УДК 541.14+577.343'15

Спиновая химия ферментативных процессов

М.С.Афанасьева, П.А.Пуртов, М.Б.Тарабан, Т.В.Лёшина

Институт химической кинетики и горения Сибирского отделения Российской академии наук 630090 Новосибирск, ул. Институтская, 3, факс (383)330–7350

Обобщены результаты исследований стадии одноэлектронного переноса и роли спиновых состояний парамагнитных интермедиатов при ферментативном окислении органических субстратов под действием пероксидазы хрена, полученные с применением методов спиновой химии. Приведено детальное теоретическое описание подхода, использованного при анализе магнитных эффектов в ферментативных многоспиновых системах, а также намечены перспективы дальнейшего применения методик спиновой химии для установления механизмов радикальных стадий ферментативных процессов.

Библиография — 80 ссылок.

Оглавление

I.	Введение	651
II.	Феноменологическое описание магнитных и спиновых эффектов в ферментативных системах	653
III.	Теория магнитных и спиновых эффектов в ферментативных многоспиновых системах	654
IV.	Магнитные эффекты в ферментативных реакциях, катализируемых пероксидазой хрена	656
V.	Заключение	665

І. Введение

Методами спиновой химии изучают радикальные реакции, скорость, а зачастую и направление которых зависят от ориентации электронных и ядерных спинов промежуточных радикальных частиц, а также от напряженности внешних и локальных магнитных полей. Спиновая химия определилась как самостоятельная область исследований примерно четверть века назад, и в настоящее время не нуждается в специальном представлении читателю. Термин «спиновая химия» применяют для обозначения двух понятий: собственно химии упомянутых выше радикальных процессов, а также методов, называемых методами спиновой химии. К последним относят методы, основанные на таких явлениях,

М.С.Афанасьева. Аспирантка лаборатории магнитных явлений ИХКиГ СО РАН. Телефон: (383)333–1405,

e-mail: afanasieva@ns.kinetics.nsc.ru

П.А.Пуртов. Доктор физико-математических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории теоретической химии того же института. Телефон: (383)333–1102, e-mail: purtov@ns.kinetics.nsc.ru М.Б.Тарабан. Кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории магнитных явлений того же института.

Телефон: (383)333-1405, e-mail: taraban@ns.kinetics.nsc.ru

Т.В.Лёшина. Доктор химических наук, профессор, заведующая лабораторией магнитных явлений, ведущий научный сотрудник того же института. Телефон: (383)333–1405,

e-mail: leshina@ns.kinetics.nsc.ru

Область научных интересов авторов: спиновая химия, биохимия, ферментативные реакции, парамагнитные интермедиаты, химическая радиоспектроскопия, неравновесная химическая термодинамика, коллоидные системы, наночастицы, медицинская химия.

Дата поступления 5 апреля 2007 г.

как химическая поляризация электронов и ядер (ХПЭ и ХПЯ), магнитный (МЭ) и магнитный изотопный эффекты (МИЭ), а также сопутствующие им методики, подробному описанию которых посвящен ряд обзоров и монографий (см., например,^{1, 2}).

В последнее десятилетие, после того как было завершено теоретическое описание магнитных эффектов, регистрируемых в модельных системах, усилилась тенденция к практическому применению полученных знаний при изучении методами спиновой химии сложных химических и биохимических процессов. Такое направление исследований представляется весьма важным, поскольку установление строения и свойств короткоживущих интермедиатов химических реакций одна из ключевых задач современной химии. Методы спиновой химии позволяют изучать парамагнитные интермедиаты, времена жизни которых лежат в диапазоне от нанодо микросекунд; это — ион-радикалы и нейтральные свободные радикалы, бирадикалы, карбены и их аналоги, а также молекулы в триплетном возбужденном состоянии.

Впечатляющие примеры успешного применения методов ХПЯ и МЭ для установления механизмов процессов, в которых участие ион-радикалов, радикалов и бирадикалов только постулировалось, подробно описаны в публикациях $^{3-5}$. Особый интерес представляют современные исследования с применением методик спиновой химии в биологии, ⁶ в том числе для изучения колебательных ферментативных реакций, ⁷ структурных особенностей обратимого фолдинга белков, ⁸ типа интермедиатов в реакциях B_{12} -зависимых ферментов, ⁹ а также для моделирования механизмов взаимодействия белков и нуклеиновых кислот.¹⁰

Между тем в последние годы в литературе приводится все больше экспериментальных свидетельств того, что свободно-радикальные состояния инициируют процессы, вызывающие разрушение клеточных структур, отдельных белков и нуклеиновых кислот.¹¹ Именно со свободными радикалами связывают развитие заболеваний сердечно-сосудистой системы,¹² нарушение иммунитета,¹³ формирование катаракты,¹⁴ развитие болезни Паркинсона,¹⁵ шизофрении¹⁶ и синдрома Альцгеймера,^{15,17} а также ускорение старения и повышение вероятности развития онкологических заболеваний.¹⁸ Согласно современным представлениям, в основе деструктивных изменений в живых организмах, вероятнее всего, лежат процессы с участием реакционноспособных форм кислорода и кислородсодержащих радикалов (O_2^- , HO', HO' и $^{1}O_2$), вызывающие окислительный стресс, болезни и преждевременное старение.¹⁹ В этой связи возникла потребность в применении методов спиновой химии для исследования активных парамагнитных интермедиатов в биологических системах.

Известно, что парамагнитные частицы играют важную роль в ряде процессов, обеспечивающих нормальное функционирование клеток млекопитающих.²⁰ Участие радикальных частиц во многих биологических процессах описано, например, в обзорах^{21,22}. Ферментативные процессы в живых системах являются источниками ряда свободных радикалов, в частности HO₂ (см.²³). Так, пероксидаза хрена (ПХ), механизмам реакций которой посвящен настоящий обзор, — источник интермедиатов, реагирующих со многими свободными радикалами; существует даже термин «свободно-радикальная химия пероксидазы».²⁴ Пероксидаза хрена присутствует как в организмах млекопитающих, так и в растениях, где выполняет функцию утилизации токсичного пероксида водорода и способна служить ловушкой для свободных радикалов. При этом следует отметить, что к настоящему времени установлены далеко не все источники формирования свободных радикалов в живых системах в норме и при патологиях.

С учетом сказанного выше исследования элементарных процессов, приводящих к появлению свободных радикалов, в частности возникающих в ферментативных реакциях, представляют особый интерес. При изучении механизмов ферментативных реакций используют различные современные физико-химические методы. При идентификации парамагнитных частиц исследователи сталкиваются со значительными трудностями.²⁵ Общеизвестны проблемы детектирования свободных радикалов методом ЭПР, связанные с низкими стационарными концентрациями радикалов в биологических системах.²⁶ Применение метода спиновых ловушек в спектроскопии ЭПР решает «концентрационную» проблему, но нередко порождает ряд новых, например необходимость исключать появление сигналов ЭПР при дальнейших превращениях спиновых ловушек и образующихся стабильных радикалов.²⁶ Кроме того, при наблюдении сигнала ЭПР свободного радикала нельзя сказать, участвует ли этот радикал в исследуемом процессе или образовался в какой-либо побочной реакции. Исследования радикальных интермедиатов в биологических процессах с помошью метолик спиновой химии могли бы дать ответ на этот вопрос. Очевидно, что ферментативные процессы — также перспективные объекты исследования методами спиновой химии, поскольку превращения, происходящие в активных центрах многих металлоферментов, включают реакции с изменениями спинов и взаимопревращения интермедиатов в различных спиновых состояниях: речь идет о валентных состояниях таких металлов, как Fe, Cu, Zn и др. Например, в каталитическом цикле ПХ участвуют надежно охарактеризованные активные интермедиаты, так называемые компаунды ПХ, в активных центрах которых находятся атомы железа в различных валентных и спиновых состояниях (высокоспиновое в нативной ПХ и ферропероксидазе и низкоспиновое в компаундах I-III).24



N(His) — атом азота фрагмента гистидина.

Однако до последнего времени распространение методик спиновой химии на ферментативные процессы сильно тормозилось из-за отсутствия полного теоретического описания многоспиновых систем. Еще несколько лет назад такое описание (теория радикальных пар) существовало только для случаев, когда предшественником продуктов была радикальная пара с полуцелыми спинами (S = 1/2). Между тем во многих биологических процессах, например в реакциях с участием ионов железа или гемсодержащих ферментов, к которым относятся ПХ и цитохромы, парамагнитными промежуточными частицами являются железосодержащие интермедиаты в высокоспиновом состоянии. Обычно в таких системах одним из радикальных центров служит многоэлектронный атом, имеющий несколько неспаренных электронов.²⁷ В подобных случаях для анализа МЭ необходимо знать особенности эволюции спиновых состояний в многоспиновых системах. В настоящее время проводят интенсивные экспериментальные исследования многоспиновых систем на примерах процессов, протекающих в радикальных парах (РП) под воздействием так называемого третьего или четвертого спинов — как правило, спинов стабильных радикалов или бирадикалов.^{28,29} Эта область исследований находится в стадии накопления результатов, а стимулом к ее развитию стали работы 30, 31, в которых было обнаружено новое явление, получившее название «спиновый катализ».

Магнитные эффекты в широком понимании, т.е. влияние внешних магнитных полей (МП) на различные процессы в живых организмах — от ориентирования птиц при перелетах до воздействия так называемых магнитных бурь на самочувствие людей, — популярные объекты исследований.³² Поскольку подобные воздействия, несомненно, носят комплексный характер, собственно факт регистрации изменений, происходящих при воздействии МП, как правило, не проливает свет на механизмы возникновения МЭ и магниточувствительные составляющие исследуемых процессов.

Гораздо более информативными в плане изучения механизмов оказываются исследования влияния МП на отдельные стадии процессов *in vitro*, которые опираются именно на методы спиновой химии. Этими методами наиболее полно исследованы ферментативные процессы, в магниточувствительных стадиях которых участвуют пары парамагнитных частиц, возникающие в результате реакции одноэлектронного переноса.^{33–35} Выводы об участии радикальных пар в ферментативном процессе делаются на основании сравнения экспериментальных и рассчитанных зависимостей констант скоростей превращений парамагнитных интермедиатов от напряженности приложенного магнитного поля. Такие исследования проведены для процессов превращения активных парамагнитных интермедиатов в каталитическом цикле окисления ряда субстратов ПХ в стационарном режиме,^{33–35} а также в режиме колебаний.⁷ Важный результат этих исследований — демонстрация роли спиновых состояний парамагнитных интермедиатов в каталитическом цикле ферментативного процесса.

Магнитные эффекты в биологических системах рассмотрены в обзоре⁶, в котором также суммированы данные о возможных биологических эффектах при действии статических и переменных магнитных полей. В настоящем обзоре предпринята попытка систематизировать и осмыслить материал, касающийся теоретического описания спиновых и магнитных эффектов в многоспиновых ферментативных системах, и результаты экспериментальных исследований зависимостей скоростей реакций ферментативного окисления органических субстратов пероксидазой хрена от напряженности внешнего магнитного поля.

II. Феноменологическое описание магнитных и спиновых эффектов в ферментативных системах

Основной предмет исследований спиновой химии — реакции, скорость, а иногда и направление которых зависят от ориентации электронных и ядерных спинов парамагнитных предшественников продуктов. Пример такой реакции приведен на схеме 1.



