

DOI: 10.26693/jmbs04.06.329

УДК 577.115+577.122;

Мінаєв Б. П., Панченко О. О.

СПІН–КАТАЛІЗ ОКИСНЕННЯ НЕНАСИЧЕНИХ СУБСТРАТІВ МОНО– І ДИ–ОКСИГЕНАЗАМИ, ВІЛЬНИМИ ВІД КОФАКТОРУ. ЯК ТРИПЛЕТНИЙ КИСЕЇ МОЖЕ ПОДОЛАТИ СПІНОВУ ЗАБОРОНУ

Черкаський національний університет ім. Богдана Хмельницького, Україна

bfmin43@ukr.net

Кисень повітря – це молекула O_2 в основному триплетному стані, яка не може через заборону по спіну вступати в реакції з органічними сполуками. Останні завжди мають парне число електронів зі спареними спінами і є діамагнітними (мають повний спін рівний нулю та синглетний основний стан). Тому реакції органічних сполук з киснем при нормальних умовах заборонені за спіном. Оксидази і оксигенази можуть активувати триплетну молекулу O_2 , що перебуває в основному стані для контрольованого хімічного синтезу, ініційованого процесом переносу електрону, що призводить до відновлення кисню і утворенню іон–радикалу супероксиду. Як правило, ці ферменти використовують органічний кофактор, або парамагнітний іон металу, щоб ініціювати активацію кисню і подолати спінову заборону для реакцій триплетної молекули O_2 . Останнім часом виявлено ряд моно– та диоксигеназ, які можуть функціонувати навіть при відсутності будь–якого кофактора. Аналіз спін–орбітальної взаємодії в таких ферментах допомагає розгадати деякі головні труднощі механізму активації кисню і пояснити, чому ароматичний субстрат діє замість кофактора. В роботі показано, що загальний атрибут усіх таких ферментів, аніон–радикал супероксиду $O_2^{\cdot-}$, дає хорошу можливість індукувати триплет–синглетний квантовий перехід в активному центрі оксигенази за рахунок внутрішніх магнітних збурень в частинці $O_2^{\cdot-}$ і виконувати переверт спіна, як звичайний спосіб подолання заборони за спіном при біохімічній активації кисню. Рушійною силою перевертоту спіна є спін–орбітальна взаємодія всередині аніона супероксиду, яка не залежить від партнера радикальної пари $M^{\cdot+} \dots O_2^{\cdot-}$ (де M – кофактор або субстрат); при цьому π –делокалізована електронна оболонка субстрату здатна віддавати електрон на кисень і може працювати замість кофактора, подібного до флавіну або птерину. До цього часу у біохімії ферментів окиснення використовувалася модель Мессі для спінової конверсії в радикальній парі, де M – відновлений фла-

він у розчині. Механізм конверсії при цьому ніяк не обговорюється. Наша теорія надає перший фізично обґрунтований механізм обертання спіна в ферментах оксигеназ.

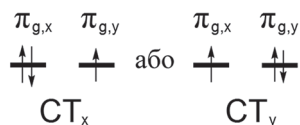
Ключові слова: активація кисню, глюкозоксидаза, монооксигенази, диоксигенази вільні від кофактору, електронний спін, супероксид аніон радикал, спін–орбітальна взаємодія, біологія.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота є фрагментом планової науково–дослідної роботи «Архітектура інтерфейсу й електронні механізми формування екситонів та ексимерів в мультишарових органічних світлодіодах і транзисторах», № державної реєстрації 0118U003862.

Вступ. Кисень та інші гази грають фундаментальну роль у перебігу багатьох ферментативних реакцій які відбуваються в живих організмах [1–11]. Однак, молекулярний кисень є унікальною сполукою, оскільки має триплетний основний стан, який визначається наявністю напівзайнятої π_g^2 відкритої оболонки [12]. Два електрона з паралельними спінами, які підпорядковуються високій молекулярній симетрії кисню (точкова група $D_{\infty h}$) і молекулярному аналогу правила Гунда [1, 12], визначають величезну кількість особливостей кисню, що проявляються в оптичних, магнітних, хімічних, атмосферних і біологічних явищах [1–6]. Більшість з них пов'язано з забороненим за спіном характером таких явищ. У першу чергу це відноситься до реакції окиснення атмосферним киснем [4, 6, 7].

