

Фотоиндуцированный разрыв связи Fe–O₂ в гемоглобине: квантовый выход диссоциации, возбужденные электронные состояния и релаксационные безызлучательные процессы

© Б.М. Джагаров¹, С.В. Лепешкевич¹, А.Ю. Панарин¹, М.В. Пархоц¹, А.Ф. Чайковский²

¹ Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси,
220072 Минск, Беларусь

² Белорусский государственный университет,
220030 Минск, Беларусь

e-mail: b.dzhagarov@ifanbel.bas-net.by

Поступила в редакцию 21.02.2018 г.

Методом лазерной кинетической наносекундной спектроскопии проведены исследования бимолекулярной рекомбинации молекулярного кислорода с гемоглобином человека при возбуждении в различных спектральных диапазонах. Получены принципиально отличные результаты: наличие достаточно эффективной фотодиссоциации при возбуждении в *Q*-полосу $\pi\pi^*$ -природы и практически полное ее отсутствие при возбуждении в полосу, расположенную в ближней ИК области и соответствующую переносу электрона с порфириновой a_{2u} -орбитали на смешанную орбиталь, образованную из *d*-орбитали железа и свободной π -орбитали молекулярного кислорода. Анализ этих данных совместно с данными, полученными ранее с привлечением техники нано-, пико- и фемтосекундной спектроскопии, позволил описать механизм и динамику реакции фотодиссоциации и релаксационных внутригемовых процессов.

DOI: 10.21883/OS.2018.07.46277.53-18

Введение

Обнаруженная в 1957 г. [1] реакция фотодиссоциации оксигемоглобина (фотоиндуцированный разрыв связи Fe–O₂), а затем аналогичная реакция для оксимиоглобина и по сей день остается предметом многочисленных исследований с привлечением различных теоретических и экспериментальных подходов [2–22]. Установление механизма, квантовой эффективности и динамики этой реакции, которая реализуется при важнейшем физиологическом процессе — дыхании, представляется крайне необходимым для понимания природы связи гемового железа с молекулярным кислородом. Необходимо также отметить, что отсутствует полное понимание того, как при встрече молекулы дезоксигемоглобина Hb (основное состояние квинтетное, $S = 2$) с молекулой O₂ (основное состояние триплетное, $S = 1$) образуется связь Fe–O₂ в оксигемоглобине HbO₂, основное состояние которого является синглетным ($S = 0$). Окончательно не решен вопрос, какова электронная природа этой связи. В литературе обсуждаются три варианта связи: 1) Fe(II) ($S = 1$)–O₂ ($S = 1$), 2) Fe(II) ($S = 0$)–¹O₂ ($S = 0$), 3) Fe(III)–O₂[–]; в последнем случае Fe находится в ферри-форме и связывается с супероксидным анион-радикалом [23,24]. Возникают также определенные сложности при выяснении причин темнового разрыва связи Fe–O₂ в гемоглобине. Кроме того, выяснение детального механизма диссоциации оксигемоглобина необходимо для понимания подобных реакций, которые происходят в комплексах гемоглобина с другими малыми лигандами NO и CO, также вовлечен-

ными в важнейшие физиологические процессы. Очевидно, что выяснение механизма ассоциации/диссоциации гемоглобина и O₂ может и должно оказаться необходимым для установления законов, управляющих нелинейным кооперативным взаимодействием биомакромолекул с различными лигандами.

Цель настоящей работы заключалась в установлении механизмов и динамики как собственно фотодиссоциации оксигемоглобина, так и конкурирующих с ней первичных фотофизических релаксационных внутригемовых процессов. При этом основная задача заключалась в установлении природы возбужденного электронного фотодиссоциирующего состояния.

В настоящей работе представлены результаты, полученные методом лазерного наносекундного фотолиза при возбуждении оксигемоглобина в ближней ИК области спектра, в которой наблюдается малоинтенсивное поглощение, обусловленное переходами перенос-зарядовой природы (*CT*-переходы) [4]. Конкретное представление орбитальной природы этих переходов будет дано далее по тексту. Необходимо сразу указать, что подобный эксперимент был выполнен в нашей лаборатории ранее [4]. В данной работе мы провели исследование с привлечением экспериментальной техники нового поколения, обладающей значительно более высокой чувствительностью в отношении регистрации изменений оптической плотности образцов при фотолизе.

Прежде чем приступить к изложению экспериментального материала, необходимо указать на следующее обстоятельство. Под первичным квантовым выходом фотодиссоциации γ_0 мы понимаем отношение образовав-

