

УДК 577.112577.122

## ФОТООКИСЛЕНИЕ ТЕТРАГИДРОБИОПТЕРИНА – КЛЮЧЕВОЙ ПРОЦЕСС ФОТОТЕРАПИИ ВИТИЛИГО

© 2021 г. Т. А. Телегина<sup>1,2,\*</sup>, Ю. Л. Вечтомова<sup>1</sup>, М. С. Крицкий<sup>1</sup>, Э. И. Мадиров<sup>2,3</sup>,  
А. С. Низамутдинов<sup>3</sup>, Ю. Н. Обухов<sup>1,2</sup>, А. А. Буглак<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр  
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

<sup>3</sup>Казанский федеральный университет, Казань, 420008 Россия

\*e-mail: telegina@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 02.04.2021 г.

После доработки 12.04.2021 г.

Принята к публикации 23.04.2021 г.

В контексте патологии и терапии витилиго исследованы процессы автоокисления и фотоокисления тетрагидробиоптерина (**H<sub>4</sub>Бип**) – кофермента, присутствующего в 3–5-кратном избытке при витилиго. Изучение кинетики автоокисления **H<sub>4</sub>Бип** и ВЭЖХ анализ продуктов реакции показали, что автоокисление проходило интенсивно с константой скорости  $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$  с образованием дигидробиоптерина, дигидроптерина и их окисленных производных. Анализ данных по автоокислению привел к новому выводу о том, что окисление избытка **H<sub>4</sub>Бип** в меланоцитах, очевидно, запускает автокаталитический цикл синтеза избытка пероксида водорода (**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**), который в свою очередь активирует интерферон-индуцибельную ГТФ-циклогидролазу, синтезирующую избыток **H<sub>4</sub>Бип**. Автокаталитический цикл избыточного синтеза **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**, по-видимому, лежит в основе патологии витилиго. Избыток **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** также частично расходуется для активации иммунной системы. Разорвать автокаталитический цикл можно путем перевода **H<sub>4</sub>Бип** в димеры дигидроптерина при его УФ-фотоокислении. Исследована кинетика фотоокисления **H<sub>4</sub>Бип**, идентифицированы продукты реакции и рассчитаны квантовые выходы образования димеров дигидроптерина. На основании данных по квантовым выходам построен спектр действия УФ-излучения, демонстрирующий, что диапазон 300–325 нм является эффективным для фототерапии витилиго.

**Ключевые слова:** витилиго, тетрагидробиоптерин, меланогенез, меланин, окислительный стресс, **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**, УФВ-фототерапия витилиго, автокаталитический цикл при витилиго

DOI: 10.31857/S0555109921050160

Витилиго – это дерматологическое заболевание, характеризующееся образованием депигментированных пятен вследствие нарушения биосинтеза меланина [1–3]. Заболеваемость витилиго по странам колеблется от 0.1 до 4.0% [4–7]. Наблюдается рост заболеваемости этой болезнью, что определяет актуальность данного исследования. Витилиго является иммуноопосредованным, многофакторным заболеванием, в патогенезе которого важна генетическая предрасположенность, а также факторы внутренней и внешней среды. Первоначальный взгляд на витилиго как на аутоиммунное заболевание уступает место пониманию того, что иммунной атаке на меланоциты предшествуют внутренние процессы в самих пигмент-синтезирующих клетках.

Пусковой момент нарушений меланогенеза в меланоцитах, по-видимому, связан с функционированием тетрагидробиоптерина (**H<sub>4</sub>Бип**) – ко-

фермента фенилаланин-гидроксилазы (фенилаланин-4-монооксигеназа, КФ 1.14.16.1). В меланоцитах тирозин образуется при гидроксилировании фенилаланина с участием кофермента **H<sub>4</sub>Бип**, далее тирозин с помощью медь-зависимой тирозиназы (КФ 1.14.18.1) преобразуется в диоксифенилаланин (ДОФА), и далее на пути к меланину образуется ДОФА-хром. При витилиго в меланоцитах фиксируется 3–5 кратный избыток **H<sub>4</sub>Бип**, который ингибирует тирозиназу – ключевой фермент в синтезе меланина [2, 8–11].

Важным является то, что, будучи восстановленным соединением **H<sub>4</sub>Бип** легко окисляется кислородом воздуха (автоокисление), как *in vitro*, так и *in vivo* [12]. Образование окисленных производных сопровождается образованием пероксида водорода (**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**). При витилиго в коже больных идентифицирован **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** в миллимолярных кон-

центрациях [11], т.е. имеет место окислительный стресс. В работе [13] было показано, что УФ облучение определенных диапазонов длин волн усиливает автоокисление за счет возбуждения самого  $H_4$ Бип ( $\lambda_{\text{max}} \text{возб.}$  298 нм), но в основном за счет возбуждения окисленного биоптерина, запускающего процесс фотосенсибилизированного окисления  $H_4$ Бип при облучении в области поглощения окисленного биоптерина (350 нм). Такое фотоокисление  $H_4$ Бип может приводить к накоплению  $H_2O_2$  и этим пролонгировать витилиго [13–15].

