить. Роль окисленных форм птеринов также велика, поскольку они используются в медицине в качестве маркеров для диагностики различных заболеваний. Наряду с этим интерес ряда исследователей привлекает высокая фотохимическая активность окисленных птеринов.

1.1.3. Фотофизические и фотохимические свойства птеринов

Фотохимия окисленных форм птеринов исследована наиболее подробно. Окисленные птерины отличает высокий выход флюоресценции [Thomas et al., 2002], способность к эффективному переносу заряда [Dantola et al., 2010a], способность образовывать триплетные возбужденные состояния с длительным временем жизни [Ledbetter et al., 1995; Neverov et al., 1996], что, в свою очередь, обуславливает высокий квантовый выход генерации синглетного кислорода [Егоров и др., 1999; Oliveros et al., 2011]. Участие окисленных птеринов в реакциях фотосенсибилизированного окисления будет подробно рассмотрено ниже. Также отметим, что конечный продукт аутоокисления тетрагидробиоптерина, Бип (Рис. 3), под действием УФ-излучения в присутствии молекулярного кислорода окисляется до 7,8-дигидро-6-формилптерина (Н₂Фоп), который в свою очередь окисляется до 6-формилптерина (Фоп) и 6-карбоксихптерина (Кап) [Vignoni et al., 2009] (Рис. 4).

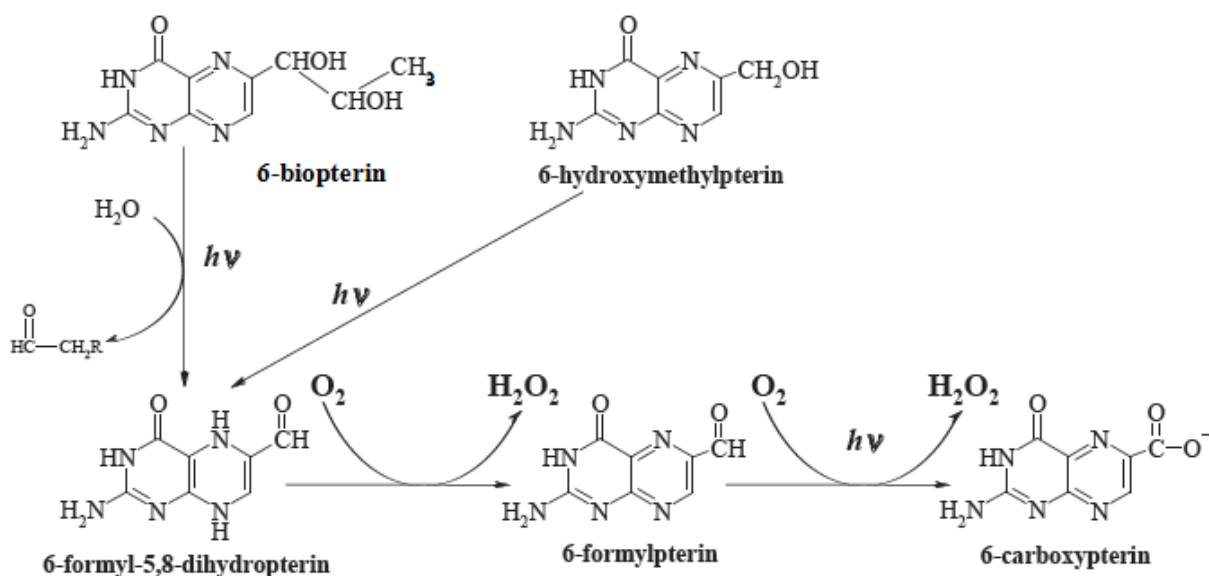


Рис. 4. Схема фотоокисления 6-биоптерина и 6-гидроксиметилптерина [Cabrerizo et al., 2004; Vignoni et al., 2009; Dántola et al., 2010b].

В отличие от окисленных, дигидровосстановленные формы птеринов имеют низкие квантовые выходы образования триплетов [Neverov et al., 1996]. Интенсивность их

флюоресценции также существенно ниже, чем у окисленных птеринов [Thomas et al., 2002]. Под действием УФ-излучения в присутствии кислорода воздуха дигидроптерины могут окисляться до окисленных форм, либо в отсутствие O_2 могут образовывать димеры [Vignoni et al., 2010]. Кроме того, известно, что дигидроформы птеринов являются эффективными тушителями активных форм кислорода (АФК). Дигидроптерины имеют высокие константы скорости тушения синглетного кислорода (k_q^Δ): например, для H_2 Бип $k_q^\Delta = (3,7 \pm 0,3) \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, для дигидронеоптерина $k_q^\Delta = (4,6 \pm 0,4) \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, для дигидроксантоптерина (H_2 Ксп) $k_q^\Delta = (6,8 \pm 0,4) \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [Oliveros et al., 2011].

Если фотохимия окисленных и дигидровосстановленных форм птеринов изучена достаточно подробно, то фотохимия тетрагидровосстановленных, коферментных форм птеринов до сих пор остается почти не исследованной. По-видимому, это обусловлено двумя обстоятельствами. Во-первых, длинноволновый максимум в спектре поглощения тетрагидровосстановленных птеринов сдвинут в область коротковолнового ультрафиолета (Рис. 5): в этом диапазоне в живых организмах поглощают в основном белки и нуклеиновые кислоты. Во-вторых, восстановленные птерины не стабильны, так как подвержены окислению молекулярным кислородом. Последнее обстоятельство значительно затрудняет изучение их фотохимии.

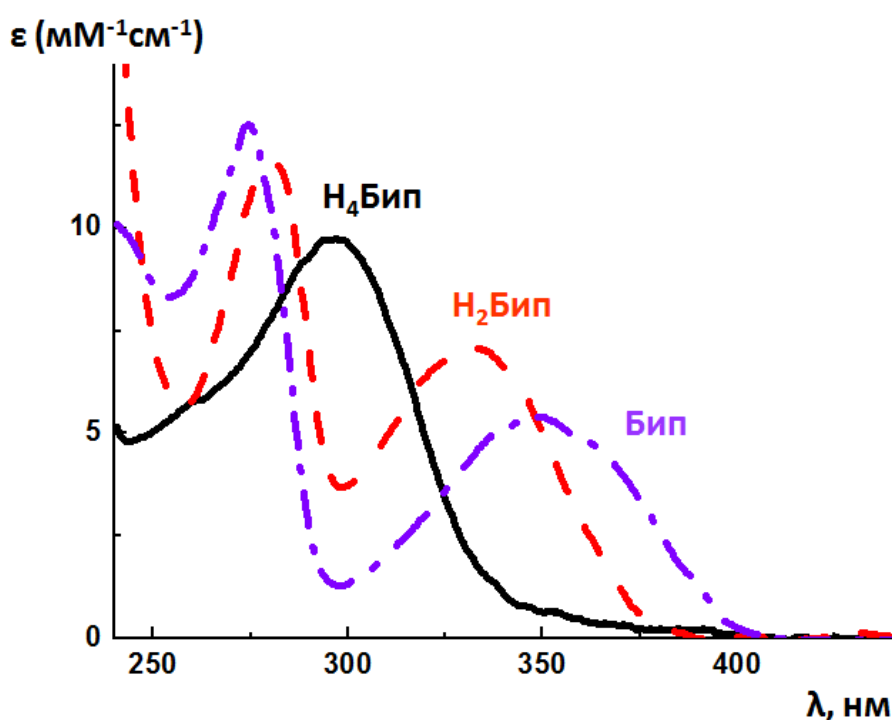


Рис. 5. Спектр поглощения 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина, 7,8-дигидробиоптерина и биоптерина.

Длинноволновый максимум в спектре поглощения Н₄Бип при нейтральном рН находится при длине волны 298 нм [Eberlein et al., 1984], также присутствует коротковолновый перегиб при длине волны 260 нм (Рис. 5). Поскольку тетрагидровосстановленные формы птеринов широко распространены в тканях высших организмов, они могут выступать в роли мишеней для неспецифического воздействия УФ на организм. Восстановленные птерины не флюоресцируют и не фосфоресцируют [Neverov et al., 1996]. Окисление птеринов можно наблюдать по изменению их спектров поглощения в УФ области (Рис. 5). Так, например, при окислении Н₄Бип максимум поглощения сдвигается в область ультрафиолета-А. Связано это с тем, что длинноволновый максимум в спектре поглощения Н₂Бип расположен при длине волны 330 нм, а длинноволновый максимум в спектре поглощения Бип расположен при длине волны 346 нм.

1.1.4. Участие окисленных птеринов в реакциях фотосенсибилизированного окисления

Фотосенсибилизаторы — молекулы, способные поглощать свет и инициировать химические реакции, которые в их отсутствие не протекают. Некоторые авторы классифицируют механизмы сенсибилизации в зависимости от того, с какой молекулой взаимодействуют сенсибилизатор [Foote, 1991]. Взаимодействие сенсибилизатора с растворителем или молекулой-мишенью относят к сенсибилизации типа I. Взаимодействие сенсибилизатора с молекулярным кислородом относят к сенсибилизации II типа. Другие авторы делят механизмы сенсибилизации на типы I и II в зависимости от того, происходит перенос заряда или происходит перенос энергии [Vidöczy, 1992]. Все реакции, связанные с переносом заряда данные авторы относят к механизму типа I, а реакции, связанные с переносом энергии, относят к типу II; следовательно, образование, например, супероксид-анион радикала относится к типу I, а образование элетрокронно-возбужденной молекулы-мишени относится к типу II. В этой связи, механизмы фотосенсибилизированного окисления общепринято классифицировать на тип I и тип II следующим образом: реакции, в ходе которых образуются свободные радикалы молекулы-мишени или растворителя относят к типу I; реакции образования синглетного кислорода относят к типу II.

Под действием света молекула переходит из основного состояния S_0 в синглетное возбужденное электронное состояние S_n ($n = 1, 2, 3$ и т.д.). Из состояния S_n в результате процессов колебательной релаксации и внутренней конверсии (IC) осуществляется переход в нижнее синглетное возбужденное состояние S_1 . Из состояния S_1 возможен

излучательный (флюоресценция) и безызлучательный (внутренняя конверсия) переход в основное состояние S_0 . Также за счет интеркомбинационной конверсии (ISC) из S_1 возможен переход в триплетное возбужденное состояние T_1 (Рис. 6). Отличительной особенностью молекул сенсibilизаторов является низкая скорость процесса внутренней конверсии S_1/S_0 и высокая скорость интеркомбинационной S-T конверсии.



Рис. 6. Диаграмма Яблонского.

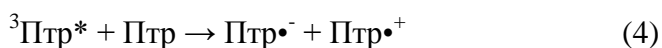
В фотохимических реакциях, как правило, участвует триплетное состояние птеринов, поскольку его время жизни составляет $\sim 1 \times 10^{-6}$ с, тогда как время жизни синглетных возбужденных состояний $\sim 1 \times 10^{-9}$ с [Jaffe, Miller, 1966]. Так, например, время жизни триплетных состояний Бип составляет: $0,34(\pm 0,04) \times 10^{-6}$ с [Serrano et al., 2012], а время жизни синглетного состояния Бип составляет $9,1(\pm 0,4) \times 10^{-9}$ с [Swarna et al., 2012]. Длительное время жизни триплетных состояний обусловлено тем, что переход $T_1 \rightarrow S_0$ запрещен по спину.

Рассмотрим основные фотохимические реакции окисленных птеринов [Dantola et al., 2010c]. Реакция 3 отражает процесс дезактивации триплетного состояния за счет фосфоресценции и интеркомбинационной конверсии:



Фотохимическая активность триплетов проявляется как: 1) способность к переносу энергии возбуждения; 2) способность возбужденной молекулы принимать либо отдавать электрон (как известно, и донорные и акцепторные свойства молекул в возбужденном состоянии возрастают). Кроме того, по-видимому, возможно протекание реакций автоионизации, то есть взаимодействия двух птериновых молекул. В частности, это может быть взаимодействие молекулы в триплетном возбужденном состоянии и молекулы

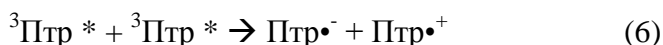
птерина в основном состоянии с образованием свободных радикалов (Реакция 4) [Chahidi et al., 1981; Song, Hwang, 2007]:



, которые затем могут реагировать уже друг с другом:



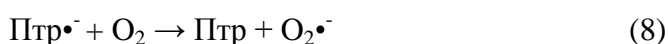
В условиях высокой концентрации Птр и высокой интенсивности облучения возможно взаимодействие двух триплетных возбужденных молекул:



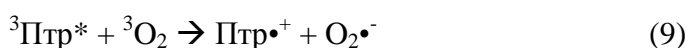
В результате переноса энергии на O_2 птерины способны генерировать синглетный кислород (Реакция 7), данный процесс относится к механизму сенсibilизации типа II:



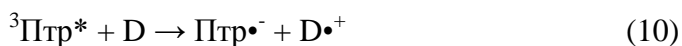
Образующийся в ходе Реакций 4 и 6 анион-радикал $\text{Птр}\bullet^-$ может, по-видимому, реагировать с молекулярным кислородом с образованием супероксид-анион радикала $\text{O}_2\bullet^-$ (Реакция 8):



Теоретически электрон-донорные свойства триплетных состояний птеринов могут проявляться в способности передавать электрон на молекулярный кислород с генерацией $\text{O}_2\bullet^-$. Однако однозначного ответа на вопрос, способны ли триплетные состояния птеринов образовывать $\text{O}_2\bullet^-$ (Реакция 9), на данный момент нет [Dantola et al., 2010c; Ji, Shen, 2011]. Согласно квантово-химическим расчетам, перенос электрона с триплетного птерина на молекулярный кислород возможен, причем вероятность такого переноса выше при щелочном pH [Ji, Shen, 2011].



В присутствии донора электрона (D) к перечисленным реакциям добавляется реакция между ${}^3\text{Птр}^*$ и D (Реакция 10). В результате данной реакции образуется $\text{Птр}\bullet^-$ и катион-радикал донора $\text{D}\bullet^+$. Данная реакция относится к механизму сенсibilизации типа I:



Обратный перенос электрона на катион-радикал донора $\text{D}\bullet^+$ (Реакция 11) является основной реакцией для птерин анион-радикала $\text{Птр}\bullet^-$ в отсутствие молекулярного кислорода O_2 и других акцепторов электрона:



В ходе Реакции 10 проявляются электронакцепторные свойства птериновых триплетов; в качестве донора электронов в данной реакции могут выступать различные соединения: аминокислоты [Chahidi et al., 1981], нуклеотиды [Petroselli et al., 2007],

фолаты [Dantola et al., 2010a], а также другие биомолекулы (Рис. 7). Кроме того, возможна инактивация ферментов путем их окисления триплетами птеринов. Показано, что перенос электрона с тирозиназы на птериновый триплет приводит к инактивации фермента [Dantola et al., 2012] (Рис. 7, Б).

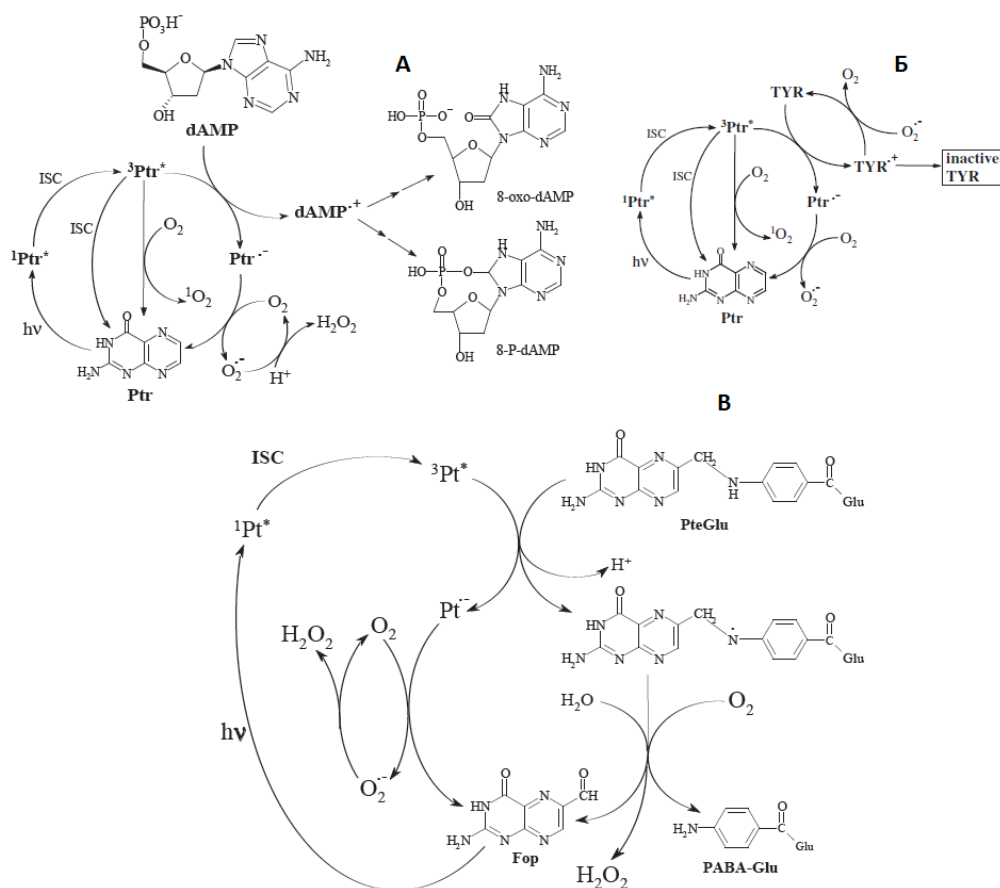


Рис. 7. Схемы сенсibilизированного окисления доноров электронов птериновыми триплетами. А – механизм окисления дезоксиаденозинмонофосфата (dAMP); Б – механизм инактивации тирозиназы (TYR); В – механизм фотоокисления фолиевой кислоты (PteGlu) [Вечтомова и др., 2010; Lorente et al., 2011; Dantola et al., 2012].

Следует учитывать, что молекулы окисленных птеринов могут находиться как минимум в двух формах: нейтральная форма характерна для кислых и нейтральных pH, анионная – для щелочных условий (Рис. 8). Также значительное влияние на фотофизические и фотохимические свойства птеринов оказывает природа бокового заместителя [Cabrerizo et al., 2005; Oliveros et al., 2011]. В свете вышеизложенного в задачи нашего исследования входило проанализировать, как природа бокового заместителя влияет на ход Реакций 4, 6-9.

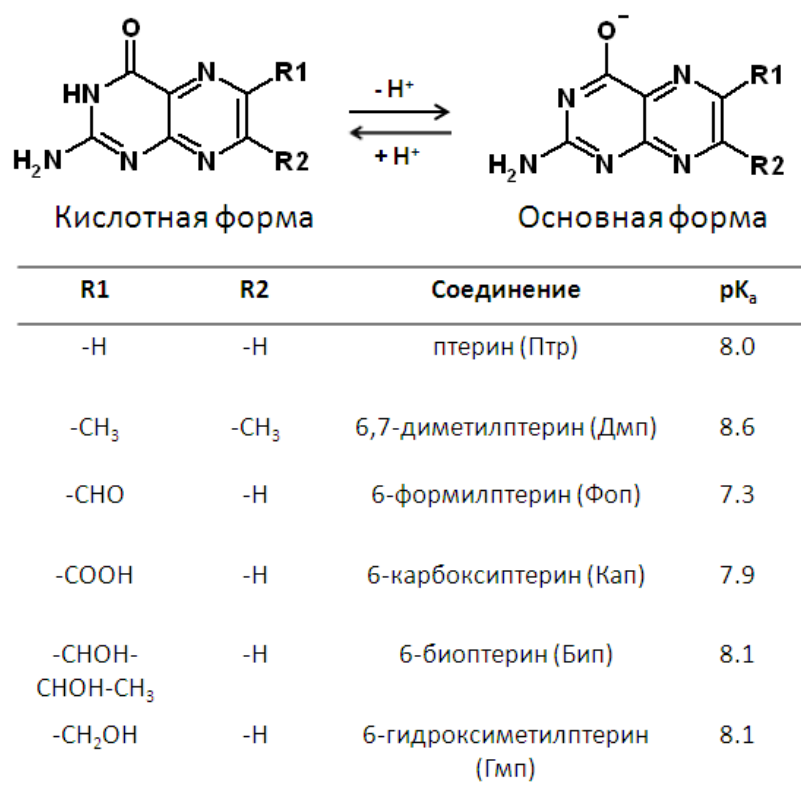


Рис. 8. Структура и значения pKa для кислотно-основного равновесия окисленных птеринов в водных растворах [Oliveros et al., 2011].

1.1.5. Генерация синглетного кислорода фотосенсибилизаторами. Параметры, определяющие величину квантового выхода генерации синглетного кислорода (Φ_{Δ})

Синглетный кислород имеет множественное применение, в том числе при очистке сточных вод, тонком химическом синтезе, а также в связи с различными аспектами фотодинамического действия: стерилизация крови, активируемые солнечным светом гербициды и инсектициды, фотодинамическая терапия рака [DeRosa et al., 2002; Krasnovsky, 2007]. Для фотодинамической терапии наибольший интерес представляют сенсибилизаторы, которые обладают следующими свойствами: 1) высокий молярный коэффициент поглощения; 2) триплетное состояние с подходящей энергией ($E_{T1} > 0,98$ эВ); 3) высокий квантовый выход образования триплетных состояний ($\Phi_T > 0,4$) и их длительное время жизни ($\tau_T > 1$ мкс); 4) высокая фотостабильность [DeRosa et al., 2002]. При этом энергия триплета сенсибилизатора должна не только превышать минимальную энергию синглетного кислорода $^1\Delta_g$ (0,98 эВ), но и по возможности не должна быть выше энергии супероксид-анион радикала $O_2^{\bullet-}$ (-3,5 эВ) [Goebbert, Sanov, 2009]: $E_{T1} < 3,5$ эВ. Образование $O_2^{\bullet-}$ в ходе фотодинамической терапии считается нежелательным, поскольку $O_2^{\bullet-}$ участвует в свободнорадикальном окислении. Очевидно, что

квантовый выход генерации синглетного кислорода является одной из наиболее важных характеристик фотосенсибилизатора.

Количественное определение синглетного кислорода в растворе, а также определение квантового выхода генерации синглетного кислорода (Φ_{Δ}) возможно напрямую при помощи высокочувствительной лазерной спектроскопии и путем детекции люминесценции при длине волны 1270 нм или опосредованно, с использованием химических ловушек синглетного кислорода [Krasnovsky, 2007]. Точность последнего метода ограничена тем, что химические ловушки помимо $^1\text{O}_2$ реагируют со свободными радикалами, пероксидами и молекулами сенсибилизатора. Таким образом, определение квантового выхода генерации $^1\text{O}_2$ является достаточно ресурсозатратным процессом. В связи с этим методы предварительного скрининга сенсибилизаторов относительно их способности продуцировать $^1\text{O}_2$ представляют значительный интерес.

Квантовый выход генерации синглетного кислорода, Φ_{Δ} , определяется как соотношение числа образовавшихся молекул синглетного кислорода к количеству поглощенных фотонов. Известно, что сразу несколько параметров влияют на величину Φ_{Δ} : энергия триплета (E_T), потенциал окисления, электронная конфигурация, полярность растворителя, агрегация и образование эксимерных комплексов [Schweitzer, Schmidt, 2003]. К переносу энергии на молекулярный кислород может вести как взаимодействие с триплетным, так и синглетным состоянием. Однако для большинства сенсибилизаторов роль взаимодействия O_2 с нижним возбужденным состоянием сенсибилизатора S_1 ограничивается увеличением квантового выхода генерации триплета. Именно взаимодействие с T_1 состоянием сенсибилизатора является основным путем генерации $^1\text{O}_2$ [Schweitzer, Schmidt, 2003], вследствие чего величина Φ_{Δ} определяется по формуле:

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_T p_T^{\text{O}_2} f_T^{\Delta} \quad (\text{ур. 1})$$

где $p_T^{\text{O}_2}$ – доля триплетных состояний, которые тушатся O_2 , f_T^{Δ} – эффективность генерации синглетного кислорода во время тушения T_1 молекулярным кислородом, Φ_T – квантовый выход генерации триплета. Поскольку внутримолекулярный переход $T_1 \rightarrow S_0$ запрещен по спину, T_1 состояния обычно имеют длительное время жизни, что ведет к почти полному тушению триплетов молекулярным кислородом ($p_T^{\text{O}_2} \approx 1$) в насыщенных воздухом растворах. Неполное тушение молекулярным кислородом наблюдается только у триплетных состояний, имеющих короткое время жизни из-за их высокой химической активности, быстрой

интеркомбинационной конверсии (например, триплеты $\pi\pi^*$) или высокой концентрации других молекул-тушителей [Schweitzer, Schmidt, 2003].

Чем выше скорость физического и химического тушения триплета, тем ниже эффективность переноса энергии с триплета сенсibilизатора на O_2 [Braun, Oliveros, 1990]:

$$f_T^\Delta = \frac{k_{et}[O_2]}{k_{et}[O_2] + k_q^T[O_2] + k_p + k_{ISC}} \quad (\text{ур. 2})$$

где k_{et} – константа скорости реакции переноса энергии; k_p и k_{ISC} – константы скорости фосфоресценции и интеркомбинационной конверсии, соответственно; k_q^T – константа скорости других возможных процессов с участием T_1 сенсibilизатора и O_2 (в том числе реакция переноса электрона с образованием $O_2^{\cdot-}$, тушение триплета молекулой кислорода с образованием основных состояний обеих молекул). Установлено, что величины k_q^T и f_T^Δ имеют обратную корреляцию, при этом оба параметра весьма чувствительны к потенциалу окисления молекулы [Wilkinson et al., 1994].

Квантовый выход генерации триплетов, Φ_T , зависит от скорости интеркомбинационной конверсии S-T (k'_{ISC}) и скорости конкурирующих процессов:

$$\Phi_T = \frac{k'_{ISC}}{k'_{ISC} + k_q + k_{fl} + k_{ic}} \quad (\text{ур. 3})$$

где k'_{ISC} – скорость интеркомбинационной конверсии S-T, k_q – скорость физического и химического тушения возбужденного синглетного состояния, k_{fl} – скорость флюоресценции, k_{ic} – скорость внутренней конверсии. Скорость ISC определяется спин-орбитальным взаимодействием (COB) [Marian, 2012]. В квантовой химии для вычисления скорости ISC используются операторы COB и наиболее современные теоретические методы [Marian, 2012].

Существуют и более простые, качественные правила, позволяющие оценить скорость ISC; упомянем два из них. М.А. Эль-Сайедом было показано, что скорость ISC между состояниями одинаковой орбитальной природы ($\pi\pi^* \sim \pi\pi^*$, $n\pi^* \sim n\pi^*$) примерно на 2-4 порядка меньше, чем скорость ISC между состояниями разной орбитальной природы ($\pi\pi^* \sim n\pi^*$, $n\pi^* \sim \pi\pi^*$) [El-Sayed, 1963; Lower, El-Sayed, 1966]. В соответствии с правилом Эль-Сайеда, эффективна S-T интеркомбинационная конверсия $^1n\pi^* \sim ^3\pi\pi^*$ и $^1\pi\pi^* \sim ^3\pi\pi^*$. Другое правило – это так называемый «закон энергетической щели», согласно которому вероятность

перехода экспоненциально зависит от адиабатической разницы энергии ΔE синглетного и триплетного состояний: чем меньше ΔE , тем выше вероятность перехода [Englman, Jortner, 1970].

Также следует упомянуть противоположный процессу генерации $^1\text{O}_2$ процесс тушения $^1\text{O}_2$. Образование комплексов с переносом заряда между $^1\text{O}_2$ и тушителем играет значительную роль в тушении $^1\text{O}_2$. Деактивация комплекса, образующегося при соударении молекулы тушителя и $^1\text{O}_2$, усиливается с образованием синглетного эксиплекса, который, в свою очередь, стабилизируется переносом заряда с тушителя Q на $^1\text{O}_2$ [Schweitzer, Schmidt, 2003]. Синглетный эксиплекс путем интеркомбинационной конверсии переходит в основное, триплетное состояние, которое затем диссоциирует на Q и O_2 , обычно без разделения заряда [Schweitzer, Schmidt, 2003]. Таким образом, константа тушения k_q^T имеет как химический, так и физический компонент. Отметим, что для аминов за перенос заряда в процессе физической деактивации ответственно взаимодействие $^1\text{O}_2$ с неподеленной электронной парой атомов азота [Minaev, 1984].

1.1.6. Генерация синглетного кислорода птеридинами

Окисленные формы птеринов являются эффективными генераторами синглетного кислорода. Однако следует учитывать, что природа бокового заместителя оказывает значительное влияние на квантовый выход генерации $^1\text{O}_2$ [Oliveros et al., 2011]. Так, например, квантовый выход генерации синглетного кислорода, Φ_Δ , кислотной формой 6-гидроксиметилптерина (Гмп) составляет 15%, птерина (Птр) – 18%, 6-карбоксихлорид птерина (Кап) – 27%, 6-биоптерина (Бип) – 34%, 6-формилптерина (Фоп) – 45% [Thomas et al., 2003].

В последние годы предпринимаются попытки применения окисленных птеринов-сенситизаторов для фотодинамической терапии (ФДТ) рака. Фотодинамический эффект от применения птеринов исследовали на линиях раковых клеток. Наряду с 6-формилптерином и птерином [Denofrio et al., 2011], для ФДТ использовались их синтетические аналоги [Yamada et al., 2005]. В настоящий момент разработки в этом направлении продолжаются. Повышение проницаемости клеточных мембран для птеринов достигается путем присоединения неполярных заместителей к пиримидиновому кольцу птеридиновой структуры (Рис. 9) [Miyoshi et al., 2008].

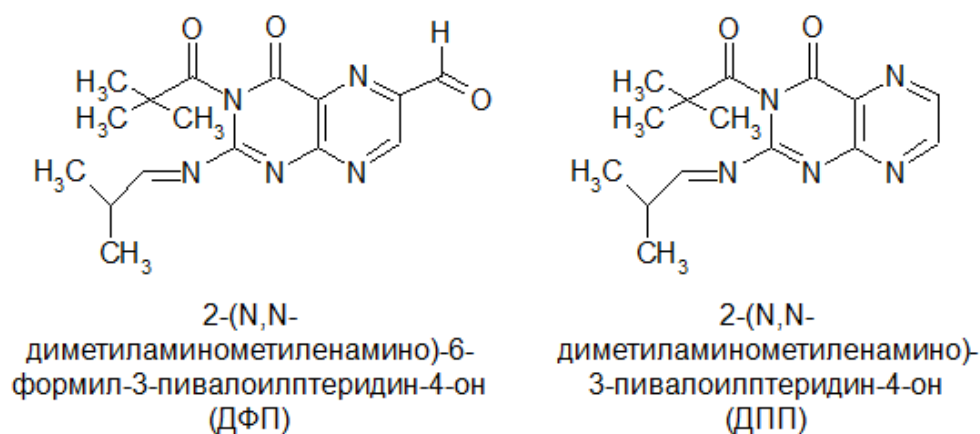


Рис. 9. Синтетические птерины, применяющиеся в экспериментах по фотодинамической терапии [Miyoshi et al., 2008].

В этой связи в задачи нашего исследования входило выяснить, какие параметры определяют сенсibiliзирующую активность (а именно величину Φ_{Δ}) птеринов. Для этого мы решили провести QSPR анализ способности птеридинов генерировать синглетный кислород. QSPR (Quantitative Structure-Property Relationship) – процедура поиска количественных соотношений структура-свойство. QSPR применяется в фотохимии для предсказания длины волны максимума поглощения [Liu et al., 2009; Xu et al., 2011, Chaudret et al., 2015], интенсивности флюоресценции [Riahi et al., 2009], фотоиндуцированной токсичности, константы скорости фотолиза и квантового выхода фотолиза [Zhang, 2013]. Также предпринимались попытки предсказания фотосенсибилизирующей активности различных органических соединений для фотодинамической терапии: пиррофеофорбидов [Henderson et al., 1997; Potter et al., 1999], бактериохлоринов [Huang et al., 2010], порфиринов [Frimayanti et al., 2011]. Насколько нам известно, до настоящего времени попыток построения QSPR моделей для прогнозирования квантового выхода генерации синглетного кислорода не предпринималось.

Поскольку для проведения QSPR анализа, как правило, требуется > 20 наблюдений (соединений), помимо птеринов в анализируемую выборку были включены флавины и люмазин. В основе строения флавинов так же лежит птеридиновая структура (Рис. 10). В сравнении с птеринами флавины являются более эффективными генераторами синглетного кислорода: квантовые выходы генерации $^1\text{O}_2$ флавинов лежат в диапазоне 30-50% [Sikorski et al., 2001; Sikorski et al., 2002; Baier et al., 2006; Knak et al., 2014]. Возможно, столь высокие значения Φ_{Δ} обусловлены присутствием у флавинов в С2 положении карбонильной группы вместо амино-группы, как у птеринов (Рис. 10). Данное предположение подтверждается тем, что люмазин, Φ_{Δ} которого равен 44% [Denofrio et al.,

2008], подобно флавином имеет карбонильную группу в С2 положении, однако, в отличие от флавинов и подобно птеринам, не имеет бензольного кольца. Флавины являются более мощными генераторами синглетного кислорода, чем порфирины [Baier et al., 2006], которые применяются в фотодинамической терапии. УФ-А облучение рибофлавина используется в офтальмологии для парахирургического лечения эктазии роговицы (двустороннее истончение роговицы), так называемая перекрестная сшивка коллагена роговицы [Spoerl et al., 2004]. Кроме того, флавины показывают высокую фототоксичность по отношению к паразитам человека (и незначительную токсичность по отношению к человеку) [Silva et al., 2015], что открывает возможности их потенциального применения в качестве антимикробных фотосенсибилизаторов. Исходя из этого QSPR анализ способности флавинов генерировать $^1\text{O}_2$ представляет значительный интерес.



Рис. 10. Нумерация атомов и структурные формулы птеридина, птерина, люмазина и изоаллоксазина.

1.2. Фотохимические свойства и биологическая роль родственных групп гетероциклических соединений

1.2.1. Роль флавинов в работе флавопротеиновых фоторецепторов

Физико-химические свойства птеринов во многом схожи со свойствами флавинов: птерины так же способны образовывать свободно-радикальные формы, участвовать в окислительно-восстановительных цепочках реакций, способны к поглощению ультрафиолета и фотосенсибилизации [Heelis, 1982]. Данные свойства делают птерины подходящими кандидатами на роль рецепторных пигментов ультрафиолета [Galland, Senger, 1988].

Флавины - фоторецепторные пигменты. Флавин аденин динуклеотид (ФАД) в качестве основного хромофора входит в состав фотолиаз (ферменты репарации ДНК) и криптохромов (рецепторы синего света). Фотолиазы – ферменты репарации ДНК, поврежденной в результате действия ультрафиолета [Hearst, 1995]. Механизм репарации включает (1) перенос электрона от фотовозбужденного ФАДН[•] на циклобутановый пиримидиновый димер (Рис. 11, А), (2) разрыв ковалентных связей внутри димера, (3) возврат электрона и восстановление каталитически активного состояния ФАДН[•]. Время переноса электрона для процесса (1) составляет порядка 10⁻¹⁰ с, для (3) – 10⁻⁹ с [Thiagarajan et al., 2011].

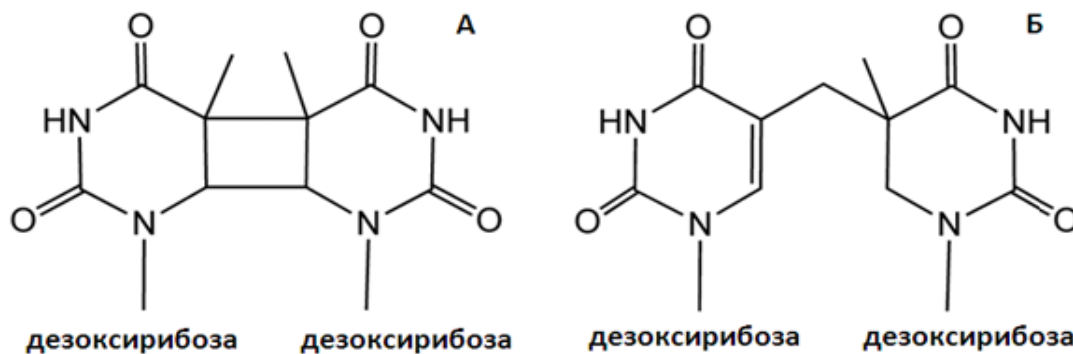


Рис. 11. Пиримидиновые димеры. циклобутановый димер (ЦД) (А) и 6,4-фотопродукт (6,4-ФП) (Б).

Фотолиазы являются мономерными белками из 450-550 аминокислотных остатков и двух нековалентно связанных хромофорных кофакторов (рис. 12). ФАД в дигидровосстановленной, анионной форме ФАДН[•] выступает в роли основного кофактора и расположен в активном центре фермента. Роль второго хромофора - светособирающей антенны - у большинства эукариот и у некоторых прокариот (например, *Escherichia coli*) играет 5,10-метенил-5,6,7,8-тетрагидрофолат (МТГФ) (λ_{\max} 380 нм). У некоторых

прокариот (например, *Streptomyces griseus*, *Anacystis nidulans* или *Scenedesmus acutus*) роль антенны-светосборщика играет 8-гидрокси-7,8-дидеметил-5-деазарибофлавин (8-ГДФ): например, ДНК фотолиаза класса 1 у галофильной археобактерии *Halobacterium halobium* или у бактерии *Streptomyces griseus*. В зависимости от природы второго кофактора фотолиазы делятся на 2 класса: фолатные и деазафлавиновые. В ряде случаев роль второго хромофора могут играть ФАД и ФМН [Ueda et al., 2005; Fujihashi et al., 2007]. Таким образом, фолаты могут участвовать в фоторецепции в роли антенны, а флавины могут выполнять как антенную функцию (8-ГДФ), так и быть «реакционными центрами» (ФАД).

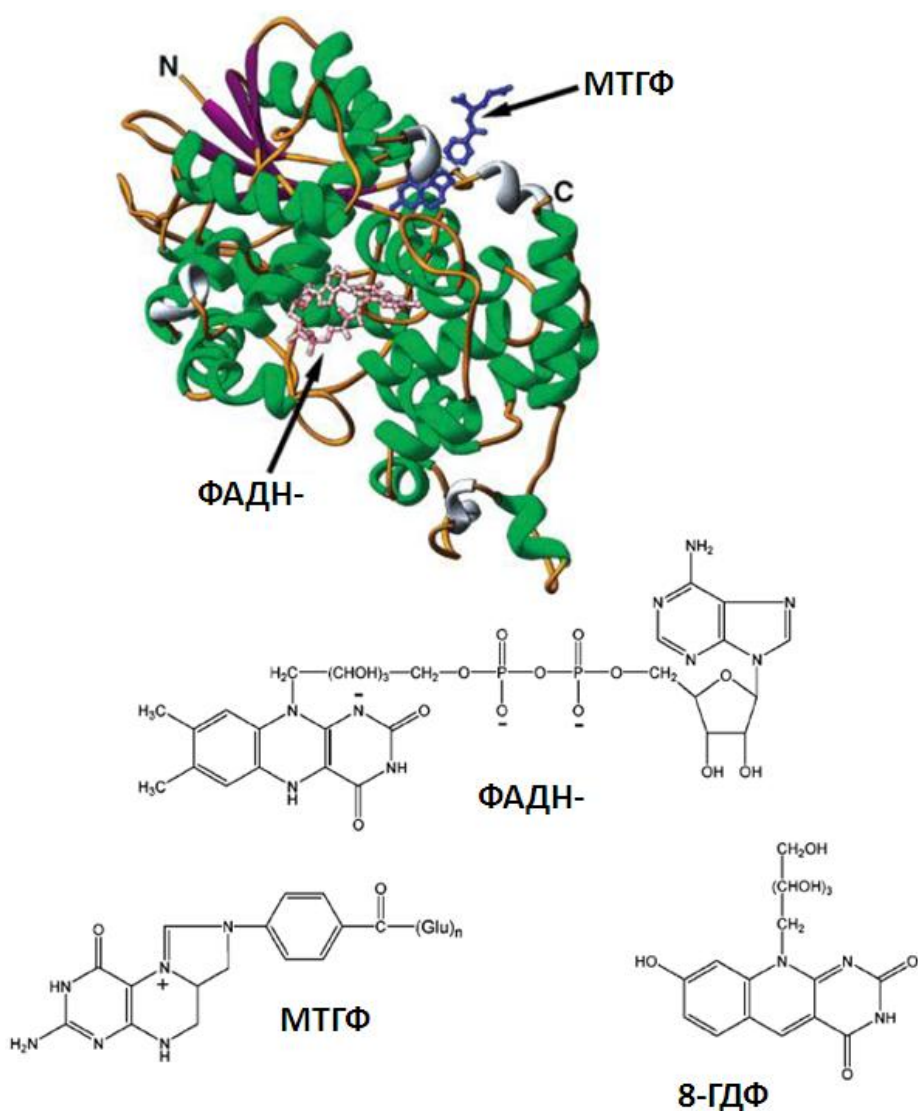


Рис. 12. Кристаллическая структура ДНК-фотолиазы из *E. Coli*. Показаны N-концевой α/β домен, C-концевой α -спиральный домен, а также положения двух кофакторов, FADH и МТГФ. ФАДН является незаменимым кофактором. МТГФ не является незаменимым, и у ряда организмов функции второго кофактора ДНК-фотолиазы выполняет 8-ГДФ [Sancar et al., 2003].

Криптохромы относятся к тому же семейству белков, что и ДНК-фотолиазы, однако их основная функция состоит не в репарации ДНК, а в фоторецепции синего света и ультрафиолета, а также в магниторецепции [Rogers et al., 2009]. Криптохромы регулируют циркадные ритмы, причем как растений, так и животных [Sancar, 2000]. Как и в ДНК-фотолиазе в состав криптохрома входят два кофактора: МТГФ (антенна-светосборщик) и ФАД (основной кофактор). Исходным в рабочем цикле криптохрома является полностью окисленное состояние ФАД. Донором электрона служит триада триптофанов, находящихся в непосредственной близости от ФАД [Liu et al., 2010]. Возбуждение ФАД приводит к одноэлектронному фотовосстановлению за счет остатка триптофана Trp⁴⁰⁰. Протон на ФАД^{•-} переносится с остатка аспарагиновой кислоты Asp³⁹⁶ [Cailliez et al., 2014]. В результате каскада реакций переноса электрона и протона образуется семихинонная радикальная форма ФАДН[•] (Рис. 13). ФАДН[•] форма криптохрома является активной, вызывающей физиологический ответ на синий свет.

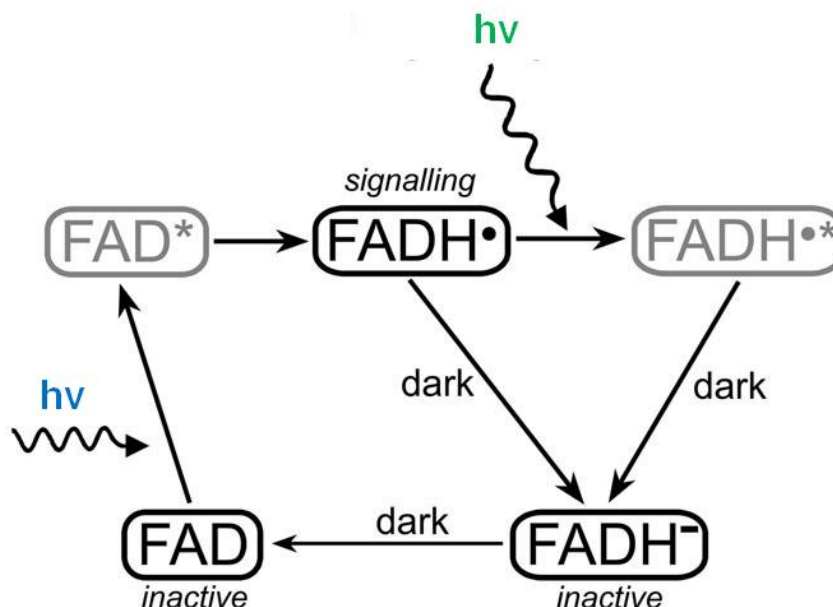


Рис. 13. Фотоиндуцированный цикл ФАД в криптохроме. Окисленная форма ФАД не активна и накапливается в темноте. Синий свет запускает фотовосстановление ФАД до ФАДН[•]. Состояние ФАДН[•] является сигнальным для криптохрома. В случае поглощения фотона зеленого света образуется полностью восстановленное состояние ФАДН⁻, которое не активно [Solov'yov, Schulten, 2009].

