

РОЛЬ ФОТОХИМИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ ТЕТРАГИДРОБИОПТЕРИНА В ПАТОГЕНЕЗЕ И ФОТОТЕРАПИИ ВИТИЛИГО

Телегина Т.А.^{1,2}, Низамутдинов А.С.², Буглак А.А.³, Шавров А.Н.¹, Лукинова Е.В.²,
Вечтомова Ю.Л.^{1,2}, Крицкий М.С.¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Ленинский проспект, 33, коп. 2, г. Москва, 119071, РФ; e-mail: telegina@inbi.ras.ru

²Казанский государственный университет

ул. Кремлевская, 18, г. Казань, 420008, РФ

³Санкт-Петербургский государственный университет

Университетская набережная, 7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ

Поступила в редакцию: 29.06.2018

Аннотация. Нарушение меланогенеза ведёт к развитию ряда патологий, включая витилиго. Тетрагидробиоптерин ($H_4\text{Bip}$) в качестве кофермента фенилаланин-гидроксилазы участвует в окислении фенилаланина в тирозин (предшественник меланина). $H_4\text{Bip}$ легко окисляется кислородом *in vivo* и *in vitro*. При витилиго наблюдается трёх-пятикратный *de-novo* синтез, его избыток и последующее автоокисление рассматриваются в качестве важных факторов в патогенезе витилиго. Мы показали, что птериновые продукты автоокисления (дигидроптерин ($H_2\text{Ptr}$), дигидроксантоптерин, птерин) преобладают над биоптериновыми продуктами (дигидробиоптерин ($H_2\text{Bip}$), биоптерин). Показали, что ультрафиолетовое (УФ) излучение ускоряет автоокисление $H_4\text{Bip}$ в присутствии окисленных производных, служащих фотосенсибилизаторами. Фотосенсибилизированное окисление $H_4\text{Bip}$ может вносить вклад в патогенез витилиго. Установили, что основной отличительной чертой фотоокисления $H_4\text{Bip}$ от его автоокисления является образование димеров дигидроптерина ($H_2\text{Ptr}$)₂ и дигидробиоптерина ($H_2\text{Bip}$)₂. Используя в качестве источников УФ излучения ксеноновые лампы и УФ перестраиваемые лазеры, в работе изучены зависимости реакции фотодимеризации от длины волны и интенсивности излучения. Показано, что облучение УФ лазером более эффективно по сравнению с облучением ксеноновой лампой. Установлено, что наибольшее количество димеров образуется при облучении раствора $H_4\text{Bip}$ излучением с длинами волн 308-312 нм. Полученные данные обсуждены в контексте УФ-В узкополосной фототерапии витилиго.

Ключевые слова: тетрагидробиоптерин, УФ облучение, автоокисление тетрагидробиоптерина, фотоокисление тетрагидробиоптерина, азациклобутановые димеры, фототерапия витилиго.

5,6,7,8-Тетрагидробиоптерин ($H_4\text{Bip}$) является коферментом фенилаланин-гидроксилазы [1], которая катализирует окисление молекулярным кислородом фенилаланина в тирозин (предшественник меланина) на начальном этапе процесса меланогенеза. Нарушение меланогенеза происходит при ряде дерматологических заболеваний, в том числе при витилиго, которое характеризуется появлением депигментированных участков кожи. Тетрагидробиоптерин является полностью восстановленным птерином и легко окисляется кислородом (автоокисление) *in vivo* и *in vitro* [2]. При автоокислении наряду с окисленными птеринами образуются и активные формы кислорода (АФК) ($O_2^{\cdot-}$ супероксид-анион радикал и H_2O_2 –пероксид водорода). При витилиго H_2O_2 определяется в коже пациентов в миллимолярных концентрациях. Образование АФК приводит к окислительному стрессу, который рассматривается в качестве одного из существенных факторов в патоэтиологии витилиго. У пациентов с витилиго наблюдается трёх-пятикратный *de-novo* синтез $H_4\text{Bip}$ [3-7] и образующийся избыток $H_4\text{Bip}$ может подвергаться автоокислению.