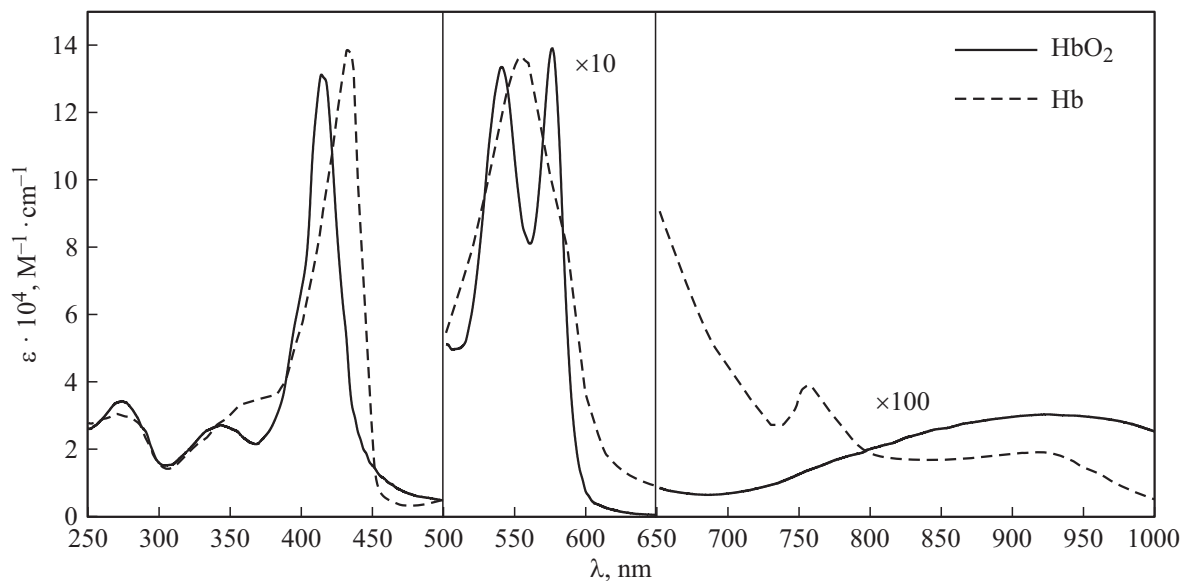


Рис. 1. Спектры поглощения окси- и дезоксигемоглобина [43]. Коэффициенты экстинкции приведены в расчете на один гем.

шихся свободных молекул O_2 , равное числу образовавшихся молекул дезоксигемоглобина, к числу фотонов, поглощенных молекулой оксигемоглобина. Величина первичного квантового выхода γ_0 составляет 0.23 [14]. После завершения геминальных стадий связывания Fe с O_2 из внутренних областей белка определенная часть молекул O_2 покидает белок. Отношение числа этих молекул (равное числу оставшихся молекул дезоксигемоглобина) к числу поглощенных фотонов определяет величину квантового выхода бимолекулярной рекомбинации γ [18]. Отношение величин γ/γ_0 равно эффективности выхода молекулы O_2 из белковой матрицы во внешнюю среду δ [18].

Экспериментальная часть

Флеш-фотолитические измерения проводились на лабораторной лазерной кинетической установке. Возбуждающий лазерный импульс длительностью 12 ns генерировался твердотельным YAG:Nd³⁺-лазером LS-2134 фирмы „ЛОТИС ТИИ“ (Минск, Беларусь). В работе использовались длины волн возбуждения 1064 и 532 nm. Частота повторения импульсов составляла 15 Hz. В качестве источника зондирующего света использовалась ксеноновая лампа OSRAM XBO 150W/1 OFR, функционирующая в непрерывном режиме.

В работе исследовался оксигемоглобин человека. Раствор оксигемоглобина получали путем гемолиза эритроцитарной массы с использованием 50 mM Tris-HCl буфера pH 8.0 с последующим центрифугированием согласно методике, описанной в работе [25]. Все измерения проводились при комнатной температуре $21 \pm 1^\circ C$.

Спектры поглощения гемоглобина в окси- и дезокси-формах, представленные на рис. 1, в видимом диапазоне

обусловлены $\pi\pi^*$ -поглощением гема (Fe-протопорфирин IX). Для этих спектров характерны: (1) высокоинтенсивная полоса Soret с максимумом при 415 и 430 nm для HbO₂ и Hb соответственно, (2) менее интенсивная Q-полоса с максимумами при 541 и 577 nm для HbO₂ и при 555 nm для Hb [26]. В красной и ближней ИК областях спектра у HbO₂ наблюдается очень слабая полоса с максимумом при 925 nm, которая сформирована из двух электронных переходов, в которые вовлечены переходы с a_{1u} и a_{2u} заполненных π -орбиталей порфириновой части гема на смешанную орбиталь, образованную d-орбиталью Fe и π^* -орбиталью O_2 [27]. Естественно, что столь большое различие коэффициентов экстинкции для различных полос в спектре поглощения (рис. 1) потребовало использования различных концентраций HbO₂ при возбуждении на длинах волн $\lambda_{ex} = 532$ и 1064 nm. Предварительные эксперименты и анализ фотоиндуцированных разностных спектров HbO₂ и Hb позволили отобрать наиболее приемлемые длины волн наблюдения с точки зрения достигаемой экспериментальной точности измерений, позволяющих регистрировать предполагаемое появление Hb при фотолизе HbO₂ и достоверно наблюдать обратную рекомбинацию O_2 и гемового железа. Соответственно длины волн регистрации были $\lambda_{reg} = 436$ nm при возбуждении $\lambda_{ex} = 532$ nm и $\lambda_{reg} = 592$ nm при возбуждении $\lambda_{ex} = 1064$ nm. При возбуждении на длинах волн $\lambda_{ex} = 532$ и 1064 nm концентрации белка составляли 20 μM и 2.0 mM по гему соответственно. Энергии лазерных импульсов возбуждения составляли 13 mJ ($\lambda_{ex} = 532$ nm) и 20 mJ ($\lambda_{ex} = 1064$ nm). Необходимо отметить, что фотодиссоциация HbO₂ при возбуждении в видимой области спектра (полосы Soret и Q) хорошо изучена [4,16], и по сути эти измерения являются контрольными для сравнения

с результатами, полученными при фотовозбуждении в полосу с максимумом в 925 nm.