Метод УФВ-фототерапии, использующий средневолновый УФ (308 и 311 нм) для лечения витилиго [11, 16], является наиболее успешным методом лечения витилиго, но механизм терапевтического эффекта долго оставался невыясненным. Предложена гипотеза и приведены аргументы в ее пользу, согласно которой главной мишенью УФВ-излучения является  $H_4$ Бип [17]. Впервые было показано образование димеров азоциклобутанового типа при УФВ-фотоокислении  $H_4$ Бип. Доказано фотообразование из  $H_4$ Бип димеров дигидроптерина ( $(H_2Птр)_2$ ).

Выяснение роли  $H_4$ Бип в патогенезе и фототерапии витилиго проведено далеко не в полном объеме и требует дальнейших исследований. Цель настоящей работы – изучение механизма фотоокисления  $H_4$ Бип: идентификация продуктов реакции и нахождение максимума в спектре действия УФ-излучения с целью оптимизации УФВ-фототерапии витилиго.

## МЕТОДИКА

**Реактивы.** 5,6,7,8-тетрагидро-L-биоптерин ( $H_4$ Бип), 7,8-дигидро-L-биоптерин ( $H_2$ Ксп), дигидроксантоптерин ( $H_2$ Ксп), L-биоптерин (Бип), ксантоптерин (Ксп) и птерин (Птр) фирмы “Schircks Laboratories” (Швейцария). Остальные реактивы, использованные в работе, были получены от “Sigma-Aldrich” (США).

**Приготовление образцов.** В работе использовали растворы  $H_4$ Бип в 0.1 М Трис-НСl буфере, рН 7.2. Растворы готовили растворением сухого препарата  $H_4$ Бип непосредственно перед проведением эксперимента, концентрацию образцов определяли по молярному коэффициенту экстинкции ( $\epsilon_{297} = 10200 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  для рН 7.0).

**УФ-облучение.** Свежеприготовленные растворы  $H_4$ Бип облучали при постоянном перемешивании на воздухе в 1 см кварцевой кювете, используя в качестве источника УФ-света спектрофлуориметр FluoroMax 4 (“Horiba Scientific”, Япония) или в кварцевой кювете 0.3 см, используя в качестве источника перестраиваемый УФ-лазер на активной среде  $LiLu_{0.7}Y_{0.3}F_4:Ce + Yb$ .

Облучение на спектрофлуориметре проводили при длинах волн 300, 305, 308, 311, 315, 320, 325, 330, 335, 340 и 350 нм со спектральной шириной щели 20 нм в течение различных промежутков времени (1 или 2 мин). Темновые интервалы, в течение которых производили запись спектров облученных образцов, составляли 2 мин. Темновые контроли к опытам по облучению ставили параллельно к каждому опыту. В темновых контролях протекал только процесс автоокисления  $H_4$ Бип.

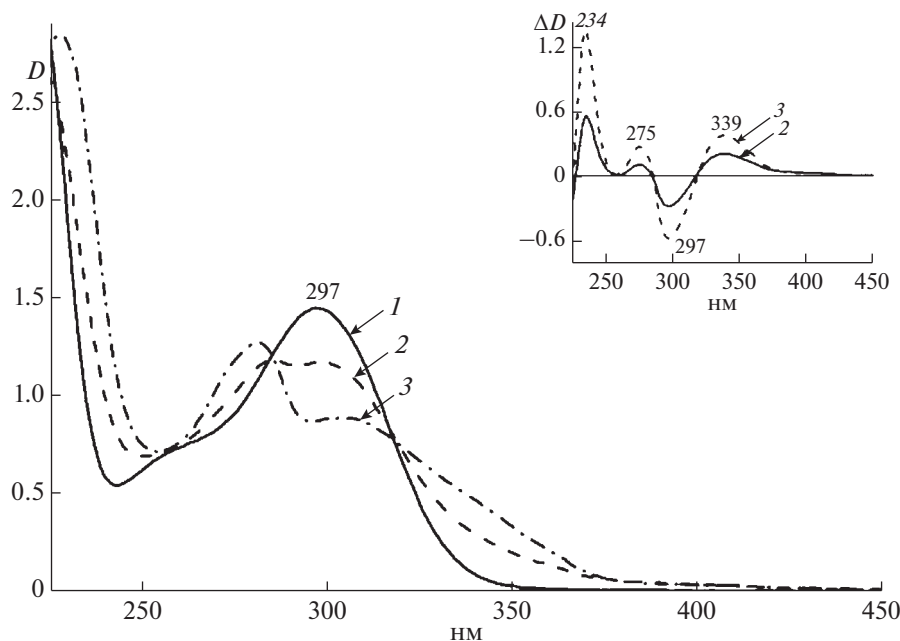
В работе использовался перестраиваемый УФ-лазер на основе кристалла  $LiLu_{0.7}Y_{0.3}F_4$ , активированного ионами  $Ce^{3+}$  и  $Yb^{3+}$ . В качестве источника накачки применялся лазер на кристалле  $LiCaAlF_6$ , активированном ионами  $Ce^{3+}$  (290 нм), источником возбуждения для которого в свою очередь служило 266 нм излучение 4-ой гармоники лазера YAG:Nd (LQ529B) “SolarLS” (Беларусь). Образец облучался лазером на длинах волн 290, 300, 308, 310, 312, 325 и 330 нм. Условия проведения эксперимента аналогичны облучению на спектрофлуориметре.