Радикальная пара, возникающая, например, при фотохимическом или термическом распаде молекулы, может находиться в одном из двух коррелированных спиновых состояний: синглетном (S) с суммарным электронным спином радикалов, равным 0, и триплетном (T), в котором такой спин равен 1. Как правило, триплетное состояние радикальной пары является нереакционноспособным (или малореакционноспособным),¹ и рекомбинация РП происходит преимущественно из синглетного состояния. Магнитные и спиновые взаимодействия индуцируют переходы между нереакционноспособным Т-состоянием и реагирующим S-состоянием, так называемые *T*-*S*-переходы, вследствие которых изменяется доля реакционноспособных частиц. Такие синглет-триплетные переходы составляют физическую суть спиновых и магнитных эффектов в химических процессах. К наиболее существенным магнитным взаимодействиям, индуцирующим синглет – триплетные переходы и влияющим на их эффективность, относятся зеемановское взаимодействие неспаренных электронов радикалов пары с приложенным внешним магнитным полем, сверхтонкое взаимодействие (СТВ) спинов электронов с магнитными ядрами (ядрами с ненулевым ядерным спином I) радикалов и электронное обменное взаимодействие между неспаренными электронами радикальной пары. На рис. 1 схематически представлены два предельных случая механизмов синглет - триплетного смешения. Так, в слабых магнитных полях (рис. 1,а) сверхтонкое взаимодействие индуцирует S-T-переходы между всеми тремя триплетными зеемановскими подуровнями (T_0, T_{+1} и T_{-1}) и рекомбинирующим синглетным состоянием (СТВ-механизм синглет-триплетных переходов). В сильных внешних магнитных полях (полях, намного превышающих локальные магнитные поля, создаваемые за счет СТВ) вследствие значительного расщепления подуровней T_{+1} и T_{-1} сверхтонкое взаимодействие влияет на переходы только между синглет-



Рис. 1. Уровни энергии радикальной пары и возможные переходы между *S*- и *T*-состояниями в слабом (*a*) и сильном (*b*) магнитных полях.

ным состоянием и одним из триплетных состояний (T_0). Два других триплетных состояния (T_{+1} и T_{-1}) не вовлекаются изотропным сверхтонким взаимодействием в S-T-переход (рис. 1,*b*). Смешение состояний *S* и T_0 радикальной пары возможно также за счет различия *g*-факторов радикалов (Δg -механизм синглет – триплетных переходов). Таким образом, даже слабые магнитные взаимодействия, такие как зеемановское и сверхтонкое, которые по величине на 5–6 порядков меньше kT, благодаря S-T-переходу могут увеличить долю реакционноспособного состояния РП.

Для проявления синглет – триплетных переходов необходимо, чтобы время жизни РП было достаточно большим. Сравнительно долгое время жизни РП в конденсированной среде достигается благодаря клеточному эффекту. Клеточный эффект определяет две основные особенности рассматриваемых реакций: сравнительно продолжительное время контакта партнеров и возможность повторных контактов той же пары реагентов в процессе их диффузионного блуждания. Характерный размер клетки (R) и время пребывания (τ) реагентов в ней — параметры, которые определяются кинематикой относительного движения, взаимодействием между реагентами и некоторыми другими свойствами. Например, сверхтонкое взаимодействие неспаренных электронов с магнитными ядрами (ω , в единицах частоты) в органических свободных радикалах характеризуется величиной порядка $\sim 10^8 - 10^9$ рад c^{-1} , а вероятность синглет – триплетных переходов на временах $\tau \sim 10^{-9} - 10^{-10}$ с составляет

 $\omega \tau \sim 0.01 - 0.1$.

Вероятность S-T-переходов повышается с увеличением вязкости раствора (с ростом τ) или в реакциях с участием ионрадикальных пар (за счет кулоновского взаимодействия радикалов-партнеров).

Зависимость синглет – триплетной конверсии от ориентации электронных и ядерных спинов партнеров в РП, а также влияние СТВ, Δg и внешнего магнитного поля на скорость такой конверсии приводят к важному следствию — возможности проявления в химических и биохимических реакциях магнитного и спиновых эффектов — МИЭ и ХПЯ.

Магнитный изотопный эффект обусловлен различием скоростей T-S-конверсии для радикальных пар, содержащих и не содержащих магнитные ядра. Такой эффект обеспечивает избирательность изотопов по различным продуктам реакции. Химическая поляризация ядер — проявление селекции спинов с α - и β -ориентацией по различным продуктам реакции; при проведении процесса в датчике спектрометра ЯМР в начальный момент можно наблюдать в спектрах ЯМР линии с распределением заселенности спиновых подуровней, отличным от больцмановского (равновесного). Подробное описание спиновых и магнитных эффектов можно найти в монографии¹.

В настоящее время влияние внешнего магнитного поля и проявление ХПЯ обнаружены для целого ряда химических процессов, таких как одноэлектронный перенос в реакциях, которые ранее относили к нуклеофильному замещению;³ *цис-транс*-изомеризация олефинов, в том числе биологически важных полиенов — ретиналя и каротиноидов;³⁶ донорно-акцепторные взаимодействия синтетических аналогов никотинамидадениндинуклеотида (NADH) — 1,4-дигидропиридинов с электроноакцепторными группами ^{37–40} — и многие другие процессы.

Рассмотрим особенности проявления магнитных и спиновых эффектов в биохимических системах. В гомогенных растворах наиболее вероятными причинами проявления значительного клеточного эффекта являются сравнительно высокая вязкость растворителя и электростатическое взаимодействие между партнерами в ион-радикальных парах. Заметные клеточные эффекты также характерны для реакций, протекающих в молекулярно-организованных вязких средах, например липосомах, мицеллах, комплексах включения типа «хозяин-гость» и др., в которых пары радикалов за счет так называемых слабых взаимодействий находятся в зоне контакта более продолжительное время, чем в невязких системах. К слабым взаимодействиям относят и взаимодействия субстрата с ферментом (фермент-субстратное связывание), происходящее в активном центре фермента. Обычно именно связывание рассматривают как определяющий фактор высокой селективности ферментативных процессов.41 По аналогии с хорошо изученными процессами, протекающими в комплексах или мицеллах, 42 можно ожидать, что образовавшиеся в ферментативном процессе радикальные интермедиаты тоже будут достаточно продолжительное время удерживаться в фермент-субстратном комплексе. Фактор связывания партнеров в активном центре фермента дает основание ожидать проявления значительного электронного обменного взаимодействия между парамагнитными частицами в фермент-субстратных комплексах, которое можно регистрировать с помощью методик спиновой химии.

Следует определить принципиальные различия в проявлениях магнитных и спиновых эффектов в гомогенных радикальных и ферментативных процессах. В радикальной реакции влияние магнитного поля сводится к изменению соотношения вероятностей рекомбинации свободных радикалов и их выхода в объем;¹ в ферментативных реакциях, где парамагнитные интермедиаты — часть каталитического цикла, два различных спиновых состояния пары парамагнитных частиц (соответствующие процессам рекомбинации и выхода в объем, см. схему 1) могут относиться к разным стадиям каталитического цикла. Таким образом, магнитное поле будет влиять на соотношение вероятностей рекомбинации (или обратного переноса электрона в случае одноэлектронного переноса) и перехода к следующей стадии каталитического цикла. В качестве примера рассмотрим модельный каталитический цикл, представленный на схеме 2.



Цикл начинается с образования фермент-субстратного комплекса [E \cdots SH], в котором происходит перенос электрона от донора (субстрата) к акцептору (ферменту) с образованием радикальной пары (P₁ SH⁺⁺), например, в синглетном

состоянии. Магнитные взаимодействия вызывают синглет – триплетную конверсию, при этом в синглетном состоянии РП возможен обратный перенос электрона (рекомбинация) и регенерация исходного фермента (Е) и субстрата (SH). В триплетном состоянии РП является предшественником следующей стадии каталитического цикла, на которой образуется интермедиат P_2 . Таким образом, приведенный пример наглядно продемонстрировал принципиальную возможность влияния спиновых состояний парамагнитных интермедиатов на скорости процессов, происходящих в каталитическом цикле, фермента.

Влияние магнитного поля на ферментативный процесс будет проявляться как зависимость скоростей отдельных стадий каталитического цикла от напряженности внешнего магнитного поля. Магнитный эффект в этом случае может определяться как отношение констант скоростей, измеренных при проведении реакции в магнитном поле заданной напряженности, к соответствующим константам в нулевом (земном) магнитном поле. Анализ магнитных эффектов, зарегистрированных в ферментативных процессах, включает измерение зависимостей скоростей отдельных стадий каталитического шикла или всего процесса в целом от напряженности внешнего магнитного поля (полевая зависимость) и сравнение экспериментальных полевых зависимостей с рассчитанными. Для ферментативных процессов находят вероятности рекомбинации (обратного переноса электрона) пары парамагнитных частиц с определенными магнитнорезонансными параметрами (константами СТВ, g-факторами радикалов, эффективным электронным обменным взаимодействием J) с учетом времен жизни парамагнитной пары и мультиплетности исходного и рекомбинирующего состояний. Рассмотрим подход к расчету вероятности рекомбинации в многоспиновых системах, к которым относятся ферменты, содержащие многоэлектронные атомы.

III. Теория магнитных и спиновых эффектов в ферментативных многоспиновых системах

Модель многоспиновой системы отличается от модели, принятой в теории радикальных пар, числом неспаренных электронов (>2). Например, в случае спинового катализа³⁰ рассматривают системы из трех радикалов (триады) или пары частиц со спинами > 1/2. Таким образом, при описании многоспиновых систем приходится учитывать возможные коррелированные дублетные, квартетные, квинтетные и более высокие спиновые состояния. В расчетах вероятности рекомбинации таких многоспиновых пар необходимо рассматривать большое число подансамблей РП, каждые из которых отвечают определенным конфигурациям электронных и ядерных спинов. Взаимодействие спинов РП с внешними магнитными полями и взаимодействие спинов между собой вызывают переход РП из одного подансамбля в другой. Такие взаимодействия описываются системами с большим числом связанных между собой кинетических уравнений. Кроме того понятно, что для описания динамики спинового состояния РП требуется привлечение аппарата квантовой механики. Для одновременного рассмотрения пространственного движения и спиновой динамики РП наиболее приемлем метод матрицы плотности. Проведем расчет вероятности рекомбинации в рамках этого метода.

Изменение матрицы плотности пары парамагнитных частиц $\rho(\vec{r}, t)$ (зависящей от расстояния *r* между ними) во времени (*t*) определяется тремя факторами: спиновой эволюцией неспаренных электронов, вызванной их взаимодействием между собой, а также с внешними и локальными магнитными полями, относительным движением реагентов и рекомбинацией радикалов¹

$$\frac{\partial \rho(\vec{r},t)}{\partial t} = \left(\frac{\partial \rho}{\partial t}\right)_{\text{спин}} + \left(\frac{\partial \rho}{\partial t}\right)_{\text{движ}} + \left(\frac{\partial \rho}{\partial t}\right)_{\text{рекомб}}.$$
(1)

Это уравнение обычно записывают в следующем виде:43

$$\frac{\partial\rho(\vec{r},t)}{\partial t} = i\hat{L}(\vec{r})\rho(\vec{r},t) + \hat{R}(\vec{r})\rho(\vec{r},t) - \hat{U}(\vec{r})\rho(\vec{r},t),$$
(2)

где $\hat{L}(\vec{r}) = \hat{\Omega} + i\hat{R} + \hat{J}(\vec{r})$ — оператор Лиувилля (лиувиллиан), включающий в описание не зависящую от координат спиновую эволюцию, обусловленную изотропным СТВ и зеемановским взаимодействием с внешними магнитными полями ($\hat{\Omega}$), процессы спиновой релаксации (\hat{R}), а также зависящую от координат спиновую эволюцию, обусловленную обменным взаимодействием ($\hat{J}(\vec{r})$). Оператор $\hat{U}(\vec{r})$ описывает спин-зависимую рекомбинацию РП, его матричные элементы характеризуют скорость ухода в продукт (или продукты) различных компонент матрицы плотности. Функциональный оператор $\hat{R}(\vec{r})$ задает движение реагентов, которое обычно рассматривают в рамках классической механики.

