

**ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ СЕЛЕКТИВНОСТЬ
ФОТОИЗОМЕРИЗАЦИИ Z,Z-БИЛИРУБИНА IX α В КОМПЛЕКСАХ С АЛЬБУМИНАМИ**

© 2007 г. **В. Ю. Плавский**, **В. А. Мостовников**, канд. физ.-мат. наук; **А. И. Третьякова**,
Г. Р. Мостовникова, канд. хим. наук

Институт физики НАН Белоруссии, г. Минск, Белоруссия

E-mail: plavskii@dragon.bas-net.by

В работе исследованы фотофизические процессы, определяющие закономерности фотоизомеризации Z,Z-билирубина IX α , – механизма, лежащего в основе широко распространенной оптической технологии лечения гипербилирубинемии (желтухи) новорожденных детей. На основании исследования спектрально-флуоресцентных и поляризационных характеристик комплексов Z,Z-билирубина IX α с сывороточными альбуминами человека (САЧ) и быка (САБ) установлено, что одной из причин преимущественного образования Z,E-билирубина IX α среди продуктов *цис-транс*-фотоизомеризации Z,Z-билирубина IX α является бихромофорный характер строения пигмента, неидентичность образующих его хромофоров и наличие межхромофорного внутримолекулярного переноса энергии. Констатирована более высокая эффективность безызлучательного переноса для комплекса билирубин-САЧ, что коррелирует с литературными данными о более высокой селективности процесса фотоизомеризации билирубина в указанном комплексе по сравнению с САБ. Фактором, способствующим процессу межхромофорного переноса энергии в условиях аномально короткого времени жизни флуоресценции билирубина (пикосекундный или субпикосекундный диапазон), является наличие экситонных взаимодействий между хромофорами.

Коды OCIS: 300.6280, 300.6390, 350.5130.

Поступила в редакцию 18.12.2006.

Введение

Фототерапия гипербилирубинемии (желтухи) новорожденных детей – один из наиболее ярких примеров эффективного использования оптических технологий в медицине. По данным различных авторов, синдром желтухи наблюдается у 50–60% доношенных новорожденных [1–3] и примерно у 80% преждевременно родившихся младенцев [4] и наиболее выражен к 3–4 дню их жизни. Указанное неинфекционное заболевание обусловлено избыточным накоплением в крови, а также подкожно-жировой клетчатке желчного пигмента (продукта обмена гемоглобина) – Z,Z-билирубина IX α , придающего коже характерный золотисто-желтый цвет. Для большинства из новорожденных, у которых проявлялись признаки гипербилирубинемии, по мере улучшения работы системы выделения билирубина и нормализации биохимических систем организма желтуха исчезает через 1–2 недели, не причиняя никакого вреда ребенку. Однако у 6–10% [1, 5] младенцев желтуха протекает в тяжелой форме вследствие высокого уровня билирубина и требует интенсивной терапии. В случае непринятия экстренных мер наличие высокой концентрации указанного токсичного пигмента в организме младенца может сказаться на его физическом и нервно-психическом развитии, а также быть непосредственной причиной смерти. Основным и наиболее распространенным методом лечения гипербилирубинемии новорож-

денных является фототерапия [6–10], заключающаяся в тотальном воздействии на поверхность тела ребенка светом плотностью мощности $P = 0,3\text{--}2\text{ мВт/см}^2$, спектральный состав которого соответствует длинноволновой полосе поглощения билирубина ($\lambda = 400\text{--}530\text{ нм}$). В практической медицине метод начал широко использоваться с 70-х годов прошлого столетия, и к настоящему времени, по данным американской академии педиатрии (American Academy of Pediatrics), в мире пролечено более миллиона младенцев [6]. Считается [11–13], что определяющую роль в снижении уровня билирубина в организме новорожденных при проведении фототерапии играют главным образом процессы фотоизомеризации пигмента – образование его конфигурационных (Z,E-билирубин IX α , E,Z-билирубин IX α , E,E-билирубин IX α) и структурных (Z-люмирубин и E-люмирубин) изомеров (см. рис. 1). Указанные изомеры, и прежде всего люмирубин, будучи более гидрофильными соединениями, чем нативный Z,Z-билирубин IX α , характеризуются повышенной скоростью экскреции [11–13].

Несмотря на очевидные практические успехи в разработке метода фототерапии и его достаточно высокую эффективность, некоторые принципиальные вопросы процесса фотоизомеризации Z,Z-билирубина IX α остаются невыясненными. Среди нерешенных проблем – причины сильно выраженной селективности процесса *цис-транс*-фотоизомеризации Z,Z-билирубина IX α , связанного с основным

Спектрально-люминесцентные и поляризационные исследования *Z,Z*-билирубина IX α проводили в буферных водных растворах в составе комплекса с САЧ (Sigma, США, фракция V, степень очистки примерно 99%) и САБ (Sigma, степень очистки не менее 96%). Из-за низкой (примерно 7 нМ [24]) растворимости билирубина в воде при физиологических значениях pH его предварительно растворяли в 0,05 М NaOH. Затем 8–10 мкл указанного раствора билирубина вносилось в 10 мл 0,1 М-го фосфатного буферного раствора сывороточного альбумина (САЧ или САБ) концентрацией $C_{\text{САЧ}} = C_{\text{САБ}} = 4$ мкМ с pH = 7,4¹. Конечную концентрацию билирубина доводили до $C_{\text{бр}} = 2$ мкМ. При выборе концентраций белка и пигмента ($C_{\text{САЧ}}/C_{\text{бр}} = 2$) исходили из наличия в молекуле САЧ двух различных участков связывания билирубина с константами связывания $K_{\text{св}} = 5,5 \times 10^7 \text{ М}^{-1}$ и $K_{\text{св}} = 4,4 \times 10^6 \text{ М}^{-1}$ [25], а в молекуле САБ – одного сайта с $K_{\text{св}} = 5,5 \times 10^6 \text{ М}^{-1}$ [26]. При вышеуказанных концентрациях компонентов молекулы билирубина локализованы лишь в одном центре связывания (характеризующемся более высокой константой связывания). Кроме того, при $C_{\text{бр}} = 2$ мкМ оптическая плотность раствора D в максимуме длинноволновой полосы поглощения билирубина в стандартных кюветах с толщиной слоя $l = 10$ мм равна примерно 0,1. Это исключает возможность искажения спектров флуоресценции растворов за счет эффекта “внутреннего фильтра” (экранирования излучения на длинах волн возбуждения и флуоресценции).

При определении концентраций исследуемых соединений исходили из следующих значений молярных коэффициентов экстинкции в максимуме их длинноволновой полосы: для САЧ $\epsilon_{280} = 3,55 \times 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [27], для САБ $\epsilon_{280} = 4,33 \times 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [27], билирубин в составе комплекса с САЧ и САБ соответственно $\epsilon_{458} = 4,70 \times 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [28], $\epsilon_{462} = 5,80 \times 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [14].