Концентрация димеров дигидроптерина определялась по изменению в поглощении полосы в области 245 нм и рассчитывалась с учетом коэффициента экстинкции ( $\epsilon_{245} = 37000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  для рН 7).

**Методы исследования.** Запись спектров поглощения темновых контролей и облучаемых образцов проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-1601 (Япония) или Cary 300 Bio (“Varian”, США) в Центре коллективного пользования ФИЦ “Биотехнологии” РАН. Плотность мощности ( $\text{Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ ) излучения, поглощаемого образцом, измеряли радиометром Аргус-04 (“ВНИИОФИ”, Россия).

ВЭЖХ анализ продуктов реакции проводили на катионообменной колонке Luna 5u SCX 100A (“Phenomenex”, США). Подвижная фаза содержала 0.1 М Na-цитратный буфер рН 2.7, предварительно дегазированный, продуваемый аргоном во время проведения хроматографии. Скорость потока  $0.4 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$ , время анализа 40 мин. Время выхода веществ устанавливали по времени выхода свидетелей – препаратов  $H_4$ Бип и его окисленных производных. Свидетеля – дигидроптерина не было, так как это соединение неустойчиво и не производится ни одной фирмой. Детекцию продуктов реакции проводили с помощью трех детекторов последовательного спектрофотометрического (267 нм), флуориметрического ( $\lambda_{\text{возб}}$  330 нм,  $\lambda_{\text{флуор}}$  440 нм) и электрохимического (+0.7 В). Такое подключение детекторов позволяло наиболее точно установить продукты реакции, поскольку все они имели разную степень окисления и флуоресцентные свойства.



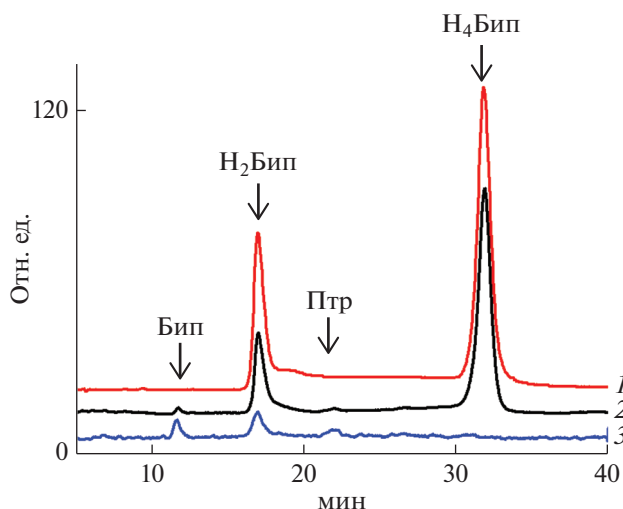


**Рис. 2.** Изменение во времени спектров поглощения раствора  $1.42 \times 10^{-4}$  М  $\text{H}_4\text{Бип}$  в 0.1 М Трис-НСI буфере рН 7.2 в присутствии кислорода воздуха. 1 – исходный раствор, 2 – через 15 мин, 3 – через 30 мин. На врезке разностные спектры (время в темноте – 0 мин).

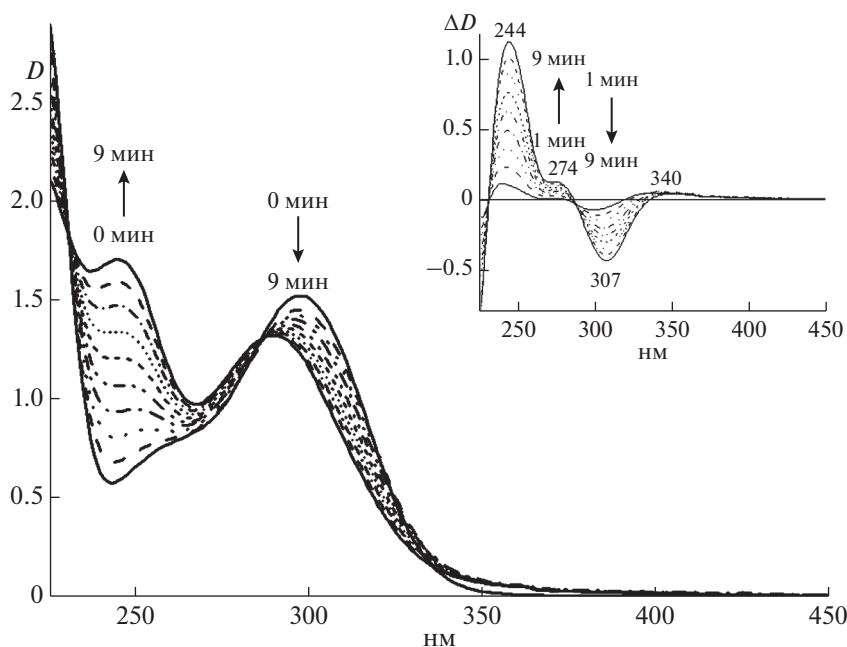
робиоптерин ( $\text{qH}_2\text{Бип}$ ) со временем жизни 1.5 мин. Затем он изомеризуется в более стабильный  $\text{H}_2\text{Бип}$  или трансформируется в  $\text{H}_2\text{Птр}$  с отрывом бокового радикала-дигидроксипропила. Далее  $\text{H}_2\text{Бип}$  переходит в полностью окисленную форму – биоптерин, а неустойчивый дигидропте-

рин ( $\text{H}_2\text{Птр}$ ) окисляется кислородом до птерина или до  $\text{H}_2\text{Ксп}$ .