Квантовый выход бимолекулярной рекомбинации молекулы O₂ определялся по формуле

$$\gamma = \frac{V\Delta A}{l\chi N\Delta\varepsilon}, \quad (1)$$

где $\Delta\varepsilon$ — разность коэффициентов экстинкции HbO₂ и Hb на длине волны регистрации; ΔA — фотоиндуцированное изменение оптической плотности образца на этой же длине волны в начальный момент времени регистрации ($\sim 1 \mu s$ после фотодиссоциации); V — рабочий объем; N — число квантов фотолитического света, попавших в рабочий объем; $\chi = 1 - 10^{-A}$ — доля квантов, поглощенных исследуемым образцом; $l = 1 \text{ cm}$ — длина кюветы, которая определяет оптический путь зондирующего света. Число квантов света определялось по формуле

$$N = P\lambda \frac{\tau}{hc}, \quad (2)$$

где P — мощность падающего на образец облучения; τ — длительность импульса; h — постоянная Планка; λ — длина волны фотолитического света; c — скорость света в вакууме.

Использование эталона (стандарта) позволяет существенно упростить измерения, избежав прямого определения величины N . Таким образом, необходимо иметь в своем распоряжении соединение, для которого известна величина квантового выхода бимолекулярной рекомбинации γ либо какой-нибудь другой фотохимической реакции. В нашем случае в качестве эталона служил оксигемоглобин, для которого надежно измерено значение γ при возбуждении в Q-полосу ($\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$). Ранее [16,18] было установлено, что при таком фотовозбуждении квантовый выход γ составляет величину 0.024 ± 0.003 и не зависит от длины волны регистрации. Выдерживая соответствующие условия эксперимента, при которых $V = V_{\text{st}}$, находим значение γ по формуле

$$\gamma = \gamma_{\text{st}} \frac{\Delta A}{\Delta A_{\text{st}}} \frac{N_{\text{st}}}{N} \frac{V}{V_{\text{st}}} \frac{1 - 10^{-A_{\text{st}}}}{1 - 10^{-A}} \frac{\Delta\varepsilon_{\text{st}}}{\Delta\varepsilon}, \quad (3)$$

где символ st относится к стандартному образцу.

Результаты и обсуждение

На рис. 2 представлены кинетические кривые изменения оптической плотности раствора оксигемоглобина, индуцируемые лазерным излучением с $\lambda_{\text{ex}} = 532$ и 1064 nm . Видно, что при возбуждении на $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$ наблюдается типичная кинетика бимолекулярной рекомбинации молекулярного кислорода с гемоглобином (рис. 2, b). Иная ситуация реализуется при возбуждении на длине волны $\lambda_{\text{ex}} = 1064 \text{ nm}$ (рис. 2, a), при котором не происходит фотоиндуцированного изменения оптической плотности образца и не наблюдается бимолекулярной рекомбинации. В этом случае изменение оптической

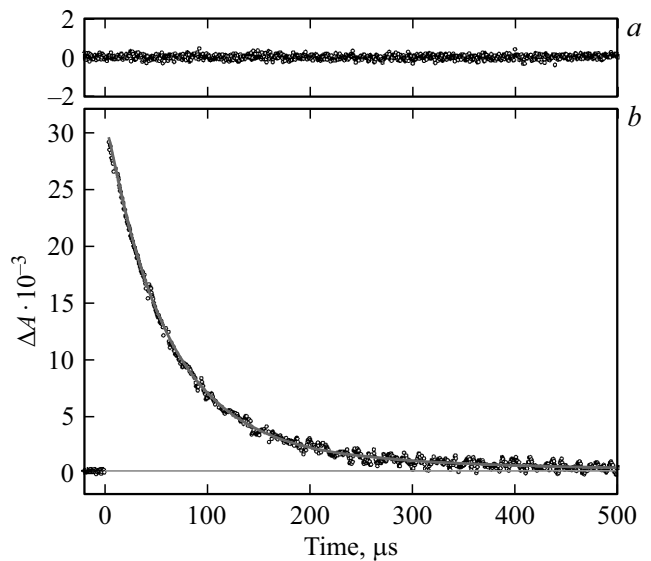


Рис. 2. Кинетика бимолекулярной рекомбинации O₂ с гемоглобином при возбуждении на длине волны $\lambda_{\text{ex}} = 1064$ (a) и 532 nm (b). Условия: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, $21 \pm 1^\circ\text{C}$; концентрация белка 2.0 mM (a) и 20 μM по гемю (b); длина волны регистрации $\lambda_{\text{reg}} = 592$ (a) и 436 nm (b).