Не так давно были открыты cry-DASH криптохромы. Cry-DASH криптохромы так названы по имени организмов в которых они были обнаружены (Drosophila, Arabidopsis, Synechocystis and Homo cryptochrome). Cry-DASH криптохромы, как и фотолиазы, в

качестве кофактора содержат восстановленный ФАД. Некоторые Cyt-DASH белки обладают криптохромной активностью при регуляции транскрипции и развития. Также было обнаружено, что cyt-DASH катализируют репарацию циклобутановых димеров одноцепочечной ДНК *in vitro* [Selby, Sancar, 2006], то есть cyt-DASH могут работать как одноцепочечные ДНК-фотолиазы, или фоторецепторы, обладающие одновременно активностью фотолиаз и криптохромов.

В составе фоторецептора растений фототропина возбужденный флаavin реагирует с тиольной группой одного из цистеиновых остатков. После переноса электрона с остатка цистеина на ФМН происходит образование свободно-радикальной пары, после образуется аддукт. В темноте аддукт разделяется с образованием исходного флавина.

Несмотря на отличия в деталях, флавиновые фотоциклы в фоторецепторах объединяет наличие реакций переноса электрона и разделения заряда, образование свободно-радикальных форм.

1.2.2. Фотохимия азотистых оснований нуклеиновых кислот

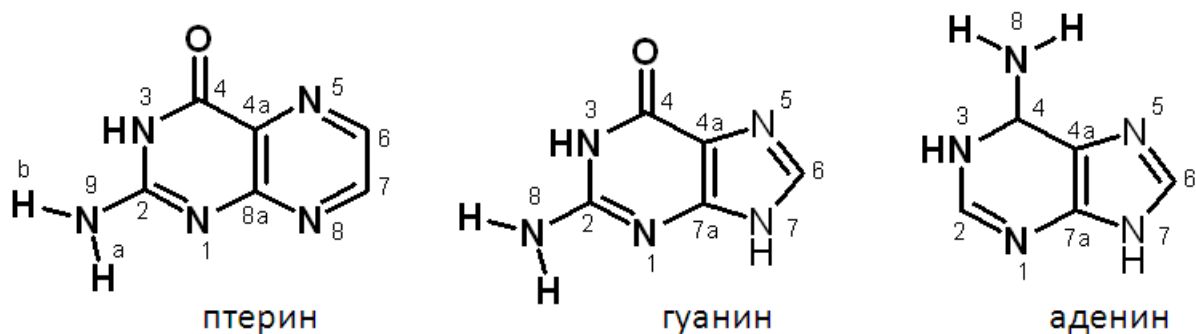


Рис. 14. Структурные формулы и нумерация атомов птерина и пуриновых азотистых оснований.

Наличие пиримидинового кольца в составе птеринов роднит их строение и свойства с азотистыми основания нуклеиновых кислот, в первую очередь с пуринами (Рис. 14). Следующие характеристики являются общими для птерина и гуанина: наличие пиримидинового кольца, амино-группа в N2 положении, карбонильная группа в C4 положении. Основное фотохимическое свойство азотистых оснований – их фотоустойчивость. Эффективная диссипация энергии возбуждения азотистыми основаниями играет ключевую роль для фотостабильности РНК и ДНК, и, по-видимому, имела ключевое значение для отбора этих молекул на роль строительных блоков нуклеиновых кислот в условиях интенсивной ультрафиолетовой радиации в период предбиологической и ранней биологической эволюции. Азотистые основания способны крайне эффективно дезактивировать возбужденные состояния за счет быстрого

безызлучательного тушения, так называемой внутренней конверсии (IC). IC переводит потенциально опасную энергию фотона УФ в колебательную энергию, которая затем диссипирует в окружающее пространство [Sobolewski, Domcke, 2006].

Физический механизм внутренней конверсии связан с двумя фундаментальными теоретическими концепциями. Первая концепция – это потенциальная поверхность Борна-Оппенгеймера. Как известно, приближение Борна-Оппенгеймера основывается на большой разнице масс электронов и ядер, вследствие чего скорость движения ядер мала по отношению к скорости движения электронов. В адиабатическом приближении Борна-Оппенгеймера определенное положение ядер соответствует определенному значению электронного уравнения Шредингера, так называемая поверхность потенциальной энергии (ППЭ) Борна-Оппенгеймера. Вторая концепция – это коническое пересечение поверхностей потенциальной энергии. Ньюман и Вигнер в 1929 году показали, что в многоатомной молекуле, ППЭ могут определенным образом пересекаться. Такие пересечения называются коническими, поскольку ППЭ имеют вид двойного конуса в подходящем двухмерном пространстве ядерных координат. В конических пересечениях адиабатическое приближение Борна-Оппенгеймера не применимо, поскольку неадиабатические взаимодействия, которыми пренебрегают, становятся бесконечными. В конических пересечениях молекула мгновенно переходит с ППЭ возбужденного состояния на ППЭ основного состояния. Конические пересечения, таким образом, являются ключевым элементом фотостабильности, особенно в том случае, когда на ППЭ возбужденного состояния они не отделены энергетическим барьером. Схема процесса фотовозбуждения и быстрой безызлучательной дезактивации через коническое пересечение показана на Рисунке 15. Если процесс фотовозбуждения происходит вертикально, то есть без изменения геометрии основного состояния, то процесс дезактивации включает фотохимическую реакцию, которая прерывается в коническом пересечении. Из всего вышесказанного следует, что характеристика электронных ППЭ необходима для теоретического понимания причин фотостабильности.

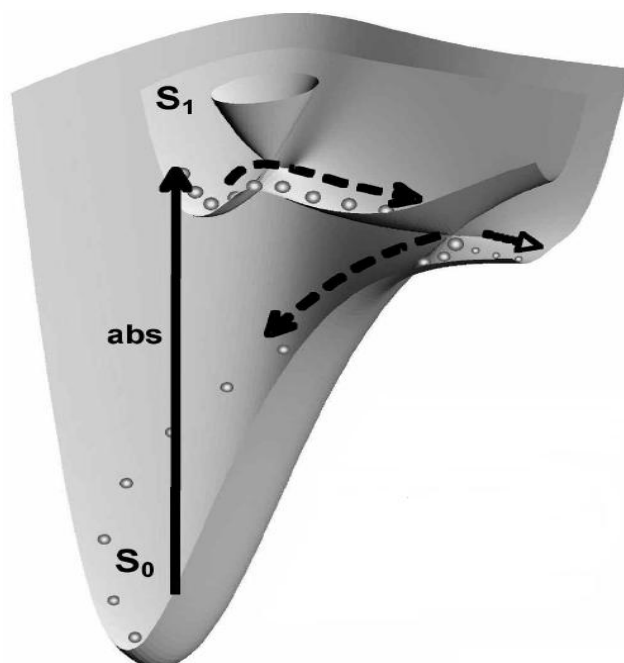


Рис. 15. Фотовозбуждение хромофора и его дезактивация через коническое пересечение поверхностей потенциальной энергии S₁ и S₀ в схематическом виде [Sobolewski, Domcke, 2002].

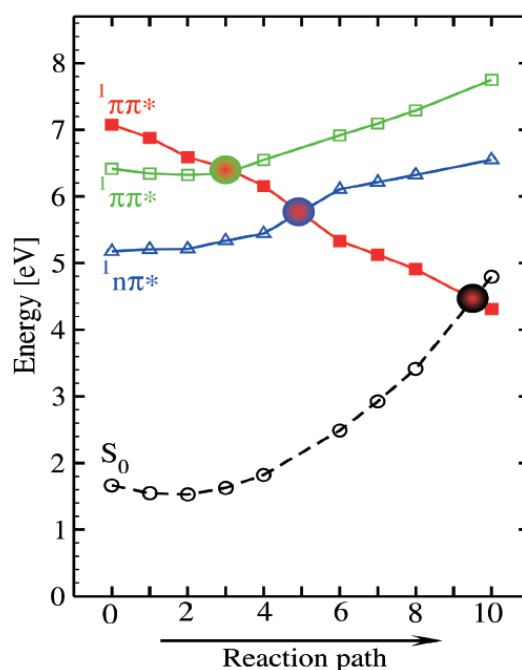


Рис. 16. Профили потенциальной энергии основного состояния S₀ и нижних возбужденных состояний аденина вдоль пути реакции, ведущего из равновесной геометрии основного состояния (слева) к коническому пересечению S₁/S₀ (справа).

В последние годы проводятся подробные исследования фотохимии азотистых оснований ДНК и РНК специалистами в области квантовой химии и фемтохимии. С момента первых исследований в 1970-е гг. было показано, что азотистые основания

имеют низкие квантовые выходы флюоресценции и обладают способностью к эффективному безызлучательному тушению возбужденных состояний [Pescourt et al., 2001]. Фотостабильность является одним из главных фотофизических свойств ДНК и РНК при облучении УФ, и, вероятно, была приобретена в ходе продолжительной молекулярной эволюции. Времена жизни возбужденных азотистых оснований крайне малы и имеют порядок сотен фемтосекунд в растворе [Crespo-Hernandez et al., 2004]. Квантово-химические методы значительно помогают в идентификации механизмов дезактивации возбужденных состояний. Было идентифицировано 2 типа фотохимических реакций, ведущих к коническим пересечениям основного и нижнего возбужденного состояний: 1) вращение C-N связей пиримидинового кольца и 2) диссоциация атома водорода азиновой или аминовой группы. На рисунке 16 показаны энергетические профили основного и трех нижних возбужденных состояний аденина как функции координаты реакции вращения двугранного угла вокруг связи C2-N1 пиримидинового кольца, ведущий к коническому пересечению основного и возбужденного состояния с наиболее низким значением потенциальной энергии.

На рисунке 17А показано, как путь реакции биологического таутомера гуанина, начиная с области Франка-Кондона, ведет к коническому пересечению и не имеет энергетического барьера. Пересечение с основным состоянием достигается при значении двугранного угла $D(C_{7a}-N_1-C_2-N_3) = 64^\circ$. Возбужденное состояние гуанина имеет крайне низкое время жизни, поскольку происходит сверхбыстрое безызлучательное тушение через коническое пересечение.

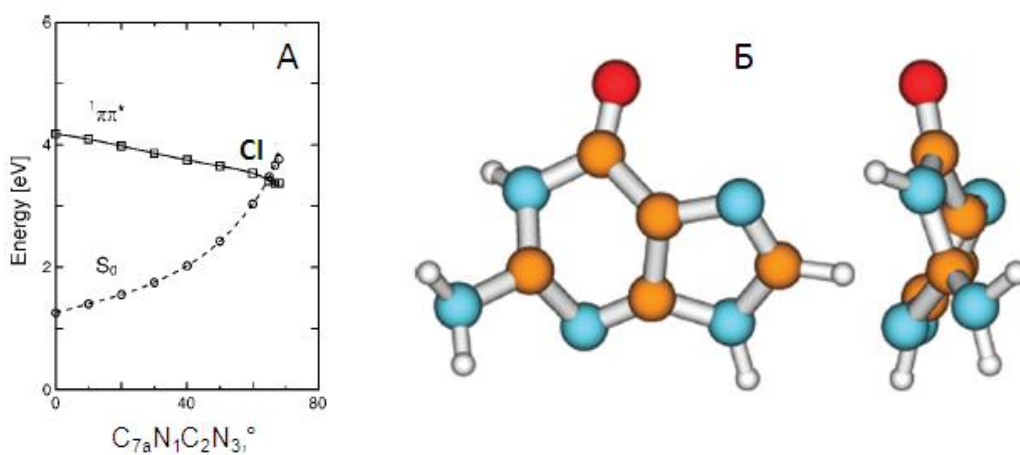


Рис. 17. А. Энергетический профиль основного состояния S_0 и возбужденного состояния $^1\pi\pi^*$ биологического таутомера гуанина вдоль координаты реакции деформации пиримидинового кольца, ведущей к коническому пересечению (CI). Б. Оптимизированная геометрия конического пересечения гуанина [Yamazaki et al., 2008].

На рисунке 18 показаны пути реакции диссоциации связей NH гуанина. Связи N₁-H и N₈-H были отобраны на основании того, что диффузная орбиталь σ^* локализована вблизи данных связей (Рис. 18, В). Проводилась оптимизация геометрии возбужденного состояния $^1\pi\sigma^*$ вдоль координаты длины связи N-H, энергия основного состояния рассчитывалась на основании оптимизированной $^1\pi\sigma^*$ геометрии. В обоих случаях профили энергии связей N-H имеют диссоциативный характер, пересечение с состоянием S₀ происходит при длине связи ~ 1,7 Å (Рис. 18, А, Б). Энергетический барьер находится при длине волны 1,3 Å и отражает трансформацию ридберговской орбитали в валентную.

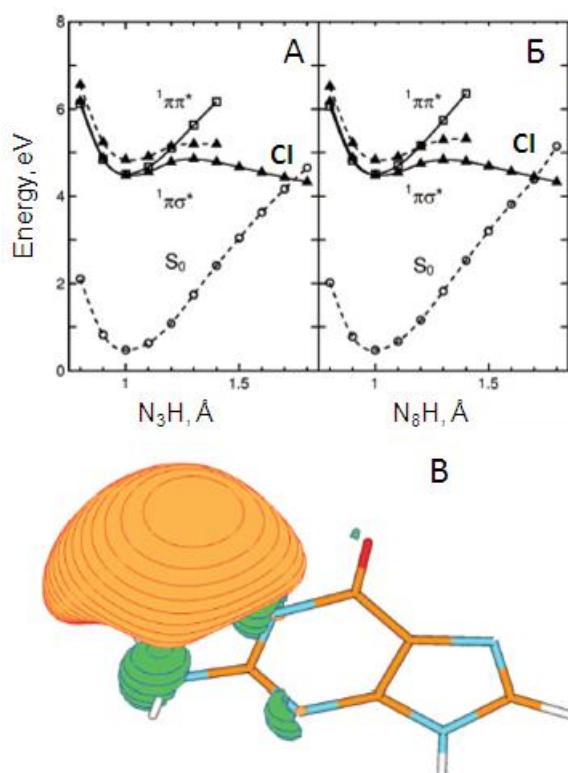


Рис. 18. Энергетические профили основного состояния S₀ и возбужденных состояний $^1\pi\pi^*$ и $^1\pi\sigma^*$ биологического таутомера гуанина вдоль координаты реакции: N₃H (А) и N₈H (Б). В. Орбиталь σ^* равновесной геометрии основного состояния гуанина [Yamazaki et al., 2008].

Таким образом, мы рассмотрели основные механизмы внутренней конверсии возбужденных синглетных состояний азотистых оснований на примере гуанина. Очевидно, фотостабильность азотистых оснований во многом обеспечивается фотофизическими свойствами пиримидинового кольца. Сходство структуры молекул гуанина и птерина также очевидно и, в первую очередь, касается тетрагидро-восстановленных форм птеринов, в которых пиримидин дополнен восстановленной

пиразиновой структурой, а не пиразином, образующим с пиримидином систему сопряженных π связей. По-видимому, тетрагидровосстановленные птерины также склонны к диссипации энергии фотовозбуждения путем колебательной релаксации и внутренней конверсии, причем по схожим с азотистыми основаниями механизмам.

1.3. Значение фотохимических реакций тетрагидровосстановленных птеринов для биологических процессов

1.3.1. Свидетельства участия птеринов в фоторецепции

Конъюгированный птерин 5,10-метенил-5,6,7,8-тетрагидрофолиевая кислота (МТГФ) (λ_{\max} 380 нм) участвует в рецепции ультрафиолета. МТГФ входит в состав ДНК-фотолиаз и криптохромов. В составе белков-рецепторов света 5,10-метенил-ТГФК непосредственно функционирует как светосборщик, энергия возбуждения которого передается на молекулу флавинадениндинуклеотида (ФАД) (λ_{\max} 450 нм), выполняющего в активном центре роль редокс-агента [Sancar, 2003].

До недавнего времени не было фактов, свидетельствующих об участии неконъюгированных птеринов в фоторецепции, и только в последние годы показано, что некоторые соединения участвуют в рецепции ультрафиолета-В. Предполагается, что тетрагидровосстановленные птерины могут выступать в роли хромофоров неких фоторецепторов ультрафиолета [Moon et al., 2012; Takeda et al., 2014]. Сами фоторецепторы до сих пор не были выделены и изучены, однако известно, что N_4 цианоптерин (6-[1-(4-О-метил-(α -D-глюкуронил)-(1,6)-(β -D-галактозилоксид)]-метил-5,6,7,8-тетрагидроптерин) (Рис. 2) ответственен за фототаксис цианобактерий в ответ на действие ультрафиолета. Было показано, что фоторецептор, содержащий цианоптерин, подавляет негативный фототаксис под действием ультрафиолета и синего света [Moon et al., 2010a]. Мутанты *pgtA* (у *pgtA* мутанта отсутствует фермент птеридинглюкозилтрансфераза, относящийся к пути биосинтеза цианоптерина) имеют такой же позитивный фототаксис в ответ на действие красного и зеленого света, как и у дикого штамма *Synechocystis* sp. PCC 6803. Однако в ответ на действие белого света мутанты *pgtA* оказываются дезориентированы, клетки двигаются «веерообразно»: во всех направлениях при небольшом положительном фототаксисе. Похожая реакция наблюдается и при воздействии УФ и синего света. Примечательно, что при действии УФ на дикий штамм *Synechocystis* sp. PCC 6803 цианобактерии остаются на месте, а *pgtA* мутанты проявляют негативный фототаксис [Moon et al., 2010a].

Рецепторы УФ в целом являются сравнительно новым классом фоторецепторов. Так, УФ-В-рецептор UVR8 (UltraViolet Resistance Locus 8) был открыт в начале 2000-х гг. [Kliebenstein et al., 2002]. UVR8 ответственен за рецепцию ультрафиолета в области 280-315 нм. Роль хромофора играет один из 7 остатков триптофана – Trp²⁸⁵ [Christie et al., 2012]. В ответ на действие ультрафиолета меняется конформация остатка Trp²⁸⁵, а вместе с

ней меняется и конформация всего белка таким образом, что из гомодимера образуется 2 мономерных молекулы [Cloix, Jenkins, 2008; Wu et al., 2012].

H₄Бип является хромофором в составе некоего фоторецептора, участвующего в регуляции синтеза антоцианов в клетках моркови. Исследования спектров действия УФ-В-индуцированного накопления антоцианов в культуре клеток моркови свидетельствовало об участии восстановленного птерина, возможно H₄Бип, в УФ-В рецепции. Помимо этого УФ-В-индуцированная активность фенилаланин-аммоний-лиазы (ФАЛ) – фермента, катализирующего превращение фенилаланина в аммиак и коричную кислоту, – подавлялась N-ацетилсеротонином (ингибитор биосинтеза тетрагидробиоптерина). Добавление H₄Бип или Бип частично восстанавливало УФ-В-индуцированную активность ФАЛ в клетках, обработанных N-ацетилсеротонином [Takeda et al., 2014]. Предполагается, что существует УФ-В-фоторецептор, отличный от UVR8, роль хромофора в котором играет тетрагидровосстановленный птерин [Takeda et al., 2014].

Таким образом, установлено, что восстановленные птериновые соединения играют роль хромофоров в составе неких УФ-В-рецепторов, однако сами эти УФ-В-рецепторы до сих пор не выделены и не исследованы. По одной из гипотез за рецепцию УФ у цианобактерий ответственен DASH криптохром [Moon et al., 2012], в котором H₄цианоптерин играет роль хромофора наряду с флавином [Moon et al., 2010b]. Спектр действия *Synechocystis* sp. PCC 6803 совпадает со спектром действия криптохрома DASH. В спектре действия проявляется 3 основных пика: пики 300 нм и 380 нм соответствуют птеринам, пик на 440 нм характерен для флавинов. Пики 380 нм и 440 нм также есть в спектре возбуждения флюоресценции криптохрома Scry1 (криптохром DASH цианобактерий) из *Synechocystis* sp. PCC 6803 [Moon et al., 2010b]. Если данная гипотеза не подтвердится, мы можем предположить, что в ближайшее время будет открыт новый УФ-фоторецептор с тетрагидровосстановленным птерином в роли хромофора.

Как известно, тетрагидроптерины не флюоресцируют, и, следовательно, не могут передавать световой сигнал путем диполь-дипольного переноса энергии по Ферстеровскому механизму. Тетрагидроптерины, по всей видимости, не образуют триплетные формы и возбужденные состояния с большим временем жизни. Можно предположить, что передача светового сигнала происходит в результате изменения конформации молекулы, в ответ на которое, вероятно, происходят структурные изменения и в апобелке УФ-В-рецептора. Например, как в белке UVR8 [Wu et al., 2012]. В связи с этим одной из задач нашего исследования было проанализировать возможность конформационных превращений тетрагидровосстановленных форм птеринов при возбуждении ультрафиолетом.

1.3.2. Роль птеринов в патогенезе заболевания витилиго

Витилиго является нарушением пигментации, которое выражается в исчезновении меланина и появлении депигментированных участков кожи (Рис. 19). Этиология витилиго до сих пор не известна, но, по-видимому, связана с метаболическими функциями фенилаланингидроксилазы (ФАГ), N_4 Бип-зависимого фермента начальной стадии меланогенеза, и тирозиназы (КФ 1.14.18.1) [Iozumi et al., 1993; Schallreuter, 1999], а также с фотохимическими реакциями N_4 Бип и окисленных птеринов [Rokos et al., 2002; Vignoni et al., 2009].



Рис. 19. Пример депигментации кожи, пораженной витилиго.

Одна из наиболее вероятных причин витилиго - нарушение обмена тирозина, предшественника меланина. ФАГ катализирует окисление фенилаланина до тирозина и является N_4 Бип-зависимым ферментом. В ходе каталитического акта при участии молекулярного кислорода N_4 Бип окисляется до 4а-ОН-тетрагидробиоптерина (карбиноламин) (Рис. 20). Дегидратация 4а-ОН-тетрагидробиоптерина до хиноноидного дигидробиоптерин (q - N_2 Бип) катализируется птерин-4а-карбиноламиндегидратазой (ПКД) (КФ 4.2.1.96). Хиноноид q - N_2 Бип оказывает сильное ингибирующее действие на ПКД, в то время как 7,8-дигидробиоптерин (N_2 Бип) такого действия не оказывает. В отсутствие ПКД, дегидратация 4а-ОН-тетрагидробиоптерина проходит неэнзиматически и приводит к образованию как N_2 Бип, так и 7- N_2 биоптерина, или дигидропримаптерина [Davis et al., 1991]. 7- N_2 Бип, в отличие от 4а-ОН-тетрагидробиоптерина, оказывает ингибирующее действие на ФАГ [Thöny et al., 2000]. Наконец, превращение q - N_2 Бип в N_4 Бип происходит с участием дигидроптеридин-редуктазы в ходе НАДН-зависимой реакции. Таким образом, регенерация N_4 Бип необходима для метаболизма фенилаланина, поскольку: 1) требуется

постоянная подача восстановленного H_4 Бип для работы ФАГ; 2) нежелательно накопление метаболитов, образующихся в результате неэзиматической перегруппировки 4а-ОН-тетрагидробиоптерина.

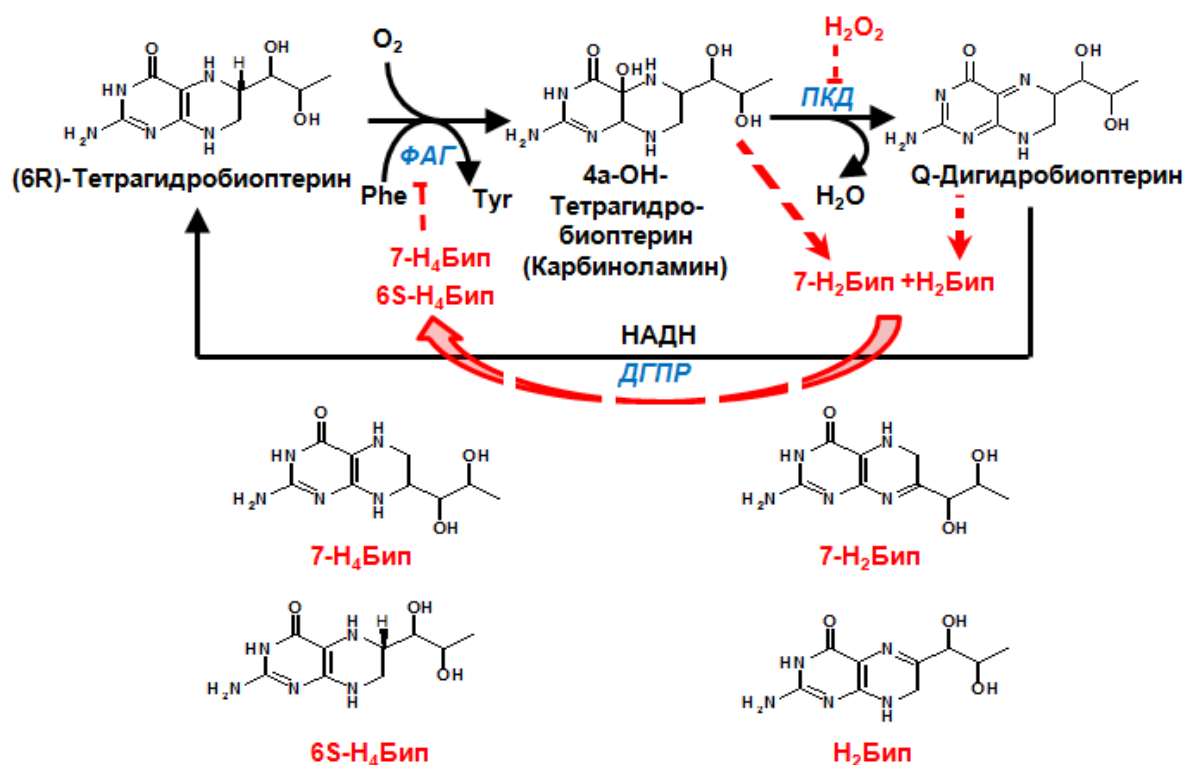


Рис. 20. Нарушение цикла регенерации H_4 Бип при окислительном стрессе и инактивация фенилаланингидроксилазы [Thöny et al., 2000] (черными линиями показан цикл регенерации H_4 Бип в норме, нарушение цикла регенерации показано красными пунктирными линиями). ФАГ - фенилаланин-4-гидроксилаза; ПКД - птерин-4а-карбиноламин дегидратаза; ДГПР - дигидроптеридин-редуктаза. 7- H_2 Бип - 7-дигидробиоптерин, или дигидропримаптерин.

H_4 Бип напрямую регулирует активность тирозиназы. Сайт связывания H_4 Бип в составе тирозиназы имеет последовательность гомологичную сайтам связывания H_4 Бип у ФАГ и ПКД [Wood et al., 1995]. Для того чтобы H_4 Бип контролировал активность тирозиназы, требуется присутствие L-тирозина. Если в качестве субстрата для тирозиназы выступает L-ДОФА, H_4 Бип не оказывает ингибирующего действия на фермент [Wood et al., 1995]. H_2 Бип и Бип, продукты окисления H_4 Бип, не оказывают значительного ингибирующего действия на тирозиназу, и это означает, что реакция гидроксирования тирозина до ДОФА контролируется соотношением H_4 Бип/Бип и может инициироваться фотоокислением H_4 Бип [Wood et al., 1995]. Показано, что H_4 Бип может функционировать в качестве УФ-В переключателя для de novo меланогенеза, поскольку

фотоиндуцированное окисление H_4 Бип может «снимать» его ингибирующее действие на тирозиназу [Schallreuter et al., 1998].

Установлено, что при витилиго в клетках дермы развивается окислительный стресс [Jain et al., 2010], в миллимолярных концентрациях накапливается перекись водорода. В условиях окислительного стресса тирозиназа активируется низкой концентрацией перекиси водорода ($< 0,3 \times 10^{-3}$ М), но дезактивируется, когда концентрации перекиси находится в диапазоне $0,5-5,0 \times 10^{-3}$ М [Wood et al., 2004]. В условиях окислительного стресса работа птерин-4а-карбиноламиндегидратазы может ингибироваться перекисью водорода, что приводит к нарушению цикла регенерации H_4 Бип [Schallreuter et al., 2001] (Рис. 20). Гипотеза о том, что витилиго вызывается нарушением цикла регенерации H_4 Бип на сегодняшний день является одной из наиболее разработанных и обоснованных [Schallreuter, 2001]. Концентрации перекиси менее 30 мкМ увеличивают активность ДГПР, однако концентрации свыше 30 мкМ инактивируют ДГПР, что происходит путем окисления Met¹⁴⁶ и Met¹⁵¹ белковой последовательности и приводит к нарушению НАДН-зависимого активного центра фермента [Hasse et al., 2004]. Инактивация ПКД ведет к неэнзиматической дегидратации 4а-ОН-тетрагидробиоптерина, которая идет с образованием H_2 Бип и 7- H_2 биоптерина [Davis et al., 1991] (Рис. 20). Энзиматическое восстановление H_2 Бип и 7- H_2 биоптерина при участии дигидроптериидинредуктазы (ДГПР) идет с образованием 6(R,S)-5,6,7,8-тетрагидробиоптерина и 7(R,S)-5,6,7,8-тетрагидробиоптерина, соответственно, поскольку ДГПР обладает низкой стереоспецифичностью [Rebrin et al., 1995]. Константа Михаэлиса для взаимодействия (6S)-5,6,7,8-тетрагидро-L-биоптерина (6S- H_4 Бип) и ФАГ в 2 раза выше, чем для (6R)-5,6,7,8-тетрагидро-L-биоптерина [Haavik et al., 1986]; 7(R,S)-5,6,7,8-тетрагидро-L-биоптерин (7- H_4 Бип) ингибирует ФАГ [Davis et al., 1992] (Рис. 20).

ГТФ-циклогидролаза I (ГТФЦГ) осуществляет превращение ГТФ в 7,8-дигидронеоптерин-3'-фосфат (Рис. 21) и является лимитирующей реакцией для биосинтеза H_4 Бип. Ингибирование ФАГ (Рис. 20) по механизму обратной связи приводит к трех–пятикратному увеличению активности ГТФЦГ. Увеличение активности ГТФЦГ приводит к de novo чрезмерному синтезу (6R)-5,6,7,8-тетрагидробиоптерина [Schallreuter et al., 1994]. Чрезмерный синтез H_4 Бип, в свою очередь, приводит к полному ингибированию тирозиназы [Wood et al., 1995], таким образом, тирозин не образуется и, как следствие, меланогенез в клетках эпидермиса прекращается.

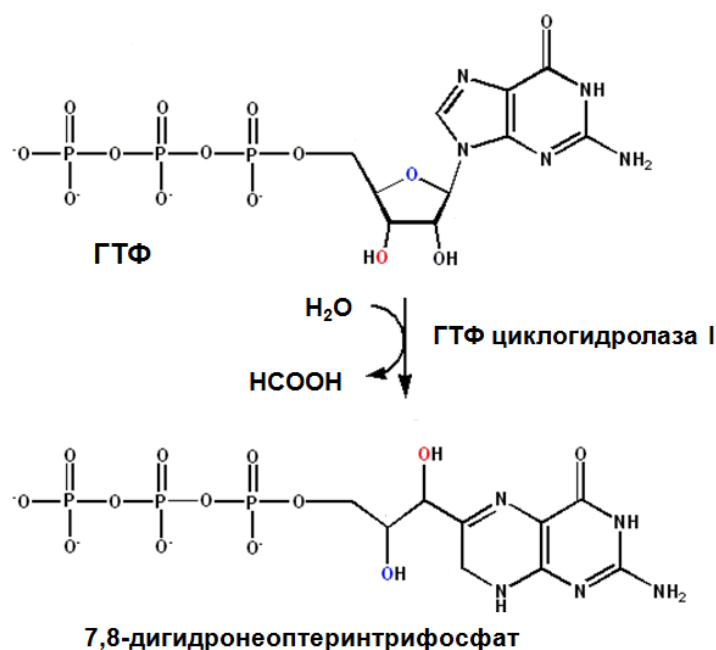


Рис. 21. Упрощенная схема превращения гуанозинтрифосфата (ГТФ) в 7,8-дигидронеоптеринтрифосфат, предшественник Н₄Бип [Thony et al., 2000].

Продукты окисления Н₄Бип, биоптерин и примаптерин, накапливаются в клетках депигментированных участков кожи (по-видимому, в результате неэнзиматического окисления Н₂Бип и Н₄Бип молекулярным кислородом) и демонстрируют характерную флюоресценцию при облучении ближним ультрафиолетом [Schallreuter et al., 1994a]. Фотолиз биоптерина в аэробных условиях приводит к образованию дополнительных количеств перекиси при витилиго [Rokos et al., 2002]. Помимо Бип и примаптерина в клетках эпидермиса накапливается 6-карбокситерин, продукт окисления биоптерина (Рис. 4), который под действием УФ также сенсibiliзирует образование АФК. Данное обстоятельство делает Н₄Бип, накапливающийся в депигментированных участках кожи в результате чрезмерного de novo синтеза, чувствительным к УФ-радиации, к генерации АФК, сенсibiliзированной окисленными птеринами. Фотохимия Н₄Бип ранее не изучалась, но вследствие всего вышеуказанного исследование процесса фотоокисления и фотосенсibiliзированного окисления Н₄Бип важно для понимания этиологии и течения заболевания, а также для разработки методов терапии витилиго.

1.3.3. Эволюционные аспекты фотохимии птерицинов

Относительно недавно стало известно, что птерицины (птерины и флавины) являются хромофорами фоторецепторных белков (фотолиаз, криптохромов и т.д.), следовательно птерицины обладают такими функциональными возможностями, которые позволяют им быть, с одной стороны, универсальными коферментами разнообразных «темновых» метаболических процессов, в первую очередь, редокс-процессов, а с другой стороны, функционировать в качестве рецепторов ультрафиолета и синего света [Крицкий и др., 2010]. Такие широкие функциональные возможности, в первую очередь, можно связать с их устойчивостью к УФ излучению. УФ-излучение и синяя часть спектра Солнца были важнейшими источниками свободной энергии в период предбиологической и ранней биологической эволюции на Земле. В этот период, вероятно, использовались те вещества, которые были доступны из абиогенеза. Показано, что птерины и изоаллоксазины (флавины) могут образовываться при термоконденсации абиогенных аминокислот [Heinz et al., 1979; Heinz, Ried, 1981; Fox, Dose, 1972]. В период предбиологической эволюции хромопротеиноиды, содержащие птерицины (птерины и флавины) в качестве хромофора могли функционировать как катализаторы в темновых редокс реакциях и как фотосенсибилизаторы в фотоиндуцированных процессах. Доступность данной группы соединений может говорить об их древности и возможном участии на всех этапах эволюции.

Второй важный эволюционный аспект – это птерицины и «мир РНК» [Крицкий, Телегина, 2004]. Существующий набор оснований в нуклеиновых кислотах является продуктом эволюции и отбора. В отборе могли участвовать разнообразные гетероциклы. Показано, что птерицины стерически подходят и могут быть встроены в нуклеотидные последовательности [Hawkins et al., 1997]. Флавины и птерины могли обогатить каталитические и фотокаталитические возможности примитивных полирибонуклеотидов, лишенных редокс функций. В условиях абиогенеза птерицины могли поглощать УФ и функционировать в качестве фотокатализаторов свободно-радикальных процессов, приводящих к синтезу соединений для дальнейшей предбиологической эволюции [Schmidt, Butler, 1976]. В неокислительных условиях предбиологической и ранней биологической эволюции структурное сходство птерина и пурина, возможно, позволяло птеринам включаться в состав прото-РНК. В отсутствие значительных количеств свободного кислорода в атмосфере конъюгированные в прото-РНК ди- и тетрагидровосстановленные птерины могли функционировать в качестве доноров

электрона и водорода в различных процессах усложнения углеродистых соединений на пути к жизни, в том числе в процессах, связанных с запасанием свободной энергии.

По мере оксигенации внешних условий и возникновения озонового экрана изменялись и функции птерицинов. Пиразиновая часть птеринового строения становилась окисленной и π электроны ее двойных связей начинали существенно влиять на электронную конфигурацию и редокс-свойства птеринов. У окисленных птеринов преобладают процессы флюоресценции, интеркомбинационной конверсии S-T, а также процессы передачи энергии на молекулярный кислород с образованием синглетного кислорода, что представляет опасность для полирибонуклеотидов и других «соседей» птеридинов. В этом случае основная фоторецепция энергии и ее запасание в продуктах реакции с необходимостью должна была переходить к более специализированным порфиринам, одним из преимуществ которых была их гидрофобность, локализация в мембранах и поглощение света в видимой части спектра. В то же время, птеридины сохранили свои УФ-хромофорные функции в составе фоторегуляторных белков. Каталитические редокс функции птеридинов, по-видимому, также сохранились на протяжении всей эволюции.

* * *

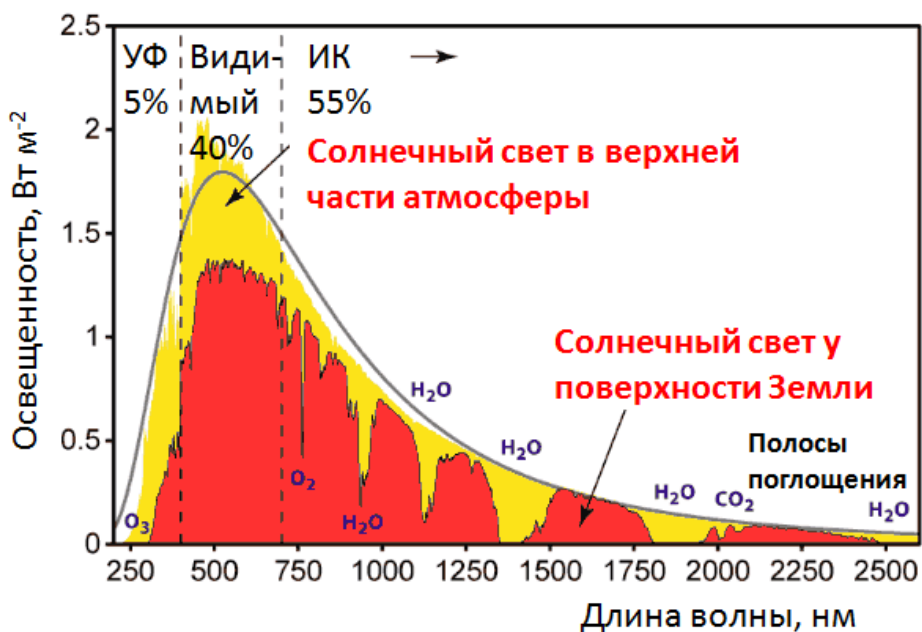


Рис. 22. Спектр солнечного излучения.

Как видно из анализа литературных данных, фотохимия окисленных птеринов исследована достаточно подробно, в то время как фотохимия тетрагидровосстановленных птеринов до сих пор мало изучена. Это, во-первых, связано с тем, что восстановленные птерины нестабильны в присутствии кислорода, что значительно

затрудняет изучение их фотохимии. Во-вторых, восстановленные птерины поглощают свет в области ультрафиолета-В (280-320 нм), который практически не достигает земной поверхности (Рис. 22).

В этой связи целью настоящей работы является исследование фотохимических свойств восстановленных, коферментных форм птеринов и анализе фотосенсибилизирующей активности их окисленных производных.

В соответствии с целью работы были сформулированы следующие задачи, определяющие структуру исследования:

- идентифицировать продукты фотохимического окисления кофермента 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина (Н₄Бип);
- предложить механизм фотохимического окисления Н₄Бип;
- 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.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы и оборудование

2.1.1. Реактивы

L-Биоптерин (содержание основного вещества не менее 99%), 7,8-дигидро-L-биоптерин (99%), (6R)-5,6,7,8-тетрагидро-L-биоптерин (99%) и другие птерины получены в Schircks Laboratories (Швейцария) и использовались без дальнейшей очистки после проверки на содержание примесей с помощью ВЭЖХ. K_2HPO_4 , цитрат натрия, KI и прочие реактивы получены в Sigma-Aldrich Co.

Растворы приготавливались путем растворения H_4Bip в 0,1 N HCl с последующим добавлением фосфатного буфера pH 7,2. Биоптерин растворяли в фосфатном буфере. Все растворы готовились на основе деионизованной воды.

2.1.2. Установка для облучения образцов.

Облучение водных растворов H_4Bip (pH 7,2) проводили в кварцевых кюветах при комнатной температуре. Для облучения ультрафиолетом широкого спектра использовали источник облучения № 1: ртутная лампа высокого напряжения ДРК-120 (Россия) со светофильтром УФС-6 (область пропускания 300-380 нм); интенсивность излучения $63,0 \pm 0,3$ мВ·см⁻². Спектрофлюориметр RF-5301 («Shimadzu», Япония) с ксеноновой лампой (источник облучения № 2) использовали как источник монохроматического света с длиной волны 300 нм (интенсивность излучения $6,9 \pm 0,2$ мВ см⁻²) и 350 нм (интенсивность излучения $26,6 \pm 0,2$ мВ см⁻²) со спектральной шириной щели 20 нм. Интенсивность излучения измеряли с помощью радиометра Hamamatsu C9386 (Япония) и «Аргус 04» (ФГУП «ВНИИОФИ», Россия).

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре СФ 2000 производства фирмы «Спектр» (Россия) и DU-650 («Beckman», Германия). Измерения проводились в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1,0 см.

2.2. Методы.

2.2.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография и масс-спектрометрия

Для фракционирования и регистрации продуктов реакций использовали градиентный жидкостный хроматограф «Стайер» производства НПФ «Аквилон» (Россия). Элюат с колонки пропускали через 3 детектора, подключенных последовательно: 1) фотометрический детектор для УФ-видимой области «Стайер» UVV-104 (Россия) использовали для регистрации поглощения при длине волны 267 нм, которая

соответствует максимуму в спектре поглощения водного раствора Н₄Бип с рН 2,7; 2) флюориметрический детекторе «Флюорат-02-Панорама» производства фирмы «Люмекс» (Россия) использовался для измерения флюоресценции с длиной волны возбуждения 330 нм и длиной волны эмиссии 440 нм, что соответствует максимумам возбуждения и эмиссии флюоресценции Н₂Бип; 3) амперометрический детектор «Цвет-Яуза-01» производства «Химавтоматика» (Россия) с потенциалом на рабочем электроде +700 мВ.

Фракционирование проводилось на ионообменной колонке Partisil SCX (5 мкм, 250 × 4,6 мм; производство «Phenomenex», США). Мобильная фаза представляла собой насыщенный аргоном 25мМ цитрат натрия рН 2,7. Фракционирование проводили в течение 30 минут при скорости потока элюента 0,7 мл мин⁻¹. Аликвоты облучаемого раствора, содержащего Н₄Бип и продукты окисления, отбирали через равные промежутки времени и стабилизировали путем добавления 0,25 М цитратного буфера рН 2,7 в соотношении 1:1. Конечный рН доводили до 2,7 путем добавления 1 М фосфорной кислоты.