Хоча молекула O_2 має парне число електронів, але на її вищій енергетичній рівень потрапляють дві вироджені молекулярні орбіталі з двома неспареними електронами π_g^2 [1]. Квантові числа таких електронів складаються і сумарний спін ($S = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} = 1$) молекули O_2 може бути орієнтований в просторі трьома різними способами з проєкціями ($M_s = 1, 0, -1$), які істотно визначають поняття триплетного стану [1]. Тут квантові числа S і M_s визначають

сумарний кутовий момент молекули в одиницях \hbar [12]; квантове число S при цьому визначає довжину спінового вектора $S^2 = S(S + 1)\hbar^2$. Таким чином, кисень повітря являє собою парамагнітний газ, який є дуже важливим для всього аеробного життя, що виходить з такої простої фізичної властивості [1]. З термохімічних і окисно-відновних оцінок O_2 є потенційно потужним окиснювачем, але його реакційна здатність з органічними речовинами в типових умовах сильно пригнічується через квантову заборону; різні спіни реагентів запобігають прямій реакції органічного окиснення шляхом з'єднання з триплетним киснем ($X^3\Sigma_g^-$). Природа розробила витончений механізм (який, здається, знаходиться поза звичайних хімічних законів), щоб порушити сильну квантову заборону за спіном для реакції окиснення триплетною молекулою O_2 [5–7]. Аеробні істоти не можуть існувати без кисню, однак, в той же час кисень є дуже небезпечним для їх існування [10], оскільки робота окисних ферментів супроводжується появою так званих активних форм кисню (АФК; тобто супероксид іон $O_2^{\cdot-}$, гідроген пероксид H_2O_2 , гідроксил радикал OH^{\cdot} , пероксильні радикали ROO^{\cdot} та синглетний кисень $O_2, a^1\Delta_g$) [11]. АФК можуть викликати не лише апоптоз або некроз клітини, але ще також керувати рядом важливих сигнальних функцій клітин [10, 11]. Можна сказати, що велика оксигенна катастрофа, яка з'явилась на Землі 2,7–2,4 мільярда років тому [10] (після розвитку фотосинтезу та виникнення достатнього тиску O_2 в біосфері [11]), нарешті, була пов'язана з можливістю триплетного кисню приймати ще один електрон, а також зі специфічними магнітними взаємодіями в супероксид-іоні [6]. Як буде показано нижче, тут йдеться про спін-орбітальну взаємодію в більш ніж наполовину зайнятій π_g^3 відкритій оболонці іону $O_2^{\cdot-}$ [2–4].



Можна припустити, що АФК з'явилися майже одночасно з появою достатнього рівня атмосферного кисню [10]. Про це свідчить той факт, що ефективний скавенджер АФК (фермент-відлякувач) – супероксид дисмутаза (СОД) поширений у всіх царствах життя і з'явився раніше відділення еубактерій від археї, тобто на початку аеробної еволюції [6, 10]. Генерація супероксиду $O_2^{\cdot-}$ ферментами оксидаз необхідна для подолання заборони за спіном для реакції окиснення і отримання енергії для АТФ синтезу; в той же час вона призводить до появи багатьох АФК. Останні генеруються багатьма ферментами, проте дана стаття присвячена моно-

і ди-оксигеназами, включаючи популярні флавінові ферменти оксидаз, на прикладі яких ми намагаємось показати, що слабка спін-орбітальна взаємодія (СОВ) в відкритій електронній оболонці супероксид-іона була і є основною рушійною силою еволюції аеробних форм життя.