Вероятность рекомбинации пары из того или иного спинового состояния к моменту времени t описывается соответствующими компонентами вектора $\hat{w}(t)$

$$\hat{w}(t) = \int_{0}^{1} \int \hat{U}(\vec{r})\rho(\vec{r},\tau) d\tau d\vec{r}.$$
(3)

Существует много методов решения уравнения (2). Наиболее часто для этого используют формализм функций Грина, задающих характер относительного движения других парамагнитных частиц в паре.⁴⁴ В этом методе используют физически оправданное допущение о том, что реакционная зона всегда является достаточно узкой областью в пространстве движения реагентов. При таком допущении получается следующее общее матричное выражение для вероятностей рекомбинации из того или иного спинового состояния пары парамагнитных частиц:⁴³

$$\hat{w} = \hat{U}_0 \hat{g} \left(1 + \hat{U}_0 \hat{g} \right)^{-1} \rho_0 ,$$
 (4)

где \hat{U}_0 — матрица констант рекомбинации в различных спиновых состояниях (в общем случае рекомбинация возможна из любых электронных спиновых состояний, но с разной скоростью); \hat{g} — оператор, усредненный по зоне реакции и характеризующий относительное движение, а также спиновую динамику в паре. Матрица этого оператора представляет собой матрицу «времен». Например, элемент матрицы g_{nn.kk} представляет собой среднее время нахождения пары в спиновом состоянии $|nn\rangle$ при условии, что вначале система находилась в электронном спиновом состоянии $|kk\rangle$. Все элементы этой матрицы выражаются через единственную функцию g(s), характеризующую относительное движе-(изменение взаимного расположения) ние в паре рекомбинирующих парамагнитных частиц.

При проведении конкретных расчетов часто необходимо знать только некоторые элементы матрицы \hat{g} — одно или несколько характерных «времен». Рассмотрим довольно типичный случай, когда пара может рекомбинировать только в определенном электронном спиновом состоянии, например дублетном или синглетном. Пусть спиновая эволюция в РП осуществляется таким образом, что переходы между различными рекомбинирующими состояниями радикалов отсутствуют. Тогда весь ансамбль пар можно разбить на подансамбли с фиксированной конфигурацией ядерных спинов $\{m\}$ в дублетном (или синглетном) состоянии. Расчеты для каждого подансамбля проводят независимо; вероятность рекомбинации заданного подансамбля равна

$$w_m = \frac{U_0 \tau_m}{1 + U_0 \tau_m},$$
(5)

где величина τ_m имеет смысл среднего времени нахождения пары в реакционной зоне в дублетном состоянии с заданной конфигурацией $\{m\}$ при условии старта из реакционной зоны в дублетном состоянии с той же конфигурацией $\{m\}$.

В некоторых случаях переходы между дублетными состояниями могут играть важную роль. Предположим, что возможен переход из дублетного состояния с конфигурацией ядерных спинов $\{m\}$ в дублетное состояние с конфигурацией $\{m'\}$. В этом случае имеем более общий, чем уравнение (5), результат

$$w_m = U_0 \frac{\tau_m + \tau_{mm'} + U_0(\tau_m \tau_{m'} - \tau_{mm'} \tau_{m'm})}{1 + U_0(\tau_m + \tau_{m'}) + U_0^2(\tau_m \tau_{m'} - \tau_{mm'} \tau_{m'm})}.$$
 (6)

Здесь $\tau_{mm'}$ — среднее время нахождения пары в реакционной зоне в дублетном состоянии с заданной конфигурацией $\{m\}$ при условии старта из дублетного состояния с заданной конфигурацией $\{m'\}$. Аналогичный смысл имеет $\tau_{m'm}$.

В ходе дальнейших расчетов для описания спиновой эволюции необходимо задать спин-гамильтониан пары, а для описания движения частиц в пространстве — выбрать подходящую модель относительного движения. Чтобы отразить изменения взаимного расположения частиц в ферментсубстратном комплексе, можно воспользоваться достаточно простой двухпозиционной моделью. 45 В рамках этой модели возможны два состояния РП в клетке: 1) радикалы находятся в контакте и могут рекомбинировать; 2) контакт между радикалами отсутствует, но существует возможность возврата радикалов в состояние контакта. Первое состояние характеризуется временем т1, с которым РП из этого состояния переходят во второе состояние. Для характеристики второго состояния вводятся два параметра: т₂ — время обратного перехода из второго состояния в первое, τ_c время необратимого распада РП. Синглет-триплетные переходы осуществляются во втором состоянии РП.

Для двухпозиционной модели функция *g*(*s*), характеризующая изменение взаимного расположения в паре рекомбинирующих парамагнитных частиц, записывается следующим образом:⁴⁵

$$g(s) = \frac{\tau_{\rm p}}{n+1} \left(1 + \frac{n}{1+s\tau_{\rm c}} \right),\tag{7}$$

где n — число повторных контактов, а $\tau_{\rm p} = n \tau_{\rm l}$.

Для описания спиновой эволюции выбирают удобные базисные спиновые состояния φ_i . Например, для пары частиц со спинами 1/2 удобен синглет-триплетный базис. Если пару образуют частицы со спином 1/2 и 1, то результирующее спиновое состояние может быть дублетным или квартетным. Спиновые функции для таких состояний имеют вид

$$|D\rangle = \begin{cases} \sqrt{\frac{2}{3}}\beta T_{+1} - \sqrt{\frac{1}{3}}\alpha T_{0} \\ \sqrt{\frac{2}{3}}\alpha T_{-1} - \sqrt{\frac{1}{3}}\beta T_{0} \end{cases},$$
(8)

$$|Q\rangle = \begin{cases} \alpha T_{+1} \\ \sqrt{\frac{1}{3}}\beta T_{+1} + \sqrt{\frac{2}{3}}\alpha T_{0} \\ \sqrt{\frac{1}{3}}\alpha T_{-} + \sqrt{\frac{2}{3}}\beta T_{0} \\ \beta T_{-1} \end{cases}.$$

(...T

Задавая спин-гамильтониан системы, можно найти стационарные уровни энергии (E_i) и собственные волновые функции системы (ψ_i). Стационарные волновые функции в базисе φ_i представляют в виде

$$\psi_i = \sum_j (\hat{Q})_{ij} \varphi_j \,,$$

где $(Q)_{ij}$ — матрица перехода от начального спинового базиса к базису системы собственных функций. Эволюция волновых функций подчиняется закону

 $|\psi(t)\rangle = \exp(-i\hat{H}t)|\psi(0)\rangle.$

 $=\hat{Q}^{-1}\exp(-\mathrm{i}\hat{H}t)\hat{Q}|\varphi(0)\rangle;$

Запишем матрицу плотности в базисе функций φ_i . В результате действия оператора \hat{Q} на функции φ_i получаем

$$|\varphi(t)\rangle = \hat{Q}^{-1}|\psi(t)\rangle = \hat{Q}^{-1}\exp(-i\hat{H}t)|\psi(0)\rangle =$$
(9)

так как

$$\hat{\rho}(t) = |\varphi(t)\rangle\langle\varphi(t)|,$$
^{ro}
$$\hat{\rho}(t) = \hat{Q}^{-1} \exp(-i\hat{H}t)\hat{Q}|\varphi(0)\rangle\langle\varphi(0)|\hat{Q}^{-1} \exp(i\hat{H}t)\hat{Q}.$$
(10)

Например, вероятность обнаружить РП в одном из дублетных состояний в любой момент времени выражается следующим образом:

$$\rho_{DD}(t) = \left\langle D \middle| \hat{Q}^{-1} \exp(-i\hat{H}t) \hat{Q} \middle| D \right\rangle \left\langle D \middle| \hat{Q}^{-1} \exp(i\hat{H}t) \hat{Q} \middle| D \right\rangle.$$
(11)

Здесь \hat{Q} выступает в качестве матричных коэффициентов, поэтому $\rho_{DD}(t)$ можно преобразовать к виду

$$\rho_{DD}(t) = \sum_{i} Q_{i1}^{4} + \sum_{i,j} Q_{i1}^{2} Q_{j1}^{2} \exp\left[-i(E_{i} - E_{j})\right] t + \sum_{i,j} Q_{i1}^{2} Q_{j1}^{2} \exp\left[i(E_{i} - E_{j})\right] t.$$
(12)

Среднее время нахождения пары в дублетном состоянии при условии старта из этого же состояния определяется по формуле

$$\tau = (\hat{g})_{DD, DD} = \sum_{i} Q_{i1}^{4} g(0) + \sum_{i,j} Q_{i1}^{2} Q_{j1}^{2} g \Big[-i(E_{i} - E_{j}) \Big] + (13)$$
$$+ \sum_{i,j} Q_{i1}^{2} Q_{j1}^{2} g \Big[i(E_{i} - E_{j}) \Big].$$

В случае двухпозиционной модели уравнение для τ преобразуется к виду

$$\tau = \tau_{\rm p} \left[\sum_{i} Q_{1i}^4 + 2 \sum_{i>j} \frac{Q_{1i}^2 Q_{1j}^2}{n+1} \left(\frac{1+n}{1 + \left[(E_i - E_j) \tau_{\rm c} \right]^2} \right) \right].$$
(14)

Уравнения вероятности рекомбинации из дублетного состояния при условии образования пары радикалов в дублетном и квартетном состояниях соответственно имеют вид

$$w^{D} = \frac{1}{2} \frac{U_{0}\tau}{1 + U_{0}\tau},$$
(15)

$$w^{Q} = \frac{1}{4} \frac{U_{0}(\tau_{p} - \tau)}{1 + U_{0}\tau}.$$
(16)

Расчеты вероятностей рекомбинации для таких систем на примере реакций, катализируемых пероксидазой хрена, в активном центре которой находится атом железа, проведены ниже.

IV. Магнитные эффекты в ферментативных реакциях, катализируемых пероксидазой хрена

1. Современные представления о механизмах окисления субстратов, катализируемых пероксидазой хрена

В литературе описаны две модели механизма каталитического цикла пероксидазы хрена: «упрощенная»²⁷ и «химически реалистичная».²⁴ Первая модель (схема 3) предложена в качестве возможного механизма окисления природного субстрата пероксидазы (NADH) в присутствии инициатора (пероксида водорода) и включает последовательное превращение нативной ПХ (Per³⁺, Fe^{III}) в ее активные парамагнитные интермедиаты — компаунд I, в активном центре которого находится π -катион-радикал оксо-формы гема (Fe^{IV}=O⁺⁻), и компаунд II (Fe^{IV}=O).



Вторая модель (схема 4) использована для описания окисления NADH в отсутствие H_2O_2 . Она опирается на предположение о том, что медленное окисление NADH кислородом, находящемся в буферном растворе, в кислой среде приводит к образованию H_2O_2 в количестве, достаточном для инициирования каталитического цикла,⁴⁶ который включает взаимопревращения нативной ПХ (Per³⁺, Fe^{III}), компаунда I (Fe^{IV}=O⁺), компаунда II (Fe^{IV}=O), компаунда III (Fe^{IV}=O) и ферропероксидазы (Per²⁺, Fe^{II}). Однако эффективность предполагаемой стадии генерирования H_2O_2

Схема 4



вызывает сомнение. Гораздо более вероятной авторам настоящей публикации представляется возможность одноэлектронного переноса между нативной ПХ и субстратом NADH: это общепринятая начальная стадия окисления для реакций, катализируемых другими гемсодержащими ферментами.^{47,48} В самом деле, согласно литературным данным,^{49,50} при окислении субстратов, катализируемом ПХ, связывание субстрата в активном центре фермента происходит близко к плоскости гема, что обеспечивает возможность переноса электрона непосредственно с субстрата на гем. При этом скорость одноэлектронного переноса с субстрата на гем в фермент-субстратном комплексе должна намного превышать скорость реакции окисления субстрата растворенным кислородом (для NADH $k = 3.0 \cdot 10^{-6} \text{ c}^{-1}$).²⁴ Следует отметить, что высокая вероятность одноэлектронного переноса также обеспечивается за счет донорных свойств NADH ($E^0 = -320 \text{ MB}$) и акцепторных свойств ПХ $(E^0 = -306 \text{ мB})^{.51}$ Однако, несмотря на эти аргументы, в литературе 24,47 продолжает доминировать точка зрения, в соответствии с которой именно с образования H2O2 начинается окисление субстрата, катализируемое пероксидазой. Тем не менее с учетом сказанного выше можно предположить, 34, 35 что одноэлектронный перенос может происходить в фермент-субстратном комплексе [Per³⁺…NADH]. Следует отметить, что возможность переноса электрона между ПХ и NADH с образованием ферропероксидазы (Per²⁺) обсуждалась ранее в работе 52 для процесса окисления фотовозбужденного NADH, катализируемого ПХ.