Процесс автоокисления $H_4\text{Bip}$ начинается со спонтанной реакции переноса электрона с тетрагидробиоптерина на молекулу кислорода, в результате которой образуется супероксид-анион радикал ($O_2^{\cdot-}$) и тетрагидробиоптерин-катион радикал ($H_4\text{Bip}^{\cdot+}$) [8]:



Или образуется тригидробиоптерин-радикал $H_3\text{Bip}^{\cdot}$ и гидропероксильный радикал HO_2^{\cdot} [9]:



Свободные радикалы и АФК участвуют в дальнейших реакциях активации молекулярного кислорода и окисления $H_4\text{Bip}$. В целом, автоокисление $H_4\text{Bip}$ является радикальным цепным процессом [9,10,11]. Первым молекулярным продуктом автоокисления $H_4\text{Bip}$ является хиноноидный 6,7-дигидробиоптерин ($qH_2\text{Bip}$) с временем жизни 1,5 минуты. Затем $qH_2\text{Bip}$ изомеризуется в более стабильный 7,8 дигидробиоптерин ($H_2\text{Bip}$) или трансформируется в 7,8-дигидроптерин ($H_2\text{Ptr}$) путём отрыва бокового радикала. $H_2\text{Ptr}$ легко окисляется кислородом до дигидроксантоптерина ($H_2\text{Xap}$) и птерина (Pterin), а $H_2\text{Bip}$ окисляется до биоптерина (Bip). На рисунке 1 представлены молекулярные продукты, образующиеся в процессе автоокисления $H_4\text{Bip}$ [2].

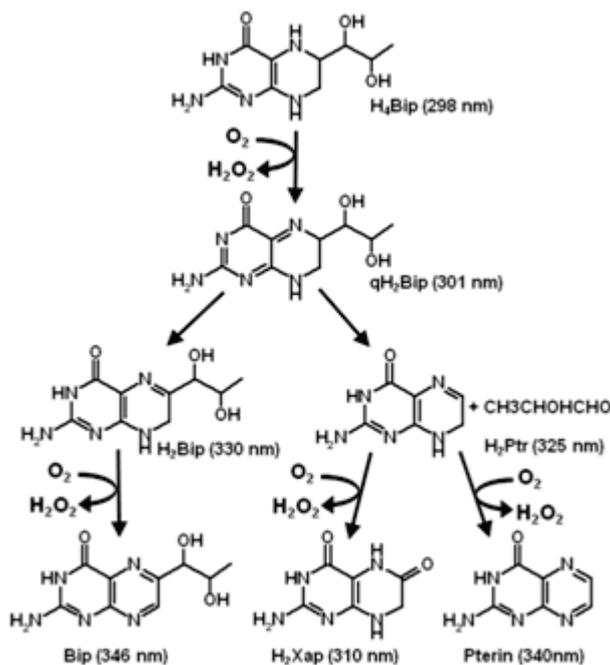


Рисунок 1. Схема автоокисления тетрагидробиоптерина, в скобках длинноволновые максимумы в спектрах поглощения

Методом HPLC-MS/MS-масс-спектрометрии удалось показать, что птериновые продукты автоокисления H₄Bip (дигидроптерин, дигидроксантиоптерин и птерин) преобладают над окисленными биоптериновыми продуктами (дигидробиоптерин и биоптерин) [12]. Важным моментом при рассмотрении автоокисления избытка H₄Bip, сопровождающего витилиго, является образование H₂O₂ на каждом этапе окислительного процесса. Накопление H₂O₂ может приводить к формированию окислительного стресса.