Були необхідні мільйони років еволюції для того щоб організувати належне протеїнове середовище всередині флавінвмісних ферментів, щоб полегшити перенесення електрона з відновленого флавіну до кисню. Метою даної роботи є роз'яснення цього поняття та пояснення його головної властивості для великої кількості оксидаз та оксигеназ, які здатні ефективно активувати кисень для порушення і подолання забороненого за спіном відновного біологічного окиснення.

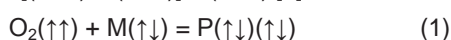
Мета дослідження: визначення впливу спін-орбітальної взаємодії на активацію кисню моно- і ди-оксигеназами, вільними від кофактору. Порівняння з глюкозооксидазою та іншими ферментами окиснення, які мають кофактор типу флавіну, де активація кисню для подолання спінової заборони пояснювалася на основі концепції В. Мессі: переверт спіна в радикальній парі «флавін радикал – супероксид». Визначення рушійної сили, яка генерує триплет-синглетний перехід в радикальній парі, що пояснює активність самого субстрату без наявності кофактору.

Матеріал та методи дослідження. Розрахунки електронної структури і геометрії активного центру ферменту бактеріальної 1-N-3-гідрокси-4-оксохінальдин 2,4-диоксигенази проведені методом теорії функціоналу густини B3LYP в базисі гаусових атомних орбіталей 6–31G(d,p) за допомогою програми Гауссіан 09 [13]. Розрахунок триплетного бірадикального інтермедіату 3I_1 і точки перетину з синглетним аналогом 1I_1 при мінімальній енергії проведений розширеним багатоконфігураційним методом (ХМС) з урахуванням квазі-виродженої теорії збурень другого порядку (QD PT2) [14] за допомогою програми Firefly (світлячок) [15]. При розрахунку точки перетину триплет-синглетних станів і оцінці СОВ врахований метод [16], який імплементований в програму Firefly. В даній роботі нами розширено повний активний простір (ПАП) для методу ХМС до 18 електронів і 12 орбіталей (9 зайнятих і 3 вакантних). Розрахунки проведені щоб вирішити який із двох запропонованих механізмів дозволяє ефективно подолати спінову заборону в реакціях гідрокси-оксохінальдин 2,4-диоксигенази, що каталізує розщеплення оксохінальдинового субстрату молекулярним киснем.

1. Спінова заборона як кінетична перешкода реактивності кисню

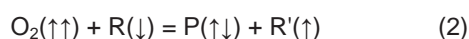
Спочатку розглянемо загальну проблему спінової перешкоди для реакцій O_2 . За відсутності

радикалів та інших парамагнітних сполук кисень зазвичай проявляє дуже мляву хімічну реакційність [2]. Два неспарених електрона в π_g молекулярних орбіталах (МО) створюють спін і магнітний момент молекули O_2 , який пояснює парамагнетизм кисню і перешкоджає його прямим реакціям з органічними молекулами (М). Останні є типowo діамагнітними сполуками, які володіють парним числом електронів з парними спінами і загальним квантовим числом спінів $S = 0$ (синглетний основний стан). Продукти (Р) окиснення також є діамагнітними речовинами з синглетним основним станом; таким чином прямі реакції органічного окиснення заборонені правилом відбору для квантового числа повного спіну реагентів і продуктів: $[(S=1) + (S=0)] \neq (S=0)$ [3]:



У рівнянні (1) уся ліва частина має триплетний повний загальний спін $S=1$ (пояснюється наявністю O_2), а в правій частині всі спіни спарені, $S=0$. Ця суто релятивістська заборона є дуже серйозним квантовим обмеженням в цілому для усіх реакцій окиснення органічних сполук молекулярним киснем. Для того, щоб реакція відбувалась, повинен відбутись переверот спіна, який має чисто магнітне походження. Хімічні сили, завдяки яким відбуваються органічні реакції, визначаються головним чином електричними кулонівськими взаємодіями: вони загалом складаються з електронно-ядерного притягання і міжелектронного відштовхування однойменних зарядів при квантовому розрахунку потенціалу [3]. Переверот спіна можуть індукувати лише внутрішні магнітні сили, які зазвичай слабкі і нехтуються в квантовій органічній хімії [4–6]. Тому, заборона для реакцій окиснення органічних сполук молекулярним киснем є дуже суворою. Наша Земля давно згоріла б, якби не спін-заборонені властивості органічного окиснення, пояснені простим рівнянням (1) [2]. Таким чином, реактивність кисню є унікальним хімічним прикладом, який ілюструє загальну важливість цього квантового правила спінової селекції [2–8].