Таким образом, возможность переноса электрона между нативной ПХ и NADH нуждается в экспериментальной проверке. Особый интерес представляют экспериментальные доказательства участия катион-радикала NADH⁺ в процессах ферментативного окисления. До сих пор продолжается дискуссия о том, реализуется ли в биологических системах многостадийный механизм, включающий перенос электрона,

NADH \longrightarrow NADH⁺· \longrightarrow NAD' \longrightarrow NAD⁺,

или окисление осуществляется через стадию гидридного переноса.⁵³ Необходимо подчеркнуть, что радикальные стадии предполагались практически во всех процессах с участием ПХ: утилизации пероксида водорода, инициировании полимеризации при построении клеточных мембран растений и пр.⁴⁷ Между тем к настоящему времени экспериментально зарегистрированы лишь активные парамагнитные интермедиаты нативной ПХ — компаунды I–III.⁴⁶ Поскольку участие парамагнитных интермедиатов (Per³⁺, Per²⁺, компаундов I–III) в каталитическом цикле ПХ можно считать установленным (см. схемы 3, 4), естественно было ожидать, что применение методик спиновой химии позволит получить достоверную информацию о предполагаемых активных парамагнитных частицах субстратов, возникающих в этих процессах.

Ниже кратко изложены методические подходы к проведению экспериментов и анализу магнитных эффектов, позволяющих надежно установить проявление радикальных стадий в процессах окисления органических субстратов, катализируемых ПХ.

2. Методология исследования магнитных эффектов в процессах окисления субстратов, катализируемых пероксидазой хрена

К настоящему времени с помощью одного из методов спиновой химии, основанного на магнитном эффекте, проведено детальное исследование катализируемых ПХ реакций окисления ряда органических субстратов — 2-метил-1-(триметилсилилокси)проп-1-ена (Me₂C=CH(OSiMe₃)) в присутствии H₂O₂,³³ NADH³⁴ и его синтетического аналога, 2,3-диметил-3,5-ди(метоксикарбонил)-4-нитрофенил-1,4-дигидропиридина (нифедипина, HФ),³⁵ — без инициирования H₂O₂.

метил-3,5-ди(метоксикарбонил)-4-нитрофенил-1,4-дигидропиридина (нифедипина, HФ),³⁵ — без инициирования H₂O₂. Во всех трех случаях с помощью быстросканирующего спектрофотометра методом остановленной струи измерялись эффективные константы скоростей превращений отдельных интермедиатов каталитического цикла ПХ (Per³⁺, Per²⁺, компаундов I-III). В работе ⁴⁶ показано, что перечисленные интермедиаты имеют различные спектры поглощения (рис. 2), это позволяет отслеживать кинетику их взаимных превращений. Например, при исследовании окисления $Me_2C = CH(OSiMe_3)$ изменения оптического поглощения (A) активных интермедиатов ПХ регистрировали на длине волны 418 нм (максимум поглощения компаундов II и III, см. рис. 2) в течение секунды с временным разрешением 1 мс.³³ При окислении NADH временное разрешение составляло 16 мс,³⁴ а в случае $H\Phi - 32$ мс,³⁵ поскольку реакции с этими субстратами были гораздо более продолжительными (до 500 с). Для изучения влияния внешнего магнитного поля кювету смешения, в которой протекала реакция между субстратом и ПХ, помещали между полюсами электромагнита и варьировали напряженность магнитного поля от 0 до 4500 Гс. Регистрируемые кинетические зависимости в каждом случае сопоставляли с зависимостями, полученными в нулевом магнитном поле (с этой целью остаточную намагниченность электромагнита компенсировали до величины 0.3-0.5 Гс). Для определения эффективных констант скорости взаимопревращения интермедиатов ПХ использовали алгоритм нелинейной регрессии Левенберга-Марквардта. В качестве функции обработки использовали аналитическое решение системы дифференциальных уравнений, описывающих последовательное превращение интермедиатов каталитического цикла ПХ с учетом их молярных коэффициентов экстинкции на длине волны регистрации экспериментальных кинетических зависимостей (418 нм).^{24,47} Магнитные эффекты регистрировали в форме зависимости отношения эффективной константы скорости в определенном магнитном поле к соответствующей константе в геомагнитном поле от напряженности внешнего магнитного поля.



Рис. 2. Спектры поглощения пероксидазы хрена и ее активных интермедиатов.⁴⁷

I— компаунд I, 2 — ${\rm Per}^{2+},$ 3 — компаунд III, 4 — компаунд II, 5 — ${\rm Per}^{3+}.$

3. Анализ магнитных эффектов в процессе окисления 2-метил-1-(триметилсилилокси)проп-1-ена пероксидазой хрена

Первой реакцией окисления субстрата гемсодержащим ферментом, в которой зарегистрировали влияние магнитного поля на превращения парамагнитных интермедиатов, было окисление Me₂C=CH(OSiMe₃) пероксидазой хрена, инициируемое пероксидом водорода.³³

Кинетические зависимости (рис. 3) с учетом поглощения активных интермедиатов пероксидазы на длине волны 418 нм (см. рис. 2) объясняются последовательностью превращений парамагнитных частиц, в соответствии с которой начальный спад оптического поглощения (см. рис. 3, участок *1*) объясняется образованием компаунда I (коэффициент экстинкции $\varepsilon_{418} = 35 \, n \cdot \text{ммоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) в результате реакции нативной ПХ с молекулой H₂O₂. Последующая реакция компаунда I с первой молекулой субстрата приводит к образованию компаунда II ($\varepsilon_{418} = 115 \, n \cdot \text{ммоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) и, соответственно, к росту оптического поглощения (см. рис. 3, участок *2*). Затем компаунд II реагирует со второй молекулой субстрата с регенерацией нативной ПХ.

Реакция ПХ с пероксидом водорода слишком быстрая для качественной обработки при описанных экспериментальных условиях и временном разрешении, в связи с чем начальный участок спада кинетической кривой не учитывался при разработке модели теоретического описания кинетики процесса. Поэтому в рамках приведенной выше последовательности превращений (схема 5), изменение оптического поглощения определяется кинетической моделью двух последовательных мономолекулярных реакций

Компаунд I
$$\xrightarrow{k_1}$$
 компаунд II $\xrightarrow{k_2}$ компаунд III. (17)

Поскольку коэффициент экстинкции ПХ на длине волны наблюдения (418 нм) значительно меньше коэффициента экстинкции компаунда II (см. рис. 2), суммарная функция для описания экспериментально наблюдаемой кинетики изменения оптического поглощения (A_{418}) задается следующим выражением:

$$A_{418} = [$$
компаунд II + Per³⁺ $] \approx$ (18)





Рис. 3. Кинетическая кривая превращений активных парамагнитных интермедиатов пероксидазы, наблюдаемая на длине волны 418 нм.

Условия реакции (все концентрации даны после смешения): 100 мМ фосфатный буфер, pH 7.4, $[Per^{3+}] = 4$ мкмоль $\cdot n^{-1}$, $[H_2O_2] = 0.1$ ммоль $\cdot n^{-1}$, [2-метил-1-(триметилсилилокси)проп-1ен] = 16 ммоль $\cdot n^{-1}$; 25°С.



Чтобы найти эффективные константы k_1 и k_2 , аналитическое решение (18) используют для построения соответствующей кинетической зависимости с учетом последовательности превращений активных парамагнитных интермедиатов каталитического цикла пероксидазы (см. схему 5) с помощью алгоритма нелинейной регрессии Левенберга-Марквардта. Полное соответствие между экспериментальной кинетической зависимостью и рассчитанной функцией (18) отражено на рис. 4. Магнитные эффекты рассчитывали как отношение констант k_1 и k_2 , измеренных во внешнем магнитном поле, к соответствующим константам, измеренным в нулевом магнитном поле. Полевые зависимости магнитных эффектов для k₁ и k₂ приведены на рис. 5. Выше (см. раздел III) было показано, что ход полевой зависимости магнитного эффекта и положение экстремумов определяются магнитно-резонансными параметрами пары парамагнитных частиц.¹ При сравнении экспериментальной полевой зависимости (см. рис. 5) и рассчитанной для данного случая в рамках известного полуклассического приближения 54 можно определить магниточувствительную стадию процесса – вторую стадию каталитического цикла, на которой происходит взаимодействие компаунда II с субстратом. В акте одноэлектронного переноса на данной стадии образуются радикальная форма ком-



Рис. 4. Результаты теоретической обработки экспериментальной кинетической зависимости по алгоритму нелинейной регрессии Левенберга – Марквардта с использованием аналитического решения (18).

Точки — экспериментальная зависимость, сплошная линия — расчет.



Рис. 5. Влияние магнитного поля на константы $k_1(a)$ и $k_2(b)$ реакции окисления 2-метил-1-(триметилсилилокси)проп-1-ена, катализируемой пероксидазой хрена. Приведены стандартные отклонения (усреднение по трем экспериментальным сериям, каждая содержит по 5–6 измерений).

Условия реакции (все концентрации после смешения): 100 мМ фосфатный буфер, pH 7.4, $[Per^{3+}] = 4$ мкмоль $\cdot n^{-1}$, $[H_2O_2] = 0.1$ ммоль $\cdot n^{-1}$, [2-метил-1-(триметилсилилокси)проп-1ен] = 16 ммоль $\cdot n^{-1}$; 25°С.

паунда II и анион-радикал енольной формы 2-метил-1-(триметилсилилокси)проп-1-ена (Me₂C=CHO^{-•}). Магнитный эффект в этом случае возникает за счет различия между вероятностями обратного переноса электрона в образовавшейся радикальной паре в слабом и сильном магнитных полях. При этом в коллективном триплетном состоянии РП в акте обратимого переноса электрона происходит регенерация компаунда II, в то время как синглетное состояние в конечном счете приводит к исходной ПХ (Per³⁺) (схема 6).



Таким образом, наличие магнитного эффекта подтверждает предположение об участии парамагнитных интермедиатов в каталитическом цикле ПХ. Кроме того, проявление магнитного эффекта указывает на возможность существования новой неисследованной короткоживущей радикальной формы компаунда II.^{24, 27, 47}

4. Магнитные эффекты в процессах окисления NADH и его синтетических аналогов пероксидазой хрена

а. Ферментативное окисление NADH, катализируемое пероксидазой хрена

Другим примером проявления магнитного эффекта в реакциях, катализируемых ПХ, является окисление ее природного субстрата — NADH. Выше при обсуждении материала, посвященного современным представлениям о механизмах окисления органических субстратов, катализируемых ПХ, упоминалось о том, что стадия инициирования каталитического цикла в отсутствие пероксида водорода нуждается в дополнительных исследованиях. Вероятным начальным актом цикла может быть перенос электрона с молекулы донора (NADH) на акцептор, в качестве которого может выступать гем активного центра ПХ. Выбор методов спиновой химии для доказательства такого предположения представляется адекватным.