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Specord M40 UV VIS (Carl Zeiss, Jena, Германия). Измерения скорректированных спектров флуоресценции, возбуждения флуоресценции, а также поляризационных спектров возбуждения флуоресценции и спектров поляризации флуоресценции проводили на высокочувствительном автоматизированном спектрофлуориметре СДЛ-2² [29], состоящем из светосильного монохроматора возбуждения

МДР-12 и монохроматора регистрации МДР-23. Оптические оси возбуждения и регистрации располагались под углом 90°. При записи поляризационных спектров автоматически вводился поправочный коэффициент, учитывающий различие fotocувствительности флуориметра для поляризованного излучения с вертикальной и горизонтальной ориентациями электрического вектора, величина которого изменяется с изменением длины волны регистрации флуоресценции [30]. Шаг сканирования составлял 2 нм, температура образца, равная 20 °С, поддерживалась с точностью $\pm 0,2$ °С.

Спектральная ширина щелей монохроматоров возбуждения и флуоресценции составляла 4,2 нм. Выбор достаточно узких щелей монохроматора возбуждения обусловлен прежде всего низкой фотохимической стабильностью пигмента, что при интенсивном возбуждении может приводить к появлению в его растворе продуктов фотоизомеризации с близкими к *Z,Z*-билирубину спектрально-люминесцентными характеристиками [17, 20, 21]. Для исключения возможных артефактов, обусловленных накоплением фотопродуктов, каждый раствор в кювете использовался для записи только одного спектра, а все манипуляции с растворами проводили в затемненных условиях при тусклом красном освещении.

Результаты исследований

Спектры поглощения буферного раствора *Z,Z*-билирубина IX α (pH = 7,4, $C_{\text{бр}} = 2$ мкМ) в комплексе с САЧ ($C_{\text{САЧ}} = 4$ мкМ) и САБ ($C_{\text{САБ}} = 4$ мкМ) показаны на рис. 2 (кривые 1 и 2 соответственно). Как следует из рисунка, длинноволновые спектры поглощения указанных пигмент-белковых комплексов расположены в сине-зеленой области спектра ($\lambda = 380\text{--}520$ нм) с максимумом при $\lambda_{\text{макс}} = 458$ нм для билирубин–САЧ и при $\lambda_{\text{макс}} = 462$ нм для билирубин–САБ. При этом для комплекса пигмента с САБ отмечается более высокое значение коэффициента молярной экстинкции в максимуме полосы.

Спектры флуоресценции, возбуждения флуоресценции, поляризационный спектр возбуждения флуоресценции и спектр поляризации флуоресценции для комплексов билирубин–САЧ и билирубин–САБ представлены на рис. 3а и 3б соответственно. Как следует из рисунков, изменение длины волны возбуждения в пределах длинноволновой полосы поглощения *Z,Z*-билирубина IX α сопровождается bathochromным смещением полосы флуоресценции. Так, при возбуждении флуоресценции при длинах волн $\lambda_{\text{возб}} = 400, 460$ и 500 нм максимумы спектров флуоресценции билирубина в составе комплекса с САЧ располагаются соответственно при $\lambda_{\text{макс}} = 529$,

¹ Контрольными измерениями было показано, что внесение микроколичеств щелочи при указанном соотношении смешиваемых объемов практически не влияет на pH буфера.

² Авторы признательны канд. физ.-мат. наук П.П. Першукевичу за помощь при измерении поляризационных спектров флуоресценции.

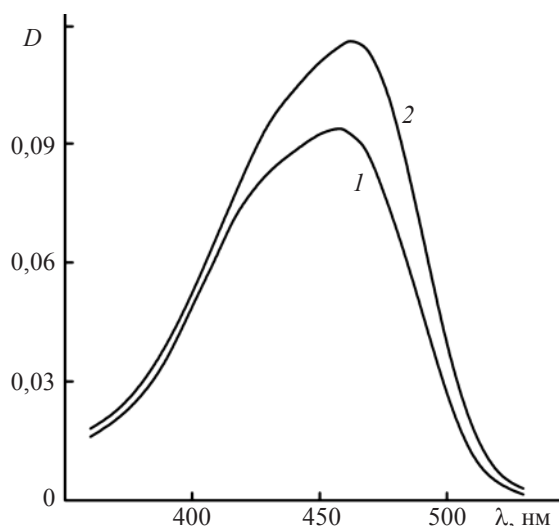


Рис. 2. Спектры поглощения буферных растворов *Z,Z*-билирубина IXα в комплексе с САЧ (1) и САБ (2).

532 и 536 нм (см. рис. 3а, кривые 4–6), а для комплексов пигмента с САБ – при $\lambda_{\text{макс}} = 530, 534$ и 541 нм (см. рис. 3б, кривые 4–6). И наоборот, при варьировании длины волны регистрации флуоресценции $\lambda_{\text{рег}} = 500, 535$ и 580 нм соответствующие максимумы в спектре возбуждения для комплекса билирубин–САЧ располагаются при $\lambda_{\text{макс}} = 452, 457$ и 462 нм (рис. 3а, кривые 1–3), а для комплекса билирубин–САБ – при $\lambda_{\text{макс}} = 458, 465$ и 471 нм (рис. 3б, кривые 1–3). Таким образом, изменение длины волны возбуждения в пределах длинноволновой полосы поглощения билирубина (примерно 100 нм) или длины волны регистрации в пределах полосы флуоресценции (примерно 80 нм) сопровождается выраженным смещением положения максимумов спектра флуоресценции (на 7–11 нм) и возбуждения флуоресценции (на 10–13 нм) пигмента, встроенного в белковую матрицу.

Важная информация о путях дезактивации энергии электронного возбуждения молекулы *Z,Z*-билирубина IXα, связанного с альбуминами различного видового происхождения, получена из поляризационных спектров возбуждения флуоресценции (см. рис. 3, кривые 7) и спектров поляризации флуоресценции (рис. 3, кривые 8, 9). Как видно из рис. 3а (кривая 7), для комплекса билирубин–САЧ наблюдается сильная зависимость степени поляризации флуоресценции от длины волны возбуждения (поляризационный спектр по возбуждению, $\lambda_{\text{рег}} = 535$ нм). Так, если при возбуждении флуоресценции в области $\lambda_{\text{возб}} > 480$ нм степень поляризации флуоресценции $p = 0,45$ – $0,46$ близка к предельной ($p = 0,50$), то при уменьшении длины волны возбуждения наблюдается ее резкое снижение до $p = 0,135$ при $\lambda_{\text{возб}} = 390$ нм. Деполяризация флуоресценции наблюда-

ется также и для комплекса билирубин–САБ при смещении длины волны возбуждения на коротковолновый склон полосы поглощения пигмента (рис. 3б, кривая 7). Однако в отличие от раствора билирубин–САЧ степень поляризации флуоресценции пигмента, встроенного в структуру бычьего альбумина, значительно выше и при $\lambda_{\text{возб}} = 390$ нм составляет $p = 0,32$. При этом, как и для комплекса билирубин–САЧ, в случае длинноволнового возбуждения $\lambda_{\text{возб}} > 480$ нм степень поляризации флуоресценции близка к предельному значению.