Відомо, що спінова заборона ефективно долається в процесах горіння, коли окиснення ініціюється високотемпературною стадією активації (перший радикал R, індукується запаленням сірника або високотемпературним нагрівом) [5, 6]:



Як бачимо, сумарний спін ($S = 1/2$, $M_s = +1/2$) є однаковим у лівій та правій частинах рівняння (2), тому спінової заборони більше немає. Вона знята додаванням спіну радикалу R і появою нового радикалу R'. Лише ці зіткнення з винятковими спіновими орієнтаціями двох реагентів у формулі (2) є

реакційно здатними. Будь-який радикал забезпечує таку можливість подолати спінову заборону для проходження реакції за участю триплетного O_2 . Пояснимо, скільки таких зіткнень існує за статистикою. Зіткнення в кватетному стані ($S = 3/2$, всі спіни паралельні зліва) призводять до розсіювання реагентів (оскільки продукти мають бути з сумарним спіном $S = 1/2$); але ще два з шести зіткнень дають продукти реакції. Кватетні і дублетні стани є чотирикратно ($M_s = \pm 3/2, \pm 1/2$) і двократно ($M_s = \pm 1/2$) виродженими відповідно. Всі можливі спінові орієнтації однаково вірогідні при зіткненнях $O_2 + R$ за статистикою. Тому два ($M_s = \pm 1/2$) дублетні стани у формулі (2) реалізуються статистикою для кожного з шести зіткнень.

Таким чином, горіння протікає як радикальна ланцюгова реакція, а новонароджені радикали R' завжди продовжують ланцюг з додатковим залученням окисненої молекули палива (М), яку маємо в рівнянні (1); але вже без заборони за спіном через присутність радикалу, що забезпечує рівняння (2) для початкового процесу запалення. Як правило, це екзотермічна реакція з розгалуженим ланцюгом, що забезпечує світло і тепло вогню, допоки кисень і органічне паливо є в наявності. В полум'ї існує багато радикалів і випадкових зіткнень; новонароджений радикал віддаляється всередину об'єму вогню і втрачає спінову пам'ять, створену під час зародження радикалу R' за формулою (2). У новому зіткненні з іншою молекулою O_2 знову можлива випадкова орієнтація спіну через втрату пам'яті спіну радикалу R'. Звичайно, такий «вогневий» механізм енергозабезпечення клітини неприйнятний для біо-окиснення, оскільки зародження радикального ланцюгу потребує великої енергії активації; крім того, процес горіння є некерованим і не може запасати дозовану енергію для синтезу АТФ.

2. Біологічна активація кисню ферментами оксидази і моно-оксигенази

Як відомо, кисень добре дифундує крізь мембрани та інші органели клітини. Коли дифузія O_2 надає можливість кисню для проникнення в реакційний центр ферменту оксидази, молекула O_2 тісно зв'язується міжмолекулярними взаємодіями з кофактором і білковим каркасом ферменту. Перший акт активації зазвичай починається з перенесення електрона на кисень з відновленого кофактору K^- (або субстрату) і виникає пара радикалів $K^{\cdot} \dots O_2^{\cdot-}$ (або $C^{\cdot} \dots O_2^{\cdot-}$). Це не означає створення умов для радикально-ланцюгової реакції, оскільки обидва спіна залишаються в щільній порожнині активного центру ферменту. Обидва радикали добре зберігаються від втечі із активного центру ферменту і підтримують спінову пам'ять свого прекурсору – триплетного кисню. Переверот спіна має

відбуватися під час життя цієї радикальної пари, коли $O_2^{\cdot-}$ і кофактор (або субстрат) радикал все ще знаходяться в кишені активного центру білка і забезпечують спін–корельовану триплетну радикальну пару (РП).