Реакцию окисления NADH, катализируемую ПХ, в отсутствие H₂O₂ исследовали с помощью упомянутой выше методики остановленной струи со спектрофотометрической регистрацией. Детектирование активных интермедиатов ПХ, компаундов I, II и III, также проводили на длине волны максимального поглощения компаундов II и III (418 нм). На основании известных последовательностей взаимопревращений интермедиатов ПХ (см.⁴⁶) и их молярных коэффициентов экстинкции²⁴ (см. рис. 2) предложено следующее описание характерной кинетической кривой для данного процесса (рис. 6):³⁴ уменьшение поглощения на первой стадии (см. рис. 6, участок 1) связывается с превращением нативной ПХ ($\varepsilon_{418} = 62 \, \pi \cdot \text{ммоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) в ферропероксидазу (Per²⁺) ($\epsilon_{418} = 62 \, \pi \cdot \text{ммоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) в акте переноса электрона с субстрата NADH на исходную ПХ, что приводит к образованию ее восстановленной формы (Per²⁺). Далее следует реакция ферропероксидазы с кислородом, растворенным в буферном растворе (схема 7), в результате которой Рег²⁺ быстро ($k = 5.8 \cdot 10^4$ л · моль⁻¹ · с⁻¹) превращается в компаунд III ($\epsilon_{418} = 115 \text{ л} \cdot \text{ммоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$),²⁴ что приводит к росту величины оптического поглощения (см. рис. 6, участок 2). В результате быстрого депротонирования катионрадикала NADH⁺ ($k = 3.6 \cdot 10^6 \text{ c}^{-1}$) (см.⁵⁵) появляется радикал NAD', при взаимодействии которого с компаундом III



Рис. 6. Кинетическая кривая превращений активных парамагнитных интермедиатов пероксидазы хрена, наблюдаемая на длине волны 418 нм в реакции окисления NADH, катализируемой пероксидазой.

Условия реакции (все концентрации после смешения): 100 мМ MES-буфер, pH 5.6; $[Per^{3+}] = 1$ мкмоль · π^{-1} , [NADH] = 100 мкмоль · π^{-1} ; 25°С.



образуется компаунд I ($\varepsilon = 35 \text{ л} \cdot \text{ммоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) (см. схему 7). Этому процессу соответствует область «прогиба» на кинетической кривой (см. рис. 6, участок 3). Далее в ходе одноэлектронного восстановления компаунда I образуется компаунд II ($\varepsilon_{418} = 115 \text{ л} \cdot \text{ммоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), что приводит к росту оптического поглощения на длине волны 418 нм (рис. 6, участок 4).

Начальный участок кинетической кривой из-за очень быстрого протекания стадии образования ферропероксидазы не удалось обработать, и, соответственно, он не мог быть учтен при создании теоретической модели описания кинетики. Поэтому, в соответствии с предлагаемой последовательностью превращений (см. схему 7), рост оптического поглощения (см. рис. 6, участки 2–4) описывали кинетической моделью трех мономолекулярных реакций

$$\operatorname{Per}^{2+} \xrightarrow{k_1}$$
 компаунд III $\xrightarrow{k_2}$ компаунд I $\xrightarrow{k_3}$ компаунд II. (19)

Коэффициенты экстинкции компаундов II и III равны между собой, примерно в три раза больше молярной экстинкции компаунда I и в два раза превышают эту величину для Per²⁺, поэтому суммарную функцию для описания экспериментального изменения оптического поглощения во времени можно представить следующим выражением:

2

$$A_{418} = [компаунд III] + [компаунд II] + (20) + \frac{[компаунд I]}{3} + \frac{[Per^{2+}]}{2} = = [Per^{2+}]_0 - \frac{2[компаунд I]}{3} - \frac{[Per^{2+}]}{2}.$$

Кривая, рассчитанная на основании экспериментальных данных в рамках алгоритма нелинейной регрессии Левенберга – Марквардта для суммарного аналитического решения (20) системы уравнений, описывающих последовательность реакций в каталитическом цикле ПХ (19), практически совпала с экспериментальной кинетической зависимостью, представленной на рис. 7. Необходимо отметить, что с уче-



Рис. 7. Теоретическая обработка экспериментальной кинетической зависимости для реакции пероксидазы и NADH по алгоритму нелинейной регресии Левенберга – Марквардта с использованием аналитического решения (20).

том стадии образования ферропероксидазы при моделировании кинетики получено наибольшее приближение экспериментальной и расчетной кривых. В результате удалось найти константы скоростей k_1 , k_2 , k_3 в последовательности процессов (19).

Еще одно доказательство наличия стадии одноэлектронного переноса между ПХ и NADH в процессе ферментативного окисления получено на основании анализа полевых зависимостей магнитного эффекта, зарегистрированного в этом процессе. Полевая зависимость магнитного эффекта, рассчитанного как отношение эффективных констант в магнитном поле к константам в нулевом поле, была обнаружена только для константы k_1 (рис. 8). Наиболее вероятно, что магниточувствительной стадией является стадия переноса электрона между нативной ПХ и NADH. Последующее превращение ферропероксидазы в реакции с кислородом протекает в кинетическом лиапазоне $(k = 6 \cdot 10^4 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}),^{24,47}$ поэтому скорость образования компаунда III будет намного меньше скорости спиновой конверсии в паре (Per²⁺ O₂), следовательно, этот процесс, скорее всего, не будет спиновозависимым. Взаимодействие



Рис. 8. Влияние магнитного поля на константу k_1 реакции окисления NADH, катализируемой пероксидазой хрена.

Разброс представляет собой сумму аппаратной погрешности прибора (3.5%) и стандартной ошибки усреднения по трем экспериментальным сериям, каждая включала по 5–6 измерений. Условия реакции (все концентрации после смешения): 100 мМ MES-буфер, pH 5.6; [Per³⁺] = 1 мкмоль · π^{-1} , [NADH] = 100 мкмоль · π^{-1} ; 25°C. компаунда III с радикалом NAD' тоже не может быть источником заметного магнитного эффекта, если в результате его встречи с радикалом NAD' в объеме образуется так называемая F-пара, для которой, как известно, не характерны значительные магнитные эффекты.⁵⁶ Однако можно ли в случае ферментативных реакций вообще говорить об объемных процессах? Ответа на этот вопрос пока нет. Что касается последующих стадий каталитического цикла, то при взаимодействии компаунда I и NADH не происходит формирования РП, а стадия образования пероксидазы в результате реакции между компаундом II и молекулой NADH вообще не учитывалась в аналитической функции, поскольку в исследованном временном диапазоне данную стадию не наблюдали. Таким образом, нами сформулирована гипотеза о том, что зависимость константы k1 от напряженности внешнего магнитного поля обусловлена его влиянием на скорость образования ферропероксидазы в процессе одноэлектронного переноса между ПХ и NADH.

Для проверки предположения о том, что магнитный эффект формируется на первой стадии каталитического цикла, проведен расчет полевой зависимости магнитного эффекта для парамагнитной пары (Per²⁺ NADH⁺⁺). Чтобы установить мультиплетность РП в рамках теории кристаллического поля, было проанализировано ³⁴ спиновое состояние центрального атома железа в геме ферропероксидазы.⁵⁷

Согласно существующим представлениям, неорганический комплекс (ферропероксидазу, Per²⁺) можно рассматривать как устойчивую многоатомную систему, в которой влияние лигандов (порфирина (N) и гистидина (N_{His})) на центральный ион Fe(II) является электростатическим. Установлено, что пять d-состояний (d_{xy} , d_{xz} , d_{yz} , d_{z^2} и $d_{x^2-y^2}$) с одинаковой энергией в свободном атоме железа в пирамидальном поле лигандов ферропероксидазы (N и N_{His}) расщепляются на четыре группы с различными значениями энергий в каждой, т.е. пятикратно вырожденный ⁵D-терм свободного иона в поле лигандов пирамидального комплекса расщепляется на четыре: b₁ ($d_{x^2-y^2}$), b₂ (d_{xy}), двукратно вырожденный е (d_{xz} , d_{yz}) и a (d_{z^2}).

Электронные состояния РП отражены на схеме 8. В акте одноэлектронного переноса от NADH к нативной ПХ образуется РП (Per^{2+} NADH⁺⁺) в квартетном и дублетном состояниях. За счет интеркомбинационной конверсии нереакционноспособное квартетное спиновое состояние переводится в реакционноспособное дублетное. Последнее в результате рекомбинации (обратного переноса электрона) обеспечивает регенерацию исходной ПХ и NADH.



Расчет вероятности рекомбинации исследуемой РП проводили в рамках формализма матрицы плотности для двухпозиционной модели. Основы этого подхода рассмотрены выше (см. главу III). Предполагалось,³⁴ что наблюдаемая квартет-дублетная эволюция спинов РП определяется взаимодействием электронных спинов с постоянным внешним магнитным полем, изотропным сверхтонким взаимодействием неспаренных электронов с магнитными ядрами и обменным взаимодействием между неспаренными электронами, вследствие которого термы радикальной пары расщепляются на дублетный и квартетный.

Гамильтониан для такой системы взаимодействий записывается следующим образом:

$$\hat{H} = \omega_1 \hat{S}_1 + \omega_2 \hat{S}_2 + a \hat{S}_2 \hat{I} + J \hat{S}_1 \hat{S}_2, \qquad (21)$$

где $\omega_1 = g_1 \beta \hbar^{-1} H_0$ и $\omega_2 = g_2 \beta \hbar^{-1} H_0$ – частоты прецессии спинов радикалов пары частиц с электронными спинами 1 и 1/2, значения g-факторов для которых равны соответственно: $g_1 = 3.25$ (для ферропероксидазы)⁵⁸ и $g_2 = 2.003$ (для катионрадикала субстрата);⁵⁵ $a = 32.9 \ \Gamma c \ (см.^{55})$ — константа изотропного сверхтонкого взаимодействия неспаренного электрона катион-радикала NADH⁺ со своим магнитным ядром, спин которого равен 1/2; Ј — обменный интеграл между дублетным и квартетным термами радикальной пары. Необходимо отметить, что в общем случае величина обменного взаимодействия зависит от расстояния между радикалами (r), а также от углов ориентации (θ и ϕ), т.е. $J = f(r, \theta, \phi)$. В работе ³⁴ для простоты ограничились анализом только двух возможных конформационных состояний комплекса [Per²⁺…NADH^{+•}], в котором происходит квартет-дублетная (Q-D) эволюция с соответствующими обменными интегралами J₁ и J₂, значения которых варьировали в пределах от $200 \cdot 10^7$ до $300 \cdot 10^7$ рад с⁻¹. Набольшее приближение расчетной и экспериментальной зависимостей от приложенного магнитного поля достигалось в случае $J_1 = 200 \cdot 10^7$ и $J_2 = 265 \cdot 10^7$ рад $\cdot c^{-1}$.

Спин-гамильтониан (21) коммутирует с проекцией суммарного спина электронов и ядра на направление внешнего магнитного поля H_0 , причем суммарная проекция будет равна

$$\hat{\Sigma}_{Z} = \hat{S}_{1Z} + \hat{S}_{2Z} + \hat{I}_{Z} \,. \tag{22}$$

Принимая во внимание тот факт, что квантовые переходы возможны только между состояниями с одинаковой суммарной проекцией, все спиновые состояния радикальной пары можно разделить на следующие подансамбли: $\Sigma_Z = \pm 2$, $\Sigma_Z = \pm 1$ и $\Sigma_Z = 0$, причем в рекомбинацию РП вклад вносят только подансамбли с суммарными проекциями, равными +1, -1 и 0. Для перечисленных подансамблей поведение стационарных уровней энергии, полученных в результате решения уравнения Шредингера с гамильтонианом (21), иллюстрирует рис. 9. Расчет вероятности рекомбинации проводили для каждого из трех указанных подансамблей. Конечную вероятность рекомбинации для РП (Per²⁺ NADH⁺) рассчитывали как сумму вероятностей для каждого подансамбля с учетом статистических весов. Рассчитанная таким способом вероятность рекомбинации W(Q) для радикальной пары (Per^{2+} NADH⁺) в начальном квартетном состоянии приведена на рис. 10.