Наше предположение, что УФ излучение, действуя прямо на H₄Bip (максимум в его спектре поглощения равен 298 нм) [11] может ускорять реакцию окисления с кислородом подтвердилось. УФ облучение при длине волны 300 нм увеличивало начальную скорость реакции окисления почти в три раза. Так, начальная скорость процесса окисления 43 мкМ водного раствора H₄Bip без облучения равнялась $(6,8 \pm 0,7) \times 10^{-9} \text{ M c}^{-1}$, с облучением она составляла $(18,1 \pm 1,0) \times 10^{-9} \text{ M c}^{-1}$. Квантовый выход равнялся $(2,7 \pm 0,4) \times 10^{-3}$. Более сильное воздействие на окисление H₄Bip оказывало излучение с длиной волны 350 нм. При этом облучении квантовый выход составлял $(7,7 \pm 1,2) \times 10^{-3}$. Молекулы H₄Bip не поглощают фотоны в области 350 нм, но в этой области поглощают окисленные птерины. Длина волны 350 нм близка к длинноволновому максимуму птерина (340 нм) и биоптерина (346 нм), которые являются продуктами автоокисления H₄Bip (рисунок 1). Было предположено, что окисленные птерины фотосенсибилизируют окисление H₄Bip. Действительно, в присутствии биоптерина излучение с длиной волны 350 нм значительно ускоряло процесс окисления H₄Bip и квантовый выход реакции окисления достигал $(9,7 \pm 1,5) \times 10^{-3}$. Была проведена серия экспериментов, в которых изучалась сенсибилизирующая активность биоптерина и устанавливался механизм сенсибилизированного биоптеринном окисления по данным квантово-химических расчётов. Экспериментально показано, что скорость окисления H₄Bip линейно зависит от концентрации биоптерина. Опыты с иодидом калия (селективный тушитель триплетных состояний птерина) показали, что окисление H₄Bip сенсибилизируется птеринном в триплетном состоянии. Согласно квантово-химическим расчётам, возможна прямая реакция переноса электрона с H₄Bip на биоптерин в триплетном состоянии, а сенсибилизированная биоптеринном генерация АФК возможна за счёт прямого переноса энергии, но не за счёт прямого переноса электрона [11, 13]. Показано, что механизм сенсибилизации за счёт транспорта электрона (механизм 1 типа) является доминирующим. Перенос энергии (механизм 2 типа) и генерация синглетного кислорода играют второстепенную роль. Механизмы этих фотопроцессов подробно описаны в нашей работе [11].

На основании полученных результатов можно заключить, что при УФ воздействии имеет место взаимодействие процессов автоокисления и фотоокисления H₄Bip по механизмам фотосенсибилизации I и II типа. При витилиго в депигментированных клетках эпидермиса происходит трёх-пятикратное накопление H₄Bip вследствие его *de novo* синтеза, а также накопление биоптерина [3]. В этих условиях возможно фотосенсибилизированное окисление H₄Bip с участием продукта его окисления – биоптерина, что может вести к дальнейшему развитию патологии при воздействии УФ излучения на депигментированные участки кожи.

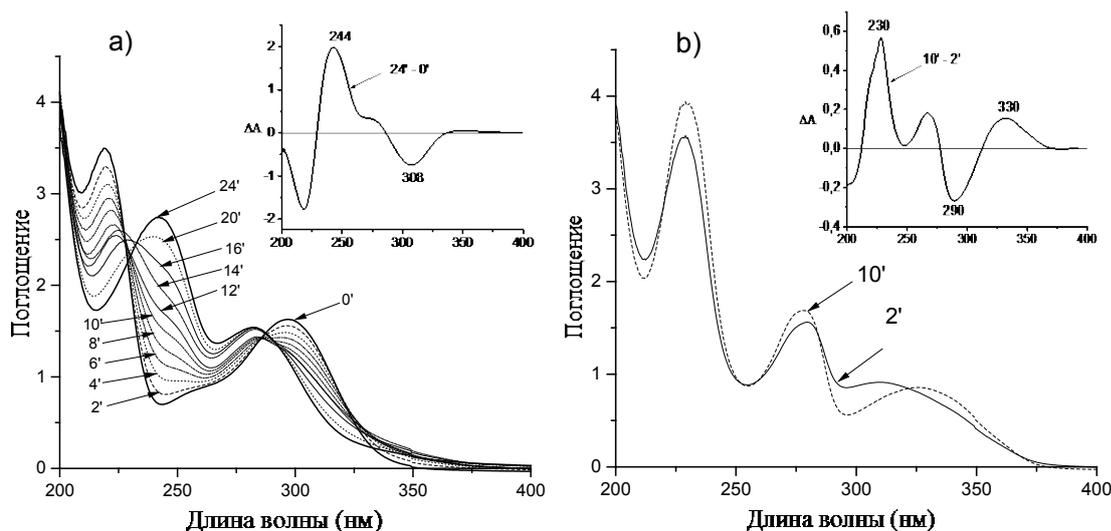


Рисунок 2. Кинетика (а) фотоокисления и (б) автоокисления тетрагидробиоптерина при облучении с длиной волны 312 нм; плотность мощности излучения 12,1 Вт/м². На вставке – разностный спектр ($A_t - A_0$)

Далее было изучено воздействие УФ излучения на окисление $H_4\text{Bip}$ в широком спектральном диапазоне с использованием двух источников УФ излучения – ксеноновой лампы и ртутной лампы высокого давления ДРК 120 в комбинации со светофильтром УФС-6 (полоса пропускания 300-380 нм.) [12]. Было показано, что конечные продукты фотоокисления отличаются от продуктов автоокисления.