В зависимости от рН среды, температуры и природы буфера будет преобладать  $\text{H}_2\text{Бип}$  или  $\text{H}_2\text{Птр}$  и их полностью окисленные формы. В серии экспериментов по исследованию темновых процессов автоокисления спектрофотометрически показано, что по мере протекания процесса убывает полоса поглощения  $\text{H}_4\text{Бип}$  (297 нм) и нарастает поглощение в области 275–280 нм и в области 325–340 нм, которые характеризуют накопление  $\text{H}_2\text{Бип}$ ,  $\text{H}_2\text{Птр}$ , Бип и Птр (рис. 2). Изучение кинетики автоокисления показало, что процесс идет довольно интенсивно с константой скорости  $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ . Уточнение характера окисления  $\text{H}_4\text{Бип}$  в условиях эксперимента и количественное определение продуктов темнового автоокисления было проведено методом ВЭЖХ (рис. 3). Как видно из рис. 3 в результате ВЭЖХ анализа установили образование  $\text{H}_2\text{Бип}$ , Бип и Птр при проведении автоокисления  $\text{H}_4\text{Бип}$  в течение 30 мин. Полученные результаты говорят о том, что за столь короткий промежуток времени может протекать довольно глубокое автоокисление  $\text{H}_4\text{Бип}$  с образованием дигидро- и полностью окисленных птериновых производных. Об образовании неустойчивого  $\text{H}_2\text{Птр}$  при окислении  $\text{H}_4\text{Бип}$  свидетельствует идентифицированный на хроматограмме продукт его дальнейшего спонтанного окисления – Птр.



**Рис. 3.** ВЭЖХ-анализ продуктов окисления  $1.42 \times 10^{-4}$  М  $\text{H}_4\text{Бип}$  (0.1 М Трис-НСI буфер, рН 7.2) через 30 мин в темноте. 1 – спектрофотометрический детектор (267 нм); 2 – электрохимический детектор (+0.7 В); 3 – флуориметрический детектор ( $\lambda_{\text{возб.}}$  330 нм,  $\lambda_{\text{флуор.}}$  440 нм).



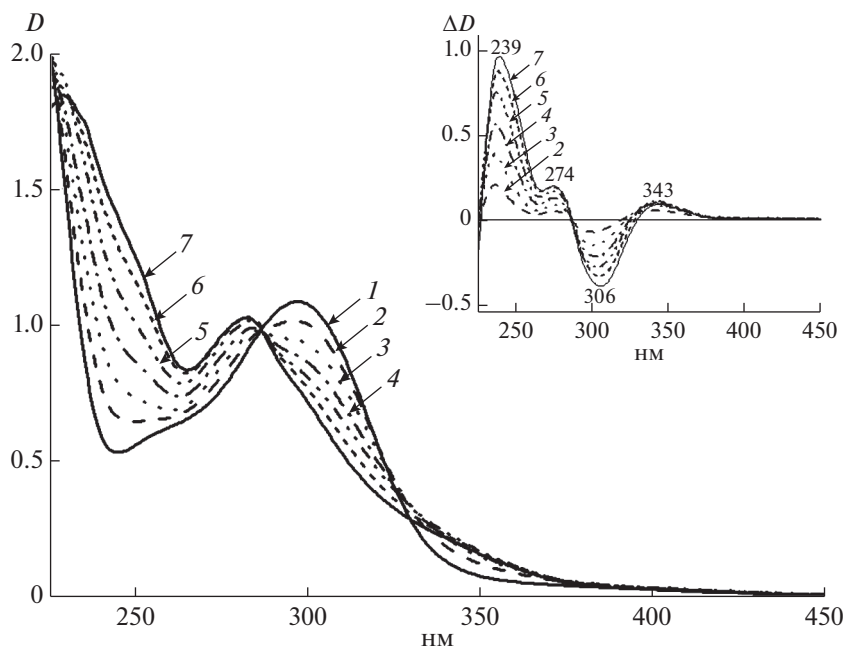
**Рис. 4.** Изменение спектров поглощения раствора  $1.46 \times 10^{-4}$  М  $\text{H}_4\text{Бип}$  в 0.1 М Трис-НСl буфере рН 7.2 при ступенчатом облучении  $325 \pm 10$  нм на флуориметре в присутствии кислорода воздуха. На врезке — разностные спектры (время облучения — 0 мин).

При этом на всех этапах окисления идет образование  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Благодаря процессам автоокисления 3–5-кратного избытка  $\text{H}_4\text{Бип}$ , имеющего место при витилиго, в коже накапливается  $\text{H}_2\text{O}_2$  в миллимолярных концентрациях, ведущие к окислительному стрессу.  $\text{H}_2\text{O}_2$  при посредстве цитокринов, в частности  $\gamma$ -интерферона, может активировать ГТФ-циклогидролазу (КФ 3.5.4.16), синтезирующую избыточное количество  $\text{H}_4\text{Бип}$ , который неизбежно будет автоокисляться с образованием  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Можно предположить, что, таким образом, может запускаться автокаталитический цикл избыточного синтеза  $\text{H}_2\text{O}_2$  при витилиго. Известно, что одной из функций активных форм кислорода, в частности  $\text{H}_2\text{O}_2$ , является индукция иммунной системы. Действительно при витилиго активируются системы гуморального и клеточного иммунитета, ведущие к уменьшению количества меланоцитов, продуцирующих меланин.