Интерес представляет также и ход поляризационного спектра по испусканию. Как следует из рис. 3 (кривые 8, 9), в случае длинноволнового возбуждения флуоресценции билирубина ($\lambda_{\text{возб}} = 500$ нм, кривая 8) степень поляризации ($p = 0,46$) на коротковолновом склоне полосы флуоресценции ($\lambda_{\text{рег}} = 515$ нм) близка к предельному значению независимо от типа белка-носителя (САЧ или САБ). При увеличении длины волны регистрации ($\lambda_{\text{рег}} = 630$ нм) наблюдается некоторое уменьшение степени поляризации флуоресценции ($p = 0,40$) для комплекса билирубин–САЧ

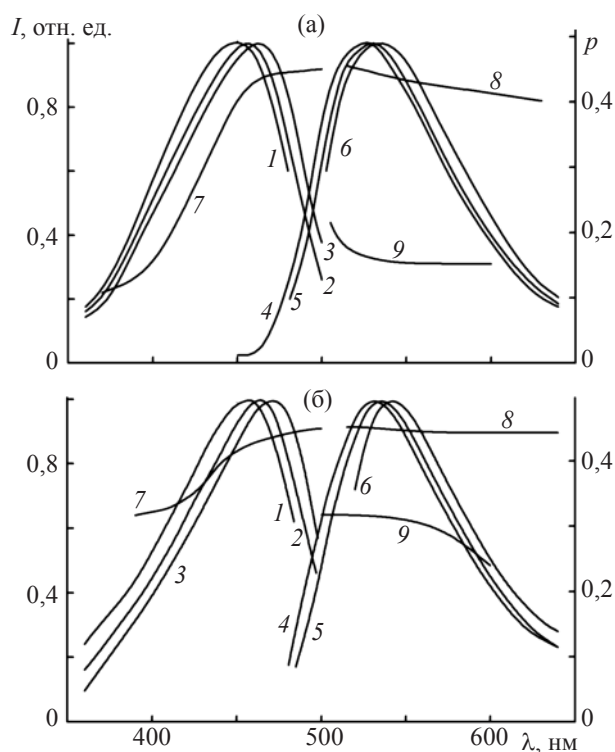


Рис. 3. Спектры возбуждения флуоресценции (1–3), флуоресценции (4–6), поляризационные спектры флуоресценции по возбуждению (7) и испусканию (8, 9) буферных растворов *Z,Z*-билирубина IXα в комплексе с САЧ (а) и САБ (б). $\lambda_{\text{рег}} = 500$ (1), 535 (2, 7), 580 нм (3), $\lambda_{\text{возб}} = 400$ (4, 9), 460 (5), 500 нм (6, 8).

(рис. 3а, кривая 8), в то время как для раствора билирубин–САБ она практически не снижается ($p = 0,45$, рис. 3б, кривая 8).

При возбуждении флуоресценции на высокие колебательные подуровни S_1 -состояния билирубина (коротковолновый склон полосы поглощения $\lambda_{\text{возб}} = 400$ нм, рис. 3, кривые 9) степень поляризации имеет более низкие значения по всему диапазону спектра флуоресценции. В этом случае наблюдается более выраженная зависимость степени поляризации флуоресценции от длины волны регистрации (степень поляризации падает при смещении от коротковолнового к длинноволновому склону спектра флуоресценции). Следует также отметить, что при коротковолновом возбуждении ($\lambda_{\text{возб}} = 400$ нм) степень поляризации флуоресценции билирубина, связанного с САБ (рис. 3б, кривая 9), несколько выше соответствующего значения (при той же длине волны регистрации) для комплекса билирубин–САЧ (рис. 3а, кривая 9).

Обсуждение результатов

Отличительной особенностью флуоресценции растворов Z,Z -билирубина IX α при комнатной температуре является ее крайне низкий квантовый выход ($\Phi_{\text{фл}}$): для водных растворов $\Phi_{\text{фл}} = 2 \times 10^{-5}$ [17], который увеличивается на порядок при встраивании пигмента в белковую структуру САЧ или САБ. По данным [17–19], для комплекса пигмента с САЧ в буферной водной среде $\Phi_{\text{фл}} = (1-3) \times 10^{-3}$, а для комплекса с САБ согласно [31] $\Phi_{\text{фл}} = 8,5 \times 10^{-4}$. При этом увеличение квантового выхода флуоресценции наблюдается только при встраивании билирубина в центр сильного связывания САЧ, образование комплексов с центрами более слабого связывания практически не сказывается на интенсивности флуоресценции. Следует отметить, что низкий квантовый выход флуоресценции билирубина не обусловлен высокой эффективностью интеркомбинационной конверсии $S_1 \rightarrow T_1$: квантовый выход в триплетное состояние для комплекса билирубин–САЧ $\Phi_{\text{т}} < 0,01$ [17]. То есть ни испускание излучения в виде флуоресценции, ни интеркомбинационная конверсия $S_1 \rightarrow T_1$ не являются основными путями дезактивации энергии электронного возбужденного синглетного состояния молекулы билирубина при комнатной температуре. Принято считать [17, 19], что главной причиной слабой флуоресценции растворов билирубина при указанных условиях является внутренняя конверсия – высокая вращательная подвижность внешних пиррольных колец молекулы. В этой связи увеличение квантового выхода флуоресценции билирубина при встраивании в белковую матрицу САЧ или САБ может быть

следствием некоторого ограничения степеней свободы [31].

Проведенные в настоящей работе исследования показывают наличие выраженной зависимости положения спектра флуоресценции Z,Z -билирубина IX α в составе комплекса с альбумином (САЧ или САБ) от длины волны возбуждения (см. рис. 3, кривые 4–6) и положения спектра возбуждения от длины волны регистрации флуоресценции (см. рис. 3, кривые 1–3). При этом для комплекса билирубин–САБ батохромный сдвиг спектра флуоресценции более выражен: изменение длины волны возбуждения от $\lambda_{\text{возб}} = 400$ нм к $\lambda_{\text{возб}} = 500$ нм сопровождается смещением положения максимума спектра флуоресценции на 11 нм. В аналогичных условиях смещение спектра флуоресценции билирубина, связанного с САЧ, составляет 7 нм. Высокая степень очистки использованного препарата Z,Z -билирубина IX α , а также результаты ранее проведенных исследований [30] с использованием изотропных органических растворителей позволяют утверждать, что наблюдаемая зависимость положения спектра флуоресценции от длины волны не обусловлена присутствием в растворе примесей с близкими спектральными характеристиками.