Для ВЭЖХ-MS/MS масс-спектрометрии использовали колонку Synergi-4u-Polar-RP 80A (250 × 4,6 мм; производство «Phenomenex», США) с мобильной фазой: 0,05 М ацетат аммония с формиатом (рН 7); градиент: 0-60% ацетонитрила. 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: tandemный квадруполь времяпролетный Agilent 6520 (США).

2.2.2. Расчет квантового выхода фотореакций

Расчет квантового выхода фотореакций производили по следующей формуле:

$$\Phi_R = \frac{(d[R_{light}]/dt - d[R_{dark}]/dt) \times V \times t}{\frac{E \times S \times \int_0^t (1 - 10^{-A_\lambda}) dt}{N_A \times E_q}} \quad (\text{ур. 4})$$

где $d[R_{dark}]/dt$ - скорость убыли реагента (накопления продуктов) без облучения, $d[R_{light}]/dt$ - скорость убыли реагента (накопления продуктов) под действием света (моль л⁻¹с⁻¹), E - облученность (интенсивность излучения, получаемого на единицу площади) (мВ см⁻²), A_λ – оптическая плотность раствора при соответствующей длине волны, E_q - энергия одного фотона соответствующей длины волны (мВ с), N_A постоянная Авогадро (моль⁻¹), V –

объем раствора (l), S – площадь поверхности, на которую падает излучение (cm^2), t время облучения (s).

2.3. Квантово-химические расчеты

Квантово-химические расчеты выполнены с помощью программ Orca 3.0.1 [Neese, 2012] и Firefly (PC GAMESS) 8.0.0 [<http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html>], разработанной на основе квантово-химического программного пакета GAMESS US [Schmidt et al., 1993]. Для визуализации полученных результатов, визуализации пространственного строения молекул и анализа их орбитального строения использовалась программа ChemCraft 1.6 [<http://www.chemcraftprog.com>].

2.3.1. Оптимизация равновесной геометрии

Оптимизацию геометрии 5,6,7,8-тетрагидро-6-гидроксиметилптерина ($H_4Гмп$) и окисленных птеринов проводили в рамках теории функционала плотности (DFT) [Hohenberg, Kohn, 1964; Kohn, Sham, 1965] с использованием гибридного трёхпараметрического функционала Беке-Ли-Янга-Паппа (B3LYP) [Lee et al., 1988; Becke, 1993]. Расчеты для основного электронного состояния проводили в рамках ограниченного по спину метода Кона-Шэма (Restricted Kohn-Sham, RKS). Для радикальных состояний – катион-радикала $H_4Гмп^+$ и триплетных состояний окисленных птеринов – расчет проводился в рамках неограниченного по спину метода Кона-Шэма (Unrestricted Kohn-Sham, UKS).

При поиске равновесных геометрий с целью сокращения времени расчета использовалось последовательное усложнение базисного набора функций вплоть до достижения требуемого приближения. Первоначальную оценку геометрического строения проводили с использованием двухкратно валентно-расщепленных базисных наборов 3-21G [Binkley et al., 1980]. С целью повышения точности расчетов увеличивали размер базиса до трехкратно валентно-расщепленного 6-31G [Hehre et al., 1975] и 6-311G [Krishnan et al., 1980] с включением поляризационных функций d для «тяжелых» атомов и p для атомов водорода [Krishnan et al., 1980]. При оптимизации геометрии окисленных птеринов, а также при расчете геометрии возбужденных синглетных состояний $H_4Гмп$ в базисный набор включались дополнительные диффузные s -орбитали для атомов H и p -орбитали для атомов $Li-Ne$ [Krishnan et al., 1980].

Для равновесных геометрий рассчитывали гессиан (гессиан - матрица вторых производных полной энергии молекулы по координатам), дабы подтвердить, что гессиан не содержит отрицательных, мнимых частот и найденная геометрия действительно

соответствует минимуму поверхности потенциальной энергии (ППЭ). В ряде случаев полученные при расчете гессиана данные в дальнейшем использовались для расчета термодинамических параметров.

Для учета влияния растворителя (H₂O) использовалась континуальная модель COSMO [Klamt, Schüürmann, 1993; Klamt, 1995] с параметрами: диэлектрическая проницаемость $\epsilon = 80$, показатель преломления среды $n = 1.33$.

2.3.2. Расчеты термодинамических параметров

При расчете термодинамических показателей конформационных превращений основного состояния H₄Гмп в качестве альтернативы B3LYP использовался метод Хартри-Фока (RHF) с учетом электронной корреляции по методу теории возмущения Меллера-Плессе второго порядка (MP2) [Head-Gordon et al., 1988]. Поиск равновесной геометрии молекул осуществлялся путем последовательной оптимизации начальной геометрии DFT и ab initio методами в приближениях B3LYP/3-21G, B3LYP/6-31G(d,p) и MP2/6-31G(d,p). Решение колебательной задачи с целью нахождения значения свободной энергии Гиббса проводилось в приближениях B3LYP/6-31G(d,p) и MP2/6-31G(d,p).

Заселенность конформеров рассчитывалась согласно Больцмановскому распределению:

$$\frac{N_i}{N_{Total}} = \frac{e^{-G_{отн.}/RT}}{\sum_{k=1}^{N_{Total}} e^{-G_k/RT}} \quad (\text{ур. 5})$$

где $G_{отн.}$ - энергия Гиббса конформера i относительно конформера с минимальной энергией, G_k - энергия Гиббса конформера k относительно конформера с минимальной энергией, R – универсальная газовая постоянная (8,31 Дж моль⁻¹ К⁻¹), T – температура (298 K).

2.3.3. Расчет электронных спектров поглощения и оптимизация геометрии возбужденных состояний методом TD-DFT

Расчет электронных спектров поглощения проводился в рамках метода нестационарной теории функционала плотности (TD-DFT) [Runge, Gross, 1984; Marques, Gross, 2004]. Для учета влияния H₂O использовалась континуальная модель COSMO с параметрами диэлектрической проницаемости $\epsilon = 80$ и показателем преломления среды $n = 1.33$. Для оптимизации геометрии возбужденных состояний H₄Гмп также применяли метод TD-DFT.

2.3.4. Расчет физико-химических свойств на основании оптимизированных геометрий

Расчет вертикального потенциала ионизации и энергии сродства к электрону проводили на основе оптимизированной геометрии с использованием более высокого уровня теории B3LYP/6-311G++(2d,2p).

Изучение электронной структуры 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина проводили путем расчета энергий молекулярных орбиталей, их заселенностей и атомных зарядов по Малликену [Mulliken, 1955] в приближении B3LYP/6-31G(d,p).

2.3.5. Оптимизация геометрии конических пересечений $^1\pi\pi^*/S_0$ H₄Гмп

Оптимизацию геометрии конических пересечений (CI) H₄Гмп проводили методом самосогласованного поля в варианте полного активного пространства (Complete Active Space Self Consistent Field, CASSCF) [Roos, 1980]. Оптимизация CI проводилась, начиная с геометрии минимума состояния $^1\pi\pi^*$, найденной в рамках TDDFT. В ходе оптимизации геометрии использовался базисный набор функций 6-31G(d)+. В активное пространство включали 6 электронов, расположенных на 6 орбиталях π характера. Оптимизация проводилась без ограничений по симметрии. Усреднение по состояниям делалось для двух состояний ($^1\pi\pi^*$ и S_0) с одинаковыми весами.

2.4. Поиск количественных соотношений структура-свойство (QSPR)

Активность птерицинов, представленная в виде логарифма квантового выхода генерации синглетного кислорода $\text{Log } \Phi_{\Delta}$, использовалась в качестве зависимой переменной в ходе QSPR расчетов. Птерицины при помощи генерации случайных чисел были разделены на 2 выборки: тренировочную (80%) и тестовую (20%). Требования для максимального и минимального значения в тестовой выборке были следующими: 1) максимальное значение $\text{Log } \Phi_{\Delta}$ должно быть меньше либо равно максимальному значению $\text{Log } \Phi_{\Delta}$ в тренировочной выборке; 2) минимальное значение $\text{Log } \Phi_{\Delta}$ должно быть больше либо равно минимальному значению $\text{Log } \Phi_{\Delta}$ в тренировочной выборке.

Искомое уравнение линейной регрессии имеет следующий вид:

$$y = a_1*x_1 + a_2*x_2 + a_3*x_3 + c$$

где y – зависимая переменная ($\text{Log } \Phi_{\Delta}$); a_1, a_2, a_3 – коэффициенты линейной регрессии; x_1, x_2, x_3 – зависимые переменные (дескрипторы); c – константа.

Поиск лучшей QSPR модели вели методом пошаговой регрессии. Метод пошаговой регрессии состоит в том, что на каждом шаге производится либо включение в

модель, либо исключение из модели какого-то одного дескриптора. В частности, применялись техники: 1) Forward (отбор вперед): начинается с дескриптором, имеющим наиболее высокую степень корреляции с зависимой переменной y , затем находят наилучший дескриптор из тех, что остались, затем следующий наилучший и т.д.; 2) Stepwise (пошаговая): аналогична отбору вперед за исключением того, что имеется дополнительный шаг, в котором в каждом уравнении все переменные (дескрипторы) снова проверяются с целью проверки того, что они остаются значимыми даже после того, как была внесена новая переменная. Работа с данными проводилась в Microsoft Excel, а также 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 статистических параметров, таких как r^2 – квадрат коэффициента корреляции, или коэффициент детерминации для тренировочной выборки, RMSE – среднеквадратичная ошибка (Root Mean Square Error), а также среднеквадратичная ошибка расчетного значения Φ_{Δ} . Статистические параметры, такие как q^2 (r^2 по результатам внутренней перекрестной проверки тренировочной выборки по методу leave-one-out (LOO)), LOF – ошибка аппроксимации по Фридману (Friedman Lack of Fit) и pred_r^2 (r^2 для тестовой выборки, оценивающий предсказательную способность модели) использовались для проверки и сравнения моделей. Все QSPR модели проходили тестирование предсказательной способности с использованием внешнего тестового набора из шести соединений.

2.4.1. Конформационный анализ и оптимизация геометрии

Конформационный анализ проводили с помощью программы Spartan'14 [<http://www.wavefun.com>]. Генерация серии низкоэнергетических конформеров проводилась методом молекулярной механики, посредством силового поля MMFF (Merck Molecular Force Field) [Halgren, 1996]. Оптимизации геометрии проводилась в рамках полуэмпирического квантово-химического метода AM1 [Dewar et al., 1985]. Выбор наиболее энергетически выгодной конформации проходил на основе значения полной энергии, рассчитанной квантово-химическим методом Хартри-Фока с базисным набором 6-31G(d).

2.4.2. Молекулярные дескрипторы

Различные виды дескрипторов использовались для QSPR анализа оптимизированных молекул: физико-химические (липофильность (LogP), поляризуемость, электрический дипольный момент, растворимость в воде и др.), квантово-химические

дескрипторы (энергия HOMO и LUMO орбиталей, электростатические заряды на атомах, заселенность атомов по Малликену и др.), конституционные дескрипторы (количество доноров водородной связи, количество акцепторов водородной связи, количество метильных групп, количество -ОН групп и др.). Квантово-химические дескрипторы рассчитывались методом AM1. Некоторые параметры, такие как энергия вертикальных электронных переходов для синглетных и триплетных состояний, разница энергий нижних возбужденных синглетного и триплетного состояний, атомные заряды состояния T₁, были рассчитаны в рамках метода TD-DFT и функционала B3LYP на основании геометрии, оптимизированной методом AM1. Всего в ходе анализа было использовано 128 дескрипторов.

Мы оценивали влияние каждого дескриптора на модель. С этой целью рассчитывалось соотношение между коэффициентом детерминации R² для Log Φ_Δ и отдельно взятого дескриптора x_n и суммой индивидуальных R² коэффициентов всех дескрипторов:

$$\alpha(x_1) = \frac{R^2(x_1)}{R^2(x_1)+R^2(x_2)+R^2(x_3)} \times 100\% \quad (\text{ур. 6})$$

где $\alpha(x_i)$ – относительный вклад дескриптора x_i в исходную модель.

2.4.3. Статистические параметры

Для выбора и статистической проверки моделей использовалось несколько параметров.

Скорректированный коэффициент детерминации R²adj позволяет учесть при оценке качества модели соотношение количества наблюдений и количества оцениваемых параметров модели, то есть учитывается рост R² за счет увеличения количества переменных и «переучивания» модели. Если R² позволяет оценить степень корреляции зависимой переменной и независимых переменных, то R²adj позволяет сравнивать модели с разным количеством переменных. Рассчитывали R²adj по следующей формуле:

$$R^2 adj = 1 - (1 - R^2) \frac{(N-1)}{(N-c)} \leq R^2 \quad (\text{ур. 7})$$

где N – количество соединений в тренировочной выборке, c – количество переменных.

Еще один статистический параметр – ошибка аппроксимации LOF (Lack-of-Fit) [Friedman, 1991]. LOF оценивает наиболее приемлемое число переменных и препятствует «переучиванию» модели:

$$LOF = \frac{SSE}{(1 - \frac{c+dp}{N})^2} \quad (\text{ур. 8})$$

где SSE – сумма квадратов ошибок, c – количество зависимых переменных регрессионной

модели, d – коэффициент сглаживания (равен 0,5), p – количество дескрипторов, используемых в уравнении, N – количество наблюдений в тренировочной выборке.

2.4.4. Проверка достоверности моделей

Внутренняя проверка тренировочной выборки проводилась с использованием метода leave-one-out (q^2 , LOO). Для расчета показателя q^2 каждая молекула тренировочной выборки исключалась из выборки и ее активность предсказывалась на основе модели, рассчитанной для оставшихся соединений. Параметр q^2 оценивает внутреннюю стабильность модели и рассчитывается следующим образом:

$$q^2 = 1 - \frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum(y_i - y_{mean})^2} \quad (\text{ур. 9})$$

где y_i и \hat{y}_i – экспериментальное и предсказанное значение $\text{Log } \Phi_\Delta$ для молекулы i из тренировочной выборки, соответственно; y_{mean} – средняя активность всех молекул в тренировочной выборке.

В качестве внешней проверки активность каждой молекулы тестовой выборки предсказывалась при помощи модели, разработанной для тренировочной выборки. Параметр pred_R^2 для оценки предсказательной способности модели относительно тестовой выборки соединений рассчитывали следующим образом:

$$\text{pred}_R^2 = 1 - \frac{\sum(y_{act} - y_{pred})^2}{\sum(y_{act} - y_{mean})^2} \quad (\text{ур. 10})$$

где y_{act} и y_{pred} – экспериментальное и предсказанное значение $\text{Log } \Phi_\Delta$ для молекулы из тестовой выборки, соответственно; y_{mean} – средняя активность всех молекул в тренировочной выборке. Суммирование проводится по всем молекулам тестовой выборки. Таким образом, параметр pred_R^2 является основным для оценки предсказательной способности модели.

2.4.5. Согласованность данных в анализируемой выборке

Как правило, экспериментальные данные для QSPR/QSAR анализа получают в рамках одного исследования и в одинаковых условиях. Однако, как мы упомянули ранее, измерение квантового выхода генерации синглетного кислорода является ресурсозатратным процессом. В этой связи мы использовали данные из нескольких разных исследований, известных из литературы и согласующихся друг с другом. В рассматриваемых исследованиях определение квантового выхода генерации $^1\text{O}_2$ проходило в одинаковых условиях: во всех исследованиях $^1\text{O}_2$ детектировался напрямую путем измерения разрешенной во времени люминесценции при длине волны 1270 нм в водных D_2O растворах в присутствии

кислорода воздуха. В рассматриваемых работах в качестве стандартов применялись широко известные сенсibilизаторы, такие как бенгальский розовый, тетра(п-сульфoфенил)порфирин или перинафтенон с известными значениями Φ_{Δ} .

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Фотоокисление тетрагидробиоптерина: возможные пути и механизмы

3.1.1. Окисление $\text{H}_4\text{Бип}$ в водном растворе под действием широкополосного УФ-излучения

Оценивали влияние УФ-излучения на ход окисления 6R-L-5,6,7,8-тетрагидробиоптерина ($\text{H}_4\text{Бип}$) в водном растворе в присутствии кислорода воздуха. В присутствии кислорода воздуха растворы $\text{H}_4\text{Бип}$ (570 мкМ, 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,2) облучали УФ с диапазоном от 300 до 380 нм (источник света № 1, см. раздел Методы). Во время эксперимента записывали спектры поглощения растворов, и параллельно соединения, представленные в инкубационной смеси, разделяли и идентифицировали с помощью ВЭЖХ. ВЭЖХ-детекция продуктов реакций, представленных как в облученных, так и в необлученных растворах, выявила 4 пика (Рис. 23). Три пика имели времена выхода соответствующие временам выхода стандартов 6-биоптерина (Бип), 7,8-дигидроксантоптерина ($\text{H}_2\text{Ксп}$) и 7,8-дигидробиоптерина ($\text{H}_2\text{Бип}$); а четвертый пик соответствовал 7,8-дигидроптерину ($\text{H}_2\text{Птр}$), который из-за его нестабильности не доступен в качестве стандарта. Однако во время окисления стандарта 5,6,7,8-тетрагидроптерина ($\text{H}_4\text{Птр}$) в присутствии кислорода воздуха (процесс аналогичный аутоокислению $\text{H}_4\text{Бип}$ в водном растворе в присутствии кислорода) образовывался $\text{H}_2\text{Птр}$, и его время выхода соответствовало 14,7 минуте на ВЭЖХ хроматограммах. Поэтому $\text{H}_4\text{Птр}$ использовался в качестве стандарта для идентификации $\text{H}_2\text{Птр}$. ВЭЖХ-MS/MS масс-спектрометрия подтвердила присутствие $\text{H}_2\text{Бип}$, $\text{H}_2\text{Ксп}$, $\text{H}_2\text{Птр}$ и Бип в качестве продуктов.

Хроматограммы УФ-облученных растворов отличались от необлученных наличием дополнительного пика с временем выхода 20,5 минут (Рис. 23), который был идентифицирован как димер дигидробиоптерина ($\text{H}_2\text{Бип}$)₂. Мы пришли к такому выводу на основании того, что характеристики спектра этого соединения очень похожи на спектры, полученные ранее А.Н.Thomas с соавторами во время облучения $\text{H}_2\text{Бип}$, с основным пиком на 246 нм и плечом на 280 нм [Vignoni et al., 2010]. Образование димеров было подтверждено нами с помощью ВЭЖХ-MS/MS масс-спектрометрии. В масс-спектре присутствует сигнал MH^+/z 479, соответствующий массе димера ($\text{H}_2\text{Бип}$)₂ – 478 Da.

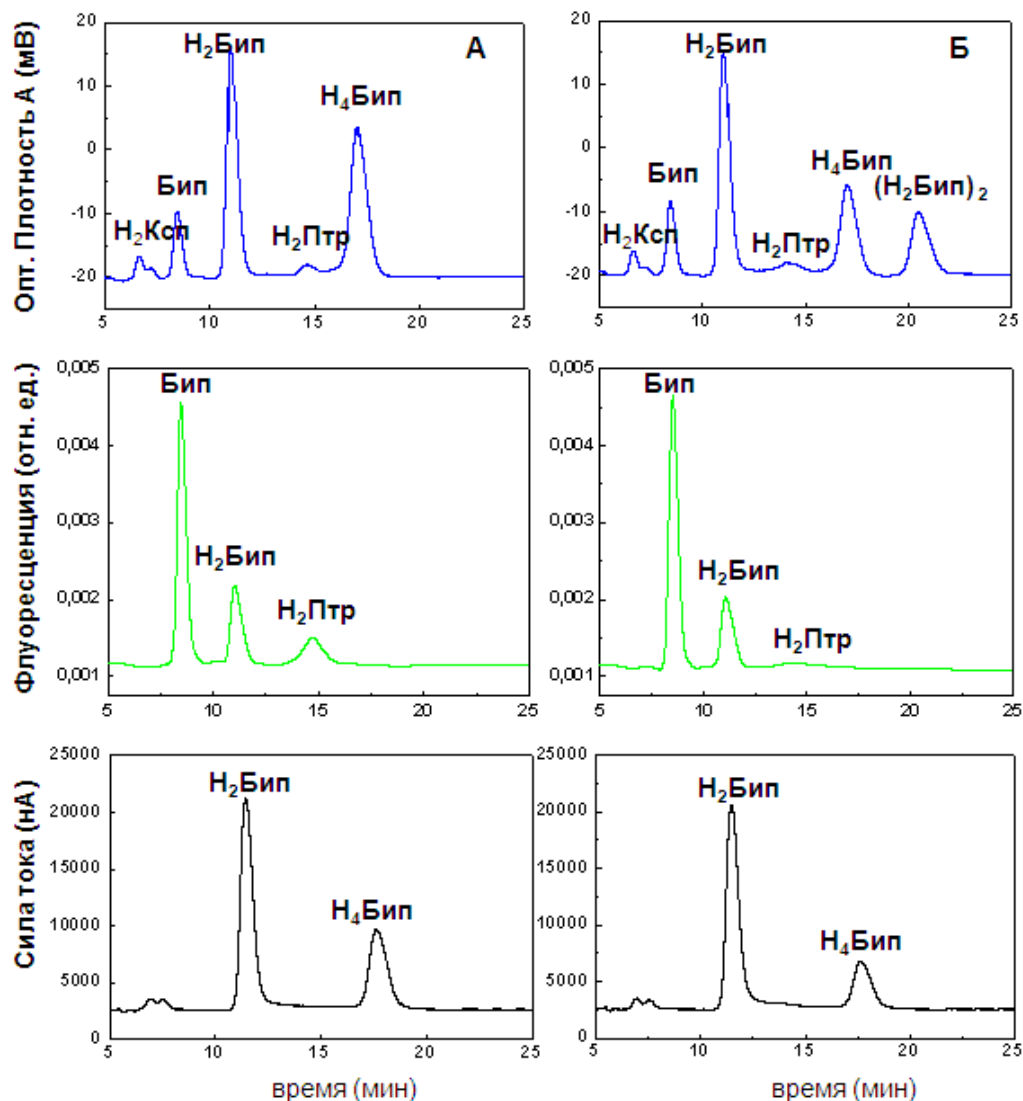


Рис. 23. Идентификация продуктов в инкубационной смеси (рН 7.2). Использовались детекторы трех типов: фотометрический, флуориметрический и амперометрический (см. раздел Методы). ВЭЖХ хроматограммы записаны через 15 минут после начала инкубации; $[H_4\text{Бип}]_0 = 570$ мкМ. А. Без облучения. Б. УФ-излучение с диапазоном 300-380 нм (63 мВ см^{-2}).

Уменьшение полосы поглощения с максимумом 298 нм (максимум поглощения в спектре $H_4\text{Бип}$) происходило и в облученных и в необлученных растворах $H_4\text{Бип}$ (Рис. 24). Одновременно с этим в необлученных растворах появлялись полосы поглощения с максимумами 232 нм, 280 нм и 330 нм, которые соответствуют максимумам $H_2\text{Бип}$ (Рис. 24, А). По данным ВЭЖХ, $H_2\text{Бип}$ преобладал среди продуктов в необлученных растворах (Рис. 23, А). Изобестические точки при 284 нм и 316 нм были представлены на серии спектров, которые были записаны последовательно во время инкубации необлученных

растворов (Рис. 24, А); напротив, спектры облученных растворов (Рис. 24, Б) изобестических точек не имели. Отсутствие изобестических точек в серии спектров облученных растворов свидетельствует о появлении нескольких продуктов.

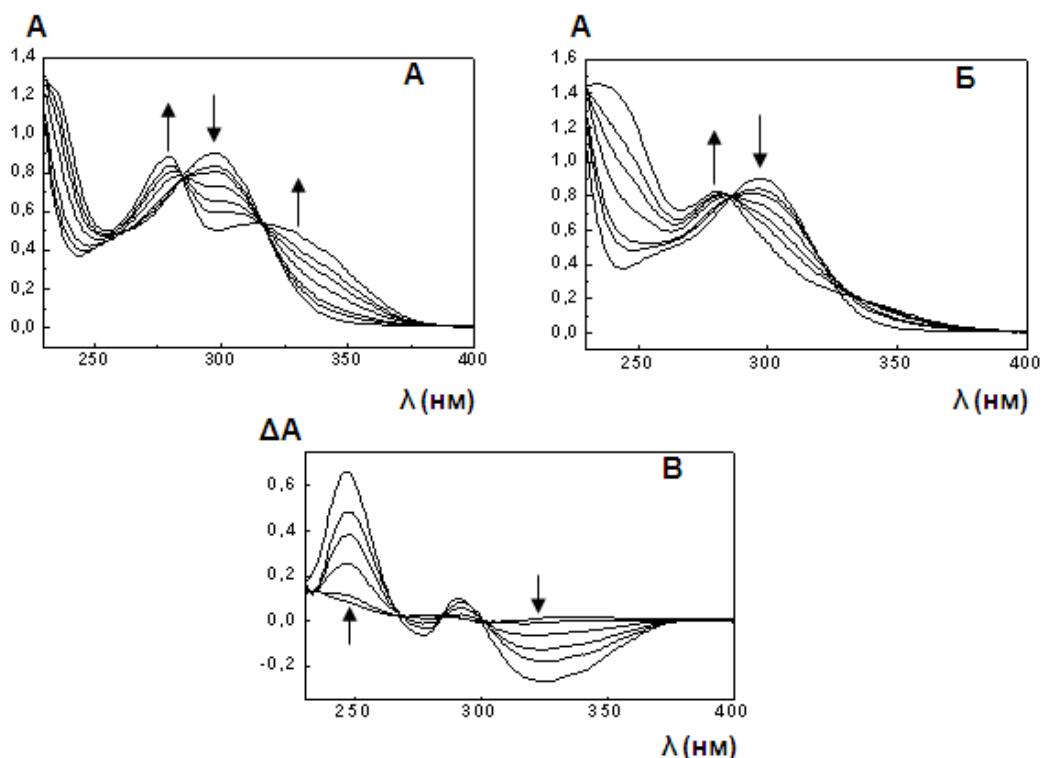


Рис. 24. Изменение спектров поглощения H_4Bip в присутствии кислорода воздуха. Спектры записаны через 3, 5, 10, 15, 20 и 30 минут облучения; длина оптического пути 0,5 см. Стрелками показаны наблюдаемые изменения спектров. $[H_4Bip]_0 = 177 \mu M$, $pH = 7,2$. А) необлученный раствор; Б) УФ-излучение (300-380 нм, 63 мВ см^{-2}); В) разностные спектры (спектр Б минус спектр А).

Предположение о том, что облучение H_4Bip приводит к образованию димеров $(H_2Bip)_2$, подтверждается анализом дифференциальных спектров (Рис. 24, В). Рост полосы поглощения в области 246 нм является признаком образования димеров [Vignoni et al., 2010]. Рост этой полосы происходил одновременно с убылью полосы с максимумом 330 нм, которая типична для спектров H_2Bip . Таким образом, в данных условиях ($[H_4Bip]_0 = 177 \mu M$, $pH = 7,2$; УФ λ 300-380 нм, 63 мВ см^{-2}), вероятно, большая часть H_4Bip превращается в $(H_2Bip)_2$. На основе дифференциальных спектров поглощения (Рис. 24, В) и молярных коэффициентов поглощения H_2Bip ($\epsilon_{330} = 6800 \text{ л моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$) были рассчитаны молярные коэффициенты поглощения димеров (Таблица 1).

Чтобы рассчитать концентрации основных индивидуальных компонентов в растворе по спектрам поглощения, мы решали следующую систему уравнений:

$$A_{246} = 4500 \times [\text{H}_4\text{Бип}] + 8700 \times [\text{H}_2\text{Бип}] + 37600 \times [(\text{H}_2\text{Бип})_2] + 11000 \times [\text{Бип}]$$

$$A_{298} = 10200 \times [\text{H}_4\text{Бип}] + 3700 \times [\text{H}_2\text{Бип}] + 15500 \times [(\text{H}_2\text{Бип})_2] + 2500 \times [\text{Бип}]$$

$$A_{330} = 2400 \times [\text{H}_4\text{Бип}] + 6800 \times [\text{H}_2\text{Бип}] + 5400 \times [\text{Бип}]$$

$$A_{350} = 400 \times [\text{H}_4\text{Бип}] + 4500 \times [\text{H}_2\text{Бип}] + 6500 \times [\text{Бип}]$$

В Таблице 1 указаны молярные коэффициенты поглощения птеринов, которые использовались для расчета концентраций индивидуальных компонентов в растворе.

Таблица 1. Молярные коэффициенты поглощения (л мол⁻¹ см⁻¹) птеринов.

λ , нм	$\text{H}_4\text{Бип}^a$	$\text{H}_2\text{Бип}^a$	$(\text{H}_2\text{Бип})_2$	Бип
246	4500	8700	37600	11000
298	10200	3700	15500	2500
330	2400	6800	0	5400
350	400	4500	0	6500

^a [Davis et al., 1988]

Согласно нашему обсчету спектров поглощения с помощью вышеуказанных уравнений, концентрация $\text{H}_4\text{Бип}$ через 15 минут УФ-облучения (300-380 нм) была на 32% ниже, чем в контрольных необлученных растворах, при этом 55% молекул $\text{H}_2\text{Бип}$ образовывали димеры. Из-за димеризации количество $\text{H}_2\text{Бип}$ в облученных и необлученных растворах было одинаково, несмотря на серьезное различие в скорости окисления $\text{H}_4\text{Бип}$.

Таким образом, облучение раствора $\text{H}_4\text{Бип}$ широкополосным УФ (300-380 нм) ускоряло окисление $\text{H}_4\text{Бип}$ по сравнению с необлученными образцами и увеличивало набор продуктов окисления (образование димеров). Следующим нашим шагом было ответить на вопрос о том, является ли рост скорости окисления $\text{H}_4\text{Бип}$ результатом его возбуждения и его фотохимической активности или же этот эффект обусловлен активностью других соединений.

3.1.2. Окисление $\text{H}_4\text{Бип}$ в растворе под действием монохроматического ультрафиолета с длиной волны $\lambda = 300$ нм

Для того чтобы исследовать механизм фотоокисления $\text{H}_4\text{Бип}$ мы подвергали растворы $\text{H}_4\text{Бип}$ (43 мкМ, рН 7,2) действию монохроматического излучения с длиной волны 300 нм, что близко к максимуму поглощения $\text{H}_4\text{Бип}$ (λ_{max} 298 нм). И $\text{H}_2\text{Бип}$ и Бип имеют в спектрах поглощения в этой области локальные минимумы, что минимизирует

вклад этих продуктов в фотоокисление $\text{H}_4\text{Бип}$. Набор продуктов при облучении растворов светом 300 нм состоял из Бип, $\text{H}_2\text{Ксп}$, $\text{H}_2\text{Бип}$, $\text{H}_2\text{Птр}$ и $(\text{H}_2\text{Бип})_2$ димеры, то есть тех же, что и при облучении широкополосным УФ.

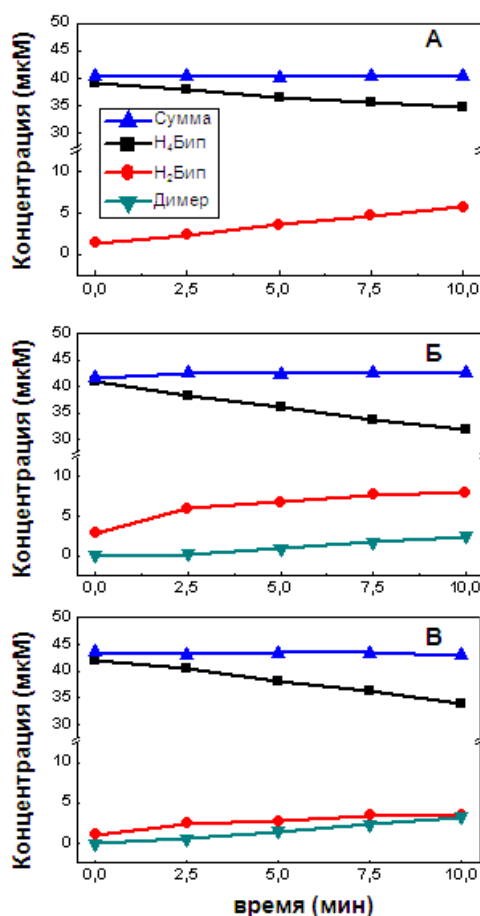


Рис. 25. Изменение концентраций $\text{H}_4\text{Бип}$ и продуктов окисления с течением времени. $[\text{H}_4\text{Бип}]_0 = 43$ мкМ, рН = 7,2. А) необлученный раствор; Б) монохроматическое излучение $\lambda = 300$ нм; В) монохроматическое излучение $\lambda = 350$ нм.

Кривые изменения концентраций $\text{H}_4\text{Бип}$ и $\text{H}_2\text{Бип}$, которые определяли с помощью решения системы уравнений, показали убыль $\text{H}_4\text{Бип}$ и увеличение концентрации $\text{H}_2\text{Бип}$ и димеров со временем (Рис. 25, Б). Скорости окисления $\text{H}_4\text{Бип}$ и накопления $\text{H}_2\text{Бип}$ под действием света $\lambda = 300$ нм были выше, чем в необлученных образцах (Рис. 25, А). Это, вероятно, означает, что возбуждение непосредственно $\text{H}_4\text{Бип}$ ускоряет окисление. Чтобы количественно оценить оба процесса, мы рассчитали скорость и квантовый выход фотоокисления. Скорость аутоокисления $\text{H}_4\text{Бип}$ была равна $(6,8 \pm 0,7) \times 10^{-9}$ М с⁻¹ (Таблица 2). Облучение УФ с длиной волны $\lambda = 300$ нм ($6,9$ мВ·см⁻²) увеличивало скорость окисления до $(18,1 \pm 1,0) \times 10^{-9}$ М с⁻¹. Исходная оптическая плотность раствора при $\lambda = 300$ нм была $A_{300}(0) = 0,463$, конечная оптическая плотность раствора через 10

минут облучения составила $A_{300}(10) = 0,412$ (Рис. 26, А). Кажущийся квантовый выход фотоокисления H_4Bip в условиях эксперимента составил $(2,7 \pm 0,4) \times 10^{-3}$.

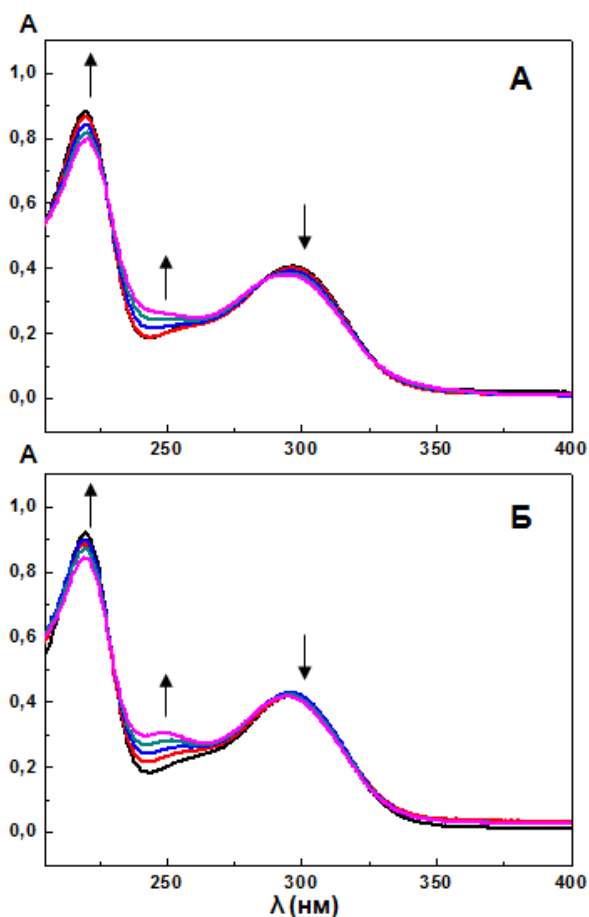


Рис. 26. Изменение спектра поглощения растворов H_4Bip со временем. Спектры записаны через 2,5, 5, 7,5 и 10 минут после начала облучения. Длина оптического пути 1 см. $[H_4Bip]_0 = 43$ мкМ, $pH = 7.2$. А. Облучение монохроматическим УФ 300 нм ($6,9$ мВт см $^{-2}$). Б. Облучение монохроматическим УФ 350 нм ($26,6$ мВт см $^{-2}$).

Таблица 2. Количественные показатели окисления H_4Bip при различных условиях освещения.

Условия	Скорость реакции ($d[H_4Bip]/dt$), 10^{-9} М с $^{-1}$	Кажущийся квантовый выход (Φ_R)	% H_4Bip от исходного в растворе через 10 минут облучения
Без облучения	$6,8 \pm 0,7$	-	$88,7 \pm 1,1$
λ 300 нм, $6,9$ мВт см $^{-2}$	$18,1 \pm 1,0$	$(2,7 \pm 0,4) \times 10^{-3}$	$78,2 \pm 0,7$
λ 350 нм, $26,6$ мВт см $^{-2}$	$16,3 \pm 1,6$	$(7,7 \pm 1,2) \times 10^{-3}$	$81,4 \pm 1,0$

По-видимому, для Н₄Бип, как и для других тетрагидровосстановленных форм птеринов, несвойственно образование триплетных состояний [Neverov et al., 1996]. Вероятно, это обусловлено, в том числе, большим количеством С-Н и N-Н связей в составе Н₄Бип, что дает дополнительное количество колебательных мод (на 6 больше, чем у Н₂Бип, и на 12 больше, чем у Бип), и отчасти обуславливает высокую скорость колебательной релаксации и внутренней конверсии из возбужденных синглетных состояний в S₀ [Henry, Kasha, 1968], вследствие чего Н₄Бип имеет крайне низкую интенсивность флюоресценции. Возможно, наблюдаемое увеличение скорости окисления Н₄Бип под действием монохроматического УФ с длиной волны λ 300 нм происходит в результате активности окисленных форм птеринов, фотовозбуждение которых светом 300 нм отчасти экранируется молекулами тетрагидробиоптерина.

3.1.3. Окисление Н₄Бип в растворе под действием монохроматического ультрафиолета с длиной волны $\lambda = 350$ нм

Мы предположили, что ускорение окисления Н₄Бип под действием широкополосного УФ может быть результатом сенсibiliзирующей активности продуктов окисления Н₄Бип, то есть окисленных птеринов, представленных в растворе. В связи с этим мы подвергали Н₄Бип действию монохроматического УФ λ 350 нм. Данная длина волны близка к длинноволновому максимуму окисленных птеринов, в частности биоптерина (λ_{\max} 346 нм). Молекулы Н₄Бип не поглощают фотоны в данной области спектра, вследствие чего не проявляют фотохимической активности под действием такого излучения.

В результате облучения Н₄Бип ультрафиолетом λ 350 нм в течение 15 минут продуктами были Бип, Н₂Ксп, Н₂Бип, Н₂Птр и (Н₂Бип)₂ димеры. Концентрационные кривые Н₄Бип и основных продуктов, определенные путем решения системы уравнений, были схожи с аналогичными для света λ 300 нм, но с рядом отличий: в случае УФ λ 350 нм скорость накопления Н₂Бип была ниже, а скорость формирования димеров была выше (Рис. 25, В).

Облучение ультрафиолетом λ 350 нм ускоряет окисление Н₄Бип. По-видимому, это происходит из-за фотохимической активности, которую проявляют окисленные птерины, несмотря на то, что их присутствие минимально в первые 10 минут фотоокисления. Скорость окисления Н₄Бип под действием УФ-излучения λ 350 нм (26,6 мВ см⁻²) была равна $(16,3 \pm 1,6) \times 10^{-9}$ М с⁻¹. Исходная оптическая плотность раствора – $A_{350}(0) = 0,017$, конечная оптическая плотность через 10 минут облучения – $A_{350}(10) = 0,026$ (Рис. 26, Б). Кажущийся квантовый выход фотоокисления Н₄Бип составил $(7,7 \pm 1,2) \times 10^{-3}$. Скорость

убыли $\text{H}_4\text{Бип}$ в растворе под действием излучения λ 350 нм была схожа со скоростью, рассчитанной для λ 300 нм (Таблица 2). В то же время квантовый выход был в 2,9 раз выше под действием УФ λ 350 нм. Данное противоречие возникает из-за низкой концентрации птеринов, которые поглощают в области УФ-А, и, соответственно, низкого значения оптической плотности A_{350} . Тем не менее эффект УФ λ 350 нм был интенсивным.

Облучение λ 350 нм имело более ярко выраженный эффект, чем облучение λ 300 нм, хотя $\text{H}_4\text{Бип}$ не поглощает свет в области 350 нм. Мы предположили, что биооптерин мог сенсibilизировать окисление $\text{H}_4\text{Бип}$, поскольку биооптерин образуется во время окисления $\text{H}_4\text{Бип}$ (Рис. 3), обладает сенсibilизирующей активностью и поглощает свет в области λ 350 нм.

3.1.4. Фотосенсibilизированное биооптеринном окисление $\text{H}_4\text{Бип}$

Чтобы подтвердить гипотезу о том, что биооптерин сенсibilизирует окисление $\text{H}_4\text{Бип}$, мы измерили скорость окисления в присутствии разных концентраций Бип. Скорость убыли $\text{H}_4\text{Бип}$ рассчитывали в течение первых 5 минут. Количество $\text{H}_4\text{Бип}$ в растворе измеряли с помощью ВЭЖХ. Бип добавляли к раствору перед началом облучения. Рисунок 27 демонстрирует линейную зависимость скорости убыли $\text{H}_4\text{Бип}$ от концентрации Бип.

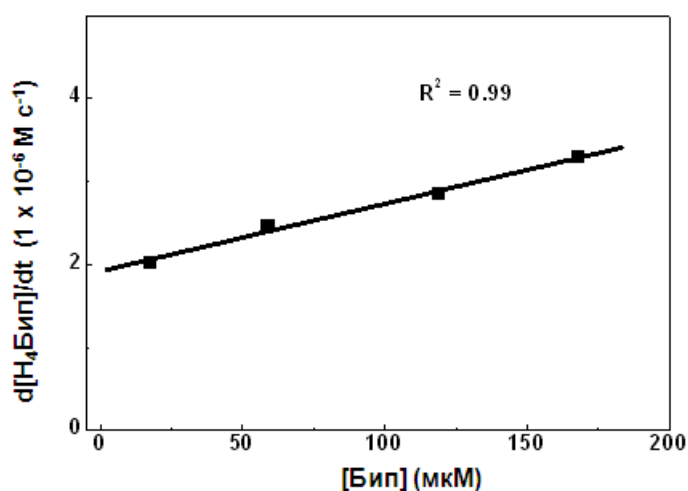


Рис. 27. Зависимость скорости убыли $\text{H}_4\text{Бип}$ от концентрации биооптерина в водном растворе в присутствии кислорода воздуха. УФ-излучение 300-380 нм, 63 мВ см^{-2} . $[\text{H}_4\text{Бип}]_0 = 600\text{-}700 \text{ мкМ}$, $\text{pH} = 7,2$.

Корреляция между концентрацией Бип и скоростью фотоокисления $\text{H}_4\text{Бип}$ приводит к вопросу о механизме сенсibilизации: требуется установить, сколько молекул Бип участвует в одном акте сенсibilизации. Например, сенсibilизация может

запускаться взаимодействием двух возбужденных молекул Бип (реакция автоионизации). Мы использовали вышеуказанную систему уравнений для установления концентраций реагентов и продуктов реакций по спектрам поглощения при фотоокислении Н₄Бип в присутствии Бип под действием УФ-излучения λ 350 нм с разной интенсивностью (Рис. 28).