плотности ΔA , обусловленное протеканием реакции, может быть „спрятано“ за уровнем шума. В этой ситуации представляется необходимым оценить верхний предел квантового выхода бимолекулярной рекомбинации γ . Для этого в уравнении (3) в качестве верхнего предела для амплитуды сигнала ΔA может быть взята величина шума, определяемая как стандартное отклонение (σ) от среднего значения флуктуации оптической плотности во всем временном окне детектирования бимолекулярной рекомбинации. Таким образом, верхний предел для амплитуды сигнала ΔA можно представить в виде

$$\Delta A \leq \sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (\Delta A_i - \overline{\Delta A})^2} \approx 0.00012, \quad (4)$$

где ΔA_i — флуктуация оптической плотности в i -й момент времени после действия лазерного импульса; n — число точек, соответствующих различным моментам времени; $\overline{\Delta A}$ — среднее значение флуктуации оптической плотности в n моментах времени.

Так как величина квантового выхода бимолекулярной рекомбинации $\gamma = 0.024$ при возбуждении в Q-полосу [16,18], то с учетом этой величины и значения ΔA в выражении (4) получаем, что верхний предел для квантового выхода γ при возбуждении в ближней ИК области составляет величину $\gamma \leq 0.0007$, т.е. выход молекул O₂ из белка практически не происходит. Принимая во внимание, что эффективность выхода молекулярного кислорода из белка δ при возбуждении в Q-полосу составляет 0.1 [18], а также предполагая, что эффективность выхода молекулы O₂ из белка не зависит от длины

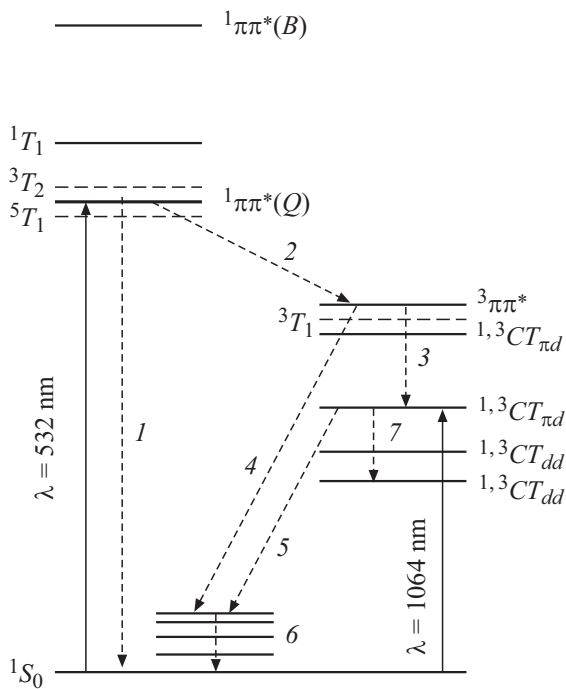


Рис. 3. Схема энергетических уровней и релаксационных процессов в оксигемоглобине.

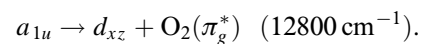
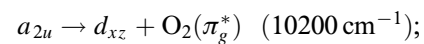
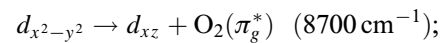
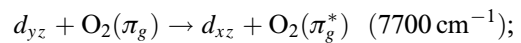
волны возбуждения, мы можем оценить верхний предел для первичного квантового выхода диссоциации при возбуждении в ближней ИК области: $\gamma_0 = \gamma/\delta \leq 0.007$. Полученное значение более чем в 30 раз меньше значения γ_0 , наблюдаемого при возбуждении в Q -полосу [14]. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при возбуждении в ближней ИК области спектра не происходит разрыва связи Fe–O₂. Далее будут рассмотрены природа возбужденного электронного фотодиссоциирующего состояния и внутригемовый размен энергии электронного возбуждения.

На рис. 3 представлен набор энергетических состояний оксигемоглобина с указанием орбитальной природы переходов между этими состояниями. При этом мы ограничимся указанием двух низших синглетных состояний $\pi\pi^*$ -природы, переходы в которые соответствуют полосам Q и B (Core). На рис. 3 указано также положение низшего триплетного $\pi\pi^*$ -состояния (${}^3\pi\pi^*$), хотя для оксигемоглобина, так же как и для всех других гембелков, фосфоресценция (как и флуоресценция) не наблюдается, и поэтому точное положение этого уровня неизвестно, и для его представления мы используем величину $\Delta({}^1\pi\pi^*)({}^3\pi\pi^*) \approx 3500 \text{ cm}^{-1}$. Такая величина характерна для всех фосфоресцирующих металлопорфиринов [28].

Далее, на рис. 3 представлены уровни энергии, которые соответствуют возбуждению d -электронов иона железа, обозначенные соответственно 1T_1 (синглетный), 3T_1 и 3T_2 (триплетные), 5T_1 (квинтетный). Сплошными линиями обозначены уровни, положение которых

установлено на основе данных по спектрам поглощения монокристаллов NbO₂ в поляризованном свете и спектрам магнитного кругового и кругового дихроизма оксигемоглобина в растворах [27]. Штриховыми линиями обозначены уровни, положение которых предсказывается на основании теоретических расчетов, выполненных в этой же работе [27]. Штриховыми стрелками обозначены всевозможные безызлучательные релаксационные переходы между энергетическими состояниями. Константа скорости внутренней конверсии (процесс 1) по аналогии с другими металлопорфиринами должна быть существенно меньше константы скорости интеркомбинационной конверсии ${}^1\pi\pi^* \rightarrow {}^3\pi\pi^*$ (процесс 2), но так как отсутствуют данные по измерению квантового выхода процесса 2 не только для гемоглобина, но и для свободных Fe-порфиринов в растворах, мы „оставляем“ место для внутренней конверсии на рис. 3.