Характерной особенностью поляризационных спектров флуоресценции Z,Z -билирубина IX α , встроенного в структуру белковой глобулы САЧ или САБ, является достаточно высокая (близкая к предельной) степень поляризации флуоресценции ($p = 0,45-0,46$) при ее возбуждении на длинноволновом склоне полосы поглощения билирубина и регистрации на коротковолновом склоне полосы флуоресценции (кривые 7, 8 на рис. 3). Однако при смещении длины волны возбуждения в коротковолновую часть спектра поглощения билирубина наблюдается выраженная деполяризация флуоресценции пигмента, связанного с САЧ (при $\lambda_{\text{возб}} = 390$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 535$ нм $p = 0,135$). Для комплекса билирубин–САБ в аналогичных условиях степень поляризации флуоресценции снижается не столь существенно ($p = 0,32$). Отмечается также непостоянство степени поляризации флуоресценции по спектру испускания: увеличение длины волны регистрации флуоресценции, как правило, сопровождается некоторым уменьшением степени поляризации (кривые 8 и 9 на рис. 3).

Не вызывает сомнения, что достаточно высокие значения степени поляризации флуоресценции Z,Z -билирубина IX α в составе комплексов с САЧ и САБ при комнатной температуре и длинноволновом возбуждении обусловлены прежде всего чрезвычайно коротким временем жизни флуоресценции пигмента, отсутствием внутри- и межмолекулярного переноса энергии, а также жесткой фиксацией пигмента

в белковой матрице [33]. Так, согласно [21] длительность затухания интенсивности флуоресценции билирубина в центре наиболее сильного связывания САЧ характеризуется $\tau = 64$ пс ($\lambda_{\text{возб}} = 476$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 550$ нм, pH = 7,4). Более короткие времена жизни флуоресценции ($\tau = 18 \pm 3$ пс) получены в [17] с использованием стрик-камеры. В этой связи следует также отметить недавно выполненную работу [22], согласно которой кинетика затухания люминесценции билирубина, связанного с САЧ ($\lambda_{\text{возб}} = 454$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 525$ нм, pH = 8,0), является полиэкспоненциальной и наилучшим образом описывается 5 компонентами с $\tau_1 = 0,077$ пс, $\alpha_1 = 0,39$; $\tau_2 = 0,60$ пс, $\alpha_2 = 0,28$; $\tau_3 = 3,65$ пс, $\alpha_3 = 0,17$; $\tau_4 = 20$ пс, $\alpha_4 = 0,12$; $\tau_5 = 95$ пс, $\alpha_5 = 0,04$. По нашему мнению, несовпадение вышеприведенных результатов по определению τ обусловлено не только различным временным разрешением используемой техники, но и отличающимся диапазоном возбуждения и регистрации флуоресценции. При наличии безызлучательного синглет-синглетного переноса энергии τ может сокращаться и существенным образом зависеть от длины волны возбуждения и регистрации флуоресценции. Что касается длительности затухания флуоресценции *Z,Z*-билирубина IX α , связанного с САБ, то согласно [21] $\tau = 33$ пс ($\lambda_{\text{возб}} = 476$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 550$ нм, pH = 7,4). Естественно, что при таком коротком времени жизни флуоресценции билирубина, связанного с САЧ или САБ, процессы вращательной депolarизации не успевают развиваться и при возбуждении молекул билирубина поляризованным излучением испускание также продолжает оставаться поляризованным даже в вязких растворах. Вместе с тем определенную роль в высокой (близкой к предельной) степени поляризации флуоресценции билирубина играет и снижение вращательной подвижности пигмента, обусловленное жестким микроокружением белкового каркаса альбумина. На жесткую фиксацию пигмента указывает как 10-кратное увеличение интенсивности его флуоресценции при связывании с САЧ и САБ, так и более высокое значение степени поляризации флуоресценции в сравнении с таковым для билирубина в хлороформе, для которого $p = 0,24 \pm 0,03$ при $\lambda_{\text{возб}} = 453$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 550$ нм [30], а кинетика затухания интенсивности флуоресценции характеризуется экспонентой с $\tau = 14 \pm 2$ пс [21].

Для анализа причин наблюдаемой зависимости положения спектра флуоресценции (возбуждения флуоресценции) от длины волны возбуждения (регистрации), непостоянства степени поляризации флуоресценции по спектру испускания, а также ее резкого снижения при смещении длины волны возбуждения в коротковолновую часть спектра поглощения обратимся к данным о строении и пространственной структуре молекулы билирубина.

Структурно *Z,Z*-билирубин IX α можно рассматривать (рис. 1 и рис. 4) как тетрапиррольную молекулу, состоящую из двух достаточно похожих, однако не полностью симметричных фрагментов (каждый из которых включает в себя два пиррольных кольца), соединенных между собой метиленовым мостиком (CH_2 -группой). Причем вследствие разрыва метиленовой группой общей цепи сопряжения и в спектральном плане молекула указанного пигмента должна рассматриваться как соединение, состоящее из двух хромофоров (хромофор I и хромофор II) – бихромофор [9, 32]. Пространственная конформация молекулы билирубина в изотропном растворителе (хлороформе) представляет собой складчатую структуру, похожую на конек крыши, в котором два пиррольных фрагмента одной половины молекулы расположены в плоскости, образующей угол порядка 98° – 104° с плоскостью двух других пиррольных колец [34]. Расстояние между дипиррольными фрагментами молекулы составляет 5–6 Å. Причиной формирования закрытой изогнутой конформации молекулы билирубина является образование 6 прочных внутримолекулярных водородных связей между –COOH-группой одной половины молекулы с –NH- и –C=O-группами другой половины молекулы тетрапиррола (см. рис. 4). Возможны два зеркальных варианта складчатой структуры (*P*- и *M*-конформеры [34]), показанных на рис. 4. Насколько нам известно, в литературе отсутствуют прямые рентгеноструктурные исследования комплексов билирубина с транспортными белками крови. Согласно спектральным данным молекула билирубина сохраняет складчатую конформацию в составе комплекса как с САЧ [34, 36], так и с САБ [37]. При этом в комплексе с САЧ билирубин глубоко и полностью входит в структуру макромолекулы, практически не контактируя с водным окружением [21, 23, 25]. В комплексе с САБ пигмент доступен растворителю: его спектральные характеристики чувствительны к изменению pH среды [21, 23]. Кроме того, если в комплексе билирубина с САЧ наблюдается некоторый избыток *P*-конформера [34], то САБ предпочтительно связывает *M*-конформацию [35]. Однако для комплекса билирубина как с САЧ, так и с САБ характерно неодинаковое микроокружение каждого из хромофоров, создаваемое различными участками полипептидной цепи. Известно также [25], что в молекуле САЧ хромофоры занимают положение в различных полудоменах белковой макромолекулы.