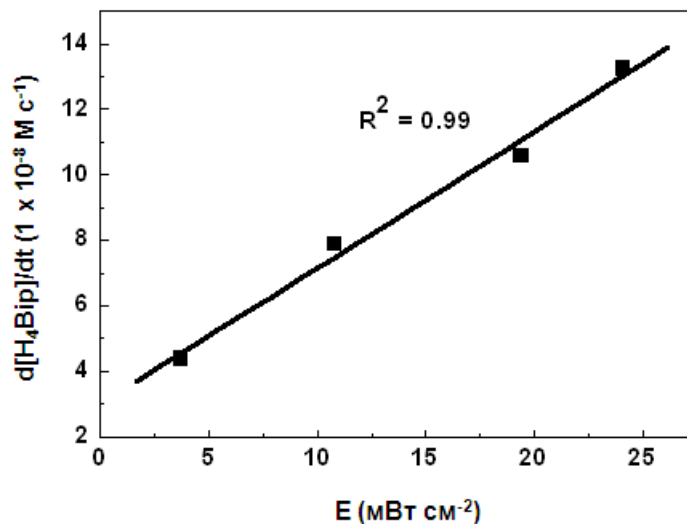


Рис. 28. Зависимость скорости убыли Н₄Бип от облученности в присутствии кислорода воздуха. УФ, $\lambda = 350$ нм. $[H_4Bip]_0 = 43$ мкМ, $[Bip]_0 = 39$ мкМ, pH = 7,2.

Рисунок 28 демонстрирует, что скорость убыли Н₄Бип линейно зависит от интенсивности облучения. Это означает, что в одном акте сенсibilизации участвует одна молекула Бип. Далее мы определяли, в триплетном или синглетном возбужденном состоянии находятся молекулы биоптерина в ходе акта сенсibilизации.

Иодид ионы (I⁻) в микромолярных концентрациях эффективно и селективно тушат триплетные состояния птеринов [Kritsky et al., 1997; Denofrio et al., 2014]. Мы провели ряд экспериментов для того, чтобы исследовать влияние иодида на сенсibilизирующую активность Бип во время окисления Н₄Бип. Для того чтобы доказать, что KI в микромолярных концентрациях действительно тушит триплетный биоптерин и при этом не влияет на его флуоресценцию, то есть не тушит синглетные состояния Бип, мы измеряли скорость фотоокисления Н₄Бип и интенсивность его флуоресценции в присутствии различных количеств KI. Концентрацию KI изменяли в диапазоне $10^{-5} - 10^{-1}$ М. Условия эксперимента были следующие: водный раствор в присутствии кислорода воздуха (pH 7,2), УФ-облучение λ 350 нм ($26,6$ мВ см⁻²). Концентрацию Н₄Бип определяли по спектрам поглощения с помощью системы уравнений. Рисунок 29 демонстрирует, что скорость фотоокисления логарифмически зависит от концентрации тушителя, причем при концентрации $3,0 \times 10^{-5}$ М скорость фотоокисления снижается вдвое относительно

максимальной скорости убыви Н₄Бип в отсутствие КІ. Интенсивность флюоресценции снижается вдвое при концентрации КІ $7,1 \times 10^{-2}$ М, то есть как тушитель триплетных состояний биоптерина КІ эффективней более чем на три порядка.

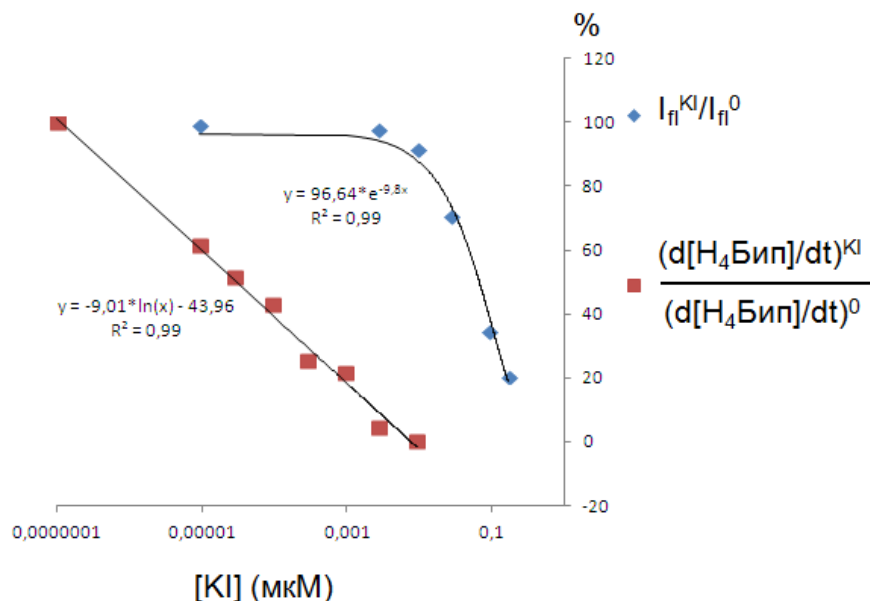


Рис. 29. Эффект КІ на интенсивность флюоресценции биоптерина и на скорость фотоокисления Н₄Бип в присутствии биоптерина (УФ λ 350 нм, 26,6 мВ см⁻²).

В частности, в присутствии 250 мкМ КІ скорость окисления Н₄Бип была в 2,3 раза ниже чем, в отсутствие йодид ионов (Рис. 30): скорость фотоокисления Н₄Бип составила $(5,8 \pm 0,3) \times 10^{-8}$ М с⁻¹ и $(13,6 \pm 0,2) \times 10^{-8}$ М с⁻¹, соответственно. Ингибирование фотосенсибилизированного окисления йодидом предполагает, что молекулы биоптерина вступают в реакции сенсбилизации, находясь в триплетном состоянии.

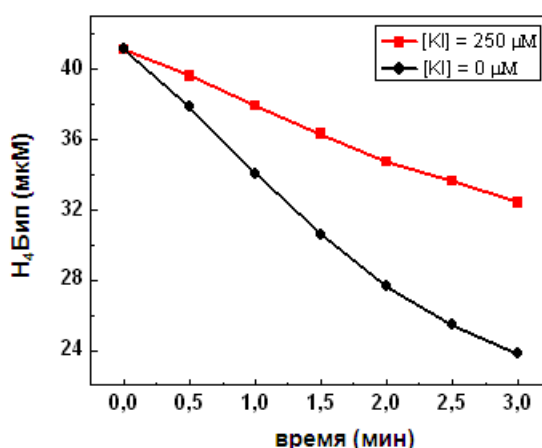
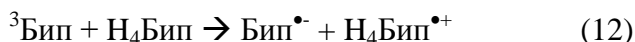
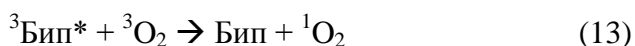


Рис. 30. Влияние КІ на изменение концентрации Н₄Бип в водном растворе под действием УФ ($\lambda = 350$ нм, 26,6 мВ см⁻²). [Н₄Бип]₀ = 41 мкМ, [КІ]₀ = 250 мкМ, рН 7.2.

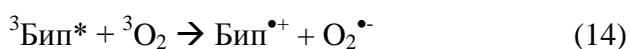
Участие $^3\text{Бип}^*$ в окислении предполагает 2 основных механизма реакций сенсibilизации, которые подразумевают разные механизмы окисления $\text{H}_4\text{Бип}$. Механизм типа I инициируется реакцией между $^3\text{Бип}^*$ и $\text{H}_4\text{Бип}$:



Механизм типа II начинается с прямого переноса энергии на молекулярный кислород и образования синглетного кислорода $^1\text{O}_2$:



Прямой перенос электрона и образование супероксид-анион радикала $\text{O}_2^{\bullet-}$ теоретически также возможно:



Далее АФК могут окислять $\text{H}_4\text{Бип}$, поскольку это наиболее восстановленное соединение в реакционной смеси.

3.1.5. Влияние D_2O и супероксиддисмутазы на фотоокисление $\text{H}_4\text{Бип}$

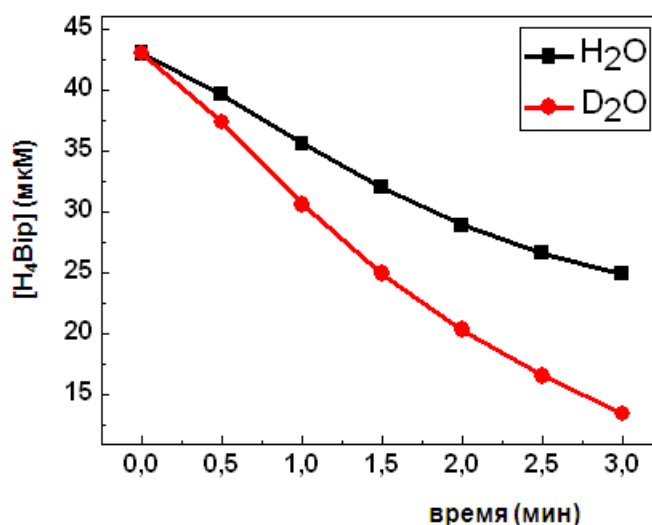


Рис. 31. Изменение концентрации $\text{H}_4\text{Бип}$ со временем в растворах, содержащих Бип и $\text{H}_4\text{Бип}$. УФ излучение λ 350 нм, $26,6 \text{ мВ см}^{-2}$. Эксперименты выполнены в D_2O и H_2O ; $[\text{Бип}]_0 = 40 \text{ мкМ}$, $[\text{H}_4\text{Бип}]_0 = 43 \text{ мкМ}$, $\text{pH} = 7,2$.

Возбужденные триплетные состояния птеринов участвуют в реакциях переноса электрона, что приводит к образованию свободных радикалов. Также триплеты птеринов способны сенсibilизировать образование синглетного кислорода [Kritsky et al., 1997; Егоров и др., 1999; Lorente, Thomas, 2006]. Квантовый выход генерации $^1\text{O}_2$ биоптеринном составляет 34% [Thomas et al., 2003]. Время жизни $^1\text{O}_2$ в D_2O в отсутствие молекул-

тушителей превосходит время жизни в воде более чем в 20 раз [Krasnovsky et al., 1987]. Вследствие этого скорости фотохимических реакций с участием $^1\text{O}_2$ значительно выше в D_2O , чем в воде. Чтобы проверить предположение о том, что $^1\text{O}_2$ участвует в окислении $\text{H}_4\text{Бип}$, мы сравнивали скорости фотоокисления в этих двух растворителях. Растворы, содержащие Бип (40 мкМ) и $\text{H}_4\text{Бип}$ (43 мкМ) в H_2O и D_2O подвергали УФ-облучению. Изменение концентрации $\text{H}_4\text{Бип}$ со временем (Рис. 31) показывает, что скорость окисления выше в D_2O на 92% (Таблица 3).

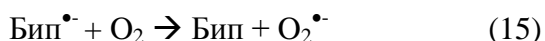
Таблица 3. Скорости (в 10^{-9} М с^{-1}) окисления $\text{H}_4\text{Бип}$ (43 мкМ) в H_2O и D_2O (99%) в присутствии Бип (40 мкМ), а также стимулирующий эффект D_2O на скорость фотоокисления. Интенсивность излучения λ 350 нм, 26,6 мВ см^{-2} .

Растворитель	[Бип] ₀ = 0 мкМ		[Бип] ₀ = 40 мкМ		Стимулирующий эффект D_2O при облучении УФ (соотношение скоростей в D_2O и H_2O)	
	Без УФ	УФ	Без УФ	УФ	[Бип] ₀ = 0 мкМ	[Бип] ₀ = 40 мкМ
	H_2O	6,8 ± 0,7	16,3 ± 1,6	7,7 ± 0,6	135,6 ± 2,2	1,8
D_2O	6,7 ± 0,7	29,5 ± 1,1	7,0 ± 0,6	260,9 ± 2,2		

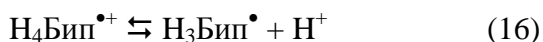
УФ-излучение увеличивало скорость убыли $\text{H}_4\text{Бип}$ в 2,4 раза по сравнению с необлученным контролем ($(16,3 \pm 1,6) \times 10^{-9} \text{ М с}^{-1}$ и $(6,8 \pm 0,7) \times 10^{-9} \text{ М с}^{-1}$, соответственно). Когда в H_2O добавляли Бип (40 мкМ), скорость убыли $\text{H}_4\text{Бип}$ 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 (Таблица 3). Исходная оптическая плотность раствора при λ 350 нм была $A_{350}^{\text{Бип}}(0) = 0,257$, через 3 минуты оптическая плотность была $A_{350}^{\text{Бип}}(3) = 0,378$. Квантовый выход фотоокисления, индуцированного биоптеринном, составил $(9,7 \pm 1,5) \times 10^{-3}$.

Замена H_2O на D_2O не влияла на скорость окисления в необлучаемых растворах. Напротив, под действием УФ в D_2O скорость фотоокисления возрастала на 81%, когда не добавляли Бип, и на 92%, когда добавляли Бип (Таблица 3). Данное наблюдение доказывает, что механизм типа II активен и $^1\text{O}_2$ действительно образуется. В то же время мы можем утверждать, что реакция образования $^1\text{O}_2$ (Реакция 4) не является доминирующей, поскольку стимулирующий эффект D_2O низок (скорость фотоокисления в H_2O менее чем в два раза ниже, чем скорость фотоокисления в D_2O), несмотря на то что время жизни $^1\text{O}_2$ в D_2O , как известно, увеличивается в 21-22 раза.

Механизм сенсibilизации типа I начинается с Реакции 12: образования анион-радикала биоптерина Бип^{•-} и тетрагидробиоптерин катион-радикала Н₄Бип^{•+}. За Реакцией 12 может следовать Реакция 15:



В условиях нашего эксперимента (рН 7.2) Н₄Бип^{•+} депротонируется, рК = 5,2 [Patel et al., 2002]:



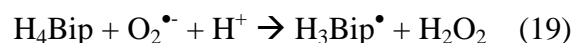
Вероятно, реакция тригидробиоптерин-радикала Н₃Вip[•] с молекулярным кислородом ведет к образованию q-Н₂Бип и гидроперекисного радикала НОО[•] [Kirsch et al., 2003]:



Затем следует депротонирование НОО[•] и образование супероксид-анион радикала О₂^{•-}, рК = 4,88 [Bielski et al., 1985]:



Прямой перенос электрона с триплетного биоптерина ³Бип* на О₂, который приводит к образованию супероксид-анион радикала О₂^{•-} (Реакция 14), - еще одна из возможных реакций сенсibilизации. Окисление тетрагидробиоптерина супероксид-анион радикалом протекает в ходе Реакции 19 [Kirsch et al., 2003]:



В этой связи мы исследовали процесс фотоокисления Н₄Бип на предмет участия в нем супероксид-анион радикала. Для этого были проведены эксперименты в присутствии супероксиддисмутазы (СОД) (Таблица 4). Супероксид-анион радикал участвует в аутоокислении Н₄Бип, поэтому скорость аутоокисления в необлученных растворах с добавлением СОД падает в 3,2 раза. Наблюдаемое различие в скорости окисления Н₄Бип между УФ-облученным раствором, содержащим СОД и контролем, не содержащим СОД, составило $(14,4 \pm 5,2) \times 10^{-9} \text{ М с}^{-1}$. Если мы возьмем данную величину и вычтем изменение скорости аутоокисления вследствие добавления СОД $((4,9 \pm 0,7) \times 10^{-9} \text{ М с}^{-1})$, то получим действительное изменение скорости фотоокисления из-за работы СОД: $(9,4 \pm 5,2) \times 10^{-9} \text{ М с}^{-1}$, или $7,0 \pm 3,9\%$. Эти результаты показывают, что О₂^{•-}, вероятно, участвует в сенсibilизированном окислении, но его вклад минимален. Это согласуется с данными А. Thomas и соавторов, которые показали, что прямой перенос

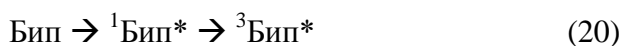
электрона с триплетного состояния птерина на молекулярный кислород не происходит [Dantola et al., 2010c].

Таблица 4. Эффект СОД на сенсibilизированное окисление тетрагидробиоптерина. Эксперименты проводились с участием или в отсутствие СОД; [Бип] = 40 мкМ, [Н₄Бип]₀ = 43 мкМ, [СОД] = 100 единиц мл⁻¹, рН = 7.2.

Условия эксперимента	Скорость убыли Н ₄ Бип, 10 ⁻⁹ М с ⁻¹	
	Без УФ	УФ
без СОД	7,2 ± 0,7	133,8 ± 2,2
с СОД	2,3 ± 0,3	119,4 ± 4,7

3.1.6. Возможные механизмы сенсibilизированного биоптерином окисления Н₄Бип, по данным квантово-химических расчетов

При возбуждении ультрафиолетом биоптерин переходит из основного состояния S₀ в синглетное возбужденное состояние (¹Бип*), и далее в результате интеркомбинационной конверсии возможен переход в триплетное состояние T₁:

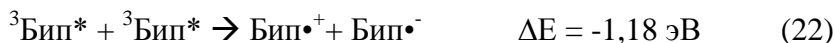


Из состояния T₁ возможна реализация сразу нескольких реакций сенсibilизации. Первый тип – это перенос энергии с T₁ на O₂ с образованием синглетного кислорода (Реакция 13).

По результатам расчетов, минимальная теоретическая энергия триплетта, то есть разница энергий S₀ и T₁ (E_{T1}) биоптерина составила 2,48 эВ (Таблица 16, раздел 3.3). Поскольку величина E_{T1} выше разности энергий ¹O₂ и ³O₂ (расчетная энергия состояния ¹Δ_g составила 0,89 эВ, а для состояния ¹Σ_{g+} - 1,65 эВ, что хорошо согласуется с экспериментально установленными величинами для этих состояний – 0,98 эВ и 1,63 эВ, соответственно), возможна генерация синглетного кислорода путем прямого переноса энергии с триплетного биоптерина ³Бип.

Теоретически также возможна сенсibilизация образованием супероксид-анион радикала за счет прямого переноса электрона на O₂ (Реакция 14). Возможность протекания реакции определяется величиной потенциала ионизации триплетного биоптерина (IP_{T1}) и сродством к электрону O₂. Прямой перенос электрона возможен в том случае, если сумма IP_{T1} и энергии сродства к электрону O₂ имеет отрицательное значение. В нашем случае величина IP_{T1} равна 3,89 эВ. Рассчитанная разница энергий продуктов реакции и

реагентов составила 0,31 эВ, то есть данная реакция, с точки зрения теоретических расчетов, невозможна. Рассчитанная разница энергий продуктов реакции и реагентов для возможных реакций автоионизации Бип следующая:

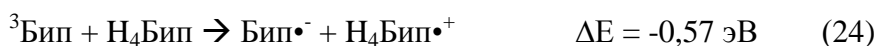


Реакция 21, согласно нашим расчетам, не реализуется, в то время как Реакция 22 возможна. В ходе реакции 22 образуется анион-радикал $\text{Бип}\cdot^-$, который способен активировать молекулярный кислород с образованием супероксид-анион радикала:



Таким образом, согласно нашим теоретическим расчетам, генерация супероксид-анион радикала напрямую путем переноса электрона с T_1 невозможна. Однако сенсбилизированная генерация $\text{O}_2\cdot^-$ возможна опосредованно через взаимодействие триплетного состояния биоптерина и $\text{H}_4\text{Бип}$, а также через триплет-триплетное взаимодействие молекул биоптерина.

Оценим возможность механизма I сенсбилизированного окисления: прямого переноса электрона с $\text{H}_4\text{Бп}$ на триплетное состояние Бип. Для этого надо знать энергию сродства к электрону $E_{A_{T_1}}$ биоптерина (-5,20 эВ; см. Таблица 16, раздел 3.3) и потенциал ионизации $\text{H}_4\text{Бип}$ (4,63 эВ).



Можно сделать вывод, что данный механизм сенсбилизации возможен. Образующийся анион-радикал $\text{Бип}\cdot^-$ в присутствии кислорода может далее вступать в реакцию (23).

Следующей задачей было установить реакции окисления $\text{H}_4\text{Бип}$ свободными радикалами и АФК, образующимися в ходе реакций сенсбилизации с участием Бип. Для этого рассчитывали свободную энергию Гиббса возможных реакций (Таблица 5). Всего было проанализировано более 30 реакций.

Механизм I, возможно, носит цепной радикальный характер, поскольку образующиеся в ходе Реакций 23 и 24 $\text{H}_4\text{Бип}\cdot^+$ и $\text{O}_2\cdot^-$, по-видимому, могут инициировать цепной радикальный процесс окисления $\text{H}_4\text{Бип}$. Образующийся в ходе Реакции 23 супероксид-анион радикал протонируется (рК 4,88) [Bielski et al., 1985], и далее уже в форме гидропероксил-радикала $\text{НОО}\cdot$ может вступать в Реакцию 25. Катион-радикал $\text{H}_4\text{Бп}\cdot^+$ (Реакция 24) депротонируется с образованием $\text{H}_3\text{Бп}\cdot$ (рК 5,2) [Patel et al., 2002]. За счет Реакций 25 и 26 возможна пролонгация цепи. Реакции 27 и 28 ведут к обрыву цепного радикального процесса. Другие известные из литературы реакции окисления

Н₄Бп активными формами кислорода (Реакции 30 и 31), согласно нашим расчетным данным, термодинамически запрещены. По механизму II синглетный кислород (продукт Реакции 13) реагирует с Н₄Бип, предположительно с образованием перекиси и q-Н₂Бип (Реакция 29), либо Н₂Бип.

Таблица 5. Реакции окисления Н₄Бип. Свободная энергия Гиббса посчитана методом V3LYP/6-31G(d,p), растворитель – Н₂О.

Реакция		$\Delta_f G^\circ$, ккал моль ⁻¹
Механизм I:		
$^3\text{Бип}^* + \text{Н}_4\text{Бип} \rightarrow \text{Бип}\cdot^- + \text{Н}_4\text{Бип}\cdot^+$	(24) инициация цепи	-15,1
$\text{Бип}\cdot^- + \text{O}_2 \rightarrow \text{Бип} + \text{O}_2\cdot^-$	(23) инициация цепи	-19,1
$\text{Н}_4\text{Бип} + \text{НОО}\cdot \rightarrow \text{Н}_3\text{Бип}\cdot + \text{Н}_2\text{O}_2$	(25) пролонгация цепи	-10,2
$\text{Н}_3\text{Бип}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{Н}_2\text{Бип} + \text{НОО}\cdot$	(26) пролонгация цепи	-1,8
$2\text{Н}_3\text{Бип}\cdot \rightarrow \text{q-Н}_2\text{Бип} + \text{Н}_4\text{Бип}$	(27) терминация цепи	-6,3
$2\text{OON}\cdot \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	(28) терминация цепи	-29,0
Механизм II:		
$\text{Н}_4\text{Бип} + ^1\text{O}_2 \rightarrow \text{q-Н}_2\text{Бип} + \text{H}_2\text{O}_2$	(29)	-44,6
Другие реакции, известные из литературы:		
$\text{Н}_4\text{Бип} + \text{O}_2\cdot^- \rightarrow \text{Н}_3\text{Бип}\cdot + \text{НОО}^-$	(30) [Vasquez-Vivar et al., 2001]	13,2
$\text{Н}_4\text{Бип} + \text{НО}\cdot \rightarrow \text{Н}_4\text{Бип}\cdot^+ + \text{НО}^-$	(31) [Patel et al., 2002]	99,9

Таким образом, нами было показано, что:

1. Согласно квантово-химическим расчетам, сенсibilизированная биоптерином генерация АФК возможна за счет прямого переноса энергии, но не за счет прямого переноса электрона. Кроме того, теоретически возможна реакция между двумя возбужденными молекулами ³Бип* (Реакция 22). Однако линейная зависимость скорости фотоокисления Н₄Бип от интенсивности облучения (Рис. 28) говорит об обратном, и, значит, в условиях нашего эксперимента протекание данной реакции крайне маловероятно.

2. Возможна прямая реакция переноса электрона с Н₄Бип на триплетное состояние биоптерина ³Бип*.

3. Показаны возможные дальнейшие реакции окисления Н₄Бип (Таблица 5). Очевидно, что в результате процессов фотосенсibilизации возможно образование свободно-радикальных форм, что, в свою очередь, говорит о возможности цепного

радикального процесса окисления Н₄Бип. Проведенные нами расчет энергии Гиббса соответствующих реакций не противоречит данной точке зрения.

3.1.7. Расчет кинетических характеристик фотосенсибилизированного окисления Н₄Бип

Для того чтобы количественно оценить вклад механизмов I и II в процесс окисления составим систему уравнений. Кинетическое уравнение для Реакции 13 выглядит следующим образом:

$$r_1 = \Phi_{\Delta} P_a$$

где Φ_{Δ} – 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).

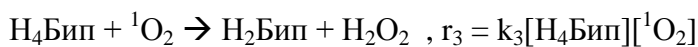
Образовавшийся 1O_2 будет дезактивироваться за счет люминесценции:



$$k_2 = 1 / \tau_0$$

где τ_0 – время жизни синглетного кислорода.

Кроме того 1O_2 будет вступать в химические реакции с птеринами в растворе, и прежде всего с Н₄Бип, который является наиболее восстановленным соединением в реакционной смеси. Совокупная константа физического и химического тушения 1O_2 (k_q^{Δ}) для биоптерина равна $2,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, для Н₂Бип – $3,7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [Oliveros et al., 2011]. Таким образом, k_q^{Δ} Н₂Бип более чем на два порядка выше, чем k_q^{Δ} биоптерина. Очевидно, что у Н₄Бип k_q^{Δ} будет такого же порядка, как у Н₂Бип, либо выше. Поэтому в расчетах реакцией тушения синглетного кислорода биоптеринном мы пренебрежем, а для реакции окисления Н₄Бип синглетным кислородом (механизм сенсibilизации типа II) уравнение будет следующим:



Синглетный кислород и триплетное состояние биоптерина $^3\text{Бип}$ будут конкурировать между собой за Н₄Бип, и параллельно с окислением Н₄Бип синглетным кислородом будет идти следующая реакция (механизм сенсibilизации типа I):



Квантовый выход образования синглетного кислорода биоптеринном Φ_{Δ} равен 0,34 [Thomas et al., 2003]. Можно с высокой степенью вероятности утверждать, что квантовый выход интеркомбинационной конверсии $S_1 \rightarrow T_1$ (Φ_{ST}) биоптерина приближенно равен квантовому выходу образования синглетного кислорода Φ_{Δ} [Schweitzer, Schmidt, 2003]. Так, например, для птерина $\Phi_{\Delta} = 0,18$ [Thomas et al., 2003], а $\Phi_{ST} = 0,20$ [Chahdi et al.,

1981], то есть $\Phi_{\Delta} \cong \Phi_{\text{СТ}}$. В то же время, очевидно, что в присутствии тушителя Н₄Бип величина Φ_{Δ} будет меньше. Вследствие этого квантовый выход образования синглетного кислорода в присутствии тушителя должен удовлетворять следующему требованию:

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

где v_2 – вклад $^1\text{O}_2$ и механизма II в процесс сенсibilизированного окисления Н₄Бип.

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

r_3 и r_4 – скорость Реакций 13 и 12, соответственно. Вклад механизма сенсibilизации типа I в окисление Н₄Бип тогда можно выразить как:

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

Теперь распишем, как меняется концентрация $^1\text{O}_2$ со временем:

$$\frac{d[{}^1\text{O}_2]}{dt} = r_1 - r_2 - r_3 = \Phi_{\Delta}' P_a - k_2[{}^1\text{O}_2] - k_3[{}^1\text{O}_2][\text{Н}_4\text{Бип}]$$

Концентрация $^1\text{O}_2$ не претерпевает серьезного изменения в течение короткого начального промежутка времени Δt ($\Delta t \rightarrow 0$), то есть $\frac{d[{}^1\text{O}_2]}{dt} = 0$. Отсюда выразим, чему будет равняться концентрация $^1\text{O}_2$ в воде:

$$[{}^1\text{O}_2]_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{\Phi_{\Delta}' P_a}{k_2^{\text{H}_2\text{O}} + k_3[\text{Н}_4\text{Бип}]} \quad (\text{I})$$

То же самое выражение для концентрации $^1\text{O}_2$ в дейтерированной воде:

$$[{}^1\text{O}_2]_{\text{D}_2\text{O}} = \frac{\Phi_{\Delta}' P_a}{k_2^{\text{D}_2\text{O}} + k_3[\text{Н}_4\text{Бип}]} \quad (\text{II})$$

По результатам наших экспериментов, мы знаем скорость фотоокисления Н₄Бип в Н₂О и в D₂О (Таблица 3). Распишем выражение для скорости фотоокисления Н₄Бип в Н₂О:

$$\frac{d[\text{Н}_4\text{Бип}]_{\text{H}_2\text{O}}}{dt} = -r_3 - r_4 = -k_3[{}^1\text{O}_2]_{\text{H}_2\text{O}}[\text{Н}_4\text{Бип}] - k_4[\text{Н}_4\text{Бип}][{}^3\text{Бип}] \quad (\text{III})$$

То же самое для фотоокисления в D₂О:

$$\frac{d[\text{Н}_4\text{Бип}]_{\text{D}_2\text{O}}}{dt} = -r_3 - r_4 = -k_3[{}^1\text{O}_2]_{\text{D}_2\text{O}}[\text{Н}_4\text{Бип}] - k_4[\text{Н}_4\text{Бип}][{}^3\text{Бип}] \quad (\text{IV})$$

Теперь вычтем из уравнения III уравнение IV. Выражение $k_4[\text{Н}_4\text{Бип}][{}^3\text{Бип}]$, относящееся к r_4 , при этом сократится. В получившееся уравнение подставим вместо $[{}^1\text{O}_2]$ правые части уравнений I и II. Получившееся равенство будет содержать единственную неизвестную k_3 . Значения остальных переменных известны либо из литературы ($k_2^{\text{H}_2\text{O}} = 3,2 \times 10^5 \text{ c}^{-1}$, $k_2^{\text{D}_2\text{O}} = 1,5 \times 10^4 \text{ c}^{-1}$ [Егоров, Красновский, 1983], либо установлены нами ($[\text{Н}_4\text{Бип}] = 43 \text{ мкМ}$, $P = 26.6 \text{ мВт см}^{-2}$, поглощение при $\lambda 350$ и соответствующей концентрации Бип (40 мкМ) было равно $(1-T) = 0,52$).

Таким образом, сопоставив скорости окисления Н₄Бип в D₂О и Н₂О и решив систему уравнений с четырьмя неизвестными, мы получили следующие результаты:

1. Константа скорости реакции между $^1\text{O}_2$ и $\text{H}_4\text{Бип}$, по нашей оценке, составила $5,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Эта величина сопоставима с константами для других соединений-антиоксидантов: $\text{H}_2\text{Бип}$ ($3,7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) [Oliveros et al., 2011], аскорбат ($3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) [Kramarenko et al., 2006], глутатион ($9,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [Sueishi et al., 2014], NADH ($4,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) [Peters, Rogers, 1981].
2. Скорость фотоокисления по механизму типа I в заданных условиях составила $1,1 \times 10^{-7} \text{ M c}^{-1}$, константа скорости Реакции 12, по расчетным данным, равна $4,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$.
3. Мы установили время жизни $^1\text{O}_2$ в присутствии тушителя $\text{H}_4\text{Бип}$ (43 мкМ) в H_2O и в D_2O . Соотношение этих величин позволяет определить стимулирующее действие D_2O на активность $^1\text{O}_2$ ($\alpha_{\Delta} = 8,9$).
4. Оценили вклад механизмов сенсibilизации типа I и II в процесс фотоокисления (Таблица 6).

Таблица 6. Вклад механизмов сенсibilизации типа I и II в процесс фотосенсibilизированного окисления $\text{H}_4\text{Бип}$.

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.

3.1.8. Оценка реакционной способности молекулы $\text{H}_4\text{Бип}$ и отдельных атомов в ее составе на основе данных об индексах Фукуи

Итак, мы установили ключевые реакции, участвующие в фотоокислении $\text{H}_4\text{Бип}$: это реакция между $\text{H}_4\text{Бип}$ и триплетным биоптеринном $^3\text{Бип}^*$, а также реакция между $\text{H}_4\text{Бип}$ и синглетным кислородом $^1\text{O}_2$. Для того чтобы подойти к изучению механизма данных реакций, мы применили метод граничных орбиталей. Метод граничных орбиталей, предложенный К. Фукуи в 1952 году, определяет относительную реакционную способность соединений по энергии граничных молекулярных орбиталей: верхней занятой (HOMO) нуклеофила или нижней вакантной (LUMO) электрофила. Положительная энергия LUMO определяет нуклеофильные свойства молекулы, отрицательная – электрофильные. Реакционная способность молекулы определяется

глобальной жесткостью. Согласно принципу жестких и мягких кислот и оснований, молекулы предпочитают реагировать с такими молекулами, с которыми они имеют одинаковые или близкие значения жесткости (мягкости). Чем больше мягкость (меньше жесткость) реагента, тем выше его реакционная способность. Приближение Купманса является одним из методов оценки глобальной жесткости:

$$\eta = (e_{LUMO} - e_{HOMO})/2 = I/S \quad (\text{ур. 11})$$

где η – это глобальная жесткость, S – это глобальная мягкость, e_{LUMO} – энергия LUMO орбитали, e_{HOMO} – энергия HOMO орбитали.

Наряду с глобальными индексами, оценивающими реакционную способность молекулы в целом, используются локальные индексы реакционной способности. Предпочтительные места атаки определяются индексом Фукуи реакционной способности – граничной плотностью электрона f_k на атоме k :

$$f_k^-(N) = P_k(N) - P_k(N-1) \quad (\text{ур. 12})$$

$$f_k^+(N) = P_k(N+1) - P_k(N) \quad (\text{ур. 13})$$

$$f_k^0(N) = 1/2 (P_k(N+1) - P_k(N-1)) \quad (\text{ур. 14})$$

где f_k^- – индекс нуклеофильности атома k в молекуле, f_k^+ – индекс электрофильности, f_k^0 – индекс Фукуи для атаки радикалом, P_k – заселенность атома k , N – число электронов в молекуле.

Индекс Фукуи характеризует склонность данного атома в составе молекулы изменять свою электронную плотность: чем больше индекс Фукуи, тем выше реакционная способность атома. Расчет индексов Фукуи позволил нам установить конкретные атомы в составе молекулы Н₄Бип, которые подвергаются атаке бирадикала (³Бип*) и электрофила (¹O₂).

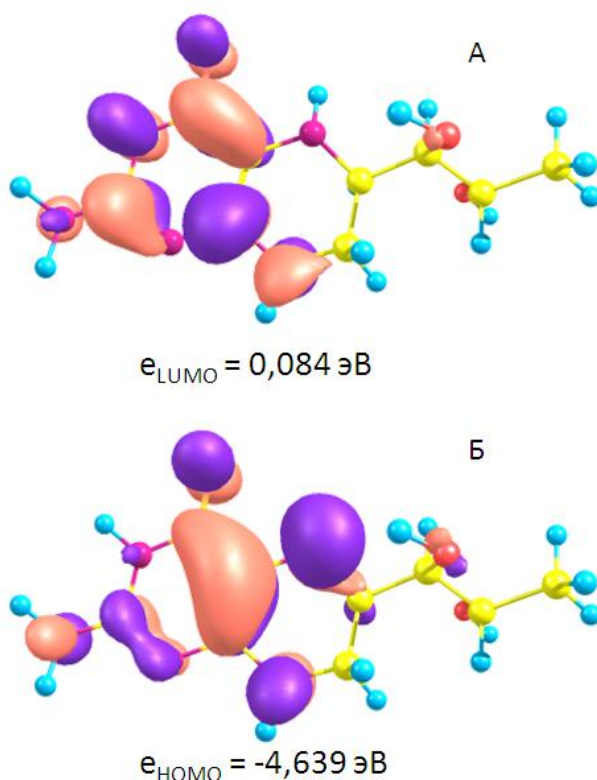


Рис. 32. Нижняя вакантная молекулярная орбиталь (LUMO) (А) и верхняя занятая молекулярная орбиталь (НОМО) (Б).

На рисунке 32 показаны LUMO и НОМО орбитали и приведены их энергии. Поскольку энергия LUMO орбитали в приближении B3LYP/6-31G(d,p) положительна (Рис. 32), молекулу Н₄Бип можно считать нуклеофилом. Реагент считается жестким, если энергетическая щель между LUMO и НОМО превышает 1 эВ; реагент считается мягким, если энергетическая щель между ВЗМО и НВМО менее 1 эВ. Для молекулы Н₄Бип величина жесткости оказалась равна 2,36 эВ, а глобальной мягкости – 0,42 эВ⁻¹, то есть разница НОМО и LUMO >1 эВ, и, следовательно, молекула Н₄Бип является жесткой, а именно является жестким нуклеофилом. В этой связи проводился расчет только f_k^- и f_k^0 индексов Фукуи (Таблица 7).

Локальная мягкость (s_k) связана с индексом Фукуи по формуле:

$$s_k = f_k S \quad (\text{ур. 15})$$

Локальная мягкость содержит больше информации, чем индексы Фукуи, и позволяет проводить сравнительный анализ реакционной способности различных молекул [Лебедев, 2001].

Из результатов, представленных в Таблице 6 можно заключить, что в наибольшей степени атаке электрофилом (в нашем случае ¹O₂) подвержены атомы С4а и N5, то есть те

атомы, в области которых наиболее высока электронная плотность (Рис. 32, Б). Атаке радикалом (в нашем случае ³Бип*) в наибольшей степени подвержен атом С8а.

Таблица 7. Индексы Фукуи (f_k), заселенность (P_k) и локальная мягкость (s_k) атомов в составе молекулы Н₄Бип.

атом	$P_k(N)$	$P_k(N-1)$	$P_k(N+1)$	f_k^-	s_k^-, eV^{-1}	f_k^0	s_k^0, eV^{-1}
N1	7,348	7,250	7,482	0,098	0,043	0,116	0,050
C2	5,684	5,689	6,995	-0,005	-0,002	0,653	0,277
N3	7,385	7,353	7,348	0,032	0,014	-0,003	-0,001
C4	5,760	5,743	3,688	0,016	0,007	-1,028	-0,435
C4a	5,860	5,666	3,088	0,194	0,084	-1,289	-0,545
N5	7,122	6,927	7,313	0,195	0,084	0,193	0,083
C6	6,082	6,206	6,319	-0,125	-0,054	0,056	0,023
C7	6,590	6,614	4,471	-0,025	-0,011	-1,072	-0,454
C8	7,261	7,133	6,120	0,128	0,056	-0,507	-0,214
C8a	6,201	6,281	11,444	-0,080	-0,035	2,582	1,093

* * *

На основании полученных в разделе 3.1. результатов сделаны следующие выводы относительно процесса фотоокисления 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина:

1. Установлены продукты фотоокисления 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина (Н₄Бип) в водном растворе в присутствии кислорода воздуха. Основными продуктами фотоокисления являются 7,8-дигидробиоптерин, 7,8-дигидроптерин, 7,8-дигидрооксантоптерин и биоптерин, а также димер дигидробиоптерина.
2. Показано, что Н₄Бип подвержен сенсibilизированному окислению продуктами собственной деградации.
3. По нашим оценкам, механизм сенсibilизации типа I (прямое окисление сенсibilизатором) доминирует при сенсibilизированном окислении Н₄Бип.

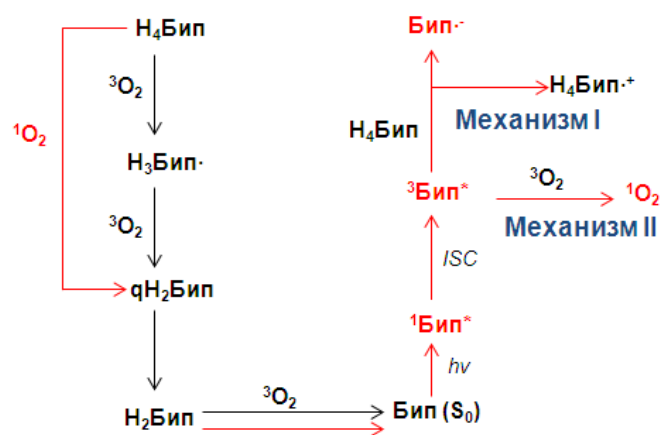


Схема 1. Предполагаемые пути окисления 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина при воздействии УФ (реакции, происходящие под действием УФ, показаны красными стрелками; реакции, происходящие в темноте, показаны черным).

На основании полученных результатов мы предлагаем следующую схему (Схема 1), которая показывает взаимодействие процессов аутоокисления и фотоокисления, механизмы сенсibilизации I и II типа. При витилиго в депигментированных клетках эпидермиса происходит пятикратное накопление H_4Bip вследствие его *de novo* синтеза, а также накопление Bip [Schallreuter et al., 1994a]. В этих условиях возможно фотосенсибилизированное окисление H_4Bip с участием продукта его деградации Bip (Схема 1), что может вести к дальнейшему развитию патологии при воздействии ультрафиолета.

3.2. Исследование фотохимических свойств тетрагидровосстановленных птеринов методами квантовой химии

Как следует из раздела 3.1, по-видимому, фотовозбуждение Н₄Бип не приводит к участию его возбужденных состояний в фотохимических реакциях с другими молекулами. Известно, что восстановленные формы птеринов не флюоресцируют и не фосфоресцируют [Neverov et al., 1996], то есть время жизни их возбужденных состояний крайне невелико. В этой связи наиболее вероятным механизмом дезактивации синглетных возбужденных состояний тетрагидровосстановленных птеринов представляется процесс внутренней конверсии. Однако в таком случае неясно, каким образом восстановленные формы птеринов могут участвовать в роли хромофоров в процессах фоторецепции [Moon et al., 2012; Takeda et al., 2014]. В связи с этим, в данном разделе перед нами стояли следующие задачи: 1) оценить возможность внутренней конверсии возбужденных синглетных состояний восстановленных птеринов; 2) оценить, какие свойства восстановленных птеринов могли бы быть востребованы с точки зрения их фоторецепторных функций. Поскольку в рамках данного подкласса соединений (тетрагидровосстановленные птерины) наиболее изученной на сегодняшний день является молекула Н₄Бип, рассмотрим некоторые свойства, известные для нее, и, очевидно, характерные и для других молекул данного подкласса.

При действии света на органические молекулы возможны такие процессы как фотодиссоциация (фотолиз), фотоизомеризация, фототаутомеризация, конформационные превращения. По данным ВЭЖХ, нами установлено, что в ходе облучения Н₄Бип фотоизомеризация не происходит: в противном случае появление новых изомеров отражалось бы на хроматограммах. В связи с этим, будем считать, что для Н₄Бип и других восстановленных птеринов фотоизомеризация не характерна.

Известно, что Н₄Бип способен образовывать свободно-радикальные формы [Vasquez-Vivar, 2009]. Также очевидно, что Н₄Бип обладает сильными электрондонорными свойствами, поэтому можно предположить возможность фотоиндуцированного переноса электрона с Н₄Бип под действием УФ. Кроме того следует оценить возможность переноса электрона в ответ на действие света. Известно, что у окисленных птеринов лактамная таутомерная форма преобладает над лактимной как в основном состоянии [Soniati, Martin, 2008], так и в триплетной форме [Serrano et al., 2013]. Следует выяснить, возможна ли фототаутомеризация Н₄птеринов в синглетном возбужденном состоянии S₁ и в триплетном возбужденном состоянии T₁.

Для тетрагидроптеринов, в частности для Н₄Бип и 5,6,7,8-тетрагидронеоптерина, характерна конформационная пластичность: возможно одновременное сосуществование нескольких конформаций. Разница в значении потенциальной энергии между двумя основными конформациями Н₄Бип (экваториальной и аксиальной) составляет 2,2 ккал моль⁻¹, согласно литературным данным [Estelberger, 1995]. По мнению W. Estelberger с соавторами, возможность вращения бокового заместителя и одновременное сосуществование сразу нескольких конформаций может отвечать за высокую биологическую активность кофактора. Мы, в свою очередь, можем предположить возможность конформационных изменений в молекулах 6-замещенных тетрагидроптеринов под действием света: теоретически поглощение фотона может существенно изменять количественное соотношение разных конформаций. Строение 6-замещенных тетрагидровосстановленных птеринов наводит на мысль о том, что в первую очередь, вероятны конформационные превращения путем вращения бокового заместителя вокруг связи С6-С1' (Рис. 33).