Предложена следующая интерпретация полевой зависимости вероятности рекомбинации, впервые рассчитанной для многоспиновой системы.³⁴ В соответствии с классической теорией РП, в исследуемой радикальной паре при условии ее образования в нереакционноспособном квартетном состоянии вероятность рекомбинации в нулевом магнитном поле будет минимальной, что и проявляется в расчете. Дальнейший рост вероятности рекомбинации W(Q) в слабых магнитных полях отражает процесс снятия вырождения зеемановских уровней энергии при переходе от нулевого к ненулевому магнитному полю. Для интерпретации остальной части полевой зависимости рассматривается поведение



Рис. 9. Переходы Q - D в парамагнитной паре (Per²⁺ NADH^{+•})Q. Расщепление стационарных уровней энергии во внешнем магнитном поле с общей проекцией, равной 0 (*a*) и -1 (*b*).



Рис. 10. Рассчитанная вероятность рекомбинации W(Q) для парамагнитной пары (Per²⁺ NADH^{+•})Q.

стационарных уровней энергии подансамблей с проекциями +1, 0 и -1 (см. рис. 9) в различных магнитных полях. Сближение уровней в диапазоне внешних магнитных полей 200-250 Гс указывает на то, что в этом диапазоне следует ожидать особенностей поведения вероятности рекомбинации. Действительно, как видно из расчетной кривой (см. рис. 10), при 250 Гс наблюдается экстремум, положение которого однозначно указывает на проявление электронного обменного взаимодействия (J). Роль J наглядно проиллюстрирована на схеме 9, где изображено положение термов РП в магнитном поле. Эффективное квартет-дублетное смешивание возможно именно во внешнем магнитном поле

$$H_0 = \frac{(3/2)J}{(g_1 + g_2)\beta}.$$



Затем, после прохождения локального максимума полевой зависимости, в результате зеемановского взаимодействия происходит дальнейшее увеличение расщепления уровней (см. схему 9, 2, 3). В результате переходы из квартетного состояния в дублетное замедляются, и вероятность рекомбинации уменьшается (см. рис. 10). Поскольку частота переходов между состояниями определяется разностью ларморовских частот прецессии спинов радикалов пары

$$\omega_{QD} = \omega_1 - \omega_2 = (g_1 - g_2)\beta\hbar^{-1}H_0$$

с увеличением магнитного поля эффективность переходов между нереакционноспособным квартетным состоянием и реакционноспособным дублетным будет вновь увеличиваться. Поэтому в сильных магнитных полях (400–1000 Гс) вероятность рекомбинации начинает возрастать.

Рассчитанная вероятность рекомбинации отражает влияние магнитного поля на переход Q-D в радикальной паре (Per²⁺ NADH⁺⁺), в результате которого происходит регенерация исходной ПХ. Поэтому экспериментально регистрируемое образование компаунда III в бимолекулярной реакции ферропероксидазы с молекулой кислорода, соответствующее константе k_1 , описывается зависимостью (1-W(Q)) от величины приложенного магнитного поля (рис. 11). Сравнение расчетной (см. рис. 11) и экспериментальной (см. рис. 8) полевых зависимостей магнитного эффекта показало, что качественно они соответствуют друг другу.

Таким образом, проявление магнитного эффекта, полевая зависимость которого описывается в рамках теории



Рис. 11. Расчетная зависимость (1 - W(Q)) для парамагнитной пары (Per²⁺ NADH⁺⁺)^Q от внешнего магнитного поля, моделирующая экспериментальную зависимость константы k_1 в реакции окисления NADH, катализируемой пероксидазой хрена, от внешнего магнитного поля.

радикальных пар, указывает на участие в процессе окисления NADH, катализируемом ПХ, пары парамагнитных частиц. При этом экспериментальная зависимость согласуется с расчетной в предположении о формировании магнитного эффекта в паре (Per²⁺ NADH⁺⁺). Подчеркнем, что вывод о наличии стадии одноэлектронного переноса в каталитическом цикле ПХ следует также и из анализа экспериментальных кинетических кривых (см., например, рис. 6).

6. Магнитный эффект в процессе ферментативного окисления синтетического аналога NADH – нифедипина

Дополнительным подтверждением наличия стадии одноэлектронного переноса в каталитическом цикле ПХ стали исследования ферментативного окисления синтетического аналога NADH — нифедипина (2,3-диметил-3,5-ди(метоксикарбонил)-4-нитрофенил-1,4-дигидропиридина), — которые также проводили с использованием метода остановленной струи.³⁵

Характерная кинетическая зависимость образования и гибели активных интермедиатов пероксидазы в реакции окисления НФ, зарегистрированная на длине волны максимального поглощения компаундов II и III (418 нм), приведена на рис. 12. При анализе кинетической зависимости применяли подход, аналогичный описанному выше для ферментативного окисления NADH. Как оказалось, кинетика окисления НФ может быть объяснена последовательностью элементарных стадий,³⁵ идентичной предложенной ³⁴ для описания ферментативного окисления NADH (схема 10).

Начальное уменьшение поглощения (см. рис. 12, участок 1) связывают³⁵ с образованием ферропероксидазы $(\varepsilon_{418} = 62 \text{ л} \cdot \text{ммоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1})$ в акте переноса электрона с НФ на атом железа гема фермента, который также приводит к образованию и катион-радикала НФ+•. Дальнейшее увеличение поглощения (см. рис. 12, участок 2) происходит в ходе реакции ферропероксидазы и растворенного кислорода с образованием компаунда III ($\epsilon_{418} = 115 \text{ л} \cdot \text{ммоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). На следующей стадии в реакцию вступает уже нейтральный радикал нифедипина (НФ), который образуется в результате депротонирования катион-радикала НФ+•. При исследовании превращений Н Φ^{+} в модельном процессе методом ХПЯ показано, 35 что процесс депротонирования длится несколько наносекунд. Получающийся радикал реагирует с компаундом III, что приводит к резкому уменьшению поглощения (см. рис. 12, участок 3) вследствие образования компаунда I



Рис. 12. Кинетическая кривая превращений активных интермедиатов пероксидазы, наблюдаемая при окислении нифедипина. Условия реакции (все концентрации после смешения): 100 мМ

фосфатный буфер, pH 7.0; $[Per^{3+}] = 1$ мкмоль·л⁻¹; $[H\Phi] = 15$ мкмоль·л⁻¹; 15% EtOH (от общего объема); 25°С.



($\epsilon_{418} = 35 \ n \cdot \text{ммоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). При одноэлектронном восстановлении компаунда I второй молекулой НФ появляется компаунд II ($\epsilon_{418} = 115 \ n \cdot \text{ммоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) и, как результат, поглощение возрастает (см. рис. 12, участок 4). Быстрой регенерации нативной ПХ в ходе реакции НФ и компаунда II не происходит, по-видимому, из-за инактивации фермента в его реакциях с радикалами.³⁵

Вместе с тем при сопоставлении кинетических кривых для катализируемых ПХ реакций окисления NADH и HФ (сравните рис. 6 и 12) очевидны существенные различия исследуемых процессов. Так, следует отметить, что каждая стадия реакции окисления НФ протекает гораздо медленнее, чем соответствующая стадия реакции ПХ с NADH. Это можно объяснить рядом факторов, в частности более низкой концентрацией НФ по сравнению с NADH (15 и 100 мкмоль · n^{-1} соответственно), а также использованием фосфатного буфера с рН 7.0 вместо буфера MES с рН 5.6, в котором, как известно,²⁴ ПХ проявляет более высокую активность. Влияет на активность фермента и добавка EtOH (15%), необходимого для солюбилизации НФ, поскольку спирт оказывает ингибирующее действие на ПХ.

При обработке кинетических кривых, измеренных при различных напряженностях внешнего постоянного магнитного поля, с помощью алгоритма нелинейной регрессии Левенберга-Марквардта были получены эффективные значения констант образования компаундов III и I. В данном случае рассматривалась кинетическая модель двух последовательных мономолекулярных стадий

$$\operatorname{Per}^{2+} \xrightarrow{k_1} \operatorname{Kommayhd} \operatorname{III} \xrightarrow{k_2} \operatorname{Kommayhd} \operatorname{I}, \qquad (23)$$

а обработку проводили только для участка кинетической кривой, описывающего кинетику образования и расходования компаунда III (см. рис. 12,2). При этом оказалось, что, как и в случае окисления NADH, только константа k_1 является магниточувствительной. Экспериментальная полевая зависимость магнитного эффекта (рис. 13) соответствует



Рис. 13. Влияние магнитного поля на константу k_1 реакции окисления нифедипина, катализируемой пероксидазой хрена.

Разброс представляет собой сумму аппаратной погрешности прибора (3.5%) и стандартной ошибки (усреднение по трем экспериментальным сериям, каждая включала по 5–6 измерений). Условия реакции (все концентрации после смешения): 100 мМ фосфатный буфер, pH 7.0; [Per³⁺] = 1 мкмоль · π^{-1} ; [H Φ] = 15 мкмоль · π^{-1} ; 15% EtOH (от общего объема); 25°C.

рассчитанной (см. рис. 11) в предположении, что магнитный эффект сформирован в паре (Per^{2+} H Φ^{++}) (схема 11).



Таким образом, можно заключить, что, как и в случае с NADH, обратный перенос электрона в паре ($Per^{2+} H\Phi^{+}$) происходит в дублетном состоянии РП, тогда как квартетное спиновое состояние является источником компаунда III (см. схемы 8 и 11).

На основании проведенного выше анализа магнитных эффектов, зарегистрированных при ферментативном окислении природного субстрата пероксидазы хрена NADH и его синтетического аналога нифедипина, можно сделать важный вывод. Начальной стадией процесса ферментативного окисления в отсутствие пероксида водорода является перенос электрона между нативной ПХ и субстратом, а не реакция со следовыми количествами пероксида водорода, образовавшегося в результате окисления NADH (HФ) растворенным кислородом, которая ранее рассматривалась в качестве инициирующей.^{24, 47}

5. Исследование влияния магнитного поля на процесс окисления NADH пероксидазой хрена в колебательной реакции

Особый интерес представляет активно изучаемая колебательная реакция окисления NADH, катализируемая ПХ, для которой характерен ряд динамических особенностей, зависящих от условий проведения реакции.⁵⁹ Установлено,²⁴ что пероксидазно-оксидазная система проявляет бистабильность, т.е. в одних и тех же экспериментальных условиях могут существовать два различных динамических состояния. Примерами являются два сосуществующих стабильных состояния⁶⁰ и стабильное состояние, существующее совместно с периодическими колебаниями.⁶¹

Необходимо отметить, что колебания в ферментативной системе описываются как сложные биохимические процессы, нередко включающие до 10-20 связанных элементарных реакций, в которых происходит либо генерация, либо расходование свободных радикалов. Для изучения колебательной реакции окисления NADH и кислород постоянно добавляют к перемешиваемому водному буферному раствору с рН в диапазоне 5.0-6.5, содержащему ПХ, а также инициатор обычно ароматическое соединение — 4-гидроксибензойную кислоту, мелатонин или метиленовый голубой. В таких условиях удается наблюдать колебательные процессы.^{62,63} При этом образуются пероксид водорода и ряд кислородсодержащих свободных радикалов.²⁴ Известно, что в клеточном метаболизме образование реакционноспособных кислородных частиц нежелательно по причине их деструктивных свойств, а слишком высокие концентрации H₂O₂ приводят к инактивации ПХ в реакции пероксида с компаундом I.^{64,65} В литературе описан механизм инактивации фермента свободно-радикальными частицами 66 и обсуждена роль ароматических инициаторов в этом процессе. Предположено, что инактивация происходит в результате взаимодействия реакционноспособных кислородных частиц с боковыми цепями аминокислот и сахарными остатками пероксидазы.67 Показано, что в колебательной системе вслед за снижением инактивации фермента следует повышение концентрации мелатонина, который быстро реагирует с образующимися кислородными радикальными частицами, например с ОН'.