ВЭЖХ анализ продуктов фотоокисления выявил, что среди продуктов реакции появляется новое соединение, с временем удерживания на катионообменной колонке Partisil SCX, превышающим времена удерживания продуктов реакции темнового автоокисления (в основном, $H_2\text{Bip}$, Bip). При этом накопление нового соединения шло параллельно с нарастанием поглощения в области 240-250 нм. Спектр поглощения показал, что в результате фотоокисления $H_4\text{Bip}$ накапливается соединение с максимумом поглощения в области 245 нм и плечом в области 275 нм. Спектральные характеристики исследуемого соединения были близки к спектральным характеристикам димеров дигидробиоптерина ($H_2\text{Bip}$)₂ (максимум поглощения при 246 нм и плечо при 280 нм), которые в очень маленьких количествах образуются при УФ облучении $H_2\text{Bip}$ в отсутствие кислорода [14,15]. Дальнейшее изучение хроматографических, спектральных, флуоресцентных свойств и масс-спектрометрический анализ исследуемого соединения, а также сравнение с димерами, образующимися при облучении тетрагидроптерина ($H_4\text{Ptr}$), позволили нам сделать заключение, что при фотоокислении $H_4\text{Bip}$ образуются преимущественно димеры дигидроптерина ($H_2\text{Ptr}$)₂ и в относительно меньших количествах димеры дигидробиоптерина ($H_2\text{Bip}$)₂ [12].

Одной из задач нашей работы, связанной с изучением механизма УФ-В фототерапии витилиго, было определение спектра действия реакции фотодимеризации. С этой целью изучалось фотоокисление $H_4\text{Bip}$ при использовании в качестве источников УФ излучения ксеноновой лампы с монохроматором и перестраиваемого импульсного УФ лазера. Водные растворы $H_4\text{Bip}$ с концентрацией $(1,6 \pm 0,1) \times 10^{-4}$ М в 0,1 М Трис или фосфатном буфере облучали различным УФ излучением в спектральном диапазоне 300-350 нм. За протеканием темнового и фото процессов окисления следили по изменению спектров поглощения. В качестве примера на рисунке 2 приведена эволюция во времени спектров поглощения $H_4\text{Bip}$ при фотоокислении (рис. 2а) и автоокислении в темноте (рис. 2б).

Спектральный анализ темнового процесса показал, что разностный спектр поглощения ($A_t - A_0$), представленный на вставке в основной спектр, является спектральной кривой, близкой к спектру поглощения $H_2\text{Bip}$ с максимумами поглощения 230, 280 и 330 нм. В случае фотоокисления по мере протекания процесса увеличивалось поглощение в области 240-250 нм, что указывало на образование димеров. На разностном спектре (вставка на рисунке 2а), отражающем разницу ($A_t - A_0$) видно, что в результате облучения в течение 24 минут на длине волны 312 нм в растворе накапливались димеры, имеющие максимум поглощения в области 245 нм и плечо в области 275 нм. Эти данные свидетельствовали о том, что в результате фотореакции димеризации образовывались димеры, в основном, дигидроптеринового типа ($H_2\text{Ptr}$)₂. Были проведены опыты по облучению $H_4\text{Bip}$ ксеноновой лампой с выделением узкополосного света с помощью монохроматора в спектральном диапазоне 300-325 нм с шагом в 2 нм. Темновой интервал во время облучения, в течение которого записывался спектр, составлял 1 минуту. В серии экспериментов было показано, что химический выход реакции фотодимеризации при каждой используемой длине волны находится в прямой зависимости от дозы облучения образца, т.е. интенсивности излучения и времени облучения. С учётом нормированных по интенсивности величин выходов реакции, мы определили, что наиболее эффективным излучением для протекания реакции фотодимеризации является излучение с длиной волны 312 нм.