3.2.1. Оптимизация геометрии основного состояния

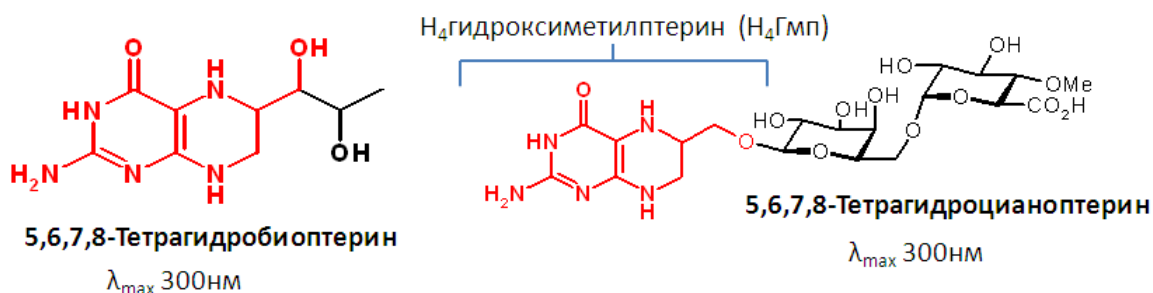


Рис. 33. Молекулярная структура 6-замещенных тетрагидроптеринов.

На Рисунке 33 показано, что в основе строения тетрагидробиоптерина и тетрагидроцианоптерина лежит одна и та же структура 6-гидрокси метил-5,6,7,8-тетрагидроптерина (Н₄Гмп). Для того чтобы снизить временные затраты, вместо Н₄цианоптерина или Н₄биоптерина расчеты проводились для модельной молекулы Н₄Гмп. С использованием функционала B3LYP и базиса 6-31G(d,p) была оптимизирована равновесная геометрия основного состояния S₀ Н₄Гмп (Рис. 34). Данная геометрия хорошо согласуется с геометрией Н₄Бип, рассчитанной V. Gogonea с соавторами [Gogonea et al., 2006], среднеквадратичное отклонение (RMSD) между нашими данными и данными V. Gogonea с соавторами составило: для длин связей - 0,002 Å, для валентных углов - 0,6°, для двугранных углов - 4,1° (Приложение №1). Крайне низкие значения RMSD свидетельствуют о том, что используемая нами геометрия Н₄Гмп является адекватной

заменой при рассмотрении геометрии Н₄Бип. Очевидно, что незначительные отклонения геометрических параметров связаны с использованием разных базисных наборов функций. Также геометрия Н₄Гмп хорошо согласуется с данными рентгеноструктурного анализа для Н₄Бип [Li et al., 1999]: среднеквадратичное отклонение для длин связей составило 0,028 Å, для валентных углов - 2,0°, для двугранных углов - 5,9° (Приложение №1). Среднеквадратичное отклонение аналогичных геометрических параметров в работе V. Gogonea с соавторами от данных Н. Li с соавторами составляет 0,026 Å, 2,4° и 3,9°, соответственно. Таким образом, мы можем заключить, что использованный нами для оптимизации геометрии функционал B3LYP обладает необходимой точностью для проведения расчетов с птериновыми молекулами, а замена Н₄Бип на Н₄Гмп является адекватной.

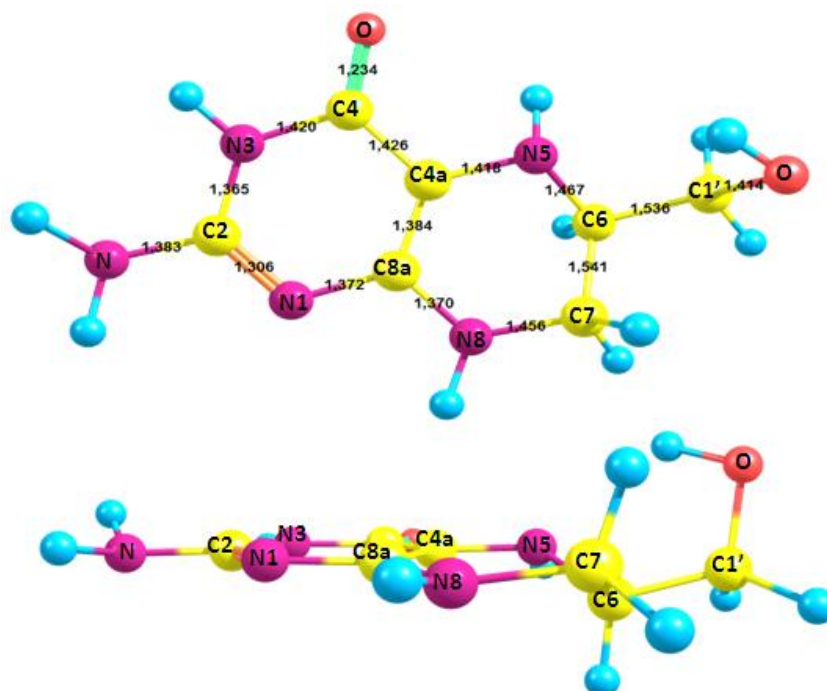


Рис. 34. Оптимизированная геометрия 6-Гидроксиметил-5,6,7,8-тетрагидроптерина (вид сверху и сбоку), соответствующая минимуму потенциальной энергии основного состояния S_0 . Указана нумерация атомов, а также межатомные расстояния.

3.2.2. TD-DFT расчет энергии вертикальных электронных переходов 5,6,7,8-тетрагидрогидроксиметилптерина (Н₄Гмп)

Прежде чем приступить к изучению различных аспектов фотохимии Н₄Гмп, требовалось рассчитать электронный спектр поглощения Н₄Гмп, установить значения и природу основных вертикальных переходов. Для полученной ранее равновесной

геометрии основного состояния провели расчет энергии вертикальных электронных переходов в рамках метода TD-DFT/B3LYP/6-311++G(2d,2p) (Таблица 8).

Таблица 8. Основные вертикальные электронные переходы в спектре поглощения Н₄Гмп. Расчет проведен методом B3LYP/6-311++G(2d,2p)//B3LYP/6-31G(d,p) для газовой фазы.

Состояние	Преобладающий переход	Природа возбужденного состояния	E _{расч.} , эВ (нм)	E _{эксп.} , эВ (нм)	f _{osc}
S ₁	HOMO→LUMO	Ry	3,75 (331)	-	0,009
S ₂	HOMO→LUMO+2	Ry	4,09 (303)	-	0,025
S ₃	HOMO→LUMO+1	ππ*	4,30 (289)	4,16 (298)	0,129
S ₄	HOMO→LUMO+3	Ry	4,42 (281)	-	0,009
S ₅	HOMO→LUMO+5	Ry	4,66 (266)	-	0,006
S ₆	HOMO→LUMO+4	ππ*	4,77 (260)	4,77 (260)	0,045

Спектр Н₄Бип, с которым мы будем в дальнейшем сопоставлять рассчитанные нами переходы в спектре Н₄Гмп, в водном растворе имеет длинноволновый максимум при 298 нм, а также перегиб при 260 нм (Рис. 5). Исходя из природы переходов, а также значений силы осциллятора (f_{osc}), данные пики могут быть соотнесены с состояниями 3 и 6 (Таблица 8). Возбужденные состояния 1, 2, 4 и 5 и соответствующие электронные переходы имеют ридберговскую природу и малоинтенсивны. Наблюдаемый в спектре поглощения переход S₀→S₃ с длиной волны 289 нм является разрешенным по правилам орбитальной симметрии π→π* переходом: обе орбитали, HOMO и LUMO+1, относятся к молекулярным орбиталям π-типа (Рис. 35). Хорошо известно, что переходы π→π* типа имеют наиболее высокую интенсивность в сравнении с другими типами электронных переходов. К переходам π→π* типа относится и переход HOMO-LUMO+4 (S₀→S₆), вследствие чего его также можно наблюдать в экспериментальном спектре поглощения в виде перегиба с длиной волны 260 нм. Рядом с S₃ расположены состояния S₁ и S₂, которые соответствуют переходам электрона с HOMO на LUMO и с HOMO на LUMO+2 орбитали, соответственно (Рис. 35) и относятся к переходам ридберговского типа. В дальнейшем речь будет идти в основном о двух возбужденных синглетных состояниях: нижнее возбужденное состояние ¹Ry (S₁) и состояние ¹ππ* (S₃).

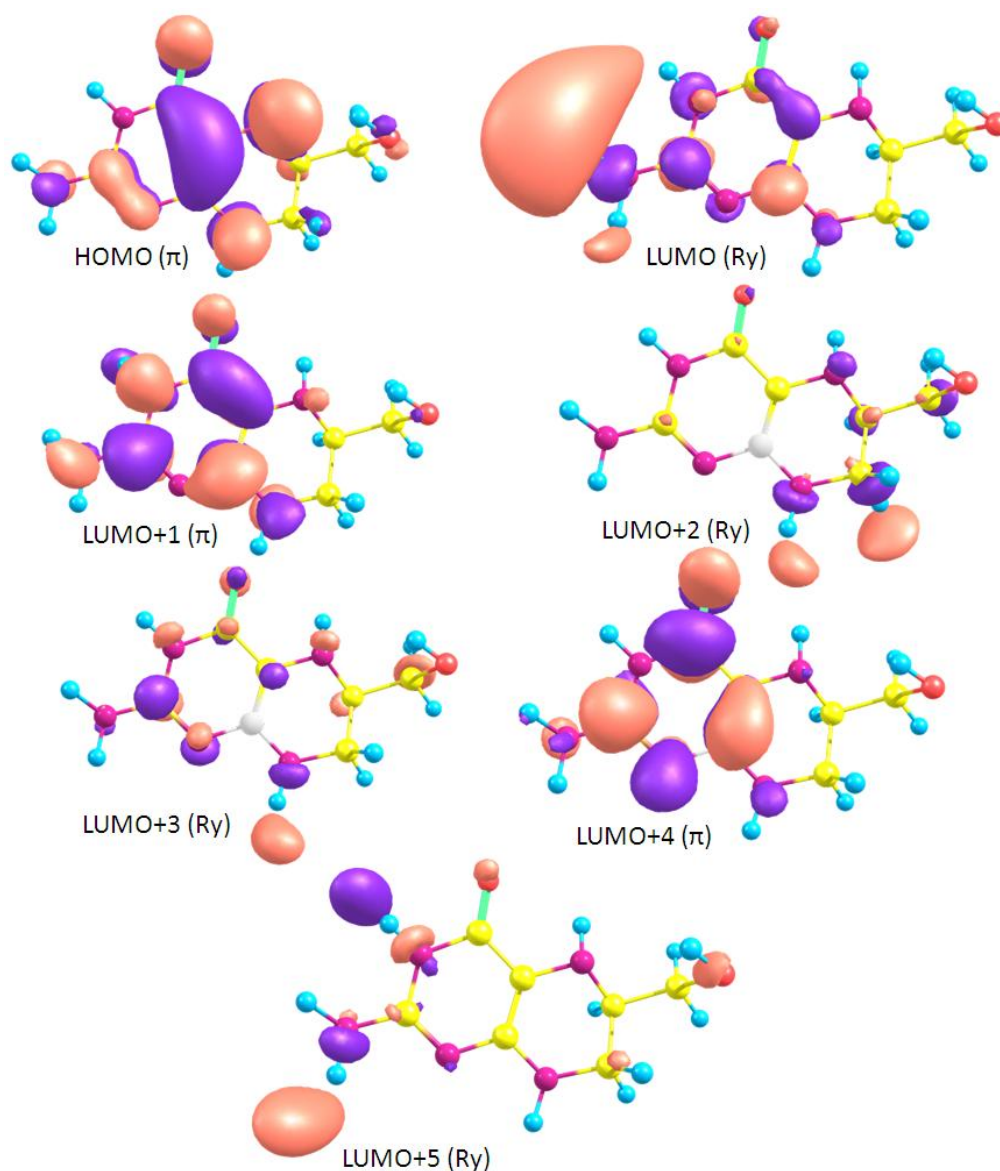


Рис. 35. Молекулярные орбитали, участвующие в электронных переходах. HOMO – высшая занятая молекулярная орбиталь, LUMO – низшая вакантная молекулярная орбиталь.

Согласно правилу Каши, люминесценция всегда происходит из нижнего возбуждённого состояния данной мультиплетности. Фотохимически активным так же является нижнее возбужденное состояние молекулы. Поскольку интенсивность флюоресценции и фосфоресценции тетрагидровосстановленных птеринов крайне низка [Neverov et al., 1996], основным каналом дезактивации возбужденного состояния, по-видимому, является внутренняя конверсия, и, значит, геометрия нижнего возбужденного синглетного состояния, вероятно, значительно отличается от геометрии основного состояния H_4Gmp . Несмотря на то, что заселение S_1 (1Ry) напрямую путем его

фотовозбуждения не происходит, по-видимому, его заселение возможно в результате внутренней конверсии из вышележащих возбужденных состояний.

Влияние растворителя на электронный спектр $\text{H}_4\text{Гмп}$ оценивали в рамках континуальной модели COSMO. В рамках данной модели нижнее возбужденное состояние S_1 (^1Ry) соответствует переходу с длиной волны 306 нм (4,06 эВ). Состояние S_2 ($^1\pi\pi^*$) соответствует электронному переходу с длиной волны 289 нм (4,29 эВ) и силой осциллятора $f_{\text{OSC}} = 0,121$ (Таблица 9). Таким образом, учет растворителя не влияет на величину энергии перехода $\pi \rightarrow \pi^*$. Состоянию S_3 (^1Ry) соответствует переход с длиной волны 281 нм (4,41 эВ) и силой осциллятора $f_{\text{OSC}} = 0,030$. Таким образом, мы видим, что в полярном растворителе H_2O , по-видимому, происходит коротковолновый сдвиг длины волны возбуждения нижних состояний с природой ^1Ry . В то же время энергия двух нижних состояний $^1\pi\pi^*$ имеет одинаковую величину и в газовой фазе, и в полярном растворителе: 4,30 эВ (289 нм) и 4,75 эВ (261 нм).

Таблица 9. Основные вертикальные электронные переходы в спектре поглощения $\text{H}_4\text{Гмп}$. Расчет проведен методом B3LYP/6-311++G(2d,2p)//B3LYP/6-31G(d,p) для водного раствора.

Состояние	Природа возбужденного состояния	$E_{\text{расч.}}$, эВ (нм)	$E_{\text{эксп.}}$, эВ (нм)	f_{OSC}
S_1	Ry	4,06 (306)	-	0,026
S_2	$\pi\pi^*$	4,29 (289)	4,16 (298)	0,121
S_3	Ry	4,41 (281)	-	0,030
S_4	Ry	4,53 (274)	-	0,018
S_5	Ry	4,63 (268)	-	0,035
S_6	$\pi\pi^*$	4,75(261)	4,77 (260)	0,077

В рамках метода TD-DFT/B3LYP/6-311G++(2d,2p) с использованием равновесной геометрии основного состояния, нами также были рассчитаны значения энергии триплетных состояний. Полученные данные суммированы с данными для синглетных переходов и представлены на Рисунке 36.

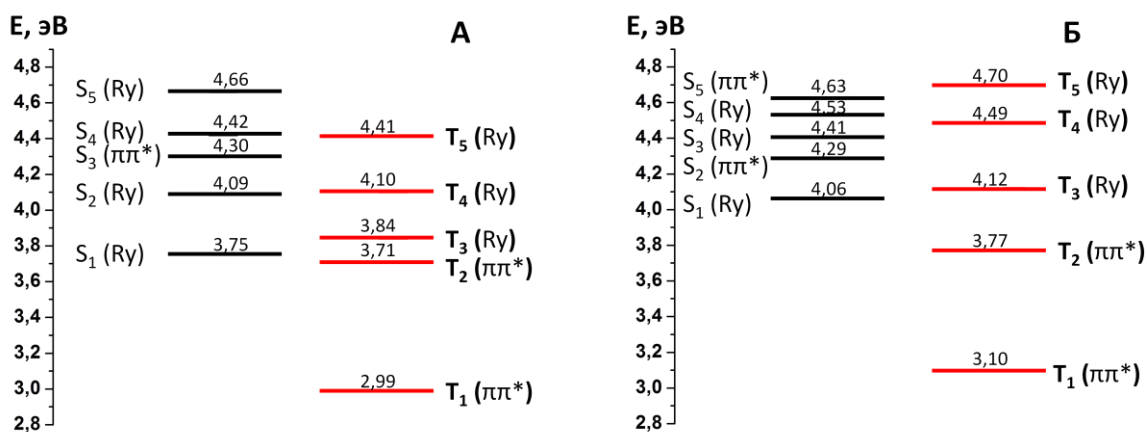


Рис. 36. Энергии вертикальных электронных переходов, рассчитанные на основании равновесной геометрии S_0 $H_4Гмп$ для пяти нижних синглетных и пяти нижних триплетных состояний. А. Газовая фаза. Б. H_2O .

Несмотря на то, что представленные энергии различных состояний являются вертикальными, а не адиабатическими, попытаемся оценить возможность некоторых переходов после заселения состояния $^1\pi\pi^*$ (S_3). Из приведенной на Рисунке 36 схемы видно, что нижним возбужденным состоянием является состояние T_1 , имеющее орбитальную природу $\pi\pi^*$. Нижнее синглетное возбужденное состояние S_1 (Ry) лежит значительно выше T_1 (в газовой фазе $\Delta E_{ST} = E(S_1) - E(T_1) = 0,76$ эВ, в воде - $0,96$ эВ). Несмотря на то, что представленные значения потенциальной энергии являются неадиабатическими, правило энергетической щели указывает на то, что вероятность перехода S_1 (1Ry) \sim T_1 ($^3\pi\pi^*$) не высока. Состояния S_1 (1Ry) и T_2 ($^3\pi\pi^*$) в газовой фазе распложены рядом (Рис. 36, А), поэтому если состояние 1Ry (S_1) действительно является нижним возбужденным синглетным состоянием (то есть если его адиабатическая энергия меньше, чем адиабатическая энергия других возбужденных синглетных состояний), то в соответствии с правилом Эль-Сайеда [Lower, El-Sayed, 1966], достаточно высока вероятность перехода S_1 (1Ry) \sim T_2 ($^3\pi\pi^*$). Если нижним является состояние $^1\pi\pi^*$, вероятность интеркомбинационной конверсии, напротив, невелика. Также можно предположить, что в воде вероятность перехода 1Ry (S_1) \sim $^3\pi\pi^*$ (T_2) ниже, поскольку разность энергий данных состояний возрастает с $0,04$ эВ для газовой фазы до $0,29$ эВ в воде.

3.2.3. Геометрия возбужденных состояний $H_4Гмп$

Для оптимизации геометрии нижних возбужденных синглетных состояний 1Ry и $^1\pi\pi^*$ применяли функционал B3LYP в рамках метода нестационарной теории

функционала плотности TD-DFT. Чтобы оценить корректность применения метода TD-DFT/B3LYP к оптимизации геометрии возбужденных состояний $\text{H}_4\text{Гмп}$, мы сравнили геометрию $^1\pi\pi^*$ состояния биологического (9-Н) таутомера гуанина, полученную нами методом B3LYP/6-311G++(d,p), с геометрией, найденной S. Yamazaki с соавторами [Yamazaki et al., 2008]. Наличие пиримидинового кольца в составе птеринов роднит их с азотистыми основаниями нуклеиновых кислот, и, в первую очередь, с гуанином (см. Рис. 14). Равновесная геометрия и значения внутренних координат $^1\pi\pi^*$ состояния гуанина представлены в Приложении № 2. Полученная нами геометрия оказалась практически идентична геометрии, установленной S. Yamazaki с соавторами: среднеквадратичное отклонение атомных координат для геометрии min(1) составило 0,073 Å, для min(2) – 0,089 Å. Исходя из этого, мы сделали вывод, что метод TD-DFT/B3LYP адекватен для работы с геометрией возбужденных состояний гуанина и схожих с ним соединений, в том числе $\text{H}_4\text{Гмп}$.

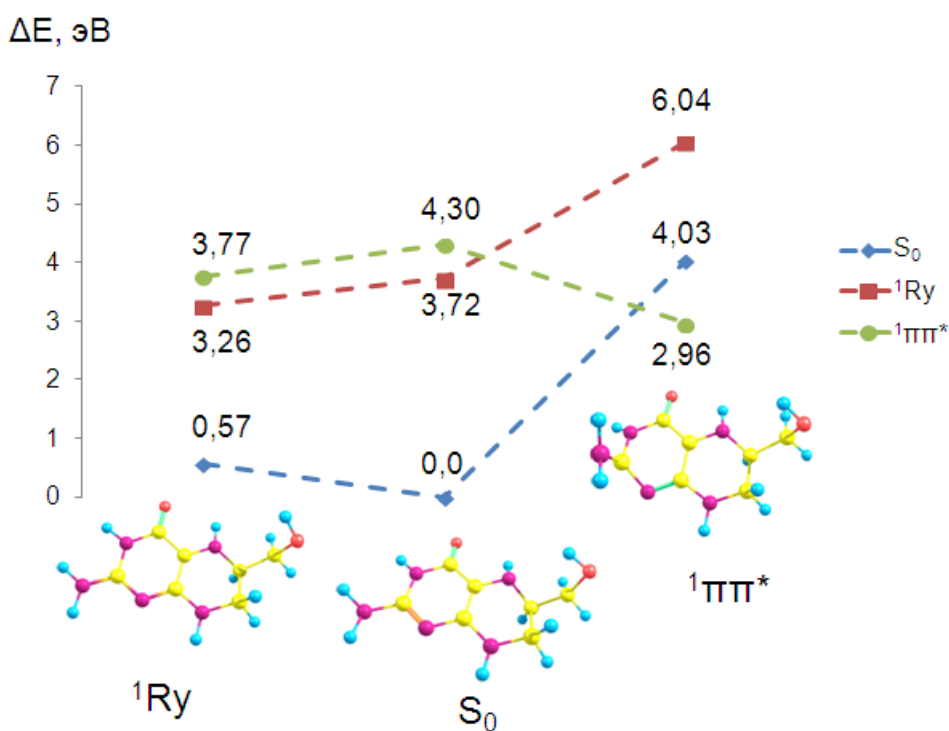


Рис. 37. Энергия вертикальных электронных переходов (в эВ), рассчитанная методом B3LYP/6-311G++(d,p) на основании равновесной геометрии основного состояния S_0 , оптимизированной геометрии энергетического минимума состояния $^1\pi\pi^*$ и состояния 1R_y .

В рамках метода B3LYP/6-311G++(d,p) оптимизирована равновесная геометрия основного состояния, методом TD-DFT/B3LYP/6-311G++(d,p) получена геометрия нижних синглетных возбужденных состояний $^1\pi\pi^*$ и 1R_y . Относительно полученных геометрий рассчитана энергия вертикальных электронных переходов. Относительно

геометрии 1R_y и S_0 значение потенциальной энергии состояния 1R_y (3,26 и 3,72, соответственно) ниже потенциальной энергии состояния ${}^1\pi\pi^*$: 3,77 эВ и 4,30 эВ, соответственно (Рис. 37). Относительно оптимизированной геометрии ${}^1\pi\pi^*$ энергия состояний располагается по-другому: состояния S_0 и 1R_y лежат выше, чем ${}^1\pi\pi^*$ на 1,07 эВ и 3,08 эВ, соответственно. По-видимому, геометрия энергетического минимума ${}^1\pi\pi^*$ не реализуется, а настоящий минимум состояния ${}^1\pi\pi^*$ соответствует коническому пересечению ${}^1\pi\pi^*/S_0$. Минимум состояния ${}^1\pi\pi^*$ расположен на 0,30 эВ ниже (2,96 эВ), чем минимум состояния 1R_y (3,26 эВ). Отсюда можно предположить, что если функция потенциальной энергии состояния ${}^1\pi\pi^*$ не имеет существенного барьера, коническое пересечение ${}^1\pi\pi^*/S_0$ лежит ниже конического пересечения ${}^1R_y/S_0$, высока вероятность внутренней конверсии из состояния ${}^1\pi\pi^*$ в S_0 .

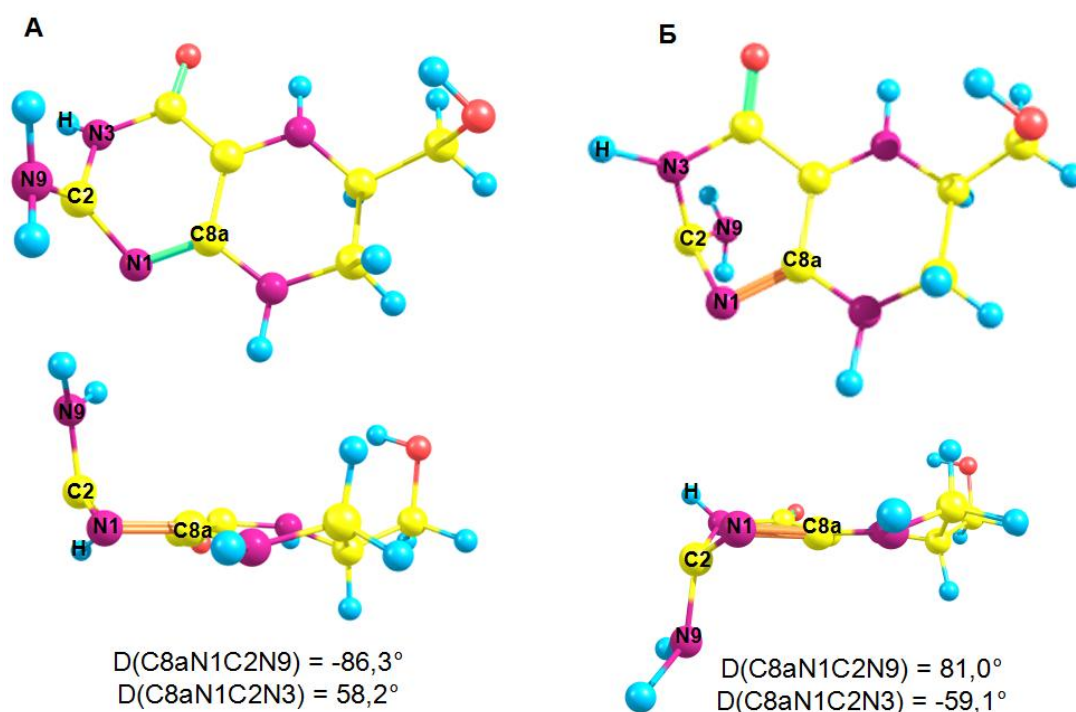


Рис. 38. Оптимизированная геометрия H_4Gmp минимумов энергии возбужденного состояния ${}^1\pi\pi^*$: min(1) (А) и min(2) (Б).

Геометрия, соответствующая минимуму ППЭ состояния ${}^1\pi\pi^*$ характеризуется значительной внеплоскостной деформацией пиримидинового кольца. Кроме того, происходит выход из плоскости пиримидинового кольца аминогруппы в С2 положении и атома водорода в N3 положении. Подобно молекуле гуанина, в зависимости от ориентации данных заместителей относительно плоскости кольца, возможно существование нескольких минимумов на ППЭ нижнего ${}^1\pi\pi^*$ состояния. Нами были найдены два минимума, min(1) и min(2), отличающихся положением аминогруппы относительно

плоскости пиримидинового кольца и значением двугранного угла $N^3-C^2-N^1-C^{8a}$ (Рис. 38). Учитывая, что наиболее энергетически выгодным коническим пересечением является коническое пересечение $CI_{12}(1)$ (см. ниже), минимум состояния ${}^1\pi\pi^*$ min(1), по-видимому, является наиболее энергетически выгодным (Рис. 38,А).

Таблица 10. Сравнение структурных параметров геометрии состояний S_0 , ${}^1\pi\pi^*$ и 1R_y , оптимизированной в рамках метода B3LYP/6-311G++(d,p).

Геометрические параметры	S_0	${}^1\pi\pi^*$	1R_y
Длина связи, Å:			
<i>Пиримидиновое кольцо</i>			
N^1-C^2	1,302	1,449	1,343
N^1-C^{8a}	1,370	1,296	1,329
C^2-N^3	1,363	1,421	1,373
$C^{4a}-C^{8a}$	1,383	1,461	1,422
N^3-H	1,012	1,010	1,031
C^2-N^9	1,382	1,392	1,317
N^9-H_a	1,010	1,009	1,018
N^9-H_b	1,010	1,012	1,042
$C^{4a}-N^5$	1,415	1,368	1,352
Валентный угол, °:			
$N^9-C^2-N^1$	120,0	117,7	119,5
$N^9-C^2-N^3$	117,1	116,1	117,6
$N^1-C^2-N^3$	122,9	116,3	122,9
$C^2-N^3-C^4$	123,4	114,6	123,5
Двугранный угол, °:			
$N^1-C^2-N^3-C^4$	-0,1	-55,3	2,5
$N^1-C^2-N^3-H$	173,3	109,0	-178,4
$N^3-C^2-N^1-C^{8a}$	-0,8	58,2	-1,3
$N^9-C^2-N^1-C^{8a}$	176,5	-86,3	179,3
$N^5-C^6-C^1-O'$	57,0	64,5	68,1
$C^6-C^1-O'-H'$	-45,3	-60,4	-74,5

Отличия минимума ${}^1\pi\pi^*$ состояния (min(1)) от S_0 включают в себя:

1. Изменение длин связей, в первую очередь, связей между атомами внутри пиримидинового кольца. В наибольшей степени это касается связи N^1-C^2 , длина которой в основном состоянии соответствует длине двойной связи (1,302 Å), а в ${}^1\pi\pi^*$ - одинарной связи (1,449 Å). Что касается пиразинового кольца, существенно изменяется только длина связи $C^{4a}-N^5$ (длина связи составляет 1,415 Å и 1,368 Å, в S_0 и ${}^1\pi\pi^*$ состоянии, соответственно) (Таблица 10).

2. Внеплоскостная деформация пиримидинового кольца; в частности, геометрия ${}^1\pi\pi^*$ состояния характеризуется двугранным углом $D N^1-C^2-N^3-C^4 = -55,3^\circ$, в основном состоянии угол $D N^1-C^2-N^3-C^4$ равен $-0,1^\circ$.

3. Выход аминогруппы из плоскости пиримидинового кольца ($D(N^9-C^2-N^1-C^{8a}) = -86,3^\circ$ в S_1 состоянии и $D(N^9-C^2-N^1-C^{8a}) = 176,5^\circ$ в S_0).

4. Пирамидализация атома C2. Из Таблицы 10 видно, что значения всех валентных углов, образуемых C2 атомом в ${}^1\pi\pi^*$ состоянии уменьшаются по сравнению с S_0 : значения трех валентных углов $N^9-C^2-N^1$, $N^9-C^2-N^3$, $N^1-C^2-N^3$ стремятся к величине $109,3^\circ$, характерной для тетраэдра, а не 120° , характерной для плоского треугольника.

Значительное изменение геометрии $H_4Гмп$ в ${}^1\pi\pi^*$ состоянии связано с перераспределением электронной плотности. НОМО орбиталь характеризуется высокой электронной плотностью в области атомов C4a и N5 (Рис. 35), двойные связи располагаются между атомами N1 и C2, а также между C4a и C8a. Переход электрона с НОМО на LUMO+1 орбиталь при фотовозбуждении сопровождается перераспределением электронной плотности. LUMO+1 орбиталь характеризуется высокой электронной плотностью в области атома C2. Вследствие этого связь N^1-C^2 , которая является двойной в основном состоянии, в ${}^1\pi\pi^*$ состоянии становится одинарной, а связь N^1-C^{8a} , напротив, становится двойной.

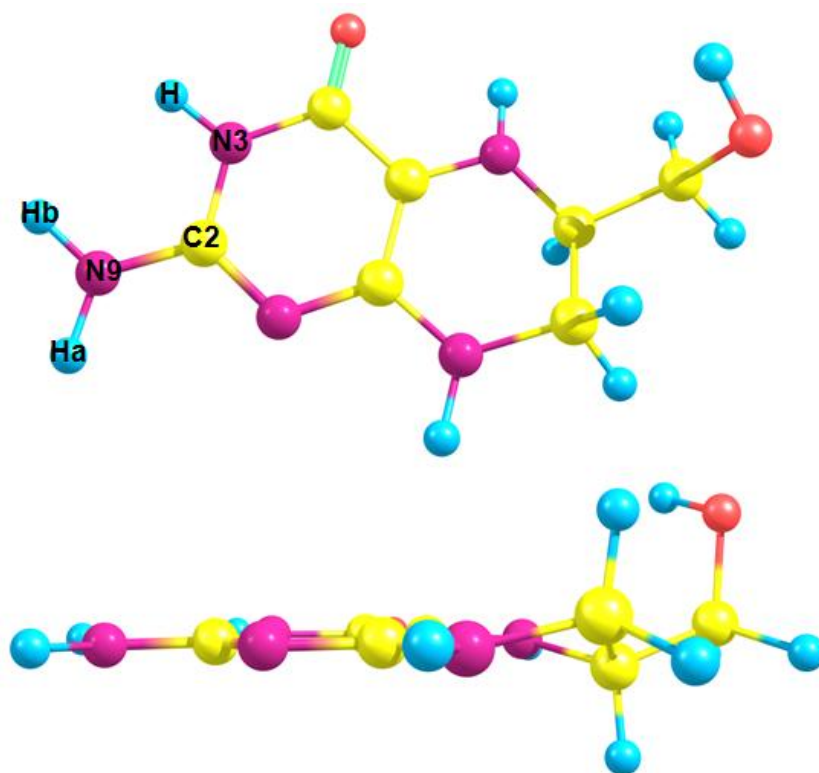


Рис. 39. Геометрия $H_4Гмп$ минимума возбужденного состояния 1R_u .

Также была найдена геометрия $H_4Гмп$, соответствующая минимуму возбужденного состояния 1R_u . Возбужденное состояние ${}^1\pi\pi^*$, как и основное состояние $H_4Гмп$, имеет непланарную геометрию, в то время как 1R_u состояние имеет планарную структуру (Рис. 39). Отличительной особенностью данной геометрии является небольшая элонгация N-H связей: длина связи N^3-H составляет $1,012 \text{ \AA}$ и $1,031 \text{ \AA}$, длина связи N^9-H_a составляет

1,010 Å и 1,018 Å, длина связи N⁹-H_b составляет 1,010 Å и 1,042 Å для S₀ и ¹Ry состояний, соответственно (Таблица 10). Также в ¹Ry состоянии связь C²-N⁹, длина которой в S₀ и ¹πл* состоянии составляет 1,382 Å и 1,392 Å, соответственно, становится двойной (1,317 Å). Полученные геометрические параметры схожи с аналогичными геометрическими параметрами нижнего ¹Ry состояния гуанина [Yamazaki et al., 2008]. Элонгация N³-H связи – один из признаков диссоциативного характера состояния ¹Ry [Marian et al., 2008].

3.2.4. Сканирование поверхности потенциальной энергии возбужденных состояний H₄Гмп

Для изучения процессов, происходящих после поглощения фотона, требуется рассмотреть возможные траектории релаксации возбужденного состояния, найти точки переходов между разными электронными состояниями (конические пересечения). Прежде всего, нас интересуют возможные траектории переходов из синглетных возбужденных состояний в основное состояние S₀.

Очевидно, что наличие конических пересечений (CI) между ППЭ основного состояния и ППЭ нижнего возбужденного состояния (CI S₁/S₀) необходимо для сверхбыстрого безызлучательного (нефотохимического) тушения фотовозбужденных молекул. Для пуриновых оснований, аденина [Perun et al., 2005a; Perun et al., 2005b] и гуанина [Yamazaki et al., 2008; Yamazaki, Domcke, 2008], было показано наличие конических пересечений ¹πл*/S₀, связанных с внеплоскостной деформацией 6-членного пиримидинового кольца и характеризующихся изгибом C-C и C-N связей, в основном состоянии являющихся формально двойными связями.

Для того чтобы показать наличие конического пересечения и возможность внутренней конверсии между возбужденным состоянием ¹πл* и основным состоянием S₀, требуется провести сканирование ППЭ состояния ¹πл*, оценить величину энергетического барьера между областью Франка-Кондона и CI, определить геометрию CI. В основном состоянии H₄Гмп двойная связь расположена между атомами N1 и C2 (Рис. 34), поэтому мы предположили, что CI можно достичь путем вращения связи N1-C2. В этой связи мы провели сканирование ППЭ состояния ¹πл* по двугранному углу C8aN1C2N3. Начиная с равновесной геометрии основного состояния, величина двугранного угла C8aN1C2N3 фиксируется при различных значениях, по остальным внутренним координатам происходит оптимизация геометрии состояния ¹πл*.

Результат сканирования представлен на Рисунке 40. Сплошной линией с квадратами показан профиль энергии состояния ¹πл*. Пунктирной линией с ромбами показаны значения энергии состояния S₀, рассчитанные относительно ¹πл*

оптимизированной геометрии. Была получена кривая, ведущая к коническому пересечению ${}^1\pi\pi^*/S_0$ и не имеющая энергетического барьера (Рис. 40). Адиабатическая энергия минимума состояния ${}^1\pi\pi^*$ (Рис. 37) относительно состояния S_0 составила 2,96 эВ, что ниже энергии CI (~3,10 эВ, согласно TDDFT расчету). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что внутренняя конверсия происходит эффективно через коническое пересечение, что объясняет отсутствие флюоресценции у восстановленных форм птеринов.

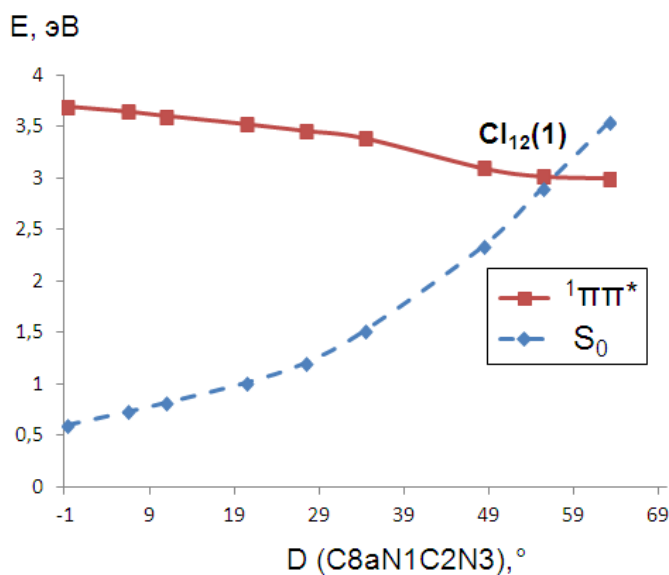


Рис. 40. Профили потенциальной энергии возбужденного состояния ${}^1\pi\pi^*$ и основного состояния S_0 , рассчитанные в рамках нестационарной теории функционала плотности TD-DFT и метода B3LYP/6-311G++(d,p). Сканирование ППЭ проводилось по двугранному углу C8aN1C2N3.

Безызлучательное тушение состояния 1R_y за счет диссоциации N-H связи показано для различных гетероциклических молекул: аденина [Sobolewski et al., 2002; Sobolewski, Domcke, 2002], гуанина [Yamazaki et al., 2008], индола [Sobolewski, Domcke, 1999] и других. Нашей задачей было проанализировать возможность подобных процессов для молекул восстановленных птеринов на примере H₄Гмп.

Распределение электронной плотности LUMO орбитали указывает на то, что 1R_y возбужденное состояние, возможно, отчасти носит диссоциативный характер и связано с отщеплением атома водорода. В какой-то мере, это подтверждается и тем, что минимум возбужденного состояния 1R_y имеет увеличенные длины связей: R(N3-H) = 1,03 Å в 1R_y состоянии и 1,01 Å в S_0 , R(N9-Hb) = 1,04 Å в 1R_y состоянии и 1,01 Å в S_0 (Таблица 10). Мы предположили, что процессы релаксации нижнего возбужденного состояния 1R_y могут

идти за счет валентных колебаний связи N9-H_b аминокетильной группы (Рис. 39) и связи N3-H. В этой связи, используя геометрию нижнего возбужденного состояния ¹R_y, мы построили профили потенциальной энергии основного состояния и двух нижних возбужденных состояний ¹R_y и ¹ππ* вдоль координат N3-H (Рис. 41, А) и N9-H_b (Рис. 41, Б). Энергии основного состояния и возбужденного ¹ππ* состояния рассчитаны на основании геометрии ¹R_y.

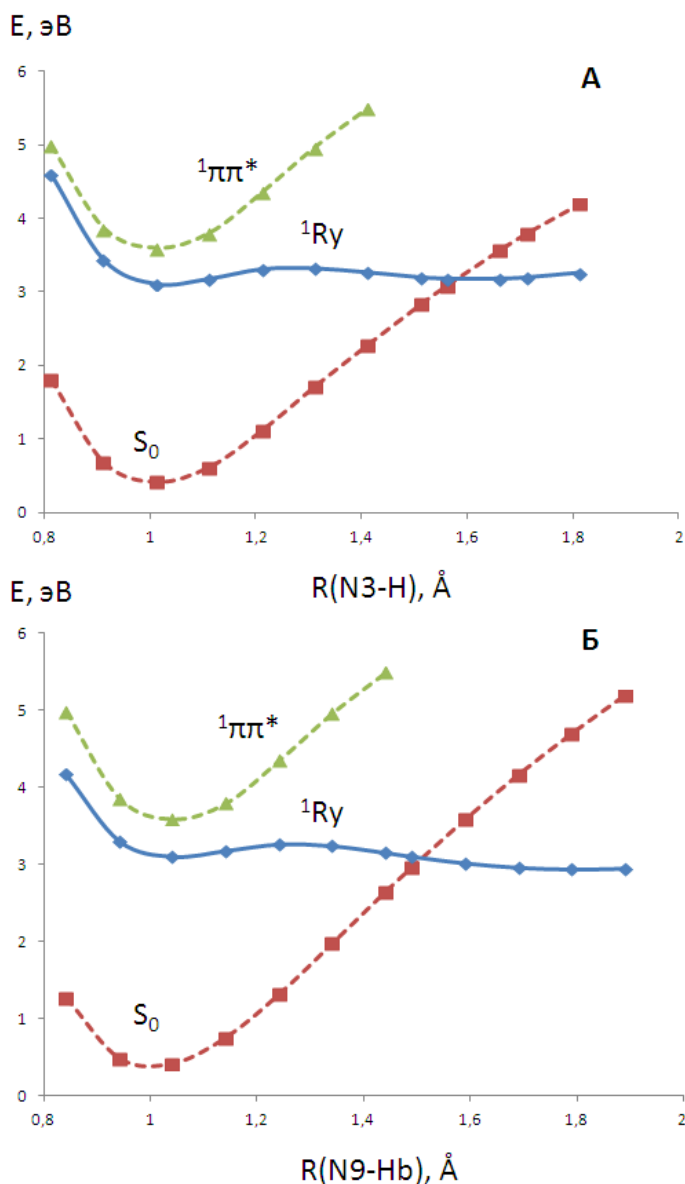


Рис. 41. Профили потенциальной энергии возбужденного состояния ¹R_y, возбужденного состояния ¹ππ* и основного состояния S₀, рассчитанные в рамках нестационарной теории функционала плотности TD-DFT и метода B3LYP/6-311G++(d,p). Сканирование ППЭ проводилось по длине связи N3-H (А) и N9-H_b (Б).

Из Рисунка 41 видно, что возможна колебательная релаксация из состояния ¹R_y в S₀ как за счет диссоциации связи N9-H_b, так и за счет диссоциации связи N3-H. Профиль

ППЭ состояния 1R_u вдоль координаты N-H имеет диссоциативный характер в обоих случаях. Пересечение с геометрией основного состояния происходит при длине связи N3-N $\sim 1,57 \text{ \AA}$ и N9-H $\sim 1,50 \text{ \AA}$. Барьер ППЭ соответствует длине связи N3-N $\sim 1,25 \text{ \AA}$ и N9-H $\sim 1,30 \text{ \AA}$, наличие барьера отражает трансформацию диффузной орбитали из Ридберговского состояния в валентное. Высота барьера составляет $\sim 0,25 \text{ эВ}$.