**Фотоокисление  $\text{H}_4\text{Бип}$ .** Было проведено несколько серий опытов по фотоокислению  $\text{H}_4\text{Бип}$ , в которых изменяли длину волны возбуждающего света. В сериях опытов, в которых изменяющейся величиной была длина волны УФ, раствор  $\text{H}_4\text{Бип}$  облучали ультрафиолетовым излучением с различными длинами волн в интервале 300–350 нм. Каждая отдельно взятая длина волны имела разброс в 10 нм, который обеспечивался спектральной шириной щели в 20 нм в спектрофлуориметре, используемом нами в качестве источника УФ-света.

На рис. 4 приведены результаты опыта по облучению раствора  $1.46 \times 10^{-4}$  М  $\text{H}_4\text{Бип}$  в Трис-НСl (рН 7.2) излучением с длиной волны  $325 \pm 10$  нм, при этом интервал облучения составлял 1 мин, а темновой интервал между облучениями составлял 2 мин. На разностном спектре поглощения (рис. 4, врезка) можно видеть, что по мере облучения убывало соединение с максимумом длинноволнового поглощения при 307 нм и нарастало поглощение в области 245 нм, а также перегиб в области 275 нм. Это может указывать на убыль промежуточного межмолекулярного комплекса хиноноидный дигидроптерин-дигидроптерин ( $\text{qH}_2\text{Птр-H}_2\text{Птр}$ ) и нарастание количества образующегося  $(\text{H}_2\text{Птр})_2$ . Промежуточный межмолекулярный комплекс может образовываться при донорно-акцепторных взаимодействиях бензидной формы дигидроптеринов ( $\text{H}_2\text{Птр}$  или  $\text{H}_2\text{Бип}$ ) с хиноноидной формой дигидроптеринов ( $\text{qH}_2\text{Птр}$  или  $\text{qH}_2\text{Бип}$ ). Образующийся межмолекулярный комплекс имеет, очевидно, поглощение с максимумом при 307 нм, что выявлено по появлению полосы при 307 нм в спектре четвертой производной спектра поглощения исходного  $\text{H}_4\text{Бип}$ . Именно полоса поглощения с максимумом 307 нм убывала при проведении фотоокисления  $\text{H}_4\text{Бип}$  при всех исследуемых длинах волн в интервале 300–350 нм.

В качестве примера опытов по облучению с помощью перестраиваемого УФ-лазера раство-



**Рис. 5.** Изменение спектров поглощения раствора  $1.07 \times 10^{-4}$  М  $\text{H}_4\text{Бип}$  в 0.1 М Трис-НСl буфере рН 7.2 при ступенчатом облучении 325 нм на перестраиваемом лазере в присутствии кислорода воздуха: 1 – 0 мин; 2 – 2 мин; 3 – 4 мин; 4 – 6 мин; 5 – 8 мин; 6 – 10 мин; 7 – 12 мин. На врезке – разностный спектр (время облучения – 0 мин).

ров  $1.07 \times 10^{-4}$  М  $\text{H}_4\text{Бип}$  в Трис-НСl буфере рН 7.2 (световые интервалы 2 мин и темновые интервалы по 2 мин) приведены результаты опыта, когда облучение проводили при длине волны 325 нм (рис. 5). На рис. 5 можно видеть, что по мере облучения также падает поглощение в области 306 нм и возрастает поглощение в области 245 и 274 нм, что свидетельствует об образовании  $(\text{H}_2\text{Птр})_2$  из промежуточного межмолекулярного комплекса. Сдвиг максимума при 245 нм в сторону 239 нм на разностном спектре (рис. 5, врезка) говорит о том, что в растворе по мере облучения накапливались также продукты темнового окисления  $\text{H}_4\text{Бип}$ . ВЭЖХ анализ продуктов фотореакции показал, что действительно в системе образовывались  $(\text{H}_2\text{Птр})_2$  и продукты окисления. Это можно объяснить тем, что при проведении опытов по облучению лазером не использовалась мешалка и, по видимому, не весь объем раствора попадал под облучение. В целом полученные данные также свидетельствовали об образовании промежуточного межмолекулярного комплекса  $q\text{H}_2\text{Птр}-\text{H}_2\text{Птр}$  ( $\lambda_{\text{max}}$  307 нм), в котором при облучении поглощала молекула хиноноидной формы дигидроптерина и молекула  $\text{H}_2\text{Птр}$  ( $\lambda_{\text{max}}$  325 нм) с преобладанием поглощения УФ-излучения хиноноидной или бензоидной формой  $\text{H}_2\text{Птр}$  в зависимости от длины волны света, используемого для иницирования фотопроцесса.