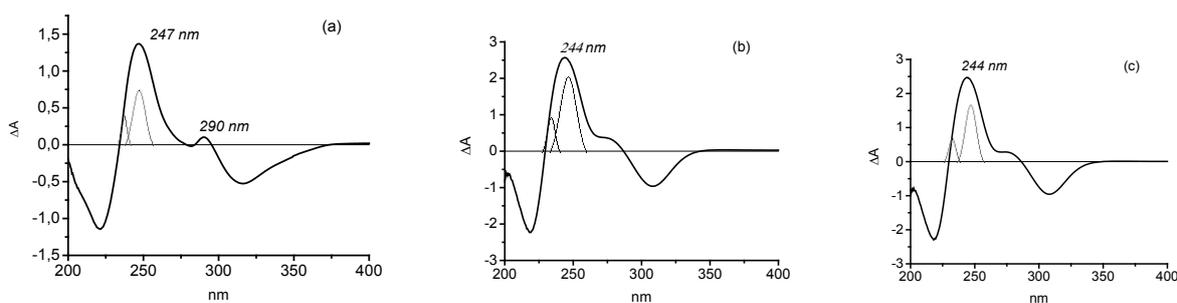


Рисунок 3. Разложение экспериментальных спектров продуктов фотореакции на гауссианы: а) облучение на длине волны 300 нм, б) на длине волны 312 нм, с) на длине волны 325 нм

С целью вычисления выхода димера относительно суммы продуктов реакции фотоокисления $H_4\text{Vip}$ спектр продуктов был аппроксимирован суммой гауссовых функций, соответствующих полосам поглощения продуктов. Важными для оценки количества продуктов являются полоса поглощения с максимумом в области 230 нм, соответствующая участвующим в димеризации дигидроптерину ($H_2\text{Ptt}$) и/или дигидробиоптерину ($H_2\text{Vip}$), и полоса с максимумом в области 245 нм, соответствующая поглощению димера ($H_2\text{Ptt}$)₂. Как видно из полученных данных, приведенных на рисунке 3 для трёх длин волн облучения, наибольший выход димера (83 % от суммы продуктов реакции) наблюдался при облучении на длине волны 312 нм.

При облучении на 300 нм практически вообще не образуются дигидроптериновые димеры, поскольку полученный разностный спектр $\Delta A = (A_t - A_0)$ отличается от спектра поглощения димеров дигидробиоптерина, в котором должен быть максимум при 245 нм и перегиб в области 275 нм, связанный с поглощением пиримидиновым кольцом птериновой структуры. В разностном спектре при облучении 300 нм, отражающем спектр поглощения продуктов фотореакции, отсутствует плечо в спектре поглощения в области 275–280 нм.

В настоящее время популярным и более эффективным инструментом фототерапии витилиго является и эксимерный лазер с длиной волны генерации 308 нм. Характерной особенностью этого лазера является импульсно-периодическое воздействие, длительность импульса составляет порядка 10 нс, частота следования импульсов – десятки килогерц, что определяет малые периоды воздействия, чередующиеся с периодами темноты. В рамках настоящей работы был исследован спектр действия именно импульсно-периодического лазерного излучения с длительностью импульса порядка 7 нс и частотой следования импульсов 10 Гц. Источником излучения являлся лазер на активной среде $\text{Ce:LiLu}_{0.7}\text{Y}_{0.3}\text{F}_4$, который позволяет получать излучение с перестройкой от 305 нм до 335 нм [16,17]. Также для облучения было использовано лазерное излучение с длинами волн 300 нм и 342 нм, полученное путем преобразования излучения 4-й гармоники лазера Nd:YAG за счет эффекта вынужденного комбинационного рассеяния в ячейке, заполненной газом H_2 . Дело в том, что эта ВКР-ячейка была использована также для обеспечения накачки для указанного лазера $\text{Ce:LiLu}_{0.7}\text{Y}_{0.3}\text{F}_4$.