Ранее нами было показано [30], что в изотропном растворителе (хлороформ, изобутанол) различия в энергии электронных переходов хромофоров I и II *Z,Z*-билирубина IX α незначительны и S_1 -уровень хромофора I расположен несколько выше, чем

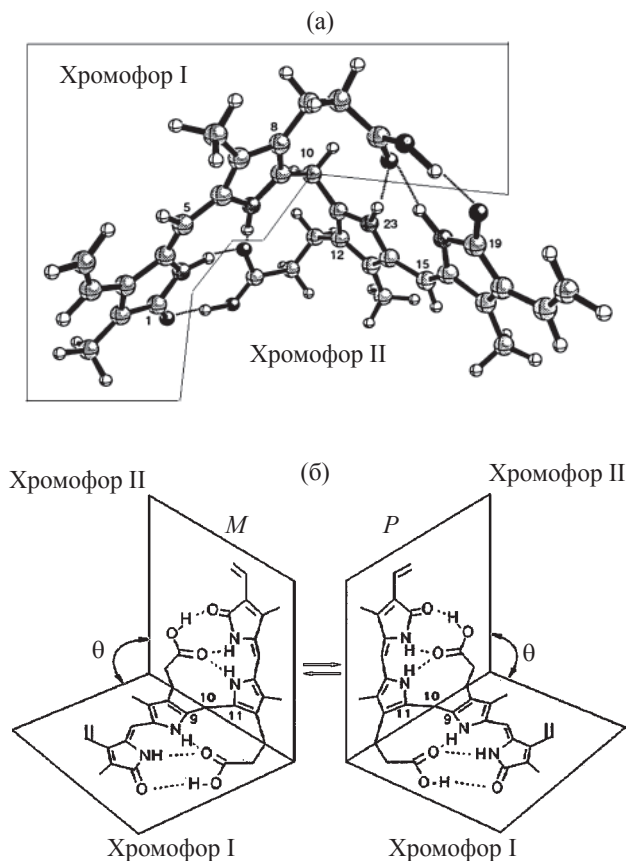


Рис. 4. Пространственная структура молекулы Z,Z-билирубина IX α (а) и расположение его хромофоров в пространстве (б).

у хромофора II (т. е. полоса поглощения хромофора I смещена в коротковолновую область по отношению к хромофору II). Для указанных растворителей батохромный сдвиг максимума спектра флуоресценции Z,Z-билирубина IX α при варьировании длины волны возбуждения не превышает 2,5–3,0 нм и обусловлен совокупностью причин [30]: структурной и спектральной неидентичностью хромофоров, образующих молекулу билирубина; конформационной гетерогенностью пигмента в растворе, вкладом во флуоресценцию молекул, не завершивших (вследствие крайне короткого времени жизни флуоресценции) колебательную релаксацию в S_1 -состоянии (“горячая флуоресценция”); неоднородным ориентационным уширением уровней [38]. При встраивании билирубина в белковую глобулу САЧ или САБ батохромное смещение спектров становится более выраженным, чем для изотропных растворителей, что может объясняться увеличением спектральных различий между хромофорами за счет гетерогенности их микроокружения. В пользу такого заключения указывает выраженная зависимость спектров поглощения и флуоресценции пигмента от диэлектрической постоянной среды [17, 18, 21]. Отметим также, что определенный вклад в различие спек-

тральных характеристик хромофоров, встроенных в белковую матрицу, может вносить и “зарядовый эффект”, поскольку если в буферном растворе в области физиологических значений pH молекула билирубина является моноанионом, то в составе комплекса с альбумином она является дианионом [34]. Следовательно, из-за различия спектральных характеристик хромофоров I и II вследствие гетерогенности их микроокружения в белковой матрице изменение длины волны возбуждения флуоресценции приводит к изменению их вкладов в общее поглощение билирубина. Если полагать, что (по той же причине) хромофоры I и II характеризуются отличающимися спектрами флуоресценции и каждый из них в той или иной степени вносит вклад в спектр флуоресценции билирубина (см. далее), становится очевидным, что варьирование длины волны возбуждения должно приводить к изменению положения спектра флуоресценции, а варьирование длины волны регистрации – к изменению положения спектра возбуждения (см. рис. 3).

Для анализа закономерностей межхромофорного взаимодействия в молекуле Z,Z-билирубина IX α обратимся к поляризационному спектру возбуждения флуоресценции (кривые 7 на рис. 3) и спектрам поляризации флуоресценции (кривые 8, 9 на рис. 3). Прежде всего вид поляризационного спектра возбуждения флуоресценции является типичным для взаимодействий, сопровождающихся внутри- или межмолекулярным синглет-синглетным переносом энергии электронного возбуждения [39, 40]. Из представленных данных следует, что при возбуждении флуоресценции билирубина, связанного с САЧ, на высокие колебательные подуровни S_1 -состояния (коротковолновая часть спектра) несмотря на аномально короткое время жизни флуоресценции наблюдается эффективный внутримолекулярный межхромофорный перенос энергии (кривая 7 на рис. 3а). На наличие внутри-, а не межмолекулярного переноса указывает тот факт, что при концентрации $C_{бр} = 2$ мкМ, $C_{САЧ} = C_{САБ} = 4$ мкМ компоненты находятся в мономерном состоянии, а межмолекулярные расстояния для билирубина являются чрезмерно большими для индуктивно-резонансного переноса энергии. К тому же замена кювет с толщиной оптического слоя $l = 10$ мм на кюветы с $l = 2$ мм с соответствующим 5-кратным увеличением концентрации пигмента практически не сказывается на поляризационных спектрах.

В отличие от комплекса билирубин–САЧ для билирубина, связанного с САБ, деполаризация флуоресценции при смещении длины волны возбуждения в коротковолновую часть спектра поглощения выражена в значительно меньшей степени (кривая 7 на рис. 3б). То есть при указанных условиях воз-

буждения для комплекса билирубин–САБ внутри-молекулярный межхромофорный перенос энергии не столь эффективен, как для билирубина, связанного с САЧ. При смещении возбуждения к длинноволновому (“красному”) краю полосы поглощения билирубина в составе комплекса с САЧ или САБ все меньше находится центров, которые могут быть акцепторами энергии электронного возбуждения и перенос становится вначале маловероятным, а затем ($\lambda_{\text{возб}} \geq 480$ нм) и практически невозможным: степень поляризации флуоресценции близка к предельному значению (так называемый “эффект красного края”, или эффект Вебера [39]).