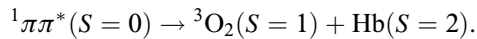
Как отмечалось ранее, в нашей работе особое внимание уделено фотовозбуждению в малоинтенсивную полосу с максимумом при $\lambda = 925 \text{ nm}$. Эта полоса имеет очень сложную спектральную природу. В работе [27] было выполнено комплексное исследование природы этой полосы с привлечением данных о спектрах поглощения монокристаллов NbO₂ в поляризованном свете, МКД- и КД-спектроскопии и квантово-механических расчетов и было показано, что эта полоса сформирована в результате четырех электронных переходов. Четырем возбужденным состояниям соответствуют следующие орбитальные переходы:



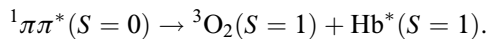
Следует отметить, что цифры в скобках соответствуют максимумам в спектрах поглощения указанных переходов. Основной вклад в интенсивность полосы с максимумом при 925 nm дают два более высокоэнергетических перехода. Эти два перехода связаны с переносом электронов с заполненных π -орбиталей (a_{1u} и a_{2u}) на низшую незаполненную орбиталь $d_{xz} + O_2(\pi_g^*)$, которая представляет „смесь“ d -орбитали Fe и x -компоненты свободной незаполненной π_g^* -орбитали O₂. Эти возбужденные состояния мы обозначили ${}^{1,3}CT_{\pi d}$, при этом синглетные и триплетные состояния энергетически расположены близко, и мы ограничиваемся общим обозначением, не указывая раздельно два состояния, отличающиеся мультиплетностью. Два более низкоэнергетических состояния мы обозначим ${}^{1,3}CT_{dd}$. Они связаны с переходами внутри Fe–O₂-ячейки NbO₂. В них задействованы d -орбитали Fe и π -орбитали O₂. Аналогичная интерпретация этих переходов дана в работе [29]. В работе [23] была предложена несколько иная интерпретация ИК полосы, однако и в этой работе два более

высокоэнергетических перехода относят к переходам $a_{1u}, a_{2u} \rightarrow d_{xz} + O_2$.

Приступим к непосредственному описанию и анализу предполагаемых фотофизических процессов, которые реализуются после фотовозбуждения HbO₂ и определяют эффективность фотодиссоциации. После акта поглощения фотона ($\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$) молекула HbO₂ оказывается в низшем синглетном $^1\pi\pi^*$ -состоянии. Молекула HbO₂ не обладает флуоресценцией (по крайней мере, квантовый выход $\leq 10^{-6}$) [30]. В результате следует ожидать, что время жизни этого состояния $\leq 100 \text{ fs}$. В опытах с HbO₂, Hb [9,31] и родственным им гембелком цитохром *c* оксидазой [32] с использованием фемтосекундной абсорбционной спектроскопии наблюдается наведенное нестационарное поглощение длительностью $\sim 50 \text{ fs}$, которое классифицируют как синглет-синглетное поглощение. Фотодиссоциация (разрыв связи Fe–O₂) в таком состоянии невозможна из-за правила корреляции продуктов диссоциации по спину (правило Вигнера–Уитмера):

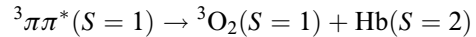


Дезоксигемоглобин в основном состоянии имеет спин, равный 2. Диссоциация HbO₂ в состоянии $^1\pi\pi^*$ возможна лишь при условии, что Hb образуется в триплетном возбужденном состоянии, т.е. в результате следующей реакции:



Известно, что Hb обладает таким состоянием, которое энергетически очень близко к основному квинтетному [27]. Однако этот канал диссоциации не реализуется, так как в противном случае в экспериментах с фемтосекундным временным разрешением наблюдалось бы за время жизни $\sim 50 \text{ fs}$ появление спектральной формы, соответствующей Hb, так как из общих соображений спектры Hb ($S = 2$) в основном состоянии и в возбужденном Hb* ($S = 1$) должны быть достаточно близки. Вместо этого авторы [6] обнаружили возникновение нестационарной формы длительностью $\sim 300 \text{ fs}$, спектр которой очень существенно отличается от спектра дезоксиформы гемоглобина. Интерпретация этой формы вызывает определенные трудности. Первооткрыватели этой формы отнесли ее к поглощению дезоксигемоглобина Hb* в возбужденном состоянии. Ряд авторов разделяют эту интерпретацию [9]. Мы полагаем, что, учитывая общий вид этого нестационарного спектра, характерный для подобных спектров металлопорфиринов, его нужно отнести к триплет-триплетному $\pi\pi^*$ -поглощению оксигемоглобина [13]. Естественно, что доказательство этого утверждения традиционными спектральными и фотохимическими экспериментами невозможно. Действительно, контрольные эксперименты по тушению этого состояния молекулярным кислородом нереальны из-за очень короткого времени жизни этого состояния, в связи с чем потребуются огромная концентрация O₂, чтобы

его потушить. Далее, отсутствие фосфоресценции исключает традиционное объяснение триплетной природы уровня (совпадение времени жизни состояния, измеренного методом кинетической спектроскопии, и длительности фосфоресценции при низких температурах). Итак, мы полагаем, что именно триплетное $\pi\pi^*$ -состояние является диссоциирующим. Главный „кинетический“ довод — время появления дезоксигемоглобина совпадает со временем жизни $^3\pi\pi^*$ -состояния ($\sim 300 \text{ fs}$) [6], а реакция



согласуется с правилом Вигнера–Уитмера.