На рисунке 4(а) представлена эволюция спектров поглощения раствора тетрагидробиоптерина в результате облучения лазерным УФ излучением с длиной волны 311 нм. Следует отметить, что спектры поглощения продуктов фотоокисления отличаются от результатов для облучения непрерывным светом, а именно увеличивается поглощение в области 230 нм. По-видимому, импульсно-периодический характер облучения приводит к уменьшению дозы, то есть времени облучения, и генерация димеров является гораздо менее эффективной.

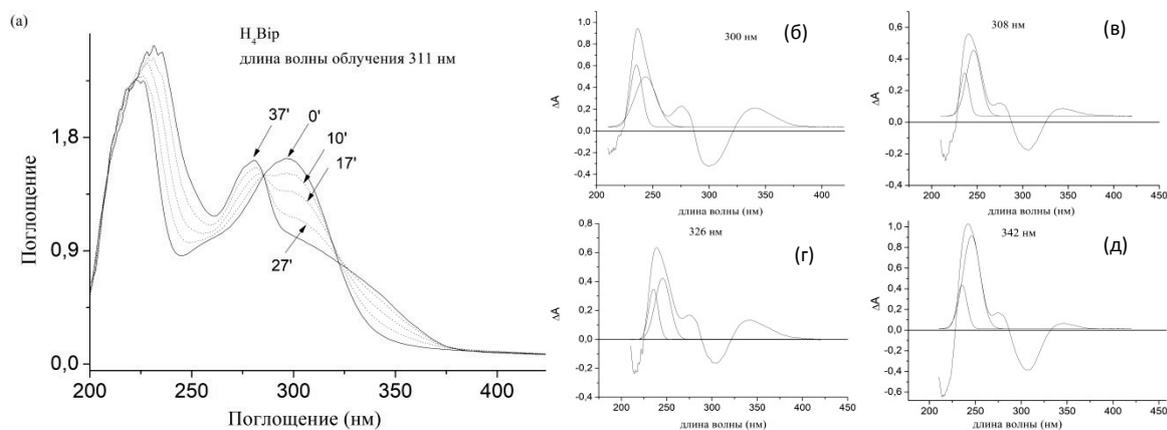


Рисунок 4. (а) кинетика фотоокисления тетрагидробиоптерина при облучении УФ лазером с длиной волны 311 нм, плотность энергии излучения 0,1 мДж/см², спектры продуктов фотоокисления при облучении УФ лазером с длиной волны 300 нм (б), 308 нм (в), 326 нм (г), 342 нм (д)

Таблица 1. Оценки относительного выхода димеров дигидроптеринов при фотоокислении H_4Bir с различными длинами волн и различными источниками

Длина волны облучения, нм	300 нм	308 нм лазер, 312 нм лампа	325 нм	342 нм
УФ лампа	Димер не образуется	83 %	54 %	Эксперимент не проводился
Лазер $Ce:LiY_{0.3}Lu_{0.7}F_4$	60 %	65 %	61 %	75 %

Это выражается в смещении коротковолновой полосы поглощения в разностных спектрах продуктов фотоокисления в область 239-241 нм (рисунки 4 (б)-(д)).

При этом видно, что для всех длин волн облучения присутствует поглощение в области 275-280 нм, что свидетельствует о наличии димерных молекул. По-видимому, малая длительность импульса света, инициирующего фотореакции, приводит к более сложным процессам, например, поглощение из возбужденного состояния, что может повлечь включение иных механизмов образования димеров дигидроптеринов. Тем не менее, можно оценить относительный выход продуктов по процедуре, описанной ранее. Результаты представлены в таблице 1.

Результаты как экспериментов с непрерывным излучением лампы, так и с импульсно-периодическим лазерным светом, свидетельствуют об эффективности света с длиной волны 308-312 нм в фотоиндуцированном образовании димеров дигидроптеринов. Высокий выход димеров при облучении лазерным светом с длиной волны 342 нм, по-видимому, связан с тем, что эта длина волны соответствует поглощению дигидробиоптерина. Однако такое излучение будет влиять на ферментативный процесс восстановления хиноноидного дигидробиоптерина в цикле регенерации тетрагидробиоптерина с участием NADH, имеющим в спектре поглощения максимум при 340 нм.