В этой связи выраженная зависимость спектра поляризации флуоресценции билирубина при возбуждении в области максимума спектра поглощения ($\lambda_{\text{возб}} = 460$ нм, рис. 3, кривая 9) обусловлена скорее всего изменяющимся вкладом по полосе флуоресценции пигмента хромофоров, непосредственно поглотивших кванты света (относительно высокая степень поляризации при коротковолновой регистрации), и хромофоров, получивших энергию электронного возбуждения в результате внутри-молекулярного переноса (длинноволновая часть спектра испускания, характеризующаяся более низким значением p).

Зарегистрированная в настоящей работе деполяризация флуоресценции Z,Z-билирубина IX α (более выраженная для его комплекса с САЧ, и менее – с САБ) при возбуждении на коротковолновом склоне полосы поглощения свидетельствует о том, что процессы межхромофорного безызлучательного переноса энергии характеризуются высокой скоростью, поскольку конкурируют с процессами излучательной дезактивации энергии электронного возбуждения хромофоров, входящих в состав Z,Z-билирубина IX α . Анализ литературных данных позволяет заключить, что фактором, способствующим данному процессу, является наличие резонансных диполь-дипольных взаимодействий между хромофорами – давидовского экситонного связывания (Davydov exciton coupling) [41–43], свидетельствующего о том, что в бихромофоре его составляющие не являются полностью независимыми. На наличие экситонных взаимодействий между хромофорами билирубина указывает ряд факторов. Прежде всего для комплексов пигмента с САЧ [34, 36] и САБ [37] наблюдается расщепление полосы (инверсия знака) в спектре кругового дихроизма, в то время как для монохромофорных аналогов билирубина (“полубилирубина” – ксантобилирубиновой кислоты) регистрируется нерасщепленная полоса [25, 44, 45]. При этом две молекулы ксантобилирубиновой кислоты, для которых расщепление отсутствует, занимают тот же сайт на молекуле САЧ, что и молекула билиру-

бина [25]. Другим подтверждением наличия экситонных взаимодействий между хромофорами является значительное уширение спектра поглощения билирубина и смещение его в длинноволновую область относительно монохромофорного аналога. Причиной уширения результирующего спектра бихромофора согласно теории экситонных взаимодействий является расщепление S_1 -уровня каждого хромофора на два (Davydov exciton splitting): один из них энергетически расположен ниже (E_1), а другой – выше (E_2) электронного уровня соответствующего хромофора. Литературные данные показывают, что максимум спектра поглощения ксантобилирубиновой кислоты в комплексе с САЧ расположен при $\lambda_{\text{макс}} = 425$ нм, а спектр характеризуется полушириной $\Delta\nu = 3980$ см $^{-1}$ [25], в то время как для комплекса Z,Z-билирубина IX α с САЧ $\lambda_{\text{макс}} = 458$ нм, $\Delta\nu = 4740$ см $^{-1}$, с САБ – $\lambda_{\text{макс}} = 462$ нм, $\Delta\nu = 4520$ см $^{-1}$. В соответствии с теорией экситонных взаимодействий [42, 43] в зависимости от угла между хромофорами θ результирующий спектр поглощения бихромофора может смещаться как в длинноволновую, так и в коротковолновую стороны по отношению к спектрам поглощения составляющих хромофоров. Направленность смещения определяется энергией резонансного диполь-дипольного взаимодействия $V_{\text{дд}}$: при $V_{\text{дд}} < 0$ должен наблюдаться длинноволновый сдвиг, а при $V_{\text{дд}} > 0$ – коротковолновый. Значение $V_{\text{дд}}$ сильно зависит от дипольных моментов (μ_1 и μ_2) каждого из хромофоров, расстояния между диполями R и их ориентации [42]: $V = [\mu_1\mu_2(\cos\theta - 3\cos\beta_1\cos\beta_2)]/4\pi\epsilon_0 R^3$, где ϵ_0 – диэлектрическая постоянная, θ – угол между диполями, β_1 и β_2 – углы между радиусом-вектором, соединяющим центры диполей, и каждым диполем. При этом величина экситонного расщепления энергии составляет $E_2 - E_1 = 2V_{\text{дд}}$.

Как уже отмечалось, для билирубина в хлороформе $\theta \approx 98^\circ$ – 104° [34], а для исследуемых пигмент-белковых комплексов угол между дипиррольными фрагментами не определен. Из возможных вариантов ($\theta \approx 30^\circ$, $\beta_1 \approx \beta_2 \approx 10^\circ$ – 20° ; $\theta \approx 90^\circ$ – 100° , $\beta_1 \approx \beta_2 \approx 60^\circ$ – 70° ; $\theta \approx 140^\circ$, $\beta_1 \approx \beta_2 \approx 130^\circ$ – 170°) расположения хромофоров, предложенных для таких комплексов в [34] на основании исследования их оптической активности, следует, что во всех случаях $V_{\text{дд}} < 0$. В соответствии с теорией результирующий спектр поглощения бихромофора должен быть смещен в длинноволновую область по отношению к монохромофорному аналогу, что и подтверждают вышеприведенные данные для билирубина и ксантобилирубиновой кислоты.

Таким образом, имеются основания полагать, что фактором, способствующим переносу энергии электронного возбуждения между хромофорами в усло-

виях аномально короткого времени жизни флуоресценции билирубина (пикосекундный или субпикосекундный диапазон), является наличие экситонных взаимодействий между хромофорами. Вследствие малого межхромофорного расстояния (5–6 Å) колебания электрического поля одного хромофора (при его возбуждении) могут восприниматься другим, вызывая перенос возбуждения. При этом электронное возбуждение становится делокализованным между хромофорами, создавая молекулярное возбужденное состояние (экситон).

Анализ экспериментальных данных (рис. 3) показывает, что при коротковолновом возбуждении быстрый внутримолекулярный межхромофорный перенос энергии делокализует возбуждение между двумя поглощающими хромофорами, с большей вероятностью заселяя уровни при меньшей энергии. Уменьшение энергии возбуждения (смещение в длинноволновую область) снижает вероятность переноса, поскольку барьер между экситонными состояниями становится значительным. В этом случае возбуждение остается локализованным на том хромофоре, который поглотил фотон. При этом образование *E,Z*-билирубина сопряжено со структурной перегруппировкой хромофора I, а к образованию *Z,E*-билирубина ведет структурная перестройка хромофора II (см. рис. 1).