Здесь уместно отметить, что различные авторы полагают в качестве фотодиссоциирующего $\pi\pi^*$, dd - или CT -состояние [13]. Какова квантовая эффективность заселения этого состояния и как она соотносится с первичным квантовым выходом фотодиссоциации $\gamma_0 = 0.23 \pm 0.04$, который ранее был определен в работе [14]? Измерения квантового выхода интеркомбинационной конверсии γ_T , как выше отмечалось, не проводились. Однако по аналогии с комплексами порфиринов с близкими для Fe металлами Zn и Cu [13,33] можно обоснованно предполагать, что величина γ_T в HbO₂ близка к 1.0, хотя нельзя полностью исключить, что внутренняя конверсия (процесс 1) „вмешивается“ в процесс размена энергии $^1\pi\pi^*$ -состояния. Мы полагаем, что квантовый выход интеркомбинационной конверсии $^1\pi\pi^* \rightarrow ^3\pi\pi^*$ для нашего случая составляет величину $\gamma_T \approx 1.0$. В этой ситуации значение квантового выхода диссоциации $\gamma_0 = 0.23$ может быть объяснено конкуренцией с безызлучательными переходами $^3\pi\pi^* \rightarrow ^1S_0$ (процесс 4) и/или $^3\pi\pi^* \rightarrow ^{1,3}CT_{\pi d}$ (процесс 3). Однако спектральные доказательства заселения $^{1,3}CT_{\pi d}$ отсутствуют. Ранее в работах [11,12] полагалось, что обнаруженная нестационарная спектральная форма длительностью 4 ps есть результат заселения именно этого состояния. Такая же интерпретация похожей спектральной формы для оксимиоглобина была позднее представлена в работе [8]. Однако совокупность дальнейших исследований позволила обоснованно утверждать, что это поглощение соответствует „колебательно-нагретой“ молекуле HbO₂ в основном состоянии, при этом сигнал длительностью 4 ps соответствует колебательной релаксации в основном состоянии (процесс б), так называемой „heme cooling“ [34]. Аналогичный процесс наблюдается и в других формах гемоглобина (дезоксигемоглобине) [31,35,38], а также в других гембелках, например, в цитохром *c* оксидазе [32]. Итак, мы полагаем, что квантовый выход диссоциации < 1.0 из-за конкуренции с безызлучательным процессом 4 ($^3\pi\pi^* \rightarrow ^1S_0$), а процесс 3 не реализуется, и, как следствие, не происходит заселения $^{1,3}CT$ -состояния. В случае прямого возбуждения в это $^{1,3}CT$ -состояние ($\lambda_{ex} = 1064 \text{ nm}$), как мы уже обсуждали, фотодиссоциация не наблюдается. В настоящее время отсутствуют

данные о времени жизни этого состояния в случае его заселения и последующей возможной дезактивации за счет процессов 5 и 7. Требуется новые фемтосекундные эксперименты с возбуждением в ИК полосу. Безусловно, большой интерес представляет вопрос, связанный с заселением двух низкоэнергетических ${}^{1,3}CT_{dd}$ -состояний. Однако на настоящий момент никаких спектральных доказательств заселения этих состояний, как и ${}^{1,3}CT_{\pi d}$, нет. Действительно, в случае их заселения возникали бы нестационарные спектры, соответствующие заселению dd -уровня гемового иона железа. При этом все π -электроны гема находились бы на низших заполненных оболочках. Подобные спектры наблюдались для комплексов порфиринов с Ni(II) и Cr(III) [13,39–42].

Выводы

Выполненные методами лазерной кинетической наносекундной спектроскопии измерения квантового выхода бимолекулярной рекомбинации молекулы O_2 гемоглобином при возбуждении в различных спектральных диапазонах дали принципиально отличные результаты: наличие достаточно эффективной фотодиссоциации при возбуждении в Q -полосу $\pi\pi^*$ -природы ($\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$) и практически полное ее отсутствие при возбуждении в полосу, расположенную в ближней ИК области ($\lambda_{ex} = 1064 \text{ nm}$) и соответствующую переносу электрона с a_{2g} -орбитали на смешанную орбиталь $d_{xz}-O_2(\pi)$. Совместный анализ этих данных с соответствующими данными, ранее полученными с привлечением спектроскопии с нано-, пико- и фемтосекундным временным разрешением, позволяет описать механизмы и динамику как реакции фотодиссоциации, так и релаксационных внутригемовых процессов.