Наличие нескольких траекторий безызлучательного тушения энергии фотовозбуждения синглетных состояний способствует фотостабильности молекулы. В первую очередь, фотостабильность обеспечивается внеплоскостными деформационными колебаниями пиримидинового кольца птериновой структуры. Соответствующая функция потенциальной энергии (Рис. 40) демонстрирует, что коническое пересечение, соответствующее внутренней конверсии $^1\pi\pi^*/S_0$, не имеет энергетического барьера, вследствие чего можно предполагать, что скорость внутренней конверсии H_4Gmp крайне высока. Аналогичным образом с помощью квантово-химических расчетов в литературе подробно описаны процессы внутренней конверсии азотистых оснований нуклеиновых кислот (см. функцию потенциальной энергии для состояния $^1\pi\pi^*$ гуанина на Рисунке 17). Таким образом объяснена крайне высокая фотостабильность азотистых оснований нуклеиновых кислот. Так, аденин и гуанин имеют время жизни порядка $0,75 \text{ пс}$ и $0,36 \text{ пс}$, соответственно [Barbatti et al., 2010]. Следовательно, можно предположить, что H_4Gmp (а также и другие тетрагидровосстановленные птерины - H_4Bip , $H_4Cianopterin$) обладает высокой скоростью внутренней конверсии и время жизни его возбужденных состояний имеет такой же порядок, как время жизни возбужденных состояний азотистых оснований, то есть $\sim 1 \text{ пс}$.

3.2.5. Геометрия конических пересечений $^1\pi\pi^*/S_0$

Поскольку в рамках TD-DFT метода установить геометрию CI невозможно, геометрия конического пересечения $^1\pi\pi^*/S_0$ была найдена методом CASSCF. На Рисунке 42 представлена оптимизированная геометрия конических пересечений $CI_{12}(1)$ и $CI_{12}(2)$.

Геометрия $CI_{12}(1)$ характеризуется значениями двугранных углов $D(C8aN1C2N3) = 62,1^\circ$ и $D(C8aN1C2N9) = -146,6^\circ$ (Рис. 42, А). Геометрия $CI_{12}(2)$ характеризуется двугранными углами $D(C8aN1C2N3) = -62,6^\circ$ и $D(C8aN1C2N9) = 144,2^\circ$ (Рис. 42, Б). Еще одно коническое пересечение $CI_{12}(3)$ соответствует экваториальной конформации ($D(N5C6C1'O') = -177,1$) и характеризуется двугранными углами $D(C8aN1C2N3) = 62,3^\circ$, $D(C8aN1C2N9) = -145,6^\circ$. Потенциальная энергия конического пересечения $CI_{12}(2)$ на $0,166 \text{ эВ}$ выше энергии $CI_{12}(1)$, а энергия $CI_{12}(3)$ на $0,045 \text{ эВ}$ выше энергии $CI_{12}(1)$. Соответственно, внутренняя конверсия, вероятно, происходит преимущественно через

коническое пересечение $CI_{12}(1)$. Сканирование ППЭ состояния ${}^1\pi\pi^*$ вдоль соответствующей координаты реакции представлено на Рисунке 40.

Представляется интересным провести сравнение геометрии, полученного нами конического пересечения $CI_{12}(1)$ с описанными ранее в литературе коническими пересечениями пуриновых оснований, в частности, с геометрией CI гуанина (Рис. 17, Б) – [Yamazaki et al., 2008]. Геометрия $CI_{12}(1)$ характеризуется значением двугранного угла $D(C8aN1C2N3) = 62,1^\circ$. Аналогичная величина для геометрии CI гуанина составляет $69,0^\circ$ [Yamazaki et al., 2008]. Также $CI_{12}(1)$ характеризуется значением двугранного угла $D(HN3C2N1) = 78,8^\circ$, аналогичная величина для гуанина составляет $81,1^\circ$ [Yamazaki et al., 2008]. Отсюда видно, что конические пересечения гуанина и $H_4Гмп$ имеют схожую геометрию, оба характеризуются внеплоскостной деформацией пиримидинового кольца, оба имеют электронную конфигурацию ${}^1\pi\pi^*$ и, очевидно, имеют одинаковую природу.

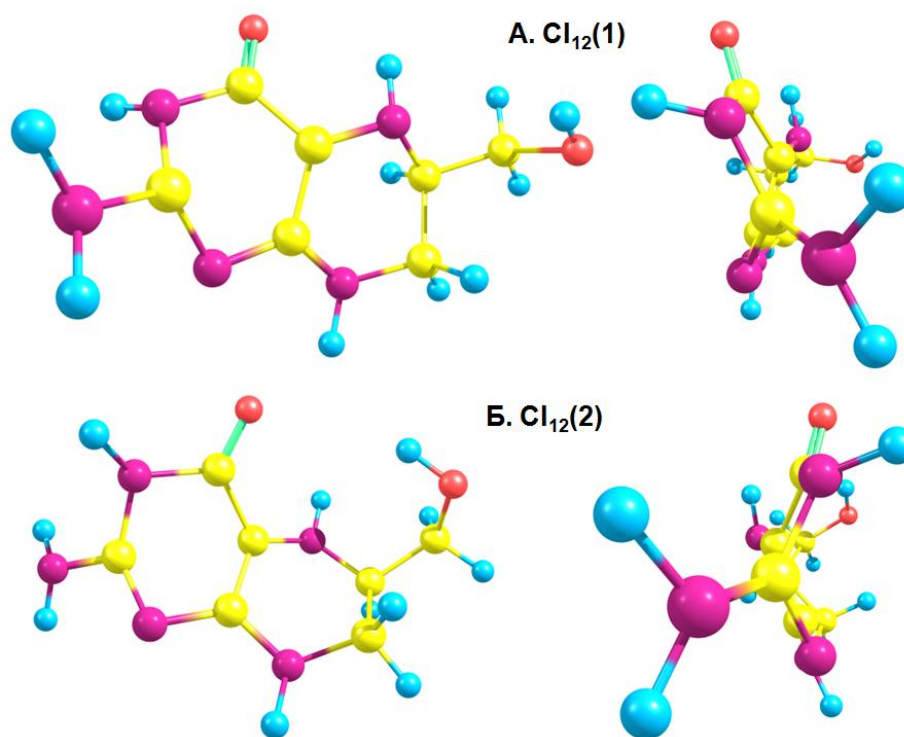


Рис. 42. Оптимизированная геометрия конических пересечений CI_{12} . А. $CI_{12}(1)$. Б. $CI_{12}(2)$.

3.2.6. Оценка возможности фототаутомеризации и вращения бокового заместителя в возбужденном состоянии $H_4Гмп$

Изначально нами было высказано предположение о том, что фоторецепторные свойства H_4 -птеринов связаны с возможностью изменения их конформации при фотовозбуждении. Для того чтобы оценить возможность изменения конформации

бокового заместителя при фотовозбуждении молекулы $\text{H}_4\text{Гмп}$, была сравнена энергия аксиальной и экваториальной конформации в нижнем синглетном $^1\pi\pi^*$ и нижнем триплетном состоянии $^3\pi\pi^*$. Для оценки возможности фототаутомеризации $\text{H}_4\text{Гмп}$ была сравнена энергия лактамной и лактимной форм возбужденных состояний. Равновесные геометрии возбужденных состояний были оптимизированы методом B3LYP/6-31G(d,p).

Разница энергий между аксиальной конформацией $^1\pi\pi^*$ и S_0 составила 2,97 эВ, между аксиальной конформацией $^3\pi\pi^*$ и S_0 – 2,54 эВ (Таблица 11). Таким образом, адиабатическая разница значений потенциальной энергии состояний $^3\pi\pi^*$ и $^1\pi\pi^*$ составила 0,43 эВ. Аксиальная конформация является основной для $^1\pi\pi^*$ состояния: разница энергии между экваториальной конформацией $^1\pi\pi^*$ и аксиальной S_0 составила 3,02 эВ, соответственно ΔE между экваториальной и аксиальной конформациями $^1\pi\pi^*$ состояния равна $\sim 0,05$ эВ. Аксиальная конформация является основной и для $^3\pi\pi^*$ состояния: разница энергии между экваториальной конформацией $^3\pi\pi^*$ и аксиальной S_0 составила 2,60 эВ, соответственно ΔE между экваториальной и аксиальной конформациями $^1\pi\pi^*$ состояния равна $\sim 0,06$ эВ. В обоих случаях, и для $^1\pi\pi^*$ и для $^3\pi\pi^*$, основной является лактамная форма. Для $^1\pi\pi^*$ энергия лактимной формы составила 4,04 эВ, а энергетическая разница между лактамом и лактимом – 1,07 эВ. Для $^3\pi\pi^*$ энергия лактимной формы – 3,17 эВ, разница между лактамом и лактимом – 0,63 эВ.

Таблица 11. Значения полной энергии оптимизированной геометрии, рассчитанной в рамках метода B3LYP/6-31G(d,p), нижних возбужденных состояний $^1\pi\pi^*$ и $^3\pi\pi^*$. Сравнение энергии аксиальной и экваториальной конформации, лактамной и лактимной форм.

№	Электронное состояние	Конформация	Таутомерная форма	$E_{\text{отн.}}$, эВ
1	S_0	аксиальная	Лактам	0
2	$^1\pi\pi^*$	аксиальная	Лактам	2,97
3	$^1\pi\pi^*$	экваториальная	Лактам	3,02
4	$^1\pi\pi^*$	аксиальная	Лактим	4,04
5	$^3\pi\pi^*$	аксиальная	Лактам	2,54
6	$^3\pi\pi^*$	экваториальная	Лактам	2,60
7	$^3\pi\pi^*$	аксиальная	Лактим	3,17

Было проведено релаксированное сканирование поверхности потенциальной энергии состояний $^1\pi\pi^*$ и S_0 . Из Рисунка 43 видно, что и в состоянии $^1\pi\pi^*$ и в S_0

доминирует аксиальная конформация. Величина энергетического барьера для перехода из аксиальной в экваториальную конформацию в $^1\pi\pi^*$ состоянии составляет ~ 5 ккал моль $^{-1}$.

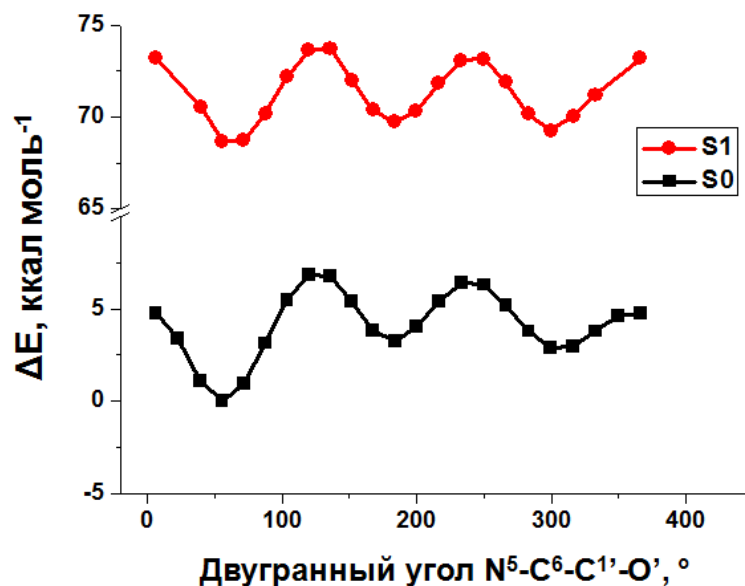


Рис. 43. Профили потенциальной энергии основного состояния S_0 и возбужденного состояния $^1\pi\pi^*$ N_4 Гмп для вращения бокового заместителя вокруг связи $C^6-C^{1'}$. ΔE посчитана относительно энергии наиболее стабильной конформации основного состояния.

Таким образом, с высокой долей вероятности можно утверждать, что при фотовозбуждении N_4 Гмп фототаутомеризация не происходит, поскольку, как показывает V3LYP/6-31G(d,p) расчет, и в нижнем возбужденном синглетном состоянии $^1\pi\pi^*$, и в нижнем триплетном состоянии, лактамная таутомерная форма является энергетически более выгодной. Также V3LYP/6-31G(d,p) расчет показывает, что изменения конформации бокового заместителя при фотовозбуждении N_4 Гмп не происходит, поскольку и в нижнем возбужденном синглетном состоянии $^1\pi\pi^*$, и в нижнем триплетном состоянии, аксиальная конформация является энергетически более выгодной. Кроме того, как показывает сканирование ППЭ $^1\pi\pi^*$ состояния, аксиальная и экваториальная конформации разделены энергетическим барьером ~ 5 ккал моль $^{-1}$.

3.2.7. Конформационный анализ нейтральной молекулы N_4 Гмп и катион-радикала N_4 Гмп $^+$

Сильные электрондонорные свойства и высокое значение энергетической щели между энергией НОМО и LUMO орбитали ($\sim 4,3$ эВ), по-видимому, делают возможным фотоиндуцированный перенос электрона с N_4 Гмп на расположенный рядом акцептор.

Очевидно, что при этом будет образовываться катион-радикал $\text{H}_4\text{Гмп}^+$. В этой связи мы предположили, что образующийся $\text{H}_4\text{Гмп}^+$ будет иметь конформацию, отличную от конформации основного состояния. В этой связи, мы провели конформационный анализ в рамках метода B3LYP/6-31G(d,p) для катион-радикала $\text{H}_4\text{Гмп}^+$ и для нейтральной молекулы $\text{H}_4\text{Гмп}$. С помощью программы Spartan 14 в рамках силового поля MMFF [Halgren, 1996] было получено 15 основных конформеров $\text{H}_4\text{Гмп}$ и 12 конформеров $\text{H}_4\text{Гмп}^+$. Далее геометрия конформеров предварительно оптимизировалась в рамках метода AM1. Полученные геометрии оптимизировались в рамках метода B3LYP/6-31G(d,p), также для каждого конформера рассчитывался гессиан. Были отобраны по 7 основных конформаций $\text{H}_4\text{Гмп}$ и $\text{H}_4\text{Гмп}^+$ с $\Delta G < 3,0$ ккал/моль и $\Delta G < 2,4$ ккал/моль, соответственно.

Геометрия конформеров определяется значениями трех двугранных углов, характеризующих боковой заместитель в С6 положении: это двугранные углы $\text{C}^{4a}\text{-N}^5\text{-C}^6\text{-C}^{1'}$, $\text{N}^5\text{-C}^6\text{-C}^{1'}\text{-O}'$ и $\text{C}^6\text{-C}^{1'}\text{-O}'\text{-H}'$. Наиболее стабильной конформацией $\text{H}_4\text{Гмп}$ является аксиальная конформация **1**, которая определяется, в первую очередь, величиной двугранного угла $D(\text{N}^5\text{-C}^6\text{-C}^{1'}\text{-O}') = 55,3^\circ$. Согласно больцмановскому распределению, доля конформера **1** составляет 89,1 %. До 2,7 % приходится на долю экваториального конформера **2** ($D(\text{N}^5\text{-C}^6\text{-C}^{1'}\text{-O}') = 181^\circ$), а также 1,9% на долю конформации **3** ($D(\text{N}^5\text{-C}^6\text{-C}^{1'}\text{-O}') = -58,8^\circ$). С учетом дипольных моментов из Таблицы 12, распределение конформеров в водном растворе должно быть аналогичным.

Таблица 12. Двугранные углы, относительная энергия Гиббса и дипольный момент семи наиболее стабильных конформеров $\text{H}_4\text{Гмп}$.

№	$D(\text{C}^{4a}\text{-N}^5\text{-C}^6\text{-C}^{1'}), ^\circ$	$D(\text{N}^5\text{-C}^6\text{-C}^{1'}\text{-O}'), ^\circ$	$D(\text{C}^6\text{-C}^{1'}\text{-O}'\text{-H}'), ^\circ$	$\Delta G,$ ккал моль ⁻¹	Заселенность, %	$\mu, \text{Д}$
1	-168,7	55,3	-42	0	89,1	4,7
2	-171,1	-179	67,5	2,08	2,7	3,6
3	-174,3	-58,8	-66,5	2,27	1,9	4,7
4	-73,2	-55,2	72,6	2,32	1,8	4,9
5	-168,4	-53,5	78,4	2,38	1,6	4,9
6	-173,2	-63,4	165,7	2,40	1,5	3,9
7	-171,6	182	181	2,45	1,4	2,8

Если у $\text{H}_4\text{Гмп}$ основной минимум приходится на аксиальную конформацию **1**, то основной минимум $\text{H}_4\text{Гмп}^+$ приходится на конформацию бокового заместителя, характеризующуюся двугранным углом $D(\text{N}^5-\text{C}^6-\text{C}^{1'}-\text{O}') = -51,6^\circ$. Наиболее стабильная конформация $\text{H}_4\text{Гмп}^+$ **1'** (Рис. 44) соответствует конформации **6** нейтральной молекулы. Для катион-радикала доля конформации **1'** составляет 61,5%, для нейтральной молекулы доля соответствующей конформации равна 1,5%.

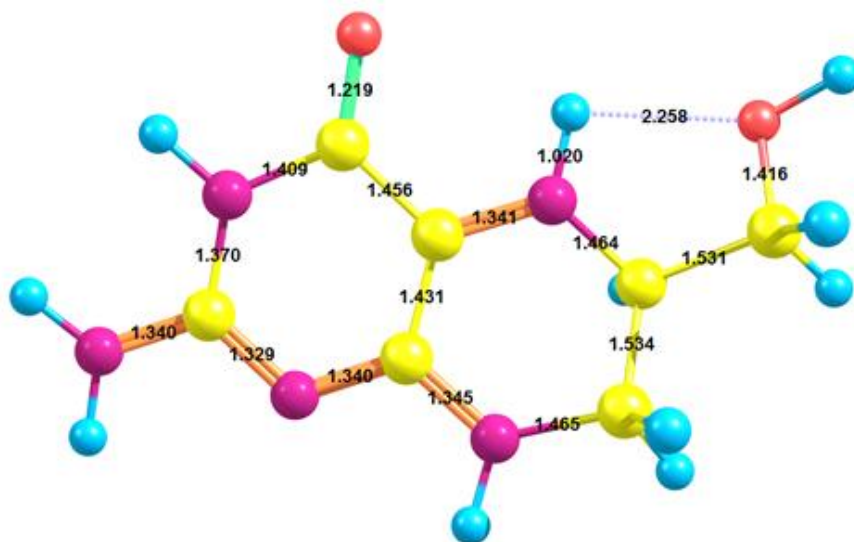


Рис. 44. Оптимизированная в рамках метода (RO)B3LYP/6-31G(d,p) геометрия наиболее стабильного конформера $\text{H}_4\text{Гмп}^+$.

Таблица 13. Двугранные углы, относительная энергия Гиббса и дипольный момент семи наиболее стабильных конформеров катион-радикала $\text{H}_4\text{Гмп}^+$.

№	$D(\text{C}^{4a}-\text{N}^5-\text{C}^6-\text{C}^{1'}), ^\circ$	$D(\text{N}^5-\text{C}^6-\text{C}^{1'}-\text{O}'), ^\circ$	$D(\text{C}^6-\text{C}^{1'}-\text{O}'-\text{H}'), ^\circ$	$\Delta G,$ ккал моль ⁻¹	Заселенность, %	$\mu,$ 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, катион-радикал $\text{H}_4\text{Гмп}^+$ действительно имеет конформацию, отличную от конформации основного состояния. Данное свойство, по всей видимости,

характерно и для других H4-восстановленных птеринов и, возможно, связано с их фоторецепторными функциями в живых организмах.

В контексте данных о фоторецепторной роли тетрагидроцианоптерина и H₄Бип в рецепции УФ-В [Moon et al., 2012, Takeda et al., 2014], можно предположить, что передача сигнала о поглощенном УФ фотоне начинается с изменения редокс-состояния и конформации птериновой молекулы, что, вероятно, может приводить к изменению и апобелка УФ-рецептора.

Поскольку тетрагидровосстановленный цианоптерин не способен флюоресцировать и, следовательно, не способен передавать энергию фотовозбуждения на соседние молекулы, то можно предположить, что передача информации происходит за счет изменения редокс-состояния и конформации молекулы.

Рассмотрим еще один аспект фотохимии птеринов – эволюционный. В контексте гипотезы «РНК мира» фотокаталитические реакции птеринов могут играть существенную роль [Крицкий, Телегина, 2004]. В условиях абиогенеза птеридины, 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.

3.3. Влияние природы бокового заместителя на сенсibiliзирующую активность окисленных форм птеринов

3.3.1. Оценка возможности реакций сенсibiliзированной генерации активных форм кислорода

Для молекул-сенсibiliзаторов важно оценить не только возможность протекания реакции генерации синглетного кислорода, но и вероятность образования побочного продукта - супероксид-анион радикала $O_2^{\bullet-}$. Особенно это важно для сенсibiliзаторов, применяемых в фотодинамической терапии, поскольку желательно, чтобы при фотосенсibiliзации кислорода токсичный $O_2^{\bullet-}$ не образовывался. Вероятность протекания фотохимических реакций, связанных с переносом энергии на молекулярный кислород и переносом электрона, можно оценить с помощью квантово-химических расчетов, сопоставив значения энергии возбужденного состояния сенсibiliзатора T_1 (E_{T_1}), его потенциала ионизации (IP_{T_1}), энергии сродства к электрону (EA_{T_1}), а также энергию синглетного возбужденного состояния 1O_2 молекулярного кислорода и энергию $O_2^{\bullet-}$.

Фотофизические и фотохимические характеристики были рассчитаны для шести птериновых молекул с разными боковыми заместителями, поскольку в зависимости от природы бокового заместителя свойства птеринов могут меняться. Результаты, полученные нами с помощью квантово-химических расчетов, представлены в Таблицах 14 и 16. Длинноволновый максимум в экспериментальном спектре поглощения птеринов обозначен в Таблице 14 как $E_{S_1}^{exp}$. Наша методика квантово-химических расчетов была откалибрована по данной экспериментальной величине, и были получены расчетные значения E_{S_1} . Как видно из Таблицы 14, расчетные данные хорошо согласуются с данными эксперимента.

Величина энергии перехода $T_1 \rightarrow S_0$ ($E_{T_1}^{exp}$) соответствует длине волны максимума в спектре фосфоресценции. Расчетные значения данного показателя (E_{T_1}) могут быть рассчитаны несколькими разными способами: 1) в рамках расчета на основании оптимизированной геометрии основного состояния; 2) в рамках расчета на основании оптимизированной геометрии состояния T_1 ; 3) как разница энергий оптимизированных геометрий основного состояния и состояния T_1 (адиабатическая разница энергия S_0 и T_1) (Рис. 45). Мы установили, что способ (3) наиболее точно предсказывает длину волны фосфоресценции (Таблица 16). Метод (1) дает ошибку при предсказании энергии триплета: расчетные данные, как правило, выше экспериментальных на 0,2-0,4 эВ. Метод (2), напротив, дает энергию триплета ниже экспериментальной энергии фосфоресценции,

систематическая ошибка составляет 0,25-0,3 эВ. Наиболее точно энергию триплета предсказывает расчет адиабатической разницы энергий T_1 и основного состояния – метод (3). Значения энергии сродства к электрону и потенциала ионизации триплетного возбужденного состояния T_1 (EA_{T_1} и IP_{T_1} , соответственно) рассчитаны относительно равновесной геометрии триплета. Все представленные величины получены как для нейтральной формы, характерной для низких значений pH, так и для анионной формы, преобладающей в щелочных растворах (значения pKa указаны на Рисунке 8).

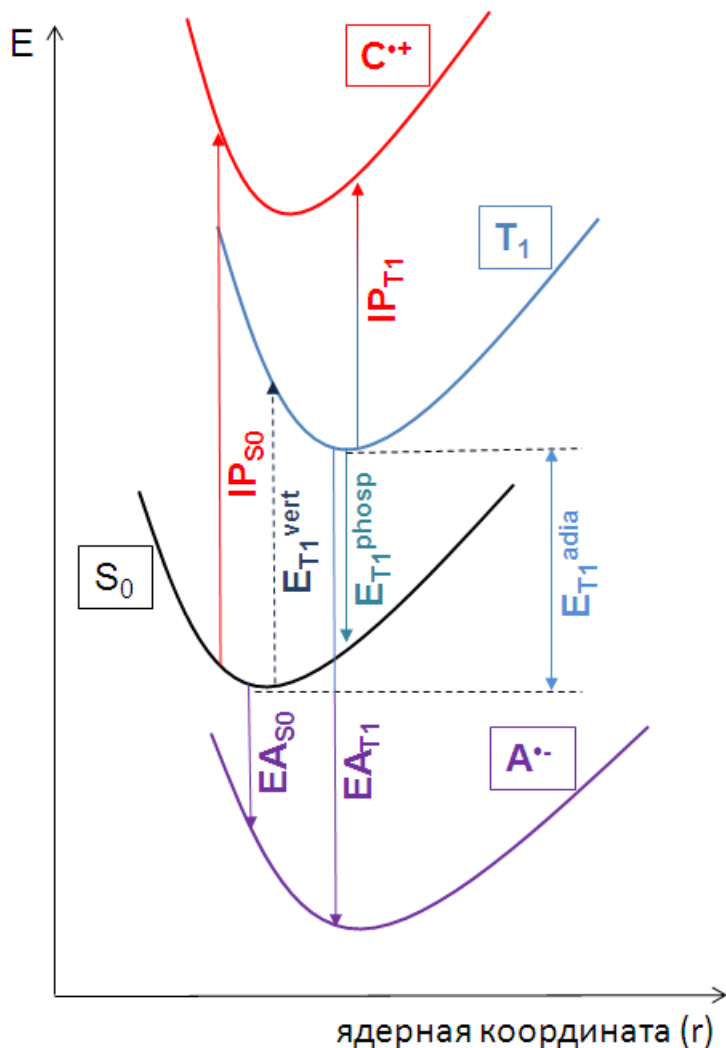


Рис. 45. Упрощенная диаграмма электронных состояний, отражающая основное состояние (S_0), нижнее триплетное состояние (T_1), катион-радикал ($C^{*\cdot}$) и анион-радикал ($A^{*\cdot}$).

Таблица 14. Фотофизические характеристики птеринов по данным расчета методом B3LYP/6-311G++(2d,2p)//B3LYP/6-31G+(d,p) в эВ. Максимум поглощения в ближнем УФ расчетный (E_{S1}) и экспериментальный (E_{S1}^{exp}), энергия сродства к электрону (EA_{S0}), потенциал ионизации (IP_{S0}), рассчитанные на основании геометрии основного состояния.

	E_{S1}	$E_{S1}^{exp, a}$	EA_{S0}	IP_{S0}
Птр (нейтр.)	3,68 (337 нм)	3,65 (340 нм)	-2,60	6,41
Птр (анион.)	3,55 (349 нм)	3,46 (358 нм)	-2,09	5,69
Бип (нейтр.)	3,62 (342 нм)	3,58 (346 нм)	-2,60	6,38
Бип (анион.)	3,49 (355 нм)	3,42 (363 нм)	-2,14	5,72
Гмп (нейтр.)	3,62 (342 нм)	3,59 (345 нм)	-2,62	6,34
Гмп (анион.)	3,48 (356 нм)	3,41 (364 нм)	-2,13	5,65
Фоп (нейтр.)	3,67 (337 нм)	3,58 (346 нм)	-2,97	6,59
Фоп (анион.)	3,49 (355 нм)	3,35 (370 нм)	-2,55	5,92
Кап (нейтр.)	3,59 (345 нм)	3,58 (346 нм)	-2,97	6,62
Кап (анион.)	3,47 (357 нм)	3,41 (364 нм)	-2,50	5,95
Дмп (нейтр.)	3,78 (328 нм)	3,60 (344 нм)	-2,33	6,19
Дмп (анион.)	3,62 (343 нм)	3,46 (358 нм)	-1,84	5,49

^a [Lorente, Thomas, 2006]

Расчет точно предсказывает длинноволновый максимум поглощения птеринов: средняя ошибка расчета относительно экспериментальных данных составила 0,08 эВ или 8 нм. На основании этого можно утверждать, что расчет энергии сродства к электрону и потенциала ионизации основного состояния методом B3LYP/6-311G++(2d,2p)//B3LYP/6-31G+(d,p) также достаточно точен. Потенциал ионизации основного состояния увеличивается в ряду Дмп < Гмп < Бип < Птр < Фоп < Кап для нейтральных молекул, и похожим образом (Дмп < Гмп < Птр < Бип < Фоп < Кап) изменяется у анионных форм. Как видно из Таблицы 14, наиболее высокое значение IP_{S0} имеют соединения с наиболее электроотрицательными заместителями (-формил, -карбоксил). Для многих групп соединений показано, что существует корреляция между потенциалом ионизации и

скоростью тушения синглетного кислорода, k_q^Δ [Schweitzer, Schmidt, 2003]. Из работ А. Thomas и соавторов мы знаем значения констант скорости тушения синглетного кислорода данными шестью птериновыми соединениями (Таблица 15). Константа скорости тушения 1O_2 убывает в той же последовательности Дмп - Гмп - Птр - Бип - Фоп – Кап, в какой растет значение потенциала ионизации анионных форм. Коэффициент детерминации для зависимости $IP_{S0} - \text{Log}(k_q^\Delta)$ для рассматриваемых птеринов, за исключением Дмп, высок и составляет $R^2 = 0,985$ (Рис. 46). Чрезмерно высокая константа скорости k_q^Δ для реакции Дмп с 1O_2 , по-видимому, объясняется влиянием «богатых» электронами метильных групп [Michaeli, Feitelson, 1994]. Наличие сразу двух метильных групп объясняет отличие экспериментально установленной константы скорости тушения 1O_2 ($31 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) от прогнозируемой согласно линии тренда на Рисунке 46 ($5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Таблица 15. Значения констант скорости тушения синглетного кислорода и квантовые выходы генерации 1O_2 птеринами в D_2O .

Соединение	$k_q^{\Delta a}, 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Φ_Δ	Φ_Δ
	(pD = 10,5)	(pD = 5,5)	(pD = 10,5)
Птр	2,9	0,18	0,30
Бип	2,4	0,34	0,40
Гмп	3,1	0,15	0,21
Фоп	1,4	0,45	0,47
Кап	1,4	0,27	0,37
Дмп	31	0,04	0,10

^a [Oliveros et al., 2011]

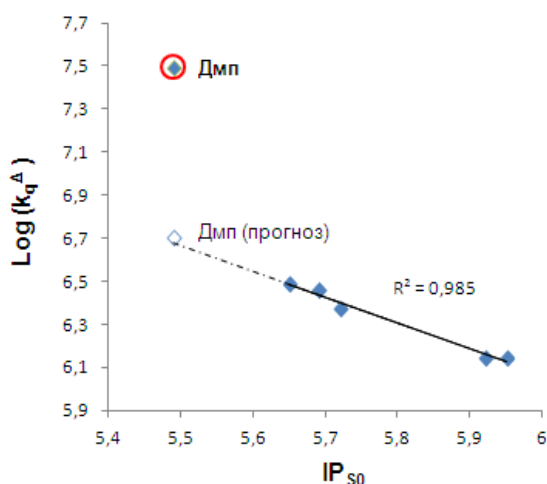


Рис. 46. Зависимость между логарифмом константы скорости тушения 1O_2 и потенциалом ионизации основного состояния.

Таблица 16. Фотофизические характеристики триплетных состояний птеринов по данным расчета методом B3LYP/6-311G++(2d,2p)//B3LYP/6-31G+(d,p) в эВ. Адиабатическая разница энергий T_1 и S_0 ($E_{T_1}^{adia}$); энергия T_1 , рассчитанная с помощью TDDFT на основании геометрии S_0 ($E_{T_1}^{vert}$) и на основании геометрии T_1 ($E_{T_1}^{phosp}$); экспериментально установленная и известная из литературы длина волны фосфоресценции ($E_{T_1}^{exp}$). Энергия сродства к электрону T_1 (EA_{T_1}), потенциал ионизации T_1 (IP_{T_1}), рассчитанные на основании геометрии T_1 .

	$E_{T_1}^{vert}$	$E_{T_1}^{phosp}$	$E_{T_1}^{adia}$	$E_{T_1}^{exp}$	EA_{S_0-} $E_{T_1}^{vert}$	EA_{S_0-} $E_{T_1}^{adia}$	EA_{T_1}	IP_{S_0-} $E_{T_1}^{vert}$	IP_{S_0-} $E_{T_1}^{adia}$	IP_{T_1}
Пгр (нейтр.)	2,84 (437 нм)	2,33 (532 нм)	2,59 (478 нм)	2,63 (472 нм) ^a 2,52 (492 нм) ^d	-5,44	-5,19	-5,23	3,57	3,82	3,89
Пгр (анион.)	2,69 (461 нм)	2,19 (566 нм)	2,44 (508 нм)	2,50 (495 нм) ^a 2,46 (505 нм) ^{b,e}	-4,77	-4,52	-4,54	3,01	3,26	3,33
Бип (нейтр.)	2,76 (449 нм)	2,22 (559 нм)	2,48 (500 нм)	-	-5,32	-5,08	-5,20	3,53	3,90	4,02
Бип (анион.)	2,60 (477 нм)	2,07 (600 нм)	2,30 (539 нм)	-	-4,68	-4,44	-4,55	2,97	3,42	3,51
Гмп (нейтр.)	2,73 (454 нм)	2,22 (559 нм)	2,48 (499 нм)	-	-5,36	-5,11	-5,16	3,61	3,86	3,95
Гмп (анион.)	2,60 (478 нм)	2,09 (594 нм)	2,33 (531 нм)	2,41 (515 нм) ^b	-4,72	-4,46	-4,49	3,06	3,32	3,39
Фоп (нейтр.)	2,71 (458 нм)	2,29 (541 нм)	2,50 (496 нм)	-	-5,68	-5,47	-5,50	3,88	4,09	4,22
Фоп (анион.)	2,52 (492)	2,15 (576 нм)	2,32 (534 нм)	2,41 (515 нм) ^b	-5,07	-4,87	-4,92	3,40	3,60	3,72
Кап (нейтр.)	2,71 (457 нм)	2,28 (544 нм)	2,50 (495 нм)	2,52 (492 нм) ^d	-5,68	-5,47	-5,52	3,91	4,12	4,26
Кап (анион.)	2,55 (486 нм)	2,46 (504 нм)	2,87 (432 нм)	2,46 (505 нм) ^{b,e}	-5,05	-5,37	-5,32	3,40	3,08	3,63
Дмп (нейтр.)	2,85 (435 нм)	2,32 (535 нм)	2,60 (477 нм)	2,46 (505 нм) ^c	-5,29	-4,93	-4,98	3,24	3,59	3,67
Дмп (анион.)	2,71 (457 нм)	2,18 (569 нм)	2,47 (503 нм)	-	-4,55	-4,30	-4,32	2,78	3,02	3,12

^a [Chahidi et al., 1981]; ^b [Parker et al., 1979]; ^c [Neverov et al., 1996]; ^d [Song, Hwang, 2007]; ^e [Freedlander et al., 1994].

Все 6 соединений имеют схожее значение энергии триплета $E_{T_1}^{adia}$: энергия T_1 анионной формы ниже (в среднем $\sim 2,4$ эВ), чем энергия триплета нейтральной молекулы ($\sim 2,5$ эВ), за исключением карбоксиптерина, у которого энергия T_1 анионной формы (2,87 эВ) выше, чем у нейтральной молекулы (2,50 эВ). Данное обстоятельство требует дальнейшего исследования. Энергия сродства к электрону и потенциал ионизации триплетного состояния были оценены тремя разными способами: 1) как разница энергии

T_1 , рассчитанной на основании геометрии состояния S_0 ($E_{T_1}^{vert}$), и потенциала ионизации (энергии сродства к электрону) основного состояния ($IP_{S_0}-E_{T_1}^{vert}$ и $EA_{S_0}-E_{T_1}^{vert}$, соответственно); 2) как разница IP_{S_0} (EA_{S_0}) и адиабатической энергии триплета $E_{T_1}^{adia}$ ($IP_{S_0}-E_{T_1}^{adia}$ и $EA_{S_0}-E_{T_1}^{adia}$, соответственно); 3) как относительная энергия катион-радикала IP_{T_1} (для анион-радикала - EA_{T_1}), рассчитанная на основании равновесной геометрии T_1 . На наш взгляд, подход (3) наиболее адекватен для расчета потенциала ионизации и энергии сродства к электрону состояния T_1 , поскольку оперирует с оптимизированной геометрией T_1 . Однако, поскольку DFT расчет систематически занижает энергию триплета, полезно также оперировать величинами $IP_{S_0}-E_{T_1}^{adia}$ и $EA_{S_0}-E_{T_1}^{adia}$. В то же время, использование подхода (1), применявшегося в работе H.F. Ji и L. Shen [Ji, Shen, 2011] для расчета потенциала ионизации и энергии сродства к электрону триплетного состояния птерина, наименее корректно.

Для того чтобы оценить вероятность протекания реакций образования АФК требуется найти энергию синглетного молекулярного кислорода и энергию супероксид-анион радикала. Для того чтобы найти энергию $^1\Delta_g$ синглетного состояния кислорода, мы использовали процедуру коррекции спина по Ямагучи [Yamaguchi et al., 1988]:

$$\Psi_{(UB)} = c_s^1\phi + c_T^3\phi$$

$$^1E_{(SC)} = ^1E_{(UB)} + f_{SC}[^1E_{(UB)} - ^3E_{(UB)}]$$

$$f_{SC} = c_T^2 / (1 - c_s^2) \approx \langle S^2 \rangle / (\langle S^2 \rangle - \langle S^2 \rangle)$$

где $^1E_{(UB)}$ и $^3E_{(UB)}$ – посчитанные методом (U)B3LYP/6-311G++(2d,2p)//B3LYP/6-31G+(d,p) энергии синглетного и триплетного состояний, соответственно; $^1E_{(SC)}$ – скорректированная по спину энергия синглета; c_s^1 и c_T^3 – коэффициенты чистого синглетного и чистого триплетного компонентов волновой функции; $\Psi_{(UB)}$ – синглетная волновая функция; $^1\phi$ и $^3\phi$ – чистая синглетная и триплетная волновые функции, соответственно; f_{SC} – доля «загрязнения» спина; $\langle S^2 \rangle$ – собственное значение оператора спина.

Таблица 17. Значения энергии активных форм кислорода: сопоставлены полученные нами методом B3LYP/6-311G++(2d,2p)//B3LYP/6-31G+(d,p) расчетные данные и экспериментальные данные, известные из литературы.

АФК	E^{B3LYP} , эВ	$E^{эксп.}$, эВ
$^1\Delta_g$	0,89	0,98 [Klán, Wirz, 2009]
$^1\Sigma_g^+$	1,65	1,64 [Klán, Wirz, 2009]
$O_2^{\bullet-}$	-3,58	-3,5 [Goebbert, Sanov, 2009]

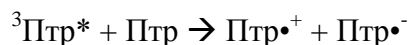
Энергия состояния $^1\Delta_g$ синглетного кислорода, согласно нашим расчетам, составила 0,89 эВ, а относительная энергия другого, менее стабильного состояния $^1\Sigma_g^+$, составила 1,65 эВ. Относительная энергия супероксид-анион радикала, или энергия сродства к электрону молекулярного кислорода, составила -3,58 эВ (Таблица 17).

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_{T1} птериновой молекулы и относительная энергия $O_2^{\bullet-}$ при суммировании дают отрицательное значение.

Все птерины имеют значения $E_{T1} \gg 1,65$ эВ, т.е. все рассмотренные молекулы способны в триплетном состоянии генерировать как $^1\Delta_g$, так и $^1\Sigma_g^+$ состояние синглетного кислорода, что согласуется с известными литературными данными [Oliveros et al., 2011]. Разница энергий E_{T1} и E_{S1} составляет порядка 0,7-0,8 эВ, и этого, напротив, недостаточно для переноса энергии с образованием синглетного кислорода.

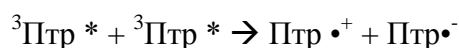
Для того чтобы участвовать в реакции переноса электрона на O_2 триплетное состояние должно иметь потенциал ионизации выше 3,58 эВ. Как следует, из Таблицы 16, анионные формы всех птеринов, кроме Кап и Фоп, способны участвовать в переносе электрона ($IP_{T1} + E(O_2^{\bullet-}) < 0$). Все нейтральные формы молекул, напротив, в переносе электрона не участвуют ($IP_{T1} + E(O_2^{\bullet-}) > 0$). Как видно из Таблицы 16, наиболее высокое значение IP_{T1} имеют соединения с наиболее электроотрицательными заместителями (-формил, -карбоксил). Отметим, что в отличие от работы Н.Ф. Ji и L. Shen [Ji, Shen, 2011], в которой утверждается возможность образования супероксид-анион радикала путем переноса электрона (e^-) с триплетного состояния птерина как нейтральной, так и анионной формы, мы утверждаем что перенос e^- на O_2 возможен только с анионной формы молекулы птерина.

Оценим возможность протекания реакции автоионизации между триплетным и основным состояниями птеринов:



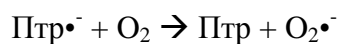
Оценить возможность протекания реакции автоионизации можно, сопоставив значения E_{AT1} и IP_{S0} : если при суммировании $E_{AT1} + IP_{S0} < 0$, то реакция возможна. Мы выяснили, что данная реакция не характерна ни для одной из молекул птеринов (включая как нейтральные, так и анионные формы), поскольку для всех молекул $E_{AT1} + IP_{S0} > 0$.

Возможность протекания реакции автоионизации между двумя молекулами в триплетном состоянии:



оценивается значениями параметров IP_{T1} и EA_{T1} . Если при суммировании $IP_{T1} + EA_{T1} < 0$, то реакция возможна. Мы установили, что во всех случаях $EA_{T1} + EA_{S0} < 0$, и данная реакция возможна для всех шести птериновых молекул.

Реакция переноса электрона с анион-радикала птерина на молекулярный кислород выглядит следующим образом:



Возможность реакции между анион-радикалом птерина и O_2 определяется значением EA_{S0} и энергией супероксид анион-радикала $E(O_2\cdot^-)$: если $E(O_2\cdot^-) - EA_{S0} < 0$, то реакция возможна. Мы установили, что во всех случаях $E(O_2\cdot^-) - EA_{S0} < 0$, и, таким образом, реакция переноса электрона с $Птр\cdot^-$ на O_2 возможна для всех рассмотренных птериновых молекул.

Исходя из того, что нейтральные формы птеринов не участвуют в реакции переноса электрона, а анионные формы, напротив, в большинстве своем участвуют, квантовый выход генерации синглетного кислорода должен быть выше у нейтральных молекул, в то время как, согласно экспериментальным данным, напротив, анионные формы всегда имеют квантовый выход генерации синглетного кислорода выше, чем нейтральные формы (Таблица 15). Одно из возможных объяснений данному явлению следующее. Квантовый выход генерации 1O_2 зависит от скорости переноса энергии на O_2 (k_{et}) и квантового выхода образования триплетов Φ_T . По-видимому, несмотря на возможность реакции переноса электрона анионными формами на O_2 (процессы переноса электрона и энергии с триплетного птерина являются конкурирующими), скорость переноса энергии k_{et} анионными и нейтральными формами птеринов сопоставима. В таком случае разница Φ_{Δ} анионных и нейтральных форм определяется разницей величины квантового выхода триплетов Φ_T , который, в свою очередь, зависит от скорости конкурирующих процессов: флуоресценции и внутренней конверсии. В процессах внутренней конверсии существенную роль играют X-H связи (X – тяжелый атом: N, O или C) [Майер и др., 1993]. Колебания N-H связей играют существенную роль в дезактивации возбужденных синглетных состояний пуринов путем внутренней конверсии [Sobolewski, Domcke, 2002; Sobolewski et al., 2002], и мы показали важность этого процесса для дезактивации возбужденных состояний восстановленных птеринов. Роль атом водорода в N3 положении, вероятно, также может быть связана с процессами релаксации птериновой структуры путем колебания связи N3-H. Мы предполагаем, что вследствие отсутствия водорода в N3 положении у анионных форм птеринов, скорость внутренней конверсии может падать, а Φ_T , напротив, возрастать.