Поскольку для комплексов билирубин–САЧ при смещении длины волны воздействующего излучения к длинноволновому склону поглощения регистрируется снижение квантового выхода *Z,E*-билирубина и рост квантового выхода люмирубина [28], можно было бы предположить, что спектр поглощения хромофора I смещен в длинноволновую область по отношению к спектру хромофора II. Однако, как следует из данных [14, 15, 35], при облучении комплексов билирубин–САЧ в пределах длинноволновой полосы поглощения пигмента концентрация *Z,E*-билирубина всегда превышает концентрацию *EZ*-изомера. Вышеприведенные данные позволяют сделать вывод, что для *Z,Z*-билирубина IX α , связанного с САЧ, спектр поглощения хромофора II смещен в длинноволновую область по отношению к хромофору I. В этом случае при возбуждении билирубина на высокие колебательные подуровни S_1 -состояния возбужденный уровень хромофора II заселяется как за счет прямого электронного возбуждения, так и путем миграции энергии с S_1 -состояния хромофора I. По мере смещения длины волны действующего излучения к длинноволновому склону полосы поглощения билирубина вероятность межхромофорного переноса энергии снижается (см. рис. 3). Соответственно, должен снижаться и квантовый выход образования *Z,E*-билирубина IX α , что и подтверждают данные [28]. При этом вслед-

ствие более интенсивного поглощения хромофора II (по сравнению с хромофором I) при длинноволновом краевом возбуждении относительное число молекул *Z,E*-билирубина IX α (образующихся в результате *цис-транс*-фотоизомеризации хромофора II) превышает таковое для *E,Z*-билирубина IX α . При коротковолновом возбуждении интенсивность поглощения хромофора I выше, чем у хромофора II. Однако вследствие очень эффективного внутримолекулярного “оттока” энергии электронного возбуждения на хромофор II также наблюдается преимущественное образование среди фотопродуктов пигмента – *Z,E*-билирубина IX α .

Для комплекса билирубин–САБ эффективность межхромофорного переноса энергии не столь выражена, что и является причиной низкой селективности процесса фотоизомеризации для указанного комплекса. Можно предположить, что высокая эффективность межхромофорного переноса энергии в билирубине, связанном с САЧ, и ее более низкое значение для комплекса с САБ обусловлены различиями конформаций пигмента в указанных комплексах (отличия в углах между дипиррольными фрагментами и в межхромофорных расстояниях). Имеющаяся информация [21, 23–25, 34–36] о строении комплексов билирубина с САЧ и САБ свидетельствует в пользу данного предположения. При этом следует отметить, что вышеприведенные результаты отнюдь не исключают и возможную роль стерических факторов, способных оказывать влияние на степень селективности процесса конфигурационной *цис-транс*-фотоизомеризации *Z,Z*-билирубина IX α в его комплексах с САЧ и САБ.

Заключение

Результаты проведенных исследований показали, что одной из причин преимущественного образования *Z,E*-билирубина IX α среди продуктов фотоизомеризации *Z,Z*-билирубина IX α при его облучении в составе комплексов с транспортными белками САЧ и САБ является наличие межхромофорного внутримолекулярного переноса энергии. Эффективность такого переноса существенным образом зависит от типа белка-носителя, определяющего конформацию связанного пигмента, и более выражена для его комплекса с САЧ, менее – с САБ. Фактором, способствующим межхромофорному переносу энергии в условиях аномально короткого времени жизни флуоресценции билирубина (пикосекундный или субпикосекундный диапазон), является наличие экситонных взаимодействий между хромофорами.

Авторы признательны проф. Б.М. Джагарову и доктору физ.-мат. наук Т.К. Разумовой за обсуждение статьи и высказанные критические замечания.