При витилиго в меланоцитах накапливается 3–5-кратный избыток  $\text{H}_4\text{Бип}$ . Проводя УФ облу-

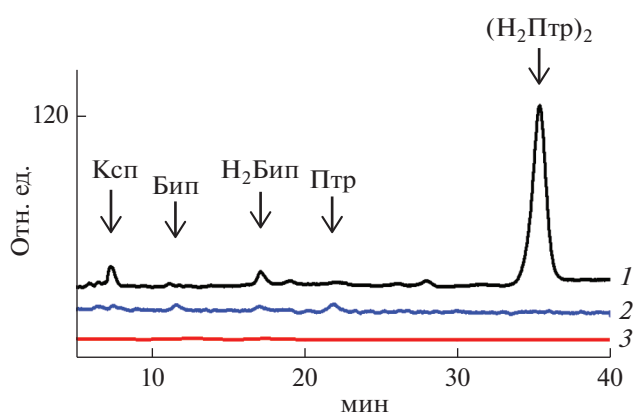
чение депигментированных участков кожи можно добиться удаления избытка  $\text{H}_4\text{Бип}$  и этим разорвать автокаталитический цикл синтеза избытка  $\text{H}_2\text{O}_2$  и способствовать предотвращению дальнейшего развития патологического процесса.

**ВЭЖХ анализ продуктов фотоокисления.** Разработан метод ВЭЖХ анализа для разделения и идентификации продуктов автоокисления и фотоокисления  $\text{H}_4\text{Бип}$  с использованием катионообменной колонки Luna 5u SCX после перевода неустойчивых продуктов реакции и исходного  $\text{H}_4\text{Бип}$  в более устойчивые катионные формы. На рис. 6 представлена типичная хроматограмма образца, полученного после облучения  $1.4 \times 10^{-4}$  М  $\text{H}_4\text{Бип}$  излучением  $320 \pm 10$  нм в течение 16 мин. Можно видеть, что среди продуктов преобладал (порядка 90%) димер дигидроптерина, который в отличие от других продуктов реакции не флуоресцирует и не дает сигнала на электрохимическом детекторе в данных условиях. Среди других продуктов реакции можно видеть небольшое количество продуктов окисления  $\text{H}_4\text{Бип}$ :  $\text{H}_2\text{Бип}$ , Бип, Птр и Ксп.

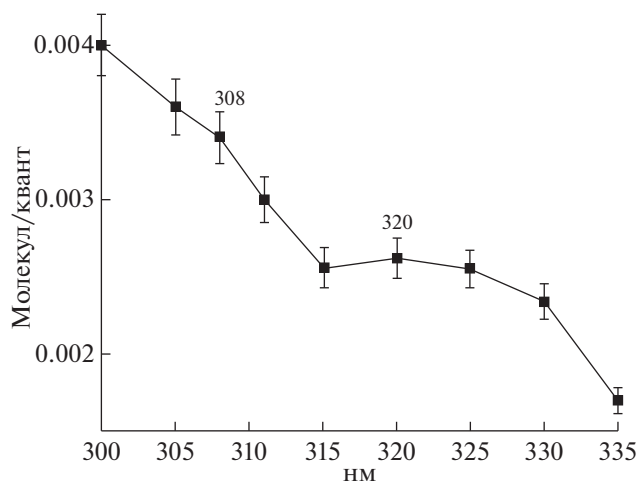
**Расчет квантовых выходов образования димера дигидроптерина.** Поскольку квантовый выход характеризует эффективность фотопроцесса, рассчитывали квантовые выходы образования  $(\text{H}_2\text{Птр})_2$  при фотоокислении  $\text{H}_4\text{Бип}$ . В табл. 1 приведены результаты расчета квантовых выходов для серии опытов, в которой для возбуждения использовали

излучение с длинами волн  $308 \pm 10$ ,  $320 \pm 10$ ,  $330 \pm 10$  и  $350 \pm 10$  нм. Из полученных результатов можно заключить, что эффективность фотохимического процесса в случае применения излучения с длиной волны 308 нм было максимальным. Квантовый выход при длине волны 308 нм, практически в 6 раз выше квантового выхода продукта реакции –  $(H_2Птр)_2$ , образующегося при использовании для фотовозбуждения света с длиной волны 350 нм. Полученные результаты можно объяснить тем, что использованная нами длина волны 308 нм совпадала с максимумом спектра поглощения (307 нм) промежуточного молекулярного комплекса ( $qH_2Птр-H_2Птр$ ). При этом при 308 нм поглощал как хиноноидный дигидроптерин, имеющий очень широкий спектр с  $\lambda_{max}$  301 нм, так и дигидроптерин ( $\lambda_{max}$  325 нм при ширине спектра около 50 нм на полувысоте), внося некоторую прибавку в суммарный квантовый выход с учетом молярного коэффициента экстинкции. При длине волны 350 нм в составе молекулярного комплекса дигидроптерин поглощал на уровне полувысоты своего спектра, а хиноноидный дигидроптерин ниже полувысоты и этим объясняется значительное снижение квантового выхода.