Исследования влияния внешнего магнитного поля на скорость колебательного процесса представляют особый интерес. Важно получить ответ на вопрос: сохраняется ли магниточувствительность ферментативного окисления в колебательном режиме и в чем конкретно заключается роль его инициатора?

Влияние внешнего магнитного поля на расход кислорода при окислении NADH, катализируемом пероксидазой хрена в колебательном режиме, обнаружено в работе Олсена с соавт.7 С помощью кислородного электрода Кларка измеряли концентрации кислорода в растворе при проведении реакции в магнитных полях, напряженность которых меняли в интервале от 0 до 4000 Гс. Зависимости, отражающие влияние магнитного поля на частоту и амплитуду [O₂]-колебаний, приведены на рис. 14. Зависимости имеют характерные экстремумы в полях ~1500 Гс. Показано,⁷ что магнитный эффект не зависит от pH, концентраций NADH и метиленового голубого, однако чувствителен к изменению концентраций ПХ и инициатора — 4-гидроксибензойной кислоты (рис. 15). Было высказано предположение, что магниточувствительные стадии оксидазной колебательной реакции могут включать радикальные пары с участием компаундов I и II.

Компаунд I + NADH \longrightarrow компаунд II + NAD', (24)

Компаунд II + NADH
$$\longrightarrow$$
 Per³⁺ + NAD[•] + H₂O. (25)



Рис. 14. Влияние магнитного поля на амплитуду (*a*) и частоту (*b*) колебаний концентрации О₂.



Рис. 15. Влияние концентраций пероксидазы (a), метиленового голубого (b) и 4-гидроксибензойной кислоты (c) на амплитуду колебаний концентрации O₂.

Зависимость наблюдаемых магнитных эффектов от концентрации фенольных соединений объясняется ⁷ участием последних в цепи переноса электрона между компаундами I и II в ходе реакций

Компаунд I + PhOH	компаунд II + PhO.	(26)
Rowing ing i i non -	Romma jug ing into ,	(20)

Компаунд II + PhOH \longrightarrow Per³⁺ + PhO' + H₂O, (27)

$$PhO' + NADH \longrightarrow PhOH + NAD'.$$
(28)

Отметим, что отсутствие расчетной полевой зависимости⁷ не позволяет сделать окончательного вывода о магниточувствительной стадии процесса. Можно лишь отметить значительные различия полевых зависимостей, зарегистрированных для катализируемого ПХ окисления органических субстратов (Me₂C=CH(OSiMe₃), NADH и НФ) в стационарном режиме (см. выше) и измеренных в ходе оксидазной реакции окисления NADH в колебательном режиме (сравните рис. 5, 8, 13 и 14). Такие различия вполне объяснимы, если принять во внимание, что в ходе стационарного окисления субстратов, катализируемого ПХ, магнитные эффекты регистрировали на отдельных стадиях каталитического цикла, тогда как в колебательной оксидазной реакции ⁷ изучали влияние поля на скорость всего процесса в целом (брутто-реакция). Наблюдаемая зависимость магнитного эффекта от концентрации фенола 7 дает основание предположить наличие нескольких магниточувствительных стадий в изучаемой реакции, что может быть вероятной причиной упомянутого различия полевых зависимостей.

V. Заключение

Рассмотренные в настоящем обзоре примеры демонстрируют принципиальную применимость методов спиновой химии для исследования парамагнитных частиц, участвующих в процессе ферментативного окисления. Сам факт проявления магнитных эффектов в ферментативных реакциях указывает на связь реакционной способности парамагнитных интермедиатов каталитического цикла ПХ с их спиновыми состояниями. Так, показано, что инициирующей стадией ферментативного окисления в отсутствие пероксида водорода является перенос электрона между нативным ферментом и субстратом. Кроме того, наблюдение эффекта ХПЯ 68 при взаимодействии фотовозбужденного NADH с пероксидазой хрена не только подтверждает вывод о возможности переноса электрона между гемом пероксидазы и NADH, но и доказывает образование катион-радикала NADH + ·, которое постулировалось при анализе магнитного эффекта.³⁴

Согласие экспериментальных полевых зависимостей магнитных эффектов, детектированных в процессах окисления, катализируемых пероксидазой хрена, с рассчитанными с помощью приближений, использованных в теории радикальных пар, позволяет сделать некоторые заключения о тонком механизме процессов, происходящих в каталитическом цикле.

Так, молекулярная динамика партнеров фермент-субстратного комплекса должна удовлетворять основным приближениям теории РП, а именно: скорости переноса электронов в ферментативных процессах должны быть близки к диффузионным (иначе невозможно проявление магнитного эффекта), а времена жизни активных реагирующих интермедиатов не должны превышать нескольких микросекунд. Расчетные полевые зависимости ³⁴ лучше всего совпадали с экспериментом при использовании субмикросекундных времен жизни пары парамагнитных частиц. Поскольку в основе расчетной модели лежит представление о диффузионном движении партнеров, приходится предполагать, что в ферментативном процессе сохраняется определенная подвижность реагентов. Кроме этого, наличие на полевых зависимостях экстремумов в магнитных полях с напряженностью порядка сотен гаусс однозначно указывает на проявление электронного обменного взаимодействия между партнерами в каталитическом цикле ПХ. Последнее, скорее всего, является следствием связывания субстрата в активном центре фермента. Можно надеяться, что анализ положения экстремумов полевых зависимостей магнитных эффектов для ферментативного окисления различных субстратов в сочетании с данными других методов, регистрирующих процессы фермент-субстратного взаимодействия, позволит в будущем выработать критерии, оценивающие связывание.

Важным результатом является и наблюдение магнитного эффекта в колебательном процессе окисления NADH пероксидазой. Чтобы сделать окончательные выводы о том, меняет ли присутствие дополнительных источников свободных радикалов (метиленового голубого, фенола и др.) что-либо в процессах, происходящих в каталитическом цикле пероксидазы при окислении в колебательном режиме, необходимо исследовать влияние магнитного поля на взаимные превращения компаундов ПХ, как это было сделано для стационарного окисления. Различия в характере полевых зависимостей магнитных эффектов, зарегистрированных на отдельных стадиях стационарного окисления и в колебательном процессе (брутто-реакция), позволяют предположить наличие неидентифицированных магниточувствительных стадий колебательного процесса.

В заключение представляется полезным перечислить другие ферментативные процессы, наиболее перспективные с точки зрения применения методов спиновой химии для установления механизмов элементарных реакций. Это прежде всего процессы с участием цитохрома Р450 и цитохром *с*-оксидазы,⁶⁹ у которых парамагнитные интермедиаты установлены и имеют много общего в строении с компаундами пероксидазы.

Цитохром Р450 играет значимую роль в ферментативном катализе металлоферментами:⁴⁷ он участвует в гидроксилировании чужеродных для организма соединений, таких как насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты,⁷⁰ стероидные гормоны,⁷¹ холестерин,⁷² желчные кислоты⁷³ и простагландины.⁷⁴ Несмотря на то что механизм окисления субстратов, катализируемых цитохромом Р450, изучается уже в течение двух десятилетий, его нельзя считать установленным. Известно,47 что каталитический цикл гидроксилирования цитохромом Р450 включает радикальные стадии (схема 12). Например, высказываются предположения, согласно которым механизм окисления субстрата, начиная со стадии его связывания с группой Fe^{IV}=O, может происходить как по радикальному («радикальные часы» норкарена и спиро-2,5-октана), так и по катионному механизму. Это приводит к образованию различных продуктов реакции.75

Кроме того, точно не установлено, в какой именно форме (высоко- или низкоспиновой) находится активный центр фермента в фермент-субстратном комплексе и как меняется это спиновое состояние при восстановлении в результате одноэлектронного переноса.⁴⁸

Методики спиновой химии могут быть полезными при исследовании механизма гидроксилирования цитохромом P450. Действительно, анализируя полевые зависимости эффективных скоростей реакций интерконверсии активных интермедиатов каталитического цикла цитохрома, так же как и зависимости соотношения продуктов окисления субстратов, от напряженности внешнего магнитного поля, можно установить спиновое состояние железа в активном центре фермента и спиновые конфигурации активных интермедиатов цитохрома. С помощью анализа магнитных эффектов можно также проследить за влиянием электронных спинов интермедиатов цитохрома P450 на соотношение радикального и катионного путей окисления.

Еще одна ферментативная система, потенциально доступная для методик спиновой химии, — система цитохром с-цитохром с-оксидаза. Роль стадий с переносом электрона в этой системе широко обсуждается в литературе.⁷⁶ Речь идет о процессе генерации химического потенциала внутри митохондрии в дыхательной цепи, которая вырабатывает большую часть свободной энергии, необходимой для жизненных процессов аэробных организмов, посредством связывания электронного переноса с синтезом аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ).77 Ключевыми в данном процессе считаются стадии переноса электрона с участием белков и высокореакционноспособных парамагнитных интермедиатов цитохрома в митохондриальной цепи. В настоящее время установлено, что система цитохром с-цитохром с-оксидаза содержит четыре кофактора: два атома меди, низкоспиновую гемовую группу и гемовую группу, которая является частью белка, содержащего гемовое железо и медь.⁷⁸ В реакции эта система присоединяет четыре электрона в четырех последовательных одноэлектронных стадиях, восстанавливая кислород до воды, и вместе с этим создает протонный градиент через внутреннюю мембрану митохондрии (см. схему 12). Недавно⁷⁶ спектроскопически были определены активные парамагнитные интермедиаты цитохром с-оксидазы, такие как соединительный пероксид (компаунды P_M и P_R), феррильный интермедиат (компаунд F), основное состояние (компаунд О), однократно восстановленная форма (компаунд Е) и дважды восстановленная форма (компаунд R). Интерконверсия этих частиц включает стадии одноэлектронного переноса между парамагнитными интермедиатами фермента.⁶⁹ На основании структурных исследований цитохрома с 79,80 предложены вероятные пути переноса электрона в ферменте и механизм, включающий интерконверсию интермедиатов цитохрома с, но эти пред-



ложения нуждаются в дополнительных доказательствах. Желательно было бы получить их при исследовании динамики процессов, происходящих в системе цитохром c-цитохром c-оксидаза. Можно ожидать, что методы спиновой химии, такие как магнитный эффект и химическая поляризация ядер, обеспечат принципиальную возможность установления роли состояний электронных спинов в различных парамагнитных интермедиатах и позволят получить информацию о тонком механизме функционирования системы митохондриального дыхания — системы цитохром c-цитохром c-оксидаза.