Оксидази та оксигенази каталізують пряме окиснення органічних речовин шляхом активації O_2 , напруженої для подолання спінової заборони [2, 17–27]. Деякі з цих ферментів містять парамагнітний іон перехідного металу як кофактор [24]. Вони не сліднують за механізмом радикальної ланцюгової реакції (2), хоча додаткове обертання спіну забезпечується металом. Замість цього окисно–відновний метал надає спочатку електрон для одержання $O_2^{\cdot-}$ [2]. Коли відкрита оболонка π_g –МО супероксиду (майже та ж сама орбіталь, що і в кисню) перекривається з $3d$ –орбітальми металу, різниця в обмінних взаємодіях між $O_2^{\cdot-}$, металом і рештою кофактора ферменту (K^+) забезпечує обертання спіна (що ілюструється мідь–аміно–оксидазою в роботі [24]). Коли фермент не містить парамагнітного металу, радикальна пара з супероксидним іон–радикалом існує в чисто діамагнітному середовищі протеїнів і амінокислотних залишків.

Відмітимо, що загальна ідея подолання спін–забороненого характеру активації кисню в оксидазах описана сімнадцять років тому [2], але біохіміки ще не звертають на неї увагу (за рідкісними випадками [23, 25]). Для ферментів, які не містять парамагнітних перехідних металів [2, 3], механізм пояснювався на прикладі глюкозооксидази (GO). Це стосується напів–реакції окиснення GO, в якій триплетний кисень взаємодіє з відновленим флавінаденіндинуклеотидом (FAD_{red}) і утворює $FAD+H_2O_2$ [7]. Реакція є забороненою за спіном, оскільки продукти і вихідний відновлений флавін $FADH_2$ є молекулою з замкненою оболонкою, що перебуває в синглетному основному стані (спін дорівнює нулю), але O_2 має два неспарених електронних спіна (триплетний основний стан, $X^3\Sigma_g^-$) [2]. Оскільки реакція є узгодженою, єдиний спосіб подолати спінову заборону полягає в тому, щоб залучити внутрішню магнітну взаємодію у вигляді спін–орбітальної взаємодії (COB) для змішування хвильових функцій триплетних (T) і синглетних (S) станів в рамках теорії збурень і щоб зробити неадіабатичний T→S перехід дозволеним [2]. Швидкість T→S переходу залежить від сили COB. Прямі розрахунки реакції окиснення GO по теорії функціоналу густини (ТФГ) для моделі активного центру (рис. 1) показали, що, дійсно, відносно сильна спін–орбітальна взаємодія може змішувати хвильові функції T і S станів реактивної системи $FADH_2+O_2$ на стадії переносу електронів і утворення радикальної пари $FADH_2^{\cdot+} \cdots O_2^{\cdot-}$ [2, 3].

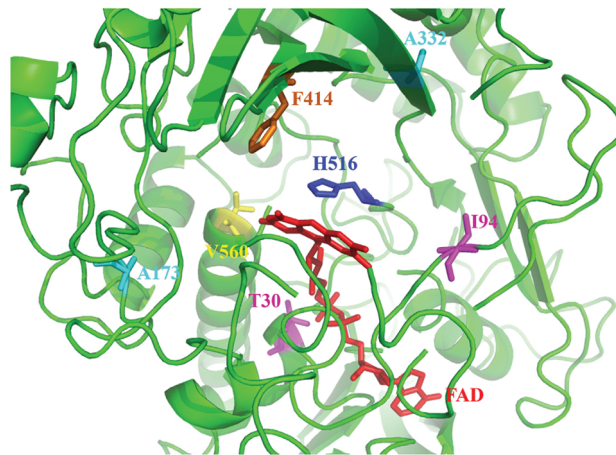


Рис. 1. Модель активного центру глюкозо оксидази (ГО)

His_{516} має протон на атомі N^ϵ . Приєднання цього протона до супероксид іону з одночасним перенесенням гідрогену від атома N5 дає утворення H_2O_2 (рис. 2).