1. Kivlahan C., James E.J.P. The natural history of neonatal jaundice // *Pediatrics*. 1984. V. 74. № 3. P. 364–370.
2. Edwards S. Phototherapy and neonate: providing safe and effective nursing care for jaundiced infants // *J. Neonat. Nursing*. 1995. V. 1. № 5. P. 9–12.
3. Porter M.L., Dennis B.L. Hyperbilirubinemia in the term newborn // *Am. Family Physician*. 2002. V. 65. № 4. P. 599–606.
4. Akobeng A.K. Effects of treatments for unconjugated hyperbilirubinaemia in term and preterm infants // *Clin. Evid*. 2004. V. 12. № 1–2. P. 501–507.
5. Bhutani V.K., Johnson L., Sivieri E.M. Predictive ability of a predischARGE hour-specific serum bilirubin for subsequent significant hyperbilirubinemia in healthy term and near-term newborns // *Pediatrics*. 1999. V. 103. № 1. P. 6–14.
6. American academy of pediatrics. Subcommittee on hyperbilirubinemia. Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation // *Pediatrics*. 2004. V. 114. № 1. P. 297–316.
7. Polin R.A. Management of neonatal hyperbilirubinemia: rational use of phototherapy // *Biol. Neonate*. 1990. V. 58. № 1. P. 32–43.
8. Vreman H.J., Wong R.J., Stevenson D.K. Phototherapy: current methods and future directions // *Semin. Perinatol*. 2004. V. 28. № 5. P. 326–333.
9. Mostovnikov V.A., Mostovnikova G.R., Plavski V.Y. Spectral and photochemical parameters, which define laser phototherapy hyperbilirubinemia of newborn higher efficacy // *Proc. SPIE*. 1994. V. 2370. P. 558–561.
10. Мостовникова Г.Р., Мостовников В.А., Плавский В.Ю., Третьякова А.И., Андреев С.П., Рябцев А.Б. Фототерапевтический аппарат на основе аргонного лазера для лечения гипербилирубинемии у новорожденных детей // *Оптический журнал*. 2000. Т. 67. № 11. С. 60–63.
11. Ennever J.F., Knox I., Denne S.C., Speck W.T. Phototherapy for neonatal jaundice: in vivo clearance of bilirubin photoproducts // *Pediatr. Res*. 1985. V. 19. № 2. P. 205–208.
12. Ennever J.F., Costarino A.T., Polin R.A., Speck W.T. Rapid clearance of a structural isomer of bilirubin during phototherapy // *J. Clin. Invest*. 1987 V. 79. № 6. P. 1674–1678.
13. Okada H., Masuya K., Yasuda S., Okubo K., Kawada K., Kusaka T., Namba M., Nishida T., Imai T., Isobe K., Itoh S. Developmental changes in serum half-life of (E,Z)-cyclobilirubin // *Early Hum. Dev*. 2005. V. 81. № 7. P. 619–622.
14. Kanna Y., Arai T., Tokumaru K. Effect of serum albumin from several mammals on the photoisomerization of bilirubin // *Bull. Chem. Soc. Jpn*. 1993. V. 66. № 5. P. 1586–1588.
15. McDonagh A.F., Lightner D.A. Mechanism of phototherapy of neonatal jaundice. Regiospecific photoisomerization of bilirubins // *Optical properties and structure of tetrapyrroles* / Ed. by Blauer G. and Sund H. Berlin, N. Y.: Walter de Gruyter & Co. Inc., 1985. P. 297–307.
16. Ennever J.F. Phototherapy for neonatal jaundice // *Photochem. Photobiol*. 1988. Vol. 47. № 6. P. 871–876.
17. Lamola A.A. Effect of environment on photophysical processes of bilirubin // *Optical properties and structure of tetrapyrroles* / Ed. by Blauer G., Sund H.: Berlin, N. Y.: Walter de Gruyter & Co. Inc., 1985. P. 311–330.
18. Chen R.F. Fluorescence stopped-flow study of relaxation processes in the binding of bilirubin to serum albumins // *Arch. Biochem. Biophys*. 1974. V. 160. № 1. P. 106–112.
19. Greene B.I., Lamola A.A., Shank C. Picosecond primary photoprocesses of bilirubin bound to human serum albumin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981. V. 78. № 4. P. 2008–2012.
20. Tran C.D., Beddard G.S. Excited state properties of bilirubin and its photoproduct using picosecond fluorescence and circularly polarized luminescence spectroscopy // *Biochim. Biophys. Acta*. 1981. V. 678. № 3. P. 497–504.
21. Tran C.D., Beddard G.S. Interaction between bilirubin and albumins using picosecond fluorescence and circularly polarized luminescence spectroscopy // *J. Am. Chem. Soc*. 1982. V. 104. № 24. P. 6741–6747.
22. Zietz B., Macpherson A.N., Gillbro T. Resolution of ultrafast excited state kinetics of bilirubin in chloroform and bound to human serum albumin // *Phys. Chem. Chem. Phys*. 2004. V. 6. № 19. P. 4535–4537.
23. Lee J.J., Gillispie G.D. The effect of pH on the fluorescence of complexes of human serum albumin and bovine serum albumin with bilirubin // *Photochem. Photobiol*. 1981. V. 33. № 5. P. 757–760.
24. Brodersen R. Bilirubin. Solubility and interaction with albumin and phospholipids // *J. Biol. Chem*. 1979. V. 254. № 7. P. 2364–2369.
25. Jacobsen J., Brodersen R. Albumin-bilirubin binding mechanism. Kinetic and spectroscopic studies of binding bilirubin and xanthobilirubin acid to human serum albumin // *J. Biol. Chem*. 1983. V. 258. № 10. P. 6319–6326.
26. Reed R.G. Kinetics of bilirubin binding to serum albumin and effect of palmitate // *J. Biol. Chem*. 1977. V. 252. № 21. P. 7483–7487.
27. Pace C.N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein // *Protein Sci*. 1995. V. 4. № 11. P. 2411–2423.
28. Greenberg J.W., Malhotra V., Ennever J.F. Wavelength dependence of the quantum yield for the structural isomerization of bilirubin // *Photochem. Photobiol*. 1987. V. 46. № 4. P. 453–456.
29. Чирвоный В.С., Першукевич П.П., Галиевский В.А., Шульга А.М. Регистрируемая в ближней ИК области необычная флуоресценция димеров порфиринов, химически связанных через этиленовый мостик // *Опт. и спектр*. 1997. Т. 82. № 5. С. 773–780.

30. Плавский В.Ю., Мостовников В.А., Мостовникова Г.Р., Третьякова А.И. Спектрально-флуоресцентные и поляризационные характеристики Z,Z-билирубина IX α // ЖПС. 2007. Т. 74. № 1. С. 108–119.
31. Мышкин А.Е., Сахаров В.Н. Фотохимия билирубина // Успехи химии. 1982. Т. 51. № 1. С. 72–91.
32. Plavski V.Y., Mostovnikov V.A., Mostovnikova G.R. Bichromophoric character of the absorption and emission of light by molecules of bilirubin // Spectroscopy of Biological Molecules / Ed. by Merlin J.C., Turrell S., Huvenne J.P. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Acad. Publ., 1995. P. 271–272.
33. Плавский В.Ю., Мостовников В.А., Мостовникова Г.Р., Третьякова А.И. Селективная лазерная фотоизомеризация билирубина // Материалы междунар. конф. “Лазерная физика и применения лазеров”, 14–16 мая 2003 г., Минск. 2003. С. 309–312.
34. Lightner D.A., Wijekoon W.M.D., Zhang M.H. Understanding bilirubin conformation and binding. Circular dichroism of human serum albumin complexes with bilirubin and its esters // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 32. P. 16669–16676.
35. McDonagh A.F., Lightner D.A., Resinger M., Palma L.A. Human serum albumin as a chiral template. Stereoselective photocyclization of bilirubin // J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1986. № 2. P. 249–250.
36. Blauer G., Harmatz D., Snir J. Optical properties of bilirubin-serum albumin complexes in aqueous solution. I. Dependence on pH // Biochim. Biophys. Acta. 1972. V. 278. № 1. P. 68–88.
37. Blauer G., King T.E. Interactions of bilirubin with bovine serum albumin in aqueous solution // J. Biol. Chem. 1970. V. 245. № 2. P. 372–381.
38. Рубинов А.Н., Томин В.И. Спектральные свойства жидких полярных растворов в условиях динамического неоднородного ориентационного уширения // ЖПС. 1983. Т. 38. № 1. С. 42–61.
39. Weber G., Shinitzky M. Failure of energy transfer between identical aromatic molecules on excitation at the long wave edge of the absorption spectrum // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1970. V. 65. № 3. P. 823–830.
40. Гайсенок В.А., Саржевский А.М. Анизотропия поглощения и люминесценции многоатомных молекул // Минск: Университетское, 1986. 320 с.
41. Давыдов А.С. Теория молекулярных экситонов. М.: Наука, 1968. 296 с.
42. Экситоны / Под ред. Рашба Э.И., Стеруса М.Д. М.: Наука, 1985. 616 с.
43. Кантор Ч., Шиммел П. Биофизическая химия. М.: Мир, 1984. Т. 2. С. 45–54.
44. Плавский В.Ю., Мостовников В.А., Третьякова А.И., Мостовникова Г.Р. Экситонные межхромофорные взаимодействия в молекуле Z,Z-билирубина IX α // Материалы междунар. конф. “Лазерная физика и оптические технологии”, 25–29 сентября 2006 г., Гродно. 2006. Т. 2. С. 336–339.
45. Lamola A.A., Braslavsky S.E., Schaffner K., Lightner D.A. Spectral study of the photochemistry of dipyrrole models for bilirubin bound to human serum albumin // Photochem. Photobiol. 1983. V. 37. № 3. P. 263–270.