Литература

- K.M.Salikhov, Yu.N.Molin, R.Z.Sagdeev, A.L.Buchachenko. Spin Polarization and Magnetic Effects in Radical Reactions. Elsevier, Amsterdam, 1984
- 2. U.Steiner, T.Ulrich. Chem. Rev., 89, 51 (1989)
- И.П.Грагеров, Л.А.Киприанова, А.Ф.Левит. Химическая поляризация ядер в исследованиях механизма реакций органических соединений. Наукова думка, Киев, 1985
- 4. М.Б.Тарабан, В.И.Рахлин, Т.В.Лешина. *Рос. хим. журн.*, **43**, 80 (1999)
- 5. Т.В.Лешина, О.С.Волкова, М.Б.Тарабан. Изв. АН. Сер. хим., 1830 (2001)
- 6. C.B.Grissom. Chem. Rev., 95, 3 (1995)
- A.C.Møller, A.Lunding, L.F.Olsen. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2, 3443 (2000)
- P.J.Hore, S.L.Winder, C.H.Roberts, C.M.Dobson. J. Am. Chem. Soc., 119, 5049 (1997)
- 9. T.T.Harkins, C.B.Grissom. Science, 263, 958 (1994)
- O.A.Snytnikova, Yu.P.Tsentalovich, R.Z.Sagdeev. Appl. Magn. Reson., 26, 183 (2004)
- C.E.Cross, B.Halliwell, E.T.Borish. Ann. Intern. Med., 107, 526 (1987)
- 12. S.Matsuzaki, L.I.Szweda. Biochemistry, 46, 1350 (2007)
- G.R.Castro, B.Panilaitis, E.Bora, D.L.Kaplan. Mol. Pharm., 4, 33 (2007)
- C.Brady, S.E.J.Bell, C.Parsons, S.P.Gorman, D.S.Jones, C.P.McCoy. J. Phys. Chem. B, 111, 527 (2007)
- E.Gaggelli, H.Kozlowski, D.Valensin, G.Valensin. Chem. Rev., 106, 1995 (2006)
- A.Zhang, J.L.Neumeyer, R.J.Baldessarini. *Chem. Rev.*, **107**, 274 (2007)
- D.P.Smith, G.D.Ciccotosto, D.L.Tew, M.T.Fodero-Tavolotti, T.Johanssen, C.L.Masters, K.J.Barnham, R.Cappai. *Biochemistry*, 46, 2881 (2007)
- 18. M.Lukin, C.de los Santos. Chem. Rev., 106, 607 (2006)
- 19. C.J.Burrows, J.G.Muller. Chem. Rev., 98, 1109 (1998)
- B.Halliwell, J.M.C.Gutteridge. In *Methods of Enzymology*. Vol. 186. (Eds L.Parker, A.N.Glazer). Academic Press, San Diego, 1990. P. 1
- A.R.Cross. In *The Molecular Basis of Oxidative Damage by Leukocytes*. (Eds A.J.Jesaitis, E.A.Dratz). CRC Press, Boca Raton, 1992. P. 215
- 22. The Respiratory Burst and Its Physiological Significance. (Eds A.J.Sbarra, R.R.Strauss). Plenum Press, New York, 1988
- T.M.Penning, S.T.Ohnishi, T.Ohnishi, R.G.Harvey. Chem. Res. Toxicol., 9, 84 (1996)
- A.Scheeline, D.L.Olson, E.P.Williksen, G.A.Horras, M.L.Klein, R.Larter. Chem. Rev., 97, 739 (1997)
- R.P.Mason, M.B.Kadiiska. In *Biological Magnetic Resonance*. Vol. 23: Biomedical EPR. Part A: Free Radicals, Metals, Medicine and Physiology. (Eds S.S.Eaton, G.R.Eaton, L.J.Berliner). Kluwer Academic; Plenum, New York, 2005. P. 93
- 26. H.Hirata, H.Fujii. Curr. Org. Chem., 10, 521 (2006)
- 27. J.H.Dawson. Science, 240, 433 (1988)
- 28. O.S.Volkova, M.B.Taraban, V.F.Plyusnin, T.V.Leshina,
- M.P.Egorov, O.M.Nefedov. J. Phys. Chem. A, 107, 4001 (2003)
- I.M.Magin, P.A.Purtov, A.I.Kruppa, T.V.Leshina. J. Phys. Chem. A, 109, 7395 (2005)

- A.L.Buchachenko, V.L.Berdinsky. J. Phys. Chem., 100, 18292 (1996)
- 31. A.L.Buchachenko, V.L.Berdinsky. Chem. Rev., 102, 603 (2002)
- 32. Biological Effects of Electromagnetic Fields. (Ed. P.Stavroulakis). Springer-Verlag, Berlin, 2003
- M.B.Taraban, T.V.Leshina, M.A.Anderson, C.B.Grissom. J. Am. Chem. Soc., 119, 5768 (1997)
- M.S.Afanasyeva, M.B.Taraban, P.A.Purtov, T.V.Leshina, C.B.Grissom. J. Am. Chem. Soc., 128, 8651 (2006)
- M.S.Afanasyeva, M.B.Taraban, N.E.Polyakov, P.A.Purtov, T.V.Leshina, C.B.Grissom. J. Phys. Chem. B, 110, 21232 (2006)
- 36. N.E.Polyakov, T.V.Leshina, L.Kispert. *RIKEN Rev.*, **44**, 140 (2002) 37. M.B.Taraban, A.I.Kruppa, N.E.Polyakov, T.V.Leshina, V.Lūsis,
- D.Muceniece, G.Duburs. J. Photochem. Photobiol., A, **73**, 151 (1993)
- A.I.Kruppa, M.B.Taraban, N.E.Polyakov, T.V.Leshina, V.Lūsis, D.Muceniece, G.Duburs. J. Photochem. Photobiol., A, 73, 159 (1993)
- N.E.Polyakov, M.B.Taraban, A.I.Kruppa, N.I.Avdievich, V.V.Mokrushin, P.V.Schastnev, T.V.Leshina, V.Lūsis, D.Muceniece, G.Duburs. J. Photochem. Photobiol., A, 74, 75 (1993)
- 40. N.E.Polyakov, A.I.Kruppa, T.V.Leshina, V.Lūsis, D.Muceniece,
- G.Duburs. J. Photochem. Photobiol., A, 111, 61 (1997)
- В.П.Комов, В.Н.Шведова. *Биохимия*. Дрофа, Москва, 2004
 S.S.Petrova, A.I.Kruppa, T.V.Leshina. *Chem. Phys. Lett.*, 385, 40 (2004)
- 43. P.A.Purtov, A.B.Doktorov. *Chem. Phys.*, **178**, 47 (1993)
- П.А.Пуртов. Дис. д-ра физ.-мат. наук. ИХКиГ СО РАН, Новосибирск, 2000
- 45. S.A.Mikhailov, P.A.Purtov, A.B.Doktorov. Chem. Phys., 166, 35 (1992)
- 46. K.Yokota, I.Yamazaki. Biochemistry, 16, 1913 (1977)
- I.Schlichting, J.Berendzen, K.Chu, A.M.Stock, S.A.Maves, D.E.Benson, R.M.Sweet, D.Ringe, G.A.Petsko, S.G.Sligar. *Science*, 287, 1615 (2000)
- 48. H.A.Harbury. J. Biol. Chem., 225, 1009 (1957)
- S.Colonna, N.Gaggero, C.Richelmi, P.Pasta. Trends Biotechnol., 17, 163 (1999)
- L.Casella, M.Gullotti, R.Ghezzi, S.Poli, T.Beringhelli, S.Colonna, G.Carrea. *Biochemistry*, 31, 9451 (1992)
- G.Battistuzzi, M.Borsari, A.Ranieri, M.Sola. J. Am. Chem. Soc., 124, 26 (2002)
- 52. Ф.И.Атауллаханов, А.М.Жаботинский. Биофизика, **20**, 596 (1975)
- 53. J.Gębicki, A.Marcinek, J.Zielonka. Acc. Chem. Res., 37, 379 (2004)
- 54. K.Schulten, P.G.Wolynes. J. Chem. Phys., 68, 3293 (1978)
- S.Fukuzumi, T.Tanaka. In Photoinduced Electron Transfer Reactions. Part C. Photoinduced Electron Transfer Reactions: Organic Substrates. (Eds M.A.Fox, M.Chanon). Elsevier, Amsterdam, 1988. Ch. 4.10
- 56. А.Л.Бучаченко, Р.З.Сагдеев, К.М.Салихов. Магнитные и спиновые эффекты в химических реакциях. Наука, Новосибирск, 1978
- И.Б.Берсукер. Электронное строение и свойства координационных соединений. Химия, Ленинград, 1986
- E.G.Pavel, N.Kitajima, E.I.Solomon. J. Am. Chem. Soc., 120, 3949 (1998)
- M.J.B.Hauser, L.F.Olsen. Transport and Structure Their Competitive Role in Biophysics and Chemistry. (Eds S.C.Müller, J.Parisi, W.Zimmermann). Springer-Verlag, Berlin, 1999
- 60. H.Degn. Nature (London), 217, 1047 (1968)
- B.D.Aguda, L.-L.H.Frisch, L.F.Olsen. J. Am. Chem. Soc., 112, 6652 (1990)
- S.Nakamura, K.Yokota, I.Yamazaki. Nature (London), 222, 794 (1969)
- 63. L.F.Olsen, H.Degn. Biochim. Biophys. Acta, 523, 321 (1978)
- J.N.Rodriguez-Lopez, J.Hernández-Ruiz, F.Garcia-Cárnovas, R.N.F.Thorneley, M.Acosta, M.B.Arnao. J. Biol. Chem., 272, 5469 (1997)

- J.Hernández-Ruiz, M.B.Arnao, A.N.P.Hiner, F.Garcia-Cárnovas, M.Acosta. *Biochem. J.*, 354, 107 (2001)
- L.F.Olsen, M.J.B.Hauser, U.Kummer. *Eur. J. Biochem.*, 270, 2796 (2003)
- 67. C.L.Hawkins, M.J.Davies. Biochim. Biophys. Acta, 1504, 196 (2001)
- 68. М.С.Афанасьева, П.А.Пуртов, М.Б.Тарабан, Т.В.Лешина,
- Ч.Б.Гриссом. *Изв. АН. Сер. хим.*, 1090 (2006) 69. P.R.Rich, S.E.J.Rigby, P.Heathcote. *Biochim. Biophys. Acta*, **1554**,
- 137 (2002)
- 70. M.L.Das, S.Orrenius, L.Ernster. Eur. J. Biochem., 4, 519 (1968)
- Р.И.Салганик, С.В.Неделькина, С.В.Аргутинская, Л.П.Кусмарцева. Вопросы мед. химии, 20, 135 (1974)
- 72. G.S.Boyd, A.C.Brownie, C.R.Jefcoate, E.R.Simpson. *Biochem. J.*, 125, 1 (1971)

- 73. K.Einarason, G.Johansson. FEBS Lett., 4, 177 (1969)
- U.Israelsson, H.Hamberg, B.Samuelsson. Eur. J. Biochem., 11, 390 (1969)
- M.Newcomb, R.Shen, Y.Lu, M.J.Coon, P.F.Hollenberg, D.A.Koop, S.J.Lippard. J. Am. Chem. Soc., **124**, 6879 (2002)
- 76. B.G.Malmstrom. Chem. Rev., 90, 1247 (1990)
- 77. H.S.Carr, D.R.Winge. Acc. Chem. Res., 36, 309 (2003)
- 78. M.Hartmut. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 12819 (1998)
- T.Tsukihara, H.Aoyama, E.Yamashita, T.Tomazaki, H.Yamaguchi, K.Shinzawa-Itoh, R.Nakashima, R.Yaono, S.Yoshikawa. *Science*, **272**, 1136 (1996)
- S.Iwata, C.Ostermeier, B.Ludwig, H.Michel. Nature (London), 376, 660 (1995)

SPIN CHEMISTRY OF THE ENZYMATIC PROCESSES

M.S.Afanasyeva, P.A.Purtov, M.B.Taraban, T.V.Leshina

Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences 3, Ul. Institutskaya, 630090 Novosibirsk, Russian Federation, Fax +7(383)330-7350

The results of spin chemistry studies of the single electron transfer step and the role of spin states of paramagnetic intermediates in the enzymatic oxidation of organic substrates induced by horse radish peroxidase are generalised. Detailed theoretical description of the approach used to analyse the magnetic effects in enzymatic multispin systems is presented. The prospects of subsequent use of spin chemistry procedures for elucidation of the mechanisms of radical steps of enzymatic processes are considered. Bibliography — 80 references.

Received 5th April 2007