Совокупность процессов, протекающих в оксигемоглобине после фотовозбуждения в ${}^1\pi\pi^*$, может быть представлена следующим образом. Молекула HbO_2 пребывает в данном состоянии $\sim 50 \text{ fs}$. Фотодиссоциация в ${}^1\pi\pi^*$ -состоянии запрещена по правилу Вигнера–Уитмера. В результате интеркомбинационной конверсии ${}^1\pi\pi^* \rightarrow {}^3\pi\pi^*$ молекула оказывается в триплетном состоянии. Оказавшись в ${}^3\pi\pi^*$ -состоянии, молекула HbO_2 претерпевает диссоциацию. Время жизни триплетного ${}^3\pi\pi^*$ -состояния составляет $\sim 300 \text{ fs}$ и совпадает со временем возникновения дезоксигемоглобина. Первичный квантовый выход фотодиссоциации $\gamma_0 = 0.23 \pm 0.04$. Эта величина заметно меньше 1.0, что объясняется в общем случае конкуренцией с безызлучательными переходами на более низкоэнергетические уровни. Основной канал дезактивации ${}^3\pi\pi^*$ -состояния — переход в основное состояние, ${}^3\pi\pi^* \rightarrow {}^1S_0$. Другой возможный канал ${}^3\pi\pi^* \rightarrow {}^{1,3}CT$ не реализуется, так как отсутствуют спектральные доказательства его заселения. Прямое возбуждение в ${}^{1,3}CT$ -полосу не приводит к диссоциации HbO_2 .

Представленная нами картина фотодиссоциации и внутригемового размена энергии возбуждения в моле-

куле оксигемоглобина является, на наш взгляд, непротиворечивой и полностью согласующейся со всеми известными данными, полученными в результате применения методов нано-, пико- и фемтосекундной спектроскопии.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГПНИ Республики Беларусь „Фотоника, опто- и микроэлектроника 1.4.01“ (2016–2020).

Список литературы

- [1] Gibson Q.H., Ainsworth S. // Nature. 1957. V. 150. P. 1416.
- [2] Greene B.I., Hochstrasser R.M., Weisman R.B., Eaton W.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. N 11. P. 5255.
- [3] Chernoff D.A., Hochstrasser R.M., Steele A.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. N 10. P. 5606.
- [4] Джагаров Б.М., Дылько П.Н., Гуринович Г.П. // ДАН СССР. 1984. Т. 275. В. 3. С. 765; Dzhagarov B.M., Dylko P.N., Gurinovich G.P. // DAN SSSR. 1984. V. 275. N 3. P. 765.
- [5] Martin J.L., Migus A., Poyart C. Ultrafast Phenomena IV. B.: Springer-Verlag. 1984. P. 447.
- [6] Petrich J.W., Poyart C., Martin J.L. // Biochemistry. 1988. V. 27. N 11. P. 4049.
- [7] Franzen S., Kiger L., Poyart C., Martin J.L. // Biophys. J. 2001. V. 80. N 5. P. 2372.
- [8] Ishizaka S., Wada T., Kitamura N. // Photochem. Photobiol. Sci. 2009. V. 8. P. 562.
- [9] Yabushita A., Kobayashi T. // J. Phys. Chem. 2010. V. 114. N 35. P. 11654.
- [10] Ye X.O., Demidov A., Rosca F., Wang W., Kumar A., Ionescu D., Zhu L.Y., Barrick D., Wharton D., Champion P.M. // J. Phys. Chem. 2003. V. 107. P. 8156.
- [11] Гульбинас В., Джагаров Б.М., Кабелка В. // ДАН СССР. 1987. Т. 293. В. 4. С. 987; Gulbinas V., Dzhagarov B.M., Kabelka V. // DAN SSSR. 1987. V. 293. I. 4. P. 987.
- [12] Джагаров Б.М., Гульбинас В., Кабелка В., Савицкене Ж. // Изв. АН СССР. Серия физическая. 1989. Т. 53. В. 8. С. 1504; Gulbinas V., Dzhagarov B.M., Kabelka V. // Izv. AN SSSR. Seriya fizicheskaya. 1989. V. 53. I. 8. P. 1504.
- [13] Джагаров Б.М., Чирвоный В.С., Гуринович Г.П. Лазерная пикосекундная спектроскопия и фотохимия биомолекул / Под ред. Летохова В.С. М.: Наука, 1987. С. 181; Dzhagarov B.M., Chirvonyi V.S., Gurinovich G.P. Laser Picosecond Spectroscopy and Photochemistry of Biomolecules / Ed. by Letokhov V.S. Bristol and Philadelphia: Adam Hilger, 1987. Ch. 3. P. 137.
- [14] Джагаров Б.М., Галиевский В.А., Крук Н.Н. // ДАН. 1999. Т. 366. В. 1. С. 121; Dzhagarov B.M., Galievskii V.A., Kruk N.N. // DAN. 1999. V. 366. I. 1. P. 121.
- [15] Dzhagarov B.M., Kruk N.N., Tikhomirov S.A., Gulbinas V., Andreyuk G.M. // Lith. J. Phys. 1994. V. 34. N 1–2. P. 108.
- [16] Lepeshkevich S.V., Karpiuk J., Sazanovich I.V., Dzhagarov B.M. // Biochemistry. 2004. V. 43. I. 6. P. 1675.
- [17] Dzhagarov B.M., Lepeshkevich S.V. // Chem. Phys. Lett. 2004. V. 390. I. 1–3. P. 59.
- [18] Lepeshkevich S.V., Gilevich S.N., Parkhats M.V., Dzhagarov B.M. // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1864. N 9. P. 1110.
- [19] Chance M.R., Courtney S.H., Chavez M.D., Ondrias M.R., Friedman J.M. // Biochemistry. 1990. V. 29. N 23. P. 5537.