**Построение спектра действия.** Для построения спектра действия УФ излучения в реакции образования димеров дигидроптерина использовали данные по квантовым выходам продукта реакции при действии УФ излучения в диапазоне 300–335 нм. На рис. 7 приведена зависимость квантового выхода от длины волны УФ излучения, используемого для проведения процесса фотоокисления  $H_4Бип$ . Можно видеть, что квантовый выход образования димеров падает по мере возрастания длины волны возбуждающего излучения и при этом падение не гладкое, а имеется два перегиба. Первый перегиб наблюдается в области 308 нм и второй перегиб в области 320–325 нм. Можно сделать вывод, что излучение в этих областях длин волн сильнее инициирует процесс фотообразования димеров в сравнении с излучением соседних длин волн. Полученный спектр действия показывает, что максимальная эффективность фотоокисления  $H_4Бип$  с образованием димеров  $(H_2Птр)_2$  достигается при облучении в области



**Рис. 6.** ВЭЖХ анализ продуктов фотоокисления  $1.4 \times 10^{-4}$  М  $H_4Бип$  (0.1М Трис-НСl буфер, рН 7.2) при облучении  $320 \pm 10$  нм в течение 16 мин. 1 – спектрофотометрический детектор (267 нм); 2 – флуориметрический детектор ( $\lambda_{возб}$  330 нм,  $\lambda_{флуор}$  440 нм); 3 – электрохимический детектор (+0.7 В).



**Рис. 7.** Зависимость квантового выхода образования димеров дигидроптерина от длины волны УФ излучения, используемого для проведения процесса фотоокисления  $H_4Бип$ .

максимального поглощения  $qH_2Бип$  ( $\lambda_{max}$  301 нм), имеющего довольно высокий молярный коэффициент поглощения ( $\epsilon_{301} = 8700$ ) [18]. Перегибы на спектре действия отражают вклад в эффектив-

**Таблица 1.** Квантовый выход образования димеров дигидроптерина

Длина волны, нм	Интенсивность поглощаемого света, Вт/м <sup>2</sup>	$\Delta A_{245}$ , ед. оптической плотности за 6 мин облучения	Квантовый выход ( $\Phi$ ), молекул/квант
308	41.4	1.7043	$2.33 \times 10^{-2}$
320	62.4	1.5075	$1.32 \times 10^{-2}$
330	85.0	1.6187	$1.02 \times 10^{-2}$
350	162.0	1.3526	$4.10 \times 10^{-3}$

ность фотопроцесса за счет поглощения света обеими частями межмолекулярного комплекса ( $qH_2P_{тр}-H_2P_{тр}$ ) ( $\lambda_{max}$  307 нм) и вклад за счет поглощения  $H_2P_{тр}$  в области максимума поглощения ( $\lambda_{max}$  325 нм). Облучение  $H_4Бип$  с использованием лазера, имеющего спектральную ширину излучения 1 нм, подтвердило полученный спектр действия и показало, что квантовый выход образования  $(H_2P_{тр})_2$  при облучении длиной волны 290 нм ниже квантового выхода при 300 нм. Полученный спектр действия указывает диапазон длин УФ излучения, который может быть наиболее эффективным для использования в фототерапии витилиго. Различие в квантовых выходах менее чем в 2 раза в диапазоне длин волн 300–325 нм указывает на применимость этих длин волн для инициирования фотоокисления  $H_4Бип$  и это позволяет расширить арсенал источников УФ для фототерапии витилиго. В настоящее время для фототерапии витилиго используется УФВ излучение эксимерного лазера (308 нм) и излучение 311 нм эмиссионного спектра паров ртути в специальных лампах. Оба эти устройства генерируют УФВ излучение в области первого перегиба на кривой спектра действия и, по-видимому, этим можно объяснить эффективность УФВ фототерапии витилиго.

В целом, полученные экспериментальные данные по изучению процесса автоокисления  $H_4Бип$  и данные литературы по его избыточному синтезу при витилиго позволяют заключить, что в основе патологии витилиго лежит формирование автокаталитического цикла избыточного синтеза  $H_2O_2$ . Очевидно, что при УФВ-фототерапии витилиго будет разрываться автокаталитический цикл избыточного синтеза  $H_2O_2$  за счет удаления избыточного количества  $H_4Бип$  в виде  $(H_2P_{тр})_2$ . Следовательно, такая УФВ-терапия будет способствовать восстановлению процесса меланогенеза. Условием успешного восстановления процесса меланогенеза является удаление избытка  $H_2O_2$ , образующегося в миллимолярных концентрациях в меланоцитах при витилиго, создающего условия окислительного стресса и активирующего иммунную систему. В условиях окислительного стресса  $H_2O_2$  может запускать автокаталитический цикл через цитокины, в частности интерферон, который активирует интерферон-индуцибельный фермент – ГТФ-циклогидролазу, синтезирующую избыток  $H_4Бип$ . Таким образом, может замыкаться автокаталитический цикл. В связи с этим лучшие результаты терапии витилиго могут быть получены, когда одновременно с УФВ-терапией применяют антиоксидантную терапию для удаления  $H_2O_2$  и предотвращения его накопления в меланоцитах. Так, например, хорошие результаты комплексной терапии достигают при применении УФВ-терапии и псевдокаталазы, разлага-

ющей  $H_2O_2$  [11, 16]. Дальнейшее развитие работ в этом направлении необходимо как для совершенствования методов терапии витилиго, так и для получения фундаментальных знаний об аутоиммунном ответе при витилиго, когда избыток  $H_2O_2$  активирует иммунную систему организма.