Процессы агрегации также негативно влияют на генерацию синглетного кислорода. Негативное влияние на процесс генерации $^1\text{O}_2$ оказывают как комплексы между молекулами сенсibilизатора, находящегося в основном состоянии, так и в возбужденном состоянии (эксимеры) [Schweitzer, Schmidt, 2003]. Строение птеринов указывает на то, что агрегация возможна путем π - π стэкинга и образования водородных связей. Данные процессы хорошо изучены, например, для фталоцианинов [Nyokong T., Ahsen V., 2012]. Хорошо известен π - π стэкинг азотистых оснований нуклеиновых кислот [Luo et al., 2001]. Упомянутые процессы, по-видимому, возможны только для нейтральных форм птеринов. Анионные формы, очевидно, не могут образовывать комплексы друг с другом, поскольку несут отрицательный заряд. Вследствие этого нейтральные формы имеют более низкие значения Φ_Δ в сравнении с анионными формами соответствующих птеринов.

3.3.2. QSPR анализ генерации синглетного кислорода птеридинами

Получено 4 модели, предсказывающих квантовый выход генерации синглетного кислорода птеридинами. Модели представлены ниже.

Модель 1 (уравнение Q1) показывает, что логарифм квантового выхода генерации синглетного кислорода зависит от растворимости и энергии НОМО орбитали:

$$\text{Log } \Phi_\Delta = -16,01 - 1,808 \times E_{\text{HOMO}} - 0,242 \times \text{Molecular_Solubility} \quad (Q1)$$

E_{HOMO} (вклад -88,7%) – энергия высшей занятой молекулярной орбитали НОМО, рассчитанная полуэмпирическим методом AM1. Поскольку E_{HOMO} имеет отрицательное значение, корреляция $\text{Log } \Phi_\Delta$ и E_{HOMO} носит обратную зависимость. Согласно теореме Купманса, энергия НОМО орбитали молекулы приближенно равна потенциалу ионизации, взятому с обратным знаком. Потенциал ионизации – энергия, требуемая для отрыва электрона от молекулы. Чем выше потенциал ионизации фотосенсibilизатора, тем выше значение f_T^Δ (эффективность генерации $^1\text{O}_2$), то есть тушение возбужденных молекул такого фотосенсibilизатора идет преимущественно путем переноса энергии [Schweitzer, Schmidt, 2003]. Согласно Модели 1, чем выше потенциал ионизации молекулы, тем выше квантовый выход генерации синглетного кислорода. Коэффициент детерминации, равный 0,806 для корреляция между $\text{Log } \Phi_\Delta$ и энергией НОМО орбитали (Рис. 47), указывает на то, что именно этот дескриптор крайне важен для модели. Как следует из Таблицы 18, наиболее низкое значение E_{HOMO} имеют люмазин и 6-карбоксихтерин.

Таблица 18. Значения молекулярных дескрипторов для птеридиновых молекул.

№	Соединение	Е НОМО (эВ)	Растворимость	Электроотрицательность (эВ)	Дипольный момент (Д)	Плотность дипольного момента (Кл м ⁻²)	Электростатический заряд N3
1	6-Метил-аллоказин	-9,44	-2,47	5,45	3,96	0,063	-0,639
2	7-Метил-аллоказин	-9,40	-2,49	5,42	4,48	0,071	-0,638
3	8-Метил-аллоказин	-9,55	-2,49	5,50	4,64	0,073	-0,639
4	9-Метил-аллоказин	-9,42	-2,47	5,44	4,24	0,067	-0,636
5	6-Биоптерин	-9,19	-1,15	5,08	3,56	0,055	-0,725
6	6-Карбоксиптерин	-9,70	-1,09	5,65	8,35	0,161	-0,684
7	6,7-Диметилптерин	-9,07	-1,55	4,99	2,59	0,048	-0,729
8	ФАД	-8,85	-1,89	5,22	6,26	0,032	-0,624
9	ФМН	-9,20	-2,2	5,45	6,71	0,057	-0,665
10	Фолиевая кислота (ФК)	-8,89	-3,97	4,97	4,40	0,036	-0,719
11	6-Формилптерин	-9,49	-1,05	5,45	5,94	0,119	-0,689
12	6-Био-7,8-дигидроптерин	-8,31	-0,87	4,46	7,25	0,110	-0,692
13	7,8-Дигидро-ФК	-8,35	-3,62	4,47	6,92	0,057	-0,688
14	6-Формил-7,8-дигидроптерин	-8,44	-0,78	4,66	7,54	0,148	-0,659
15	7,8-Дигидронеоптерин	-8,37	-0,41	4,52	7,36	0,108	-0,657
16	7,8-Дигидроксантоптерин	-8,25	-0,09	4,41	6,73	0,143	-0,762
17	6-Гидрокси метилптерин	-9,25	-0,60	5,15	4,08	0,080	-0,704
18	Люмазин	-9,98	-0,62	5,63	3,71	0,088	-0,631
19	Люмихром	-9,37	-2,98	5,39	4,97	0,072	-0,633
20	Люмифлавин	-9,17	-3,12	5,41	8,35	0,112	-0,697
21	12-N-Метил-ФК	-8,85	-3,79	4,89	2,45	0,019	-0,7
22	6-Метилптерин	-9,14	-1,14	5,05	2,75	0,056	-0,721
23	Неоптерин	-9,38	-0,63	5,28	5,51	0,083	-0,708
24	Птероевая кислота	-8,80	-2,98	4,95	5,61	0,065	-0,686
25	Птерин	-9,31	-0,74	5,15	3,26	0,075	-0,687
26	Рамноптерин	-9,22	-1,20	5,12	3,61	0,050	-0,713
27	Рибофлавин	-9,31	-2,81	5,55	6,44	0,061	-0,667
28	Сепиаптерин	-8,45	-1,25	4,65	8,31	0,129	-0,569
29	6-(Тетрагидроксибутил)-птерин	-9,37	-0,95	5,26	4,62	0,058	-0,686

Molecular_Solubility (вклад -11,3%) – молекулярная растворимость в воде. Молекулярная растворимость выражается в $\text{Log } S$, где S – растворимость в моль л⁻¹. Растворимость рассчитывалась по методу, разработанному Tetko I.V. с соавторами [Tetko et al., 2001]. Корреляция между $\text{Log } \Phi_A$ и *Molecular_Solubility* носит обратную зависимость, то есть чем ниже растворимость молекулы в воде, тем выше квантовый выход генерации синглетного кислорода. Полярные растворители усиливают индуцированную переносом заряда дезактивацию ¹O₂ [Schweitzer and Schmidt, 2003]. Возможно, объемные заместители малорастворимых молекул ограничивают доступ молекул воды к эксиплексу, образуемому в ходе переноса заряда, вследствие чего интенсивность тушения ¹O₂ такими молекулами ниже. Другое возможное объяснение

связано с тем, что слабо растворимые птеридины могут агрегировать в воде, что, в свою очередь, может снижать скорость тушения $^1\text{O}_2$. Наиболее низкая растворимость наблюдается у молекул ФАД, фолиевой кислоты и 12-N-метил-ФК, наиболее высокая – у дигидронеоптерина, дигидроксантоптерина и их аналогов.

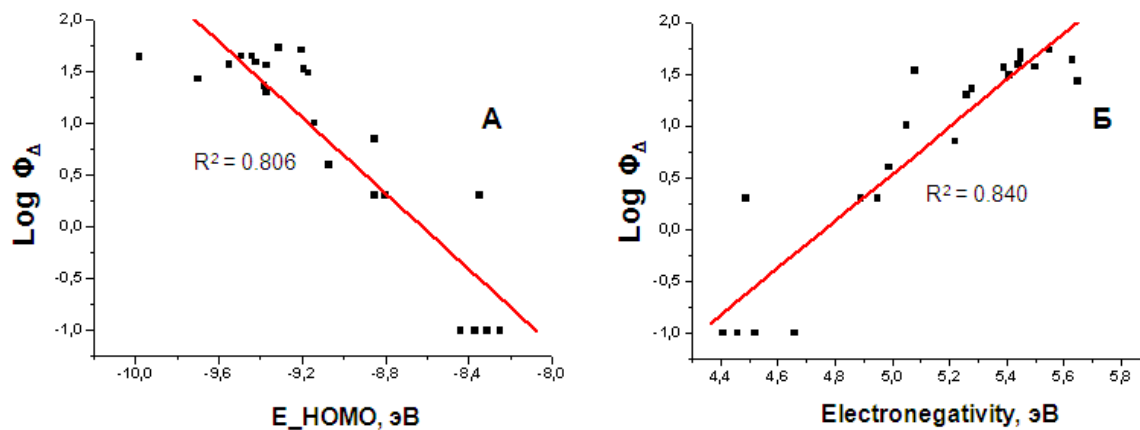


Рис. 47. А. Линейная зависимость экспериментального значения $\text{Log } \Phi_{\Delta}$ от энергии НОМО орбитали ($E_{\text{НОМО}}$). Б. Линейная зависимость экспериментального значения $\text{Log } \Phi_{\Delta}$ от абсолютной электроотрицательности (Electronegativity).

Мы сравнили точность метода AM1 с другими полуэмпирическими методами - PM3, PM6, MNDO, а также с методом B3LYP/6-31G(d,p). Коэффициенты детерминации для корреляции между энергией НОМО и $\text{Log } \Phi_{\Delta}$ были следующими: $R^2_{\text{AM1}} = 0,806$, $R^2_{\text{PM3}} = 0,786$, $R^2_{\text{PM6}} = 0,665$, $R^2_{\text{MNDO}} = 0,753$ и $R^2_{\text{B3LYP}} = 0,800$. Таким образом, метод AM1 был наиболее точен среди полуэмпирических методов и показывает такую же степень корреляции, как и B3LYP/6-31G(d,p). Возможно, более высокая в сравнении с B3LYP степень корреляции между значениями дескрипторов, рассчитанных методом AM1, и $\text{Log } \Phi_{\Delta}$ связана с тем, что оптимизацию геометрии проводили с помощью AM1. Оптимизацию геометрии методом B3LYP не проводили, поскольку соответствующие расчеты требуют чрезмерных затрат компьютерного времени. Известно, что полуэмпирический метод AM1 имеет высокий уровень корреляции с расчетными данными, полученными методом B3LYP [Kim et al., 2013], а также с результатами *ab initio* расчетов и экспериментальными данными [Karelson et al., 1996].

Модель 1 имеет удовлетворительные статистические параметры (Таблица 19). Тем не менее, мы попытались модифицировать Модель 1, чтобы улучшить ее предсказательную способность. Выяснилось, что параметр абсолютной электроотрицательности в большей степени коррелирует с $\text{Log } \Phi_{\Delta}$, чем $E_{\text{НОМО}}$: $R^2 =$

0,840 и $R^2 = 0,806$, соответственно (Рис. 47). Электроотрицательность рассчитывается следующим образом:

$$\text{Electronegativity} = - (E_{HOMO} + E_{LUMO})/2$$

, где E_{LUMO} – энергия нижней свободной молекулярной орбитали.

Таблица 19. Статистические параметры QSPR моделей, полученных методом множественной линейной регрессии.

№	Параметр	Модель 1	Модель 2	Модель 3	Модель 4
1	R	0,937	0,933	0,949	0,961
2	R^2	0,879	0,871	0,900	0,924
3	R^2_{adj}	0,867	0,859	0,891	0,912
4	q^2	0,833	0,818	0,861	0,881
5	pred_ R^2	0,777	0,904	0,858	0,873
6	RMSE	0,360	0,371	0,326	0,293
7	LOF	0,224	0,240	0,184	0,223
8	Максимальная абсолютная ошибка Φ_{Δ} (%)	36,8	26,1	26,3	21,4
9	RMS абсолютная ошибка Φ_{Δ} (%)	24,8	17,8	11,4	9,8

В этой связи мы построили Модель 2. Модель 2 (уравнение Q2) связывает величину $\text{Log } \Phi_{\Delta}$ с электроотрицательностью и дипольным моментом:

$$\text{Log } \Phi_{\Delta} = -9,932 - 0,086 \times \text{Dipole} + 2,193 \times \text{Electronegativity} \quad (Q2)$$

Вклад дескриптора *Electronegativity* в Модель 2 составляет 89,7%, то есть *Electronegativity* вносит основной вклад в Модель 2. Зависимая переменная $\text{Log } \Phi_{\Delta}$ напрямую зависит от электроотрицательности. Параметр электроотрицательности является мерой способности молекулы притягивать электроны. J. Morales и соавторы показали, что логарифм k_q^{Δ} (суммарная константа физического и химического тушения $^1\text{O}_2$) линейно зависит как от энергии НОМО, так и от отрицательности [Morales et al., 2012]. Данная зависимость указывает на влияние взаимодействий, связанных с переносом заряда, в ходе которых молекула-тушитель является донором электрона, и это отражается в увеличении k_q^{Δ} с ростом энергии НОМО и убыванием значения электроотрицательности. По-видимому, корреляция между f_T^{Δ} и электроотрицательностью также возможна, поскольку и k_q^T (константа тушения триплетов сенсibilизатора) и k_q^{Δ} обычно имеют обратную корреляцию с потенциалом ионизации, k_q^T имеет обратную зависимость с f_T^{Δ} , а f_T^{Δ} коррелирует с потенциалом ионизации

[Schweitzer, Schmidt, 2003]. Наиболее высокие значения данного параметра отмечаются для 6-карбокситерина, люмазина и рибофлавина.

Dipole (-10,3%) – дипольный момент молекулы. $\text{Log } \Phi_{\Delta}$ имеет обратную корреляцию с *Dipole*. Одно из возможных объяснений роли дипольного момента 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 $^1\text{O}_2$ [Минаев, 2009]. Наиболее низкие значения электрического дипольного момента имеют диметилптерин, метилптерин и птерин (Таблица 18).

Следующим нашим шагом было пронормировать величину дипольного момента на размер молекулы, а именно на ее объем. Поэтому в Модель 3 (уравнение Q3) мы ввели показатель плотности электрического дипольного момента [Mansuripur, 2011]:

$$\text{Log } \Phi_{\Delta} = -9,865 + 2,184 \times \text{Electronegativity} - 6,169 \times \text{Dipole_density} \quad (Q3)$$

Вклад параметра *Electronegativity* в Модель 3 составляет 87,4%.

Dipole_density (-12,6%) - плотность электрического дипольного момента (дипольный момент молекулы, нормированный на ее объем). Корреляция между $\text{Log } \Phi_{\Delta}$ и *Dipole_density* так же, как и в случае с электрическим дипольным моментом в Модели 2, носит обратную зависимость. По-видимому, влияние плотности диполя на Φ_{Δ} также можно объяснить диполь-дипольным безызлучательным переносом энергии и тушением $^1\text{O}_2$. Наиболее низкие значения плотности диполя имеют молекулы ФАД и фолиевой кислоты.

Все статистические параметры Модели 3 превосходят аналогичные параметры Модели 2, за исключением показателя pred_R^2 (Таблица 19).

Модель 4 (уравнение Q4) связывает значение $\text{Log } \Phi_{\Delta}$ с тремя дескрипторами и является улучшенной версией Модели 3:

$$\begin{aligned} \text{Log } \Phi_{\Delta} = & -13,958 - 4,659 \times \text{Electrostatic_N3} + 2,371 \times \text{Electronegativity} \\ & - 6,571 \times \text{Dipole_density} \quad (Q4) \end{aligned}$$

Вклад параметра *Electronegativity* в Модель 4 составляет 79,7%.

Вклад параметра *Dipole_density* в Модель 4 составляет -11,5%.

Electrostatic_N3 (-8,7%) – электростатический заряд атома азота в положении N3 птеридиновой структуры (Рис. 10). 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 потенциала при N3 имеют дигидроксантиоптерин, 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 электростатического заряда N3 атома связано с переносом заряда с неподеленной электронной пары азота (аминогруппы в C2 положении или азота N3) на $^1\text{O}_2$, что ведет к тушению $^1\text{O}_2$ [Minaev, 1984; Darmany et al., 1998].

Отметим, что, как следует из работы E. Oliveros с соавторами [Oliveros et al., 2011], константы тушения синглетного кислорода обратно пропорциональны значениям Φ_{Δ} . Так, например диметилптерин, метилптерин и рамноптерин имеют наиболее высокие значения среди окисленных форм птеринов констант тушения синглетного кислорода: $31 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ и $3,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, соответственно. Эти же соединения имеют наиболее низкие значения Φ_{Δ} среди рассматриваемых в работе E. Oliveros птеринов: диметилптерин – 4%, метилптерин – 10% и рамноптерин – 13%, соответственно. Это еще раз свидетельствует в пользу того, что f_{T}^{Δ} и k_{q}^{Δ} имеют обратную корреляцию.

Считается, что QSPR модель имеет предсказательную способность, если удовлетворяются следующие условия: $R^2 > 0,6$, $q^2 > 0,6$ и $\text{pred}_R^2 > 0,5$. Статистические параметры указывают на то, что все модели обладают хорошей внутренней и внешней предсказательной способностью (Таблица 19). Модель 4 демонстрирует лучшие показатели в предсказании активности соединений как для тренировочного ($q^2 = 0,881$), так и для тестового набора соединений ($\text{pred}_R^2 = 0,873$). Максимальная ошибка абсолютного значения Φ_{Δ} и среднеквадратичная ошибка абсолютного значения Φ_{Δ} Модели 4 имеют наименьшие значения среди четырех моделей: 21,4% и 9,8%, соответственно. Значения Φ_{Δ} , полученные экспериментальным путем и предсказанные с помощью QSPR представлены в Таблице 20.

Итак, нами было получено четыре QSPR модели, позволяющих проводить предварительную оценку величины Φ_{Δ} для птеридинов. Лучшая из представленных моделей (Модель 4) связывает эффективность генерации $^1\text{O}_2$ птеридинами с тремя дескрипторами: электроотрицательностью, плотностью дипольного момента и электростатическим зарядом атома N3 (Рис. 10). Данная модель обладает высокой

внутренней стабильностью ($q^2 = 0,881$), а также высокой предсказательной способностью относительно тестовой выборки соединений ($\text{pred}_R^2 = 0,873$).

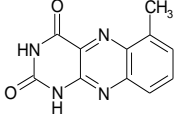
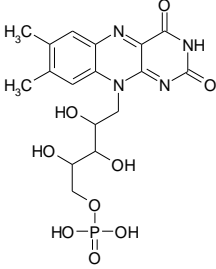
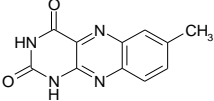
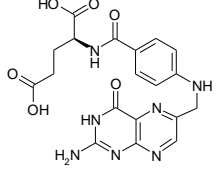
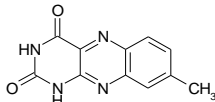
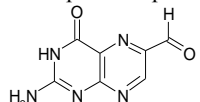
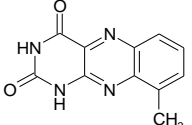
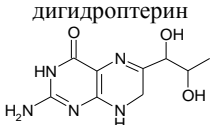
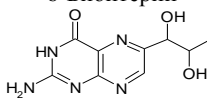
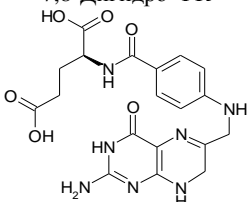
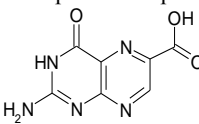
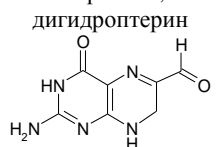
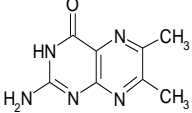
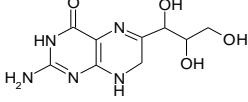
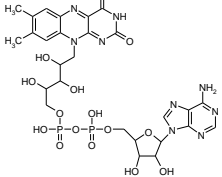
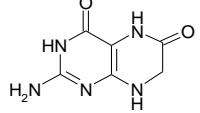
Способность птерицинов генерировать синглетный кислород в значительной мере коррелирует с энергией НОМО орбитали ($R^2 = 0,806$) и электроотрицательностью ($R^2 = 0,840$). Широко известно, что энергия НОМО, взятая с обратным знаком, равна потенциалу ионизации. С ростом потенциала ионизации растет эффективность генерации синглетного кислорода, f_T^A , и падает скорость тушения триплетов синглетным кислородом, k_q^T ; с уменьшением потенциала ионизации, эффективность генерации 1O_2 , напротив, падает [Schweitzer, Schmidt, 2003]. Для многих групп соединений показано, что скорость тушения синглетного кислорода тоже зависит от потенциала ионизации. Мы полагаем что энергия НОМО и электроотрицательность вносят основной вклад в Модели 1-4, поскольку молекулы имеют схожее строение (все имеют птерициновую систему) и энергия триплета отличается незначительно у разных птерициновых молекул. Таким образом, наши результаты, полученные методом QSPR, не противоречат известным данным о генерации синглетного кислорода.

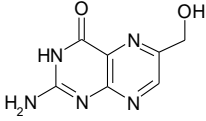
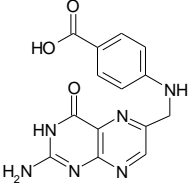
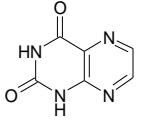
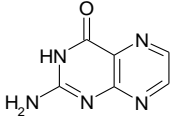
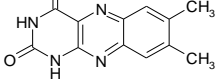
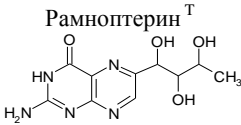
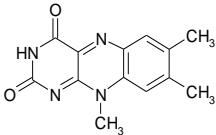
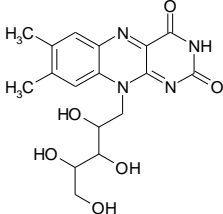
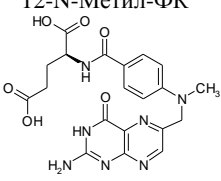
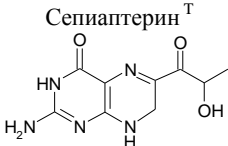
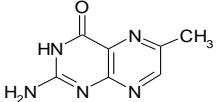
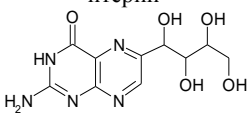
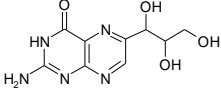
Возможно, полученные нами уравнения имеют тенденцию преувеличивать вклад процессов тушения 1O_2 (дескрипторы: растворимость в воде, электрический дипольный момент, плотность дипольного момента, электростатический заряд атома N3. Однако, поскольку скорость люминесценции 1O_2 в D_2O невысока, высока концентрация 1O_2 и вклад процессов физического и химического тушения 1O_2 ($k_q^A[O_2]$) в D_2O выше, чем в H_2O . Представляет интерес дальнейший QSPR анализ квантового выхода генерации 1O_2 в других растворителях, как полярных, так и неполярных, с целью оценки влияния процессов тушения 1O_2 в этих растворителях. Тем не менее, все наши наблюдения согласуются с механизмом переноса заряда в ходе дезактивации 1O_2 электрон-насыщенными молекулами [Schweitzer, Schmidt, 2003; Minaev, 1985].

Таким образом, QSPR метод применим к исследованию процессов фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода, дает адекватные результаты и позволяет предсказывать квантовый выход генерации 1O_2 .

Мы надеемся, что полученные нами модели будут полезны для предварительного скрининга и последующего синтеза птерициновых сенсibilизаторов с высокой эффективностью генерации 1O_2 .

Таблица 20. Структура птеридинов, экспериментальная и предсказанная в рамках Модели 4 активность.

№	Соединение	Φ_{Δ} (%)	Log Φ_{Δ}		Раз- ность	№	Соединение	Φ_{Δ} (%)	Log Φ_{Δ}		Раз- ность
			Эксп.	Расч.					Эксп.	Расч.	
1	6-Метилаллоказин 	45	1.65	1.53	0.12	9	ФМН 	51	1.71	1.68	0.03
2	7-Метил-аллоказин 	42	1.62	1.40	0.22	10	Фолиевая кислота (ФК) 	2	0.30	0.94	-0.64
3	8-Метил-аллоказин 	37	1.57	1.58	-0.01	11	6-Формилптерин 	45	1.65	1.39	0.26
4	9-Метил-аллоказин 	39	1.59	1.45	0.14	12	6-Био-7,8- дигидроптерин 	0,1	-1.00	-0.89	-0.11
5	6-Биоптерин 	34	1.53	1.10	0.43	13	7,8-Дигидро-ФК 	2	0.30	-0.53	0.83
6	6-Карбоксиптерин 	27	1.43	1.56	-0.13	14	6-Формил-7,8- дигидроптерин 	0,1	-1.00	-0.81	-0.19
7	6,7-Диметилптерин 	4	0.60	0.95	-0.35	15	7,8-Дигидронеоптерин 	0,1	-1.00	-0.89	-0.11
8	ФАД 	7	0.85	1.11	-0.26	16	7,8- Дигидроксантоптерин 	0,1	-1.00	-0.90	-0.10

№	Соединение	Φ _Δ (%)	Log Φ _Δ		Раз- ность	№	Соединение	Φ _Δ (%)	Log Φ _Δ		Раз- ность
			Эксп.	Расч.					Эксп.	Расч.	
17	6-ОН-метилптерин ^Т 	15	1,18	1,01	0,17	24	Птероевая кислота 	2	0,30	0,54	-0,24
18	Люмазин 	44	1,64	1,76	-0,11	25	Птерин ^Т 	18	1,26	0,96	0,29
19	Люмихром 	36	1,56	1,30	0,26	26	Рамноптерин ^Т 	13	1,11	1,17	-0,06
20	Люмифлавин 	31	1,49	1,38	0,11	27	Рибофлавин 	54	1,73	1,89	-0,16
21	12-N-Метил-ФК 	2	0,30	0,76	-0,46	28	Сепиаптерин ^Т 	0,1	-1,00	-1,14	0,14
22	6-Метилптерин 	10	1,00	1,01	-0,01	29	6- (Тетрагидроксипентил) -птерин 	20	1,30	1,32	-0,02
23	Неоптерин 	23	1,36	1,30	0,06						

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных исследований в соответствии с поставленной целью диссертационной работы исследованы фотохимические свойства восстановленных, коферментных форм птеринов и проанализирована фотосенсибилизирующая активность их окисленных производных.

Установлены продукты фотоокисления кофермента 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина, показана возможность его фотосенсиблированного окисления по автокаталитическому механизму. Мы полагаем, что данный процесс (фотосенсиблированное окисление 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина) может протекать в депигментированных клетках кожи, пораженных витилиго, при воздействии УФ и вести к дальнейшему развитию патологии. Фотостабильность восстановленных форм птеринов также оценена с использованием теоретических методов.

Показано, как влияет изменение бокового заместителя в С6 положении окисленного птерина на его фотофизические свойства, в частности на реакции с молекулярным кислородом. Предложены расчетные методы, позволяющие проводить скрининг птериновых и флавиновых соединений относительно их способности генерировать синглетный кислород.

Продемонстрировано сходство природы возбужденных состояний восстановленных птеринов и фотостабильных пуриновых оснований ДНК. 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.

ВЫВОДЫ

1. Методами ВЭЖХ и ВЭЖХ-MS/MS-масс-спектрометрии установлены продукты, образующиеся при воздействии УФ на 5,6,7,8-тетрагидробиоптерин (Н₄Бип) в водном растворе в присутствии кислорода воздуха. Основными продуктами являются 7,8-дигидробиоптерин (Н₂Бип), димер (Н₂Бип)₂, 7,8-дигидроптерин, 7,8-дигидроксантиоптерин и 6-биоптерин (Бип).

2. Впервые показана возможность фотосенсибилизированного окисления Н₄Бип. В роли сенсибилизатора может выступать Бип - продукт окисления Н₄Бип. 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 (Φ_{Δ}) в зависимости от структуры птерицинов.

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 ОСНОВНЫХ 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. Photooxidation 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 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.
4. 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.

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 reaction 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. Study 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baier J., Maisch T., Maier M., Engel E., Landthaler M., Bäuml W. Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers // *Biophysical Journal*. 2006. – V. 91, No 4. – P. 1452-1459.
2. Barbatti M., Aquino A.J., Szymczak J.J., Nachtigallová D., Hobza P., Lischka H. Relaxation mechanisms of UV-photoexcited DNA and RNA nucleobases // *Proceedings of the National Academy Science USA*. 2010. – V. 107, No 50. – P. 21453-21458.
3. Becke A.D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange // *The Journal of Chemical Physics*. 1993. – V. 98. – P. 5648-5652.
4. Bielski B.H.J., Cabelli D.E., Arudi R.L. Reactivity of HO_2/O_2^- Radicals in Aqueous Solution // *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. 1985. – V. 14, No 4. – P. 1041-1100.
5. Binkley J.S., Pople J.A., Hehre W.J. Self-Consistent Molecular Orbital Methods. XXI. Small Split-Valence Basis Sets for First-Row Elements // *Journal of the American Chemical Society*. 1980. – V. 102, No 3. – P. 939-947.
6. Blair J.A., Pearson A.J. Kinetics and mechanism of the autoxidation of the 2- amino-4-hydroxy-5,6,7,8-tetrahydropteridines // *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 2*. 1974. – No. 1. – P. 80-88.
7. Braun A.M., Oliveros E. Application of singlet oxygen reactions: Mechanistic and kinetic investigations // *Pure and Applied Chemistry*. 1990. – V. 62, No 8. – P. 1467-1476.
8. Cabrerizo F.M., Petroselli G., Lorente C., Capparelli A.L., Thomas A.H., Braun A.M., Oliveros E. Substituent Effects on the Photophysical Properties of Pterin Derivatives in Acidic and Alkaline Aqueous Solutions // *Photochemistry and Photobiology*. 2005. – V. 81, No 5. – P. 1234–1240.
9. Cabrerizo F.M., Thomas A.H., Lorente C., Dantola M.L., Petroselli G., Erra-Balsells R., Capparelli A.L. Generation of reactive oxygen species during the photolysis of 6-hydroxymethylpterin in alkaline aqueous solutions // *Helvetica Chimica Acta*. 2004. – V. 87, No 2. – P. 349-365.
10. Cailliez F., Müller P., Gallois M., de la Lande A. ATP binding and aspartate protonation enhance photoinduced electron transfer in plant cryptochrome // *Journal of the American Chemical Society*. 2014. – V. 136, No 37. – P. 12974-12986.
11. Castaño C., Oliveros E., Thomas A.H., Lorente C. Histidine oxidation photosensitized by pterin: pH dependent mechanism // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2015. – V. 153. – P. 483-489.

12. Chahidi C., Aubailly M., Momzikoff A., Bazin M., Santus R. Photophysical and photosensitizing properties of 2-amino-4 pteridinone: a natural pigment // *Photochemistry and Photobiology*. 1981. – V. 33, No 5. – P. 641-649.
13. Chaudret R., Kiss Cs.F., Subramanian L.. Prediction of absorption wavelengths using a combination of semi-empirical quantum mechanics simulations and quantitative structure–property relationship modeling approaches // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2015. – V. 299. – P. 183–188.
14. Christie J.M., Arvai A.S., Baxter K.J., Heilmann M., Pratt A.J., O'Hara A., Kelly S.M., Hothorn M., Smith B.O., Hitomi K., Jenkins G.I., Getzoff E.D. Plant UVR8 Photoreceptor Senses UV-B by Tryptophan-Mediated Disruption of Cross-Dimer Salt Bridges // *Science*. 2012. – V. 335, No 6075. – P. 1492–1496.
15. Cloix C., Jenkins G.I. Interaction of the Arabidopsis UV-B-specific signaling component UVR8 with chromatin // *Molecular Plant*. 2008. – V. 1, No 1. – P. 118–128.
16. Crespo-Hernández C.E., Cohen B., Hare P.M., Kohler B. Ultrafast excited-state dynamics in nucleic acids // *Chemical Reviews*. 2004. – V. 104, No 4. – P. 1977-2020.
17. Daff S. NO synthase: structures and mechanisms // *Nitric Oxide*. 2010. – V. 23, No 1. – P. 1-11.
18. Dántola L.M., Gojanovich A.D., Thomas A.H. Inactivation of tyrosinase photoinduced by pterin // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012. – V. 424, No 3. – P. 568-572.
19. Dántola L.M., Zurbano B.N., Thomas A.H. Photoinactivation of tyrosinase sensitized by folic acid photoproducts // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2015. – V. 149. – P. 172-179.
20. Dántola M.L., Denofrio M.P., Zurbano B., Gimenez C.S., Ogilby P.R., Lorente C., Thomas A.H. Mechanism of photooxidation of folic acid sensitized by unconjugated pterins // *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2010a. – V. 9, No 12. – P. 1604-1612.
21. Dántola M.L., Thomas A.H., Oliveros E., Lorente C. Visible-light photochemistry of 6-formyl-7,8-dihydropterin in aqueous solution // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2010b. – V. 209, No 2-3. – P. 104-110.
22. Dántola M.L., Vignoni M., González C., Lorente C., Vicendo P., Oliveros E., Thomas A.H. Electron-transfer processes induced by the triplet state of pterins in aqueous solutions // *Free Radical Biology and Medicine*. 2010c. – V. 49, No 6. – P. 1014-1022.
23. Darmanyan A.P., Jenks W.S., Jardon P. Charge-Transfer Quenching of Singlet Oxygen $O_2(^1\Delta_g)$ by Amines and Aromatic Hydrocarbons // *Journal of Physical Chemistry A*. 1998. – V. 102, No 38. – P. 7420–7426.

24. Davis M.D., Kaufman S., Milstien S. Conversion of 6-substituted tetrahydropterins to 7-isomers via phenylalanine hydroxylase-generated intermediates // *Proceedings of the National Academy Science USA*. 1991. – V. 88, No 2. – P. 385-389.
25. Davis M.D., Ribeiro P., Tipper J., Kaufman S. "7-tetrahydrobiopterin," a naturally occurring analogue of tetrahydrobiopterin, is a cofactor for and a potential inhibitor of the aromatic amino acid hydroxylases // *Proceedings of the National Academy Science USA*. 1992. – V. 89, No 21. – P. 10109-10113.
26. Davis M.D., S. Kaufman, Milstien S. The auto-oxidation of tetrahydrobiopterin // *European Journal of Biochemistry*. 1988. – V. 173, No 2. – P. 345-351.
27. Denofrio M.P., Lorente C., Breitenbach T., Hatz S., Cabrerizo F.M., Thomas A.H., Ogilby P.R. Photodynamic effects of pterin on HeLa cells // *Photochemistry and Photobiology*. 2011. – V. 87, No 4. – P. 862-866.
28. Denofrio M.P., Ogilby P.R., Thomas A.H., Lorente C. Selective quenching of triplet excited states of pteridines // *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2014. – V. 13. – P. 1058-1065.
29. Denofrio M.P., Thomas A.H., Braun A.M., Oliveros E., Lorente C. Photochemical and photophysical properties of lumazine in aqueous solutions // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2008. – V. 200, No 2-3. – P. 282-286.
30. DeRosa M.C., Crutchley R.J. Photosensitized singlet oxygen and its applications // *Coordination Chemistry Reviews*. 2002. – V. 233-234, No 1. – P. 351-371.
31. Dewar M.J.S., Zoebisch E.G., Healy E.F., Stewart J.J.P. AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Model // *Journal of American Chemical Society*. 1985. – V. 107, No 13. – P. 3902-3909.
32. Eberlein G., Bruice T.C., Lazarus R.A., Henrie R., Benkovic S.J. The interconversion of the 5,6,7,8-tetrahydro-, 6,7,8-dihydro-, and radical forms of 6,6,7,7-tetramethyldihydropterin. A model for the biopterin center of aromatic amino acid mixed function oxidases // *Journal of the American Chemical Society*. 1984. – V. 106, No 25. – P. 7916–7924.
33. El-Sayed M.A. Spin-orbit coupling and the radiationless processes in nitrogen heterocyclics // *The Journal of Chemical Physics*. 1963. – V. 38. – P. 2834-2838.
34. Englman R., Jortner J. The energy gap law for radiationless transitions in large molecules // *Molecular Physics*. 1970. – V. 18, No 2. – P. 145–164.
35. Escalante-Semerena J.C., Leigh J.A., Rinehart K.L., Wolfe R.S. Formaldehyde activation factor, tetrahydromethanopterin, a coenzyme of methanogenesis // *Proceedings of the National Academy Science USA*. 1984. – V. 81, No 7. – P. 1976-1980.

36. Estelberger W., Mlekusch W., Reibnegger G. The conformational flexibility of 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin and 5,6,7,8-tetrahydroneopterin: a molecular dynamical simulation // *FEBS Letters*. 1995. – V. 357, No 1. – P. 37-40.
37. Firth C.A., Laing A.D., Baird S.K., Pearson J., Giese S.P. Inflammatory sites as a source of plasma neopterin: Measurement of high levels of neopterin and markers of oxidative stress in pus drained from human abscesses // *Clinical Biochemistry*. 2008. – V. 41, No 13. – P. 1078-1083.
38. Fitzpatrick P.F. Mechanism of aromatic amino acid hydroxylation // *Biochemistry*. 2003. – V. 42, No 48. – P. 14083–14091.
39. Foote C.S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation // *Photochemistry and Photobiology*. 1991. – V. 54, No 5. – P. 659.
40. Fox S.W., Dose K. *Molecular Evolution and the Origin of Life*. San Francisco: W.H. Freeman and Co., 1972. – p. 359.
41. Freedlander R.S., Parker R.T., Dunlap R.B. Phosphorescence studies of folate // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*. 1994. – V. 50, No 3. – P. 551-565.
42. Friedman J.H. Multivariate adaptive regression splines // *The Annals of Statistics*. 1991. – V. 19, No 1. – P. 1-67.
43. Frimayanti N., Yam M.L., Lee H.B., Othman R., Zain S.M., Rahman N.A. Validation of quantitative structure-activity relationship (QSAR) model for photosensitizer activity prediction // *International Journal of Molecular Sciences*. 2011. – V. 12, No 12. – P. 8626-8644.
44. Fujihashi M., Numoto N., Kobayashi Y., Mizushima A., Tsujimura M., Nakamura A., Kawarabayasi Y., Miki K. Crystal structure of archaeal photolyase from *Sulfolobus tokodaii* with two FAD molecules: implication of a novel light-harvesting cofactor // *Journal of Molecular Biology*. 2007. – V. 365, No 4. – P. 903-910.
45. Galland P., Senger H. The role of pterins in the photoreception and metabolism of plants // *Photochemistry and Photobiology*. 1988. – V. 48, No 6. – P. 811-820.
46. Goebbert D.J., Sanov A.J. Photodetachment, photofragmentation and fragment autodetachment of $[O_{2n}(H_2O)_m]^-$ clusters: Core-anion structures and fragment energy partitioning // *The Journal of Chemical Physics*. 2009. – V. 131, No 10. – P. 104308.
47. Gogonea V., Shy J.M. 2nd, Biswas P.K. Electronic structure, ionization potential, and electron affinity of the enzyme cofactor (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin in the gas phase, solution, and protein environments // *Journal of Physical Chemistry B*. 2006. – V. 110, No 45. – P. 22861-22871.
48. Granovsky A.A., Firefly version 8.0, <http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html>.

49. Haavik J., Doskeland A.P., Flatmark T. Stereoselective effects in the interactions of pterin cofactors with rat-liver phenylalanine 4-monooxygenase // *European Journal of Biochemistry*. 1986. – V. 160, No 1. – P. 1-8.
50. Halgren T.A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94 // *Journal of Computational Chemistry*. 1996. – V. 17, No 5-6. – P. 490–519.
51. Hasse S., Gibbons N.C., Rokos H., Marle L.K., Schallreuter K.U. Perturbed 6-tetrahydrobiopterin recycling via decreased dihydropteridine reductase in vitiligo: more evidence for H₂O₂ stress // *Journal of Investigative Dermatology*. 2004. – V. 122, No 2. – P. 307-313.
52. Hawkins M.E., Pfeleiderer W., Balis F.M., Porter D., Knutson J.R. Fluorescence properties of pteridine nucleoside analogs as monomers and incorporated into oligonucleotides // *Analytical Biochemistry*. 1997. – V. 244, No 1. – P. 86-95.
53. Head-Gordon M., Pople J.A., Frisch M.J. MP2 energy evaluation by direct methods // *Chemical Physics Letters*. 1988. – V. 153, No 6. – P. 503–506.
54. Hearst J.E. The structure of photolyase: using photon energy for DNA repair // *Science*. 1995. – V. 268, No 5219. – P. 1858-1859.
55. Heelis P.F. The photophysical and photochemical properties of flavins (izoalloxazines) // *Chemical Society Reviews*. 1982. – V. 11. – P. 15-39.
56. Hehre W.J., Ditchfield R., Pople J.A. A Self-Consistent Molecular Orbital Methods. 12. Further extensions of Gaussian-type basis sets for use in molecular-orbital studies of organic-molecules // *The Journal of Chemical Physics*. 1972. – V. 56. – P. 2257-2261.
57. Heinz B., Ried W. The formation of chromophores through amino acid thermolysis and their possible role as prebiotic photoreceptors // *Biosystems*. 1981. – V. 14, No 1. – P. 33-40.
58. Heinz B., Ried W., Dose K. Thermal generation of pteridines and flavins from amino acid mixtures // *Angewandte Chemie International Edition*. 1979. – V. 18. – P. 478-483.
59. Henderson B.W., Bellnier D.A., Greco W.R., Sharma A., Pandey R.K., Vaughan L.A., Weishaupt K.R., Dougherty T.J. An in vivo quantitative structure-activity relationship for a congeneric series of pyropheophorbide derivatives as photosensitizers for photodynamic therapy // *Cancer Research*. 1997. – V. 57, No 15. – P. 4000-4007.
60. Henry B.R., Kasha M. Radiationless Molecular Electronic Transitions // *Annual Review of Physical Chemistry*. 1968. – V. 19. – P. 161-192.
61. Hohenberg P., Kohn W. Inhomogeneous electron gas // *Physical Review B*. 1964. – V. 136, No 3. – P. 864-871.
62. <http://www.wavefun.com>.

63. Huang Y.Y., Mroz P., Zhiyentayev T., Sharma S.K., Balasubramanian T., Ruzié C., Krayer M., Fan D., Borbas K.E., Yang E., Kee H.L., Kirmaier C., Diers J.R., Bocian D.F., Holten D., Lindsey J.S., Hamblin M.R. In vitro photodynamic therapy and quantitative structure-activity relationship studies with stable synthetic near-infrared-absorbing bacteriochlorin photosensitizers // *Journal of Medicinal Chemistry*. 2010. – V. 53, No 10. – P. 4018-4027.
64. Hufton S.E., Jennings I.G., Cotton R.G. Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases // *Biochemical Journal*. 1995. – V. 311. – P. 353-366.
65. Iozumi K., Hoganson G.E., Pennella R., Everett M.A., Fuller B.B. Role of tyrosinase as the determinant of pigmentation in cultured human melanocytes // *Journal of Investigative Dermatology*. 1993. – V. 100, No 6. – P. 806-811.
66. Jaffe H.H., Miller A.L. The fates of electronic excitation energy // *Journal of Chemical Education*. 1966. – V. 43, No 9. – P. 469-473.
67. Jain A., Mal J., Mehndiratta V., Chander R., Patra S.K. Study of oxidative stress in vitiligo // *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2011. – V. 26, No 1. – P. 78-81.
68. Ji H.-F., Shen L. Mechanistic Study of ROS-photogeneration by Pterin // *Pteridines*. 2011. – V. 22, No 1. – P. 73-76.
69. Karelson M., Lobanov V.S., Katritzky A.R. Quantum-Chemical Descriptors in QSAR/QSPR Studies // *Chemical Reviews*. 1996. – V. 96, No 3. – P. 1027-1044.
70. Kaufman S. A New Cofactor Required for the Enzymatic Conversion of Phenylalanine to Tyrosine // *The Journal of Biological Chemistry*. 1958. – V. 230, No 2. – P. 931-939.
71. Kim C.K., Kim M.R., Lee H.W. Prediction of Physicochemical Properties of Organic Molecules Using Semi-Empirical Methods // *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2013. – V. 34, No 4. – P. 1043-1046.
72. Kirsch M., Korth H.G., Stenert V., Sustmann R., De Groot H. The autoxidation of tetrahydrobiopterin revisited // *The Journal of Biological Chemistry*. 2003. – V. 278, No 27. – P. 24481–24490.
73. Kisker C., Schindelin H., Baas D., Rétey J., Meckenstock R.U., Kroneck P.M. A structural comparison of molybdenum cofactor-containing enzymes // *FEMS Microbiology Reviews*. 1998. – V. 22, No 5. – P. 503-521.
74. Klamt A. Conductor-like screening model for real solvents: A new approach to the quantitative calculation of solvation phenomena // *The Journal of Physical Chemistry*. 1995. – V. 99, No 7. – P. 2224-2235.
75. Klamt A., Schüürmann G. COSMO: A new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient // *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*. 1993. – No 5. – P. 799-805.