В целом, длины волн соответствующие максимальному выходу димеров, 312 нм и 308 нм, соответствуют длинам волн, которые в настоящее время используется в медицинской практике для фототерапии витилиго и псориаза в приборах с люминесцентными лампами (311 нм), эксимерными лампами и эксимерными лазерами (308 нм). Каков механизм действия такого излучения? Установлено, что избыток H_4Bir и продукты его окисления ингибируют биосинтез меланина. Большое число реакций окисления H_4Bir , указанных на рисунке 1, ведут к накоплению пероксида водорода и окислительному стрессу при витилиго [3,4,5,6,18,19]. Образующийся пероксид водорода стимулирует через цитокины биосинтез избытка H_4Bir путём индукции ГТФ-циклогидролазы [20]. Таким образом, получается «порочный круг» в который включён избыток H_4Bir . Этот «порочный круг» может быть разорван реакцией фотодимеризации, в результате которой удаляется избыток H_4Bir .

Работа поддержана частично за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности [3.1156.2017/4.6].

Список литературы / References:

1. Kaufman S. The structure of the phenylalanine-hydroxylation cofactor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1963, vol. 50, p. 1085-1093.
2. Davis M.D., Kaufman S., Milstein S. The auto-oxidation of tetrahydrobiopterin. *Eur. J. Biochem.*, 1988, vol. 173, pp. 345-351.
3. Schallreuter K.U., Wood J.M., Pittelkow M.R., Gutlich M., Lemke K.R., Rödl W., Swanson N.N., Hitzemann K., Ziegler I. Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science*, 1994, vol. 263, pp. 1444-1446.
4. Schallreuter K.U., Moore J., Wood J.M., Beazley W.D., Peters E.M.J., Marles L.K., Behrens-Williams S.C., Dummer R., Blau N., Thöny B. Epidermal H_2O_2 accumulation alters tetrahydrobiopterin (6BH4) recycling in vitiligo: identification of a general mechanism in regulation of all 6BH4-dependent processes? *J. Invest. Dermatol.*, 2001, vol. 116, pp. 167-174.
5. Schallreuter K. U. in book *Autoimmune Diseases of the Skin: Pathogenesis, Diagnosis, Management. Second edition*. Vitiligo, New-York: Springer Wein, ed. M. Hertl, ch. 13, 2005, pp. 367-384.
6. Schallreuter K. U. in book *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, ed. I. Laher, 2014, pp. 3697-3736.
7. Wood J. M., Chavan B., Hafeez I., Schallreuter K. U., Regulation of tyrosinase by tetrahydropteridines and H_2O_2 . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, vol. 325, pp. 1412-1417.
8. Nishikimi M. The generation of superoxide anion in the reaction of tetrahydropteridines with molecular oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1975, vol. 166, pp. 273-279.
9. Kirsch M., Korth H-G., Stenert V., Sustmann R., de Groot H. The autoxidation of tetrahydrobiopterin revisited. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, pp. 24481-24490.
10. Blair J. A., Pearson A. J. Kinetics and mechanism of the autoxidation of the 2-amino-4-hydroxy-5,6,7,8-tetrahydropteridines. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.*, 2, 1974, vol. 2, pp. 80-88.