- [20] *Birukou I., Soman J., Olson J.S.* // J. Biol. Chem. 2011. V. 286. P. 10515.
- [21] *Salter M.D., Nienhaus K., Nienhaus G.U., Dewilde S., Moens L., Pesce A., Nardini M., Bolognesi M., Olson J.S.* // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 35689.
- [22] *Sottini S., Abbruzzetti S., Spyrakis F., Bettati S., Ronda L., Mozzarelli A., Viappiani C.* // J. Am. Chem. Soc. 2005. V. 127. N 49. P. 17427.
- [23] *Case D.A., Huynh B.H., Karplus M.* // J. Amer. Chem. Soc. 1979. V. 101. P. 4433.
- [24] *Rovira C., Kunc K., Hutter J., Ballone P., Parrinello M.* // J. Phys. Chem. A. 1997. V. 101. N 47. P. 8914.
- [25] *Williams R.C. Jr., Tsay K.Y.* // Analytical Biochemistry. 1973. V. 54. N 1. P. 137.
- [26] *Antonini E., Brunori M.* Hemoglobin and Myoglobin in Their Reaction with Ligands. Amsterdam: North-Holland Publishers Co., 1971. 440 p.
- [27] *Eaton W.A., Hanson L.K., Stephens R.J., Sutherland J.C., Dunn J.B.R.* // J. Amer. Chem. Soc. 1978. V. 100. N 16. P. 4991.
- [28] *Gouterman M.* The Porphyrins / Ed. by Dolphin D. NY: Academic Press, 1978. V. 3. Ch. 1. P. 1.
- [29] *Makinen M.W., Churg A.K.* Iron Porphyrins / Ed. by Lever A.B.P., Gray H.B. Addison-Wesley, Reading, MA, 1983. Part 1. P. 141.
- [30] *Adar F.* The Porphyrins / Ed. Dolphin D. NY: Academic Press, 1978. V. 3. Ch. 2. P. 167.
- [31] *Kholodenko Y., Volk M., Gooding E., Hochstrasser R.M.* // Chem. Phys. 2000. V. 259. P. 71.
- [32] *Шелаев И.В., Гостев Ф.Е., Выгодина Т.В., Лепешкевич С.В., Джагаров Б.М.* // Химия высоких энергий. 2018. Т. 52. № 1. С. 31; *Shelaev I.V., Gostev F.E., Vygodina T.V., Lepeshkevich S.V., Dzhagarov B.M.* // High Energy Chemistry. 2018. V. 52. N 1. P. 45.
- [33] *Dzhagarov B.M.* // Opt. Spectrosc. 1970. V. 28. I. 1. P. 33.
- [34] *Henry E.R., Eaton W.A., Hochstrasser R.M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. N 23. P. 8982.
- [35] *Lim M., Jackson T.A., Anfinrud P.A.* // J. Phys. Chem. 1996. V. 100. N 29. P. 12043.
- [36] *Li P., Champion P.M.* // Biophys. J. 1994. V. 66. N 2. P. 430.
- [37] *Dzhagarov B.M., Kruk N.N., Tikhomirov S.A., Galievsky V.A.* Ultrafast Processes in Spectroscopy IX / Ed. by Svelto O., De Silvestro S., Denardo G. NY: Plenum Publishing Corporation, 1996. P. 497.
- [38] *Kruk N.N., Tikhomirov S.A., Andreyuk G.M., Dzhagarov B.M.* Ultrafast Processes in Spectroscopy IX / Ed. by Svelto O., De Silvestro S., Denardo G. NY: Plenum Publishing Corporation, 1996. P. 523.
- [39] *Chirvonyi V.S., Dzhagarov B.M., Timinskii Yu.V., Gurinovich G.P.* // Chem. Phys. Lett. 1980. V. 70. P. 79.
- [40] *Чирвоный В.С., Джагаров Б.М., Гуринович Г.П.* // Изв. АН СССР. Серия физическая. 1984. Т. 48. В. 3. С. 472; *Chirvonyi V.S., Dzhagarov B.M., Shulga A.M., Gurinovich G.P.* // Izv. AN SSSR. Seriya fizicheskaya. 1984. V. 48. I. 3. P. 472.
- [41] *Чирвоный В.С., Джагаров Б.М., Гуринович Г.П.* // Химическая физика. 1986. Т. 5. В. 7. С. 898; *Chirvonyi V.S., Dzhagarov B.M., Shulga A.M., Gurinovich G.P.* // Khimicheskaya Fizika. 1986. V. 5. I. 7. P. 898.
- [42] *Rodriguez J., Kirmaier C., Holten D.* // J. Chem. Phys. 1991. V. 94. N 9. P. 6020.
- [43] *Prahl S.* Tabulated Molar Extinction Coefficient for Hemoglobin in Water. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://omlc.org/spectra/hemoglobin/summary.html>