Работа поддержана грантом РНФ № 20-73-10029.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schallreuter K.U., Wood J.M., Pittelkow M.R., Gutlich M., Lemke K.R., Rödl W., Swanson N.N., Hitzemann K., Ziegler I. // *Science*. 1994. V. 263. № 5152. P. 1444–1446.
2. Schallreuter K.U., Moore J., Wood J.M., Beazley W.D., Peters E.M., Marles L.K., Behrens-Williams S.C., Dummer R., Blau N., Thony B. // *J. Invest. Dermatol.* 2001. V. 116. № 1. P. 167–174.
3. Bidaki R., Majidi N., Moghadam Ahmadi A., Bakhschi H., Sadr Mohammadi R., Mostafavi S.A., Kazemi Arababadi M., Hadavi M., Mirzaei A. // *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 2018. V. 11. P. 383–386.
4. Cho H.K., Eun L.Y., Song J.S., Kang W.H., Ro B.I. // *Ann. Dermatol.* 2009. V. 21. № 1. P. 75–77.
5. Park J.M., Kim H.J., Bae B.G., Park Y.K. // *Ann. Dermatol.* 2009. V. 21. № 3 P. 330–333.
6. Hedayat K., Karbakhsh M., Ghiasi M., Goodarzi A., Fakour Y., Akbari Z., Ghayoumi A., Ghandi N. // *Health Qual. Life Outcomes*. 2016. V. 14. № 86. <https://doi.org/10.1186/s12955-016-0490-y>
7. Morales-Sánchez M.A., Vargas-Salinas M., Peralta-Pedrero M.L., Olguín-García M.G., Jurado-Santa Cruz F. // 2017. V. 108. № 7. P. 637–642.
8. Hasse S., Gibbons N.C., Rokos H., Marles L.K., Schallreuter K.U. // *J. Invest. Dermatol.* 2004. V. 122. № 2. P. 307–313.
9. Eskandani M., Golchai J., Pirooznia N., Hasannia S. // *Indian J. Dermatol.* 2010. V. 55. № 1. P. 15–19.
10. Spencer J.D., Gibbons N.C., Rokos H., Peters E.M., Wood J.M., Schallreuter K.U. // *J. Invest. Dermatol.* 2007. V. 127. № 2. P. 411–420.
11. Schallreuter K.U., Salem M.A., Holtz S., Panske A. // *FASEB J.* 2013. V. 27. № 8. P. 3113–3122.
12. Kaufman S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1963. V. 50. № 6. P. 1085–1093.
13. Buglak A.A., Telegina T.A., Lyudnikova T.A., Vechtomo-va Y.L., Kritsky M.S. // *Photochem. Photobiol.* 2014. V. 90. № 5. P. 1017–10126.1.
14. Buglak A.A., Telegina T.A., Kritsky M.S. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2016. V. 15. № 6. P. 801–811.
15. Buglak A.A., Telegina T.A., Vorotelyak E.A., Kononov A.I. // *J. Photochem. Photobiol. A.* 2019. V. 372. P. 254–259.
16. Gawkrödger D.J. // *Br. J. Dermatol.* 2009. V. 161. № 4. P. 721–722.
17. Telegina T.A., Lyudnikova T.A., Buglak A.A., Vechtomo-va Y.L., Biryukov M.V., Demin V.V., Kritsky M.S. // *J. Photochem. Photobiol. A.* 2018. V. 354. P. 155–162.
18. Davis M.D., Kaufman S. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 15. P. 8585–8596.



## Photooxidation of Tetrahydrobiopterin is a Key Process in Vitiligo Phototherapy

T. A. Telegina<sup>a, b, \*</sup>, Yu. L. Vechtomova<sup>a</sup>, M. S. Kritsky<sup>a</sup>, E. I. Madirov<sup>b, c</sup>,  
A. S. Nizamutdinov<sup>c</sup>, Y. N. Obuhov<sup>a, b</sup>, and A. A. Buglak<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

<sup>b</sup> *Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, 199034 Russia*

<sup>c</sup> *Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*

\**e-mail: telegina@inbi.ras.ru*

In the context of the pathology and therapy of vitiligo, the processes of autooxidation and photooxidation of tetrahydrobiopterin (H<sub>4</sub>Bip), a coenzyme present in a 3–5-fold excess in vitiligo, have been investigated. The study of the kinetics of H<sub>4</sub>Bip autooxidation and HPLC analysis of the reaction products showed that autooxidation proceeds intensively with a rate constant of  $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  with the formation of dihydrobiopterin, dihydropterin, and their oxidized derivatives. Analysis of the data on autooxidation led to a new conclusion that the oxidation of excess H<sub>4</sub>Bip in melanocytes apparently triggers an autocatalytic cycle of synthesis of excess hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), which in turn activates interferon-inducible GTP cyclohydrolase, which synthesizes excess H<sub>4</sub>Bip. The autocatalytic cycle of excessive synthesis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apparently, underlies the pathology of vitiligo. Excess H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is also partially consumed to activate the immune system. The autocatalytic cycle can be broken by converting H<sub>4</sub>Bip into dihydropterin dimers during its UV photooxidation. The kinetics of H<sub>4</sub>Bip photooxidation was studied, the reaction products were identified, and the quantum yields of the dimers formation were calculated. Based on the quantum yields data, the UV action spectrum was designed, demonstrating that the range of 300–325 nm is effective for phototherapy of vitiligo.

**Keywords:** vitiligo, tetrahydrobiopterin, melanogenesis, melanin, oxidative stress, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UVB vitiligo phototherapy, autocatalytic cycle in vitiligo