11. Buglak A. A., Telegina T. A., Lyudnikova T. A., Vechtomova Y. L., Kritsky M. S. Photooxidation of tetrahydrobiopterin under UV-irradiation: possible pathways and mechanisms. *Photochem. Photobiol.*, 2014, vol. 90, pp. 1017-1026.
12. Telegina T.A., Lyudnikova T.A., Buglak A.A., Vechtomova Y.L., Biryukov M. V., Demin V.V., Kritsky M.S. Transformation of 6-tetrahydrobiopterin in aqueous solutions under UV-irradiation. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 2018, vol. 354, pp. 155-162.
13. Buglak A. A., Telegina T. A., Kritsky M. S. A quantitative structure-property relationship (QSPR) study of singlet oxygen generation by pteridines. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2016, vol. 15, pp. 801-811.
14. Vignoni M., Cabrerizo F. M., Lorente C., Claparols C., Oliveros E., Thomas A. H. Photochemistry of dihydrobiopterin in aqueous solution. *Org. Biomol. Chem.*, 2010, vol. 8, pp. 800-810.
15. Vignoni M., Lorente C., Cabrerizo F. M., Erra-Balsells R., Oliveros E., Thomas A. H. Characterization and reactivity of photodimers of dihydroneopterin and dihydrobiopterin. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2012, vol. 11, pp. 979-987.
16. Nizamutdinov A.S., Semashko V.V., Naumov A.K., Korableva S.L., Marisov M.A., Efimov V.N., Nurtdinova L.A. Characterization of Ce³⁺ and Yb³⁺ doped LiF-LuF₃-YF₃ solid solutions as new UV active media. *Proc. SPIE.*, 2011, vol. 7994, p. 79940H.
17. Nurtdinova L.A., Korableva S.L. Enhanced efficiency ultraviolet LiY_xLu_{1-x}F₄:RE³⁺ (RE = Ce, Yb) laser. *Las. Phys. Lett.*, 2014, vol. 11, p. 125807.
18. Rokos H., Beazley W. D., Schallreuter K. U. Oxidative stress in vitiligo: photo-oxidation of pterins produces H₂O₂ and pterin-6-carboxylic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, vol. 292, pp. 805-811.
19. Jain A., Mal J., Mehndiratta V., Chander R., Patra S. K. Study of oxidative stress in vitiligo. *Indian J. Clin. Biochem.*, 2011, vol. 26, pp. 78-81.
20. Shimizu S., Shiota K., Yamamoto S., Miyasaka Y., Ishii M., Watabe T., Nishida M., Mori Y., Yamamoto T., Kiuchi Y. Hydrogen peroxide stimulates tetrahydrobiopterin synthesis through the induction of GTP-cyclohydrolase I and increases nitric oxide synthase activity in vascular endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 2003, vol. 34, pp. 1343-1352.

THE ROLE OF PHOTOCHEMICAL TRANSFORMATIONS OF TETRAHYDROBIOPTERIN IN THE PATHOGENESIS AND PHOTOTHERAPY OF VITILIGO

Telegina T.A.^{1,2}, Nizamutdinov A.S.², Buglak A.A.³, Shavrov A.N.¹, Lukinova E.V.², Vechtomova Yu.L.^{1,2}, Kritsky M.S.¹

¹Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences. Leninsky prospect, 33, bld. 2, Moscow, 119071, Russia; e-mail: telegina@inbi.ras.ru

²Kazan Federal University, Kremlevskaja str., 18, Kazan, 420008, Russia

³St. Petersburg State University, Universitetskaya emb., 7/9, St. Petersburg, 199034, Russia

Abstract. Melanogenesis disorder leads to several pathologies, including vitiligo. Tetrahydrobiopterin (H₄Bip) as the phenylalanine 4-hydroxylase coenzyme catalyzes the oxidation of phenylalanine to tyrosine (a melanin precursor). H₄Bip is easily oxidized by oxygen *in vivo* and *in vitro*. Vitiligo is accompanied by three-fivefold increased *de-novo* synthesis of H₄Bip, its excess and its further oxidation are essential factors in the pathogenesis of vitiligo. We have demonstrated that pterin products of H₄Bip autoxidation (dihydropterin (H₂Ptr), dihydroxanthopterin and pterin) predominate over biopterin products (dihydrobiopterin (H₂Bip) and biopterin). It was shown that ultraviolet (UV) irradiation accelerates the autoxidation while the products of oxidative degradation of H₄Bip act as photosensitizers. Photosensitized oxidation of H₄Bip can contribute to the pathogenesis of vitiligo. The main distinguishing feature of UV photooxidation of H₄Bip from autoxidation was the formation of dihydropterin (H₂Ptr)₂ and dihydrobiopterin (H₂Bip)₂ dimers. Here we reported on the dependences of the photodimerization reaction on the wavelength and intensity of radiation using xenon lamps and UV tunable lasers as sources of UV radiation. It was shown that UV irradiation with a laser is more efficient than that with xenon lamp. It was established that the greatest number of dimers were formed by irradiating the H₄Bip solution by radiation with a wavelength in the range 308-312 nm. The data obtained are discussed in the context of UV-B narrowband vitiligo phototherapy.

Key words: tetrahydrobiopterin, UV irradiation, autoxidation of tetrahydrobiopterin, photooxidation of tetrahydrobiopterin, azacyclobutane dimers, vitiligo phototherapy