76. Klán P., Wirz J. Photochemistry of Organic Compounds: From Concepts to Practice. Chichester: Wiley, 2009. – p. 582.
77. Kliebenstein D.J., Lim J.E., Landry L.G., Last R.L. Arabidopsis UVR8 regulates ultraviolet-B signal transduction and tolerance and contains sequence similarity to human regulator of chromatin condensation 1 // *Plant Physiology*. 2002. – V. 130, No 1. – P. 234-243.
78. Knak A., Regensburger J., Maischa T., Bäuml W. Exposure of vitamins to UVB and UVA radiation generates singlet oxygen // *Photochemical Photobiological Sciences*. 2014. – V. 13, No 5. – P. 820-829.
79. Kohn W., Sham L.J. Self-consistent equations including exchange and correlation effects // *Physical Review*. 1965. – V. 140, No 4. – P. 1133-1138.
80. Kramarenko G.G., Hummel S.G., Martin S.M., Buettner G.R. Ascorbate reacts with singlet oxygen to produce hydrogen peroxide // *Photochemistry and Photobiology*. 2006. – V. 82, No 6. – P. 1634-1637.
81. Krasnovsky A.A., Chernyshova E.V., Kritsky M.S. Investigation of the role of active oxygen forms in flavin photosensitized oxygenation of NADH // *Biokhimiya*. 1987. – V. 52, No 9. – P. 1474-1483.
82. Krishnan R., Binkley J.S., Seeger R., Pople J.A. Self-Consistent Molecular Orbital Methods. XX. A Basis Set for Correlated Wavefunctions // *The Journal of Chemical Physics*. 1980. – V. 72, No 1. – P. 650-654.
83. Kritsky M.S., Lyudnikova T.A., Mironov E.A., Moskaleva I.V. The UV radiation-driven reduction of pterins in aqueous solution // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1997. – V. 39, No 1. – P. 43-48.
84. Kritsky M.S., Lyudnikova T.A., Slutsky E.S., Filimonenkov A.A., Tikhonova T.V., Popov V.O. Photoexcited flavins and pterins as electron injectors for multiheme cytochrome // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2009. – V. 424. – P. 16-19.
85. Kritsky M.S., Telegina T.A., Lyudnikova T.A., Umrikhina A.V., Zemskova Y. Participation of free radicals in photoreduction of pterins and folic acid // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2001. – V. 380. – P. 336-338.
86. Ledbetter J.W.Jr., Pfleiderer W., Freisheim J.H. Photosensitized reduction of L-biopterin in the Active Ternary Complex of Dihydrofolate Reductase // *Photochemistry and Photobiology*. 1995. – V. 62, No 1. – P. 71-81.
87. Lee C., Yang W., Parr R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density // *Physical Review B*. 1988. – V. 37, No 2. – P. 785-789.

88. Lee H.W., Oh C.H., Geyer A., Pfeleiderer W., Park Y.S. Characterization of a novel unconjugated pteridine glycoside, cyanopterin, in *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999. - V. 1410, No 1. – P. 61-70.
89. Li H., Raman C.S., Glaser C.B., Blasko E., Young T.A., Parkinson J.F., Whitlow M., Poulos T.L. Crystal structures of zinc-free and -bound heme domain of human inducible nitric-oxide synthase. Implications for dimer stability and comparison with endothelial nitric-oxide synthase // *The Journal of Biological Chemistry*. 1999. – V. 274, No 30. – P. 21276-21284.
90. Liu B., Liu H., Zhong D., Lin C. Searching for a photocycle of the cryptochrome photoreceptors // *Current Opinion in Plant Biology*. 2010. – V. 13, No 5. – P. 578-586.
91. Liu H., Wen Y., Luan F., Gao Y., Li X. Quantitative structure-lambda(max) relationship study on flavones by heuristic method and radial basis function neural network // *Analytica Chimica Acta*. 2009. – V. 649, No 1. – P. 52-61.
92. Lorente C., Petroselli G., Dántola M.L., Oliveros E., Thomas A.H. Electron Transfer Initiated Reactions Photoinduced by Pterins // *Pteridines*. 2011. – V. 22. – P. 111-119.
93. Lorente C., Thomas A.H. Photophysics and photochemistry of pterins in aqueous solution // *Accounts of Chemical Research*. 2006. – V. 39, No 6. – P. 395-402.
94. Lower S.K., El-Sayed M.A. The triplet state and molecular electronic processes in organic molecules // *Chemical Reviews*. 1966. – V. 66, No 2. – P. 199–241.
95. Luo R., Gilson H.S.R., Potter M.J., Gilson M.K. The Physical Basis of Nucleic Acid Base Stacking in Water // *Biophysical Journal*. 2001. – V. 80, No 1. – P. 140–148.
96. Malhotra K., Kim S.T., Batschauer A., Dawut L., Sancar A. Putative blue-light photoreceptors from *Arabidopsis thaliana* and *Sinapis alba* with a high degree of sequence homology to DNA photolyase contain the two photolyase cofactors but lack DNA repair activity // *Biochemistry*. 1995. – V. 34, No 20. – P. 6892-6899.
97. Mansuripur M. *Field, Force, Energy and Momentum in Classical Electrodynamics*. Oak Park: Bentham Science Publishers, 2011. – p. 336.
98. Marian C.M. Spin-orbit coupling and intersystem crossing in molecules // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*. 2012. – V. 2. – P. 187–203.
99. Marian C.M., Kleinschmidt M., Tatchen J. The photophysics of 7H-adenine: A quantum chemical investigation including spin-orbit effects // *Chemical Physics*. 2008. – V. 347, No 1-3 – P. 346-359.
100. Marques M.A.L., Gross E.K.U. Time-dependent density functional theory // *Annual Reviews of Physical Chemistry*. 2004. – V. 55, No 2. – P. 427-455.
101. Matsuura S., Sugimoto T., Murata S., Sugawara Y., Iwasaki H. Stereochemistry of bioppterin cofactor and facile methods for the determination of the stereochemistry of a

- biologically active 5,6,7,8-tetrahydropterin // *The Journal of Biochemistry*. 1985. – V. 98, No 5. – P. 1341-1348.
102. Michaeli A., Feitelson J. Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides // *Photochemistry and Photobiology*. 1994. – V. 59, No 3. – P. 284-289.
103. Minaev B.F. Quantum-Chemical Investigation of the Mechanisms of the Photosensitization, Luminescence, and Quenching of Singlet Oxygen in Solutions // *Zhurnal Prikladnoj Spektroskopii*. 1985. – V. 42. – P. 766-772.
104. Minaev B.F. Spin-orbit coupling of charge-transfer states and the mechanism for quenching singlet oxygen by amines // *Theoretical and Experimental Chemistry*. 1984. – V. 20, No 2. – P. 199-201.
105. Miyoshi T., Arai T., Nonogawa M., Makino K., Mori H., Yamashita K., Sasada M. Anticancer photodynamic and non-photodynamic effects of pterin derivatives on a pancreatic cancer cell line // *Journal of Pharmacological Sciences*. 2008. – V. 107, No 2. – P. 221-225.
106. Moon Y.J., Kim S.I., Chung Y.H. Sensing and responding to UV-A in cyanobacteria // *International Journal of Molecular Sciences*. 2012. – V. 13, No 12. – P. 16303-16332.
107. Moon Y.J., Kim S.J., Park Y.M., Chung Y.H. Sensing UV/blue: pterin as a UV-A absorbing chromophore of cryptochrome // *Plant Signaling & Behavior*. 2010a. – V. 5, No 9. – P. 1127-1130.
108. Moon Y.J., Lee E.M., Park Y.M., Park Y.S., Chung W.I., Chung Y.H. The role of cyanopterin in UV/blue light signal transduction of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 phototaxis // *Plant and Cell Physiology*. 2010b. – V. 51, No 6. – P. 969-980.
109. Morales J., Günther G., Zanocco A.L., Lemp E. Singlet oxygen reactions with flavonoids. A theoretical-experimental study // *PLoS One*. 2012. – V. 7, No 7. – e40548.
110. Mulliken R.S. Electronic Population Analysis on LCAO-MO Molecular Wave Functions // *The Journal of Chemical Physics*. 1955. – V. 23. – P. 1833-1840.
111. Murr C., Widner B., Wirleitner B., Fuchs D. Neopterin as a marker for immune system activation // *Current Drug Metabolism*. 2002. – V. 3, No 2. – P. 175-187.
112. Neese F. The ORCA program system // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*. 2012. – V. 2, No 1. – P. 73-78.
113. Neverov K.V., Mironov E.A., Lyudnikova T.A., Krasnovsky A.A., Kritsky M.S. Phosphorescence analysis of the triplet-state of pterins in connection with their photoreceptor function in biochemical systems // *Biochemistry (Moscow)*. 1996. – V. 61, No 9. – P. 1149-1155.

114. Nishikimi M. The generation of superoxide anion in the reaction of tetrahydropteridines with molecular oxygen // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1975. – V. 166, No 1. – P. 273-279.
115. Nyokong T., Ahsen V. *Photosensitizers in Medicine, Environment, and Security*. Berlin: Springer Science & Business Media, 2012. - p. 664.
116. Oliveros E., Dántola M.L., Vignoni M., Thomas A.H., Lorente C. Production and quenching of reactive oxygen species by pterin derivatives, an intriguing class of biomolecules // *Pure and Applied Chemistry*. 2011. – V. 83, No 4. – P. 801–811.
117. Pacileo M., Cirillo P., De Rosa S., Ucci G., Petrillo G., Musto D'Amore S., Sasso L., Maietta P., Spagnuolo R., Chiariello M. The role of neopterin in cardiovascular disease // *Monaldi Archives for Chest Disease*. 2007. – V. 68, No 2. – P. 68-73.
118. Parker R.T., Freedlander R.S., Schulman E.M., Dunlap R.B. Room Temperature Phosphorescence of Selected Pteridines // *Analytical Chemistry*. 1979. – V. 51, No 12. – P. 1921-1926.
119. Patel K.B., Stratford M.R., Wardman P., Everett S.A. Oxidation of tetrahydrobiopterin by biological radicals and scavenging of the trihydrobiopterin radical by ascorbate // *Free Radical Biology and Medicine*. 2002. – V. 32, No 3. – P. 203-211.
120. Pecourt J.M., Peon J., Kohler B. DNA excited-state dynamics: ultrafast internal conversion and vibrational cooling in a series of nucleosides // *Journal of the American Chemical Society*. 2001. – V. 123, No 42. – P. 10370-10378.
121. Perun S., Sobolewski A.L., Domcke W. Ab Initio Studies on the Radiationless Decay Mechanisms of the Lowest Excited Singlet States of 9H-Adenine // *Journal of the American Chemical Society*. 2005a. – V. 127, 17. – P. 6257-6265.
122. Perun S., Sobolewski A.L., Domcke W. Photostability of 9H-adenine: mechanisms of the radiationless deactivation of the lowest excited singlet states // *Chemical Physics*. 2005b. – V. 313, No 1-3. – P. 107–112.
123. Peters G., Rodgers M.A. Single-electron transfer from NADH analogues to singlet oxygen // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1981. – V. 637, No 1. – P. 43-52.
124. Petroselli G., Erra-Balsells R., Cabrerizo F.M., Lorente C., Capparelli A.L., Braun A.M., Oliveros E., Thomas A.H. Photosensitization of 2'-deoxyadenosine-5'-monophosphate by pterin // *Organic and Biomolecular Chemistry*. 2007. – V. 5, No 17. – P. 2792-2799.
125. Potter W.R., Henderson B.W., Bellnier D.A., Pandey R.K., Vaughan L.A., Weishaupt K.R., Dougherty T.J. Parabolic quantitative structure-activity relationships and photodynamic therapy: application of a three-compartment model with clearance to the in vivo quantitative structure-activity relationships of a congeneric series of pyropheophorbide derivatives used as

photosensitizers for photodynamic therapy // *Photochemistry and Photobiology*. 1999. – V. 70, No 5. – P. 781-788.

126. Rebrin I., Bailey S.W., Boerth S.R., Ardell M.D., Ayling J.E. Catalytic characterization of 4a-hydroxytetrahydropterin dehydratase // *Biochemistry*. 1995. – V. 34, No 17. – P. 5801-5810.

127. Riahi S., Beheshti A., Ganjali M.R., Norouzi P. Quantum chemical calculations to reveal the relationship between the chemical structure and the fluorescence characteristics of phenylquinolinylethyne and phenylisoquinolinylethyne derivatives, and to predict their relative fluorescence intensity // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2009. – V. 74, No 5. – P. 1077-1083.

128. Rogers C.T., Hore P.J. Chemical magnetoreception in birds: the radical pair mechanism // *Proceedings of the National Academy Science USA*. 2009. – V. 106, No 2. – P. 353-360.

129. Rokos H., Beazley W.D., Schallreuter K.U. Oxidative stress in vitiligo: photo-oxidation of pterins produces H₂O₂ and pterin-6-carboxylic acid // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002. – V. 292, No 4. – P. 805-811.

130. Roos B.O. The complete active space SCF method in a fock-matrix-based super-CI formulation // *International Journal of Quantum Chemistry*. 1980. – V. 18, No S14. – P. 175–189.

131. Runge E., Gross E.K. Density-functional theory for time-dependent systems // *Physical Review Letters*. 1984. – V. 52, No 12. – P. 997-1000.

132. Sancar A. Cryptochrome: the second photoactive pigment in the eye and its role in circadian photoreception // *Annual Review of Biochemistry*. 2000. – V. 69. – P. 31-67.

133. Sancar A. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors // *Chemical Reviews*. 2003. – V. 103, No 6. – P. 2203–2237.

134. Schallreuter K.U. A review of recent advances on the regulation of pigmentation in the human epidermis // *Cellular and Molecular Biology*. 1999. – V. 45, No 7. – P. 943-949.

135. Schallreuter K.U., Moore J., Wood J.M., Beazley W.D., Peters E.M., Marles S.C., Behrens-Williams L.K., Dummer R., Blau N., Thöny B. Epidermal H₂O₂ accumulation alters tetrahydrobiopterin (6BH₄) recycling in vitiligo: identification of a general mechanism in regulation of all 6BH₄-dependent processes? // *Journal of Investigative Dermatology*. 2001. – V. 116, No 1. – P. 167-174.

136. Schallreuter K.U., Wood J. M., Körner C., Harle K. M., Schulz-Douglas V., Werner E.R. 6-Tetrahydrobiopterin functions as a UVB-light switch for de novo melanogenesis // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998. – V. 1382, No 2. – P. 339–344.

137. Schallreuter K.U., Wood J.M., Pittelkow M.R., Gutlich M., Lemke K.R., Rödl W., Swanson N.N., Hitzemann K., Ziegler I. Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin // *Science*. 1994a. – V. 263, No 5152. – P. 1444-1446.
138. Schallreuter K.U., Wood J.M., Ziegler I., Lemke K.R., Pittelkow M.R., Lindsey N.J., Gütlich M. Defective tetrahydrobiopterin and catecholamine biosynthesis in the depigmentation disorder vitiligo // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1994b. – V. 1226, No 2. – P. 181-192.
139. Schmidt M.W., Baldrige K.K., Boatz J.A., Elbert S.T., Gordon M.S., Jensen J.H., Koseki S., Matsunaga N., Nguyen K.A., Su S., Windus T.L., Dupuis M., Montgomery J.A. The General Atomic and Molecular Electronic Structure System // *Journal of Computational Chemistry*. 1993. – V. 14, No 1. – P. 1347-1363.
140. Schmidt W., Butler W.L. Flavin-mediated photoreactions in artificial systems: a possible model for blue-light photoreceptor pigment in living systems // *Photochemistry and Photobiology*. 1976. – V. 24, No 1. – P. 71–76.
141. Schnell J.R., Dyson H.J., Wright P.E. Structure, dynamics, and catalytic function of dihydrofolate reductase // *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 2004. – V. 33, No 1. – P. 119–140.
142. Schweitzer C., Schmidt R. Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen // *Chemical Reviews*. 2003. – V. 103, No 5. – P. 1685-1757.
143. Scott-Burden T. Regulation of nitric oxide production by tetrahydrobiopterin // *Circulation*. 1995. – V. 91, No 1. – P. 248–250.
144. Selby C.P., Sancar A. A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity // *Proceedings of the National Academy Science USA*. 2006. – V. 103, No 47. – P. 17696-17700.
145. Serrano M.P., Borsarelli C.D., Thomas A.H. Type I photosensitization of 2'-deoxyadenosine 5'-monophosphate (5'-dAMP) by biopterin and its photoproduct formylpterin // *Photochemistry and Photobiology*. 2013. – V. 89, No 6. – P. 1456-1462.
146. Serrano M.P., Lorente C., Borsarelli C.D., Thomas A.H. Unraveling the Degradation Mechanism of Purine Nucleotides Photosensitized by Pterins: The Role of Charge-Transfer Steps. *Chemphyschem*. 2015. – V. 16, No 10. – P. 2244-2252.
147. Serrano M.P., Lorente C., Vieyra F.E., Borsarelli C.D., Thomas A.H. Photosensitizing properties of biopterin and its photoproducts using 2'-deoxyguanosine 5'-monophosphate as an oxidizable target // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2012. – V. 14, No 33. – P. 11657-11665.
148. Sikorski M., Sikorska E., Gonzalez Moreno R., Bourdelande J.L., Worrall D.R. Photophysics of methyl substituted alloxazines in water: efficiency of singlet oxygen generation

- // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2002. – V. 149, No 1–3. – P. 39–44.
149. Sikorski M., Sikorska E., Koziolowa A., Gonzalez Moreno R., Bourdelande J.L., Steer R.P., Wilkinson F. Photophysical properties of lumichromes in water // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2001. – V. 60, No 2-3. – P. 114-119.
150. Silva A.V., López-Sánchez A., Couto Junqueira H., Rivas L., Baptista M.S., Orellana G. Riboflavin derivatives for enhanced photodynamic activity against *Leishmania* parasites // *Tetrahedron*. 2015. – V. 71, No 3. – P. 457–462.
151. Sobolewski A.L., Domcke W. Ab initio investigations on the photophysics of indole // *Chemical Physics Letters*. 1999. – V. 315, No 3-4. – P. 293-298.
152. Sobolewski A.L., Domcke W. On the mechanism of nonradiative decay of DNA bases: ab initio and TDDFT results for the excited states of 9H-adenine // *The European Physical Journal D*. 2002a. – V. 20, No 3. – P. 369-374.
153. Sobolewski A.L., Domcke W. The chemical physics of the photostability of life // *Europhysics News*. 2006. – V. 37, No 3. – P. 20-23.
154. Sobolewski A.L., Domcke W., Dedonder-Lardeux C., Jouvét C. Excited-state hydrogen detachment and hydrogen transfer driven by repulsive $^1\pi\sigma^*$ states: A new paradigm for nonradiative decay in aromatic biomolecules // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2002b. – V. 4. – P. 1093–1100.
155. Solov'yov I.A., Schulten K. Magnetoreception through cryptochrome may involve superoxide // *Biophysical Journal*. 2009. – V. 96, No 12. – P. 4804-4813.
156. Song Q.-H., Hwang K.C. Direct observation for photophysical and photochemical processes of folic acid in DMSO solution // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2007. – V. 185, No 1. – P. 51–56.
157. Soniat M., Martin C.B. Binding affinities of folic acid and related pterins with biological macromolecules under physiological conditions // *Pteridines*. 2015 – V. 26, No 1. – P. 23–29.
158. Soniat M., Martin C.B. Theoretical Study on the Relative Energies of Neutral Pterin Tautomers // *Pteridines*. 2008. – V. 19, No 1. – P. 120-124.
159. Spoerl E., Wollensak G., Dittert D.D., Seiler T. Thermomechanical behavior of collagen-cross-linked porcine cornea // *Ophthalmologica*. 2004. – V. 218, No 2. – P. 136-140.
160. Sueishi Y., Hori M., Ishikawa M., Matsu-Ura K., Kamogawa E., Honda Y., Kita M., Ohara K. Scavenging rate constants of hydrophilic antioxidants against multiple reactive oxygen species // *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2014. – V. 54, No 2. – P. 67-74.

161. Swarna S., Lorente C., Thomas A.H., Martin C.B. Rate constants of quenching of the fluorescence of pterins by the iodide anion in aqueous solution // *Chemical Physics Letters*. 2012. – V. 542, No 23. – P. 62–65.
162. Takeda J., Nakata R., Ueno H., Murakami A., Iseki M., Watanabe M. Possible involvement of a tetrahydrobiopterin in photoreception for UV-B-induced anthocyanin synthesis in carrot // *Photochemistry and Photobiology*. 2014. – V. 90, No 6. – P. 1043-1049.
163. Tetko I.V., Tanchuk V.Yu., Kasheva T.N, Villa A.E.P. Estimation of Aqueous Solubility of Chemical Compounds Using E-State Indices // *Journal of Chemical Information and Modelling*. 2001. –V. 41, No 6. – P. 1488-1493.
164. Thiagarajan V., Byrdin M., Eker A.P., Müller P., Brettel K. Kinetics of cyclobutane thymine dimer splitting by DNA photolyase directly monitored in the UV // *Proceedings of the National Academy Science USA*. 2011. – V. 108, No 23. – P. 9402-9407.
165. Thomas A.H., Lorente C., Capparelli A.L., Martínez C.G., Braun A.M., Oliveros E. Singlet oxygen production by pterin derivatives in aqueous solutions // *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2003. – V. 2, No 3. – P. 245-250.
166. Thomas A.H., Lorente C., Capparelli A.L., Pokhrel M.R., Braun A.M., Oliveros E. Fluorescence of pterin, 6-formylpterin, 6-carboxypterin and folic acid in aqueous solution: pH effects // *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2002. – V. 1, No 6. – P. 421-426.
167. Thomas A.H., Oliveros E., Braun A.M., Espinosa M.S., Lorente C., Dántola M.L. Chemical and photochemical reactivity of 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin in aqueous solutions // *Journal of Physical Organic Chemistry*. 2013. – V. 26, No 1. – P. 2–8
168. Thöny B., Auerbach G., Blau N. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions // *Biochemical Journal*. 2000. – V. 347, Pt 1. – P. 1–16.
169. Tietz A., Lindberg M., Kennedy E.P. A New Pteridine-Requiring Enzyme System for the Oxidation of Glyceryl Ethers // *Journal of Biological Chemistry*. 1964. – V. 239. – P. 4081-4090.
170. Ueda T., Kato A., Kuramitsu S., Terasawa H., Shimada I. Identification and characterization of a second chromophore of DNA photolyase from *Thermus thermophilus* HB27 // *Journal of Biological Chemistry*. 2005. – V. 280, No 43. – P. 36237-36243.
171. Uzdensky A.B. Photodynamic therapy at the cellular level. Kerala: Research Signpost, 2007. – p. 271.
172. Vásquez-Vivar J. Tetrahydrobiopterin, superoxide, and vascular dysfunction // *Free Radical Biology and Medicine*. 2009. – V. 47, No 8. – P.1108-1119.
173. Vásquez-Vivar J., Whitsett J., Martásek P., Hogg N., Kalyanaraman B. Reaction of tetrahydrobiopterin with superoxide: EPR-kinetic analysis and characterization of the pteridine radical // *Free Radical Biology and Medicine*. 2001. – V. 31, No 8. – P. 975-985.

174. Vidóczy T. Type I and Type II photosensitized reactions: reasons for dispute // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1992. – V. 14, No 1-2. – P. 139-142.
175. Vignoni M., Cabrerizo F. M., Lorente C., Claparols C., Oliveros E., Thomas A. H. Photochemistry of dihydrobiopterin in aqueous solution // *Organic & Biomolecular Chemistry* 2010. – V. 8, No 4. – P. 800–810.
176. Vignoni M., Cabrerizo F.M., Lorente C., Thomas A.H. New results on the photochemistry of biopterin and neopterin in aqueous solution // *Photochemistry and Photobiology*. 2009. – V. 85, No 1. – P. 365-373.
177. Vignoni M., Lorente C., Cabrerizo F.M., Erra-Balsells R., Oliveros E., Thomas A.H. Characterization and reactivity of photodimers of dihydroneopterin and dihydrobiopterin // *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2012. – V. 11, No 6. – P. 979–987.
178. Vignoni M., Serrano M.P., Oliveros E., Thomas A.H. Photodimerization of 7,8-dihyroneopterin in aqueous solution under UV-A irradiation // *Photochemistry and Photobiology*. 2011. – V. 87, No 1. – P. 51-55.
179. Watschinger K., Keller M.A., Golderer G., Hermann M., Maglione M., Sarg B., Lindner H.H., Hermetter A., Werner-Felmayer G., Konrat R., Hulo N., Werner E.R. Identification of the gene encoding alkylglycerol monooxygenase defines a third class of tetrahydrobiopterin-dependent enzymes // *Proceedings of the National Academy Science USA*. 2010. – V. 107, No 31. – P. 13672–13677.
180. Wei C.C., Wang Z.Q., Tejero J., Yang Y.P., Hemann C., Hille R., Stuehr D.J. Catalytic reduction of a tetrahydrobiopterin radical within nitric-oxide synthase // *The Journal of Biological Chemistry*. 2008. – V. 283, No 17. – P. 11734-11742.
181. Werner E.R., Gorren A.C., Heller R., Werner-Felmayer G., Mayer B. Tetrahydrobiopterin and nitric oxide: mechanistic and pharmacological aspects // *Experimental Biology and Medicine*. 2003. – V. 228, No 11. – P. 1291-302.
182. Wilkinson F., McGarvey D.J., Olea A.F. Excited Triplet State Interactions with Molecular Oxygen: Influence of Charge Transfer on the Bimolecular Quenching Rate Constants and the Yields of Singlet Oxygen (O_2^* , $^1\Delta_g$) for Substituted Naphthalenes in Various Solvents // *The Journal of Physical Chemistry*. 1994. – V. 98, No 14. – P. 3762–3769.
183. Wood J.M., Chavan B., Hafeez I., Schallreuter K.U. Regulation of tyrosinase by tetrahydropteridines and H_2O_2 // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004. – V. 325, No 4. – P. 1412-1417.
184. Wood J.M., Schallreuter-Wood K.U., Lindsey N.J., Callaghan S., Gardner M.L. A specific tetrahydrobiopterin binding domain on tyrosinase controls melanogenesis // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1995. – V. 206, No 2. – P. 480-485.

185. Wu D., Hu Q., Yan Z., Chen W., Yan C., Huang X., Zhang J., Yang P., Deng H., Wang J., Deng X., Shi Y. Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8 // *Nature*. 2012. – V. 484, No 7393. – P. 214-219.
186. Xu X., Luan F., Liu H., Cheng J., Zhang X. Prediction of the maximum absorption wavelength of azobenzene dyes by QSPR tools. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2011. – V. 83, No 1. – P. 353-61.
187. Yamada H., Arai T., Endo N., Yamashita K., Nonogawa M., Makino K., Fukuda K., Sasada M., Uchiyama T. Photodynamic effects of a novel pterin derivative on a pancreatic cancer cell line // *Biochemical Biophysics Research Communications*. 2005. – V. 333, No 3. – P. 763-767.
188. Yamaguchi K., Jensen F., Dorigo A., Houk K.N. A spin correction procedure for unrestricted Hartree-Fock and Møller-Plesset wavefunctions for singlet diradicals and polyradicals // *Chemical Physics Letters*. 1988. – V. 149, No 5-6. – P. 537-542.
189. Yamazaki S., Domcke W. Ab Initio Studies on the Photophysics of Guanine Tautomers: Out-of-Plane Deformation and NH Dissociation Pathways to Conical Intersections // *Journal of Physical Chemistry A*. 2008. – V. 112, No 30. – P. 7090-7097.
190. Yamazaki S., Domcke W., Sobolewski A.L. Nonradiative decay mechanisms of the biologically relevant tautomer of guanine // *Journal of Physical Chemistry A*. 2008. – V. 112, No 47. – P. 11965-11968.
191. Zhang Q. Predictive models on photolysis and photoinduced toxicity of persistent organic chemicals // *Frontiers of Environmental Science & Engineering*. 2013. – V. 7, No 6. – P. 803-814.
192. Zhurko G.A., Chemcraft version 1.6, <http://www.chemcraftprog.com>.
193. Вечтомова Ю.Л., Телегина Т.А., Колесников М.П., Крицкий М.С. Фотобиохимия фолатов: фотохимическое восстановление фолиевой кислоты // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2010. – Т. 46, No 3. – С. 372-378.
194. Егоров С.Ю., Красновский А.А. Фотосенсибилизированная люминесценция кислорода при импульсном лазерном возбуждении. Кинетика затухания в водных растворах // *Биофизика*. 1983. – Т. 28, No 3. – С. 497-498.
195. Егоров С.Ю., Красновский А.А., Баштанов М.Е., Миронов Е.А., Людникова Т.А., Крицкий М.С. Исследование фотосенсибилизации образования синглетного молекулярного кислорода птеринами и флавинами методом разрешенного во времени измерения фосфоресценции кислорода при лазерном возбуждении // *Биохимия*. 1999. – Т. 64, No 10. – С. 1325-1330.

196. Крицкий М.С., Людникова Т.А., Миронов Е.А. Фотоиндуцированное восстановление птеринов в растворе // Доклады академии наук. 1996. – Т. 351. – С. 222-224.
197. Крицкий М.С., Телегина Т.А. Коферменты и эволюция мира РНК // Успехи современной биологии. 2004. - Т. 44. - С. 341-364.
198. Крицкий М.С., Телегина Т.А., Колесников М.П., Людникова Т.А., Вечтомова Ю.Л., Голуб О.А. Фотовозбужденные молекулы флавиновых и птериновых коферментов в эволюции. // Биохимия. 2010. – Т. 75, No 10. – С. 1348-1366.
199. Лебедев М.В. Роль сольватации сульфид-иона при модификации электронной структуры поверхности GaAs // Физика и техника полупроводников. 2001. – Т. 35, No 11. – С. 1347-1355.
200. Людникова Т.А., Дашина О.А., Телегина Т.А., Крицкий М.С. Исследование фотохимических свойств биоптерина и его восстановленных форм // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. – Т. 45, No 4. – С. 117-123.
201. Майер Г.В., Базыль О.К., Артюхов В.Я. Квантово-химическое исследование механизма реакции фотодиссоциации в многоатомных молекулах // Оптика атмосферы и океана. 1993. – Т. 6, No 3. – С. 308-312.
202. Минаев Б.Ф. Спин-катализ в процессах фото- и биоактивации молекулярного кислорода // Украинский биохимический журнал. 2009. – Т. 81, No 3. – С. 21-45.
203. Свиридов Е.А., Телегина Т.А. Неоптерин и его восстановленные формы: биологическая роль и участие в клеточном иммунитете // Успехи биологической химии. 2005. – Т. 45. – С. 355-390.

Приложение №1.

Таблица 1. Сравнение параметров равновесной геометрии $\text{H}_4\text{Гмп}$, полученной методом V3LYP/6-31G(d,p), с литературными данными для $\text{H}_4\text{Бип}$.

Геометрические параметры	$\text{H}_4\text{Гмп}$, V3LYP 6-31G(d,p) (1)	$\text{H}_4\text{Бип}$, V3LYP 6-31G+(d,p) ^a (2)	$\text{H}_4\text{Бип}$ X-ray ^b (3)	$\text{H}_4\text{Бип}$ X-ray ^b (4)	(2) - (1)	(3) - (1)	(4)-(1)
<i>Длина связи, Å:</i>							
N^1-C^2	1,306	1,307	1,346	1,349	0,001	0,04	0,043
N^1-C^{8a}	1,372	1,372	1,371	1,370	0	-0,001	-0,002
C^2-N^3	1,365	1,364	1,352	1,342	-0,001	-0,013	-0,023
C^2-N	1,383	-	-	1,324	-	-	-0,059
N^3-C^4	1,420	1,419	1,402	1,414	-0,001	-0,018	-0,006
C^4-C^{4a}	1,426	1,422	1,417	1,402	-0,004	-0,009	-0,024
C^4-O	1,234	-	-	1,229	-	-	-0,005
$\text{C}^{4a}-\text{N}^5$	1,418	1,417	1,448	1,451	-0,001	0,03	0,033
$\text{C}^{4a}-\text{C}^{8a}$	1,384	-	-	1,373	-	-	-0,011
$\text{C}^{8a}-\text{N}^8$	1,370	1,365	1,333	1,323	-0,005	-0,037	-0,047
N^5-H	1,018	1,019	-	-	0,001	-	-
N^5-C^6	1,467	1,472	1,514	1,513	0,005	0,047	0,046
C^6-C^7	1,541	1,540	1,509	1,517	-0,001	-0,032	-0,024
C^7-N^8	1,456	1,457	1,455	1,455	0,001	-0,001	-0,001
N^8-H	1,009	1,009	-	-	0	-	-
$\text{C}^6-\text{C}^{1'}$	1,536	-	-	1,538	-	-	0,002
$\text{C}^{1'}-\text{O}$	1,414	-	-	1,424	-	-	0,01
RMSD					0,002	0,028	0,029
Δ макс.					0,005	0,047	0,059
<i>Валентный угол, °:</i>							
$\text{C}^2-\text{N}^1-\text{C}^{8a}$	116,7	-	-	122,5	-	-	5,8
$\text{N}^1-\text{C}^2-\text{N}^3$	123,1	-	-	118,9	-	-	-4,2
$\text{N}^1-\text{C}^2-\text{N}$	119,8	-	-	119,7	-	-	-0,1
$\text{N}^3-\text{C}^2-\text{N}$	117,0	-	-	121,4	-	-	4,4
$\text{C}^2-\text{N}^3-\text{C}^4$	123,5	-	-	123,1	-	-	-0,4
$\text{N}^3-\text{C}^4-\text{C}^{4a}$	112,9	-	-	115,0	-	-	2,1
$\text{N}^3-\text{C}^4-\text{O}$	120,3	-	-	118,9	-	-	-1,4
$\text{C}^{4a}-\text{C}^4-\text{O}$	126,8	-	-	126,0	-	-	-0,8
$\text{N}^1-\text{C}^{8a}-\text{C}^{4a}$	123,9	123,7	-	118,2	-0,2	-	-5,7
$\text{N}^1-\text{C}^{8a}-\text{N}^8$	116,3	-	-	117,7	-	-	1,4
$\text{C}^4-\text{C}^{4a}-\text{N}^5$	118,6	119,4	117,6	117,7	0,8	-1,0	-0,9
$\text{C}^{4a}-\text{N}^5-\text{C}^6$	115,1	115,5	111,0	112,5	0,4	-4,1	-2,6
$\text{C}^{4a}-\text{C}^{8a}-\text{N}^8$	119,8	119,6	-	124,1	-0,2	-	4,3
$\text{C}^4-\text{C}^{4a}-\text{C}^{8a}$	119,8	119,3	-	122,1	-0,5	-	2,3
$\text{N}^5-\text{C}^{4a}-\text{C}^{8a}$	121,6	120,8	-	120,0	-0,8	-	-1,6
$\text{C}^6-\text{C}^{1'}-\text{O}$	111,5	-	-	110,9	-	-	-0,6
$\text{N}^5-\text{C}^6-\text{C}^{1'}$	107,4	106,6	-	107,9	-0,8	-	0,5
$\text{C}^7-\text{C}^6-\text{C}^{1'}$	111,0	-	-	112,7	-	-	1,7
$\text{N}^5-\text{C}^6-\text{C}^7$	108,5	108,6	108,9	110,2	0,1	0,4	1,7
$\text{C}^6-\text{C}^7-\text{N}^8$	110,5	110,5	111,7	111,7	0,0	1,2	1,2
$\text{C}^{8a}-\text{N}^8-\text{C}^7$	120,2	120,7	119,9	119,8	0,5	-0,3	-0,4
$\text{C}^{4a}-\text{N}^5-\text{H}$	109,2	108,9	-	-	-0,3	-	4,4
$\text{C}^6-\text{N}^5-\text{H}$	113,5	113,9	-	-	0,4	-	-0,4
$\text{C}^{8a}-\text{N}^8-\text{H}$	115,8	116,5	-	-	0,7	-	2,1
$\text{C}^7-\text{N}^8-\text{H}$	119,5	120,9	-	-	1,4	-	-1,4
RMSD:					0,6	2,0	2,7
Δ макс.					1,4	4,1	5,7

Двугранный угол, °:

C ⁴ -C ^{4a} -N ⁵ -H	-25,2	-25,3	-	-	-0,1	-	-
N ¹ -C ^{8a} -N ⁸ -H	-12,8	-7,3	-	-	5,5	-	-
N ⁵ -C ^{4a} -C ^{8a} -N ⁸	-4,0	-3,4	-1,9	-	0,6	2,1	-
C ^{8a} -C ^{4a} -N ⁵ -C ⁶	24,9	24,9	29,0	-	0,0	4,1	-
C ^{4a} -C ^{8a} -N ⁸ -C ⁷	11,5	10,7	1,6	-	-0,8	-9,9	-
C ^{4a} -C ^{8a} -N ⁸ -H	167,8	175,1	-	-	7,3	-	-
C ^{4a} -N ⁵ -C ⁶ -C ⁷	-48,8	-49,0	-53,8	-	-0,2	-5,0	-
C ^{4a} -N ⁵ -C ⁶ -H	70,9	70,7	-	-	-0,2	-	-
N ⁵ -C ⁶ -C ⁷ -N ⁸	53,9	53,6	53,8	-	-0,3	-0,1	-
C ⁶ -C ⁷ -N ⁸ -C ^{8a}	-37,0	-36,1	-28,6	-	0,9	8,4	-
C ⁶ -C ⁷ -N ⁸ -H	167,6	160,0	-	-	-7,6	-	-
C ⁴ -C ^{4a} -N ⁵ -C ⁶	-153,3	-148,4	-	-	4,9	-	-
C ^{4a} -N ⁵ -C ⁶ -C ^{1'}	-168,7	-175,8	-	-	-7,1	-	-
RMSD:					4,1	5,9	
Δ макс.					7,6	9,9	

RMSD – среднеквадратичное отклонение, Δ макс. – максимальная разница

^a Данные квантово-химических расчетов, полученные в рамках теории функционала плотности методом B3LYP/6-31G+(d,p) [Gogonea et al., 2006]. ^б Данные рентгеноструктурного анализа [Li et al., 1999]. ^в Данные рентгеноструктурного анализа [Matsuura et al., 1985].

Приложение №2.

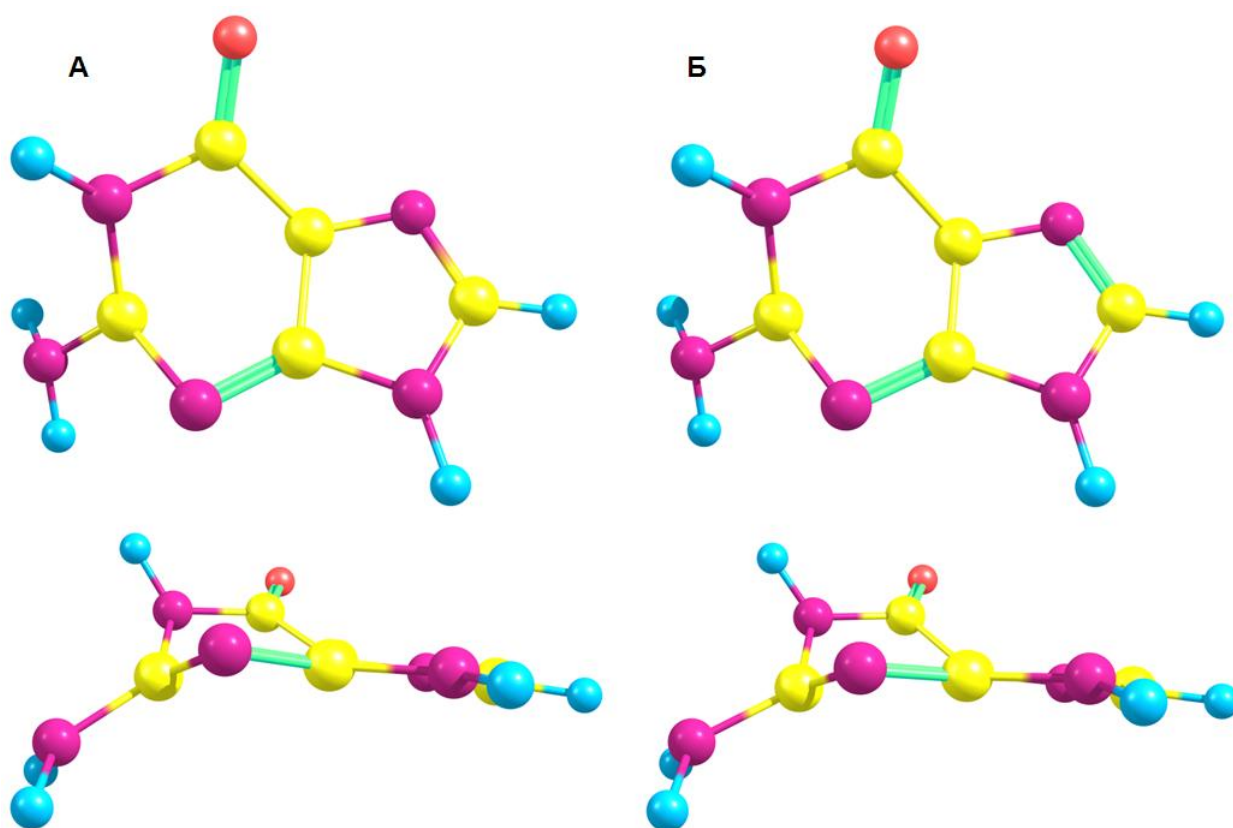


Рис. 1. Геометрия минимума состояния $^1\pi\pi^*$ биологического таутомера гуанина, полученного методом B3LYP/6-311G++(d,p) (А) и методом CASSCF (Б) [Yamazaki et al., 2008].

Таблица 2. Сравнение параметров геометрии минимума состояния $^1\pi\pi^*$ биологического таутомера гуанина, полученного методом B3LYP/6-311G++(d,p) с литературными данными.

Геометрические параметры	Min1		Min2	
	B3LYP/ 6-311G++(d,p)	CASSCF ^a	B3LYP/ 6-311G++(d,p)	CASSCF ^a
N^1-C^2 , Å	1,475	1,459	1,471	1,453
N^1-C^{8a} , Å	1,280	1,282	1,284	1,286
C^2-N^8 , Å	1,365	1,371	1,371	1,380
$C^{7a}-N^1-C^2-N^3$, °	-68,1	-66,7	-71,1	-67,3
$C^{7a}-N^1-C^2-N^8$, °	138,6	148,5	139,1	149,7
$N^1-C^2-N^3-C^4$, °	63,8	63,3	76,8	74,9
$N^1-C^2-N^3-H$, °	-81,6	-83,6	-143,6	-150,1

^a [Yamazaki et al., 2008]