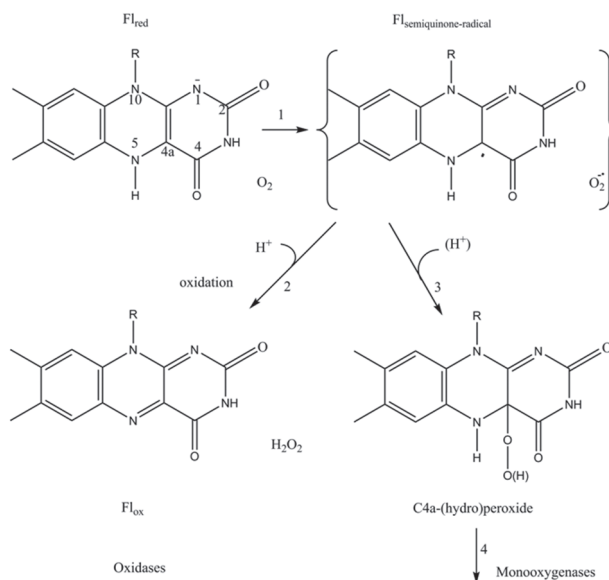
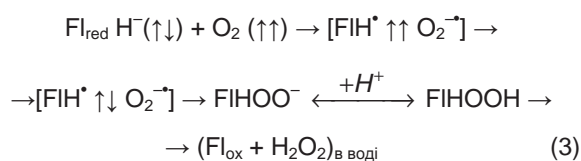


Рис. 2. Загальна схема каталітичного циклу флавінвмісних оксидаз і моно–оксигеназ. Фігурні дужки означають білкову порожнину активного центра фермента де знаходиться радикальна пара. T–S перехід на стадії РП не показано

Аналогічна загальна ідея була висунута раніше Вінсентом Мессі для всіх відновлених флавінів (Fl_{red}) [7], але без будь–яких коментарів про природу магнітних сил, що відповідають за обертання спіну. Оскільки окисно–відновний потенціал пари O_2/H_2O (+0,27 В) досить високий відносно окисно–відновного потенціалу флавіну (–0,207 В), то загальний двоелектронний процес окиснення $Fl_{red}H_2+O_2 \rightarrow Fl_{ox}+H_2O_2$ є цілком необоротним [3,7]. З кінетичного аналізу реакцій відновлених флавінів

($Fl_{red}H^-$) з киснем Мессі запропонував наступну спрощену схему спінових перетворень в реакції їх окиснення [7]:



Спочатку ця схема була запропонована для вільних флавінів, попередньо відновлених у органічних розчинах [7]. Кінцевий продукт був ідентифікований як гідропероксид $C_{(4a)}$ -флавіну (справедлива права частина **рис. 2**) [7, 9]. Перенесення електрона на кисень продукує зв'язані триплетні радикальні пари в клітині розчину (або в активному центрі ферменту), позначені квадратними дужками, які надають змогу відбутись (за невідомими причинами) T-S переходу, як і зазначається у формулі (3) [7,9]. Після цього протікає нормальна хімія синглетного стану, а радикальна пара синглетного стану переходить у гідропероксид $C(4a)$ -флавіну (який є досить нестійким у водних середовищах і гетеролітично перетворюється на окислений Fl та пероксид водню [7, 9]). Схема (3) підтверджена взаємодією радикалу FlH^* і іона O_2^{-*} в реакціях імпульсного радіолізу аерованих розчинів рибофлавіну; вона була поширеною Вінсентом Мессі також і на реакції флавопротеїнів [7].

Типовими прикладами є флавін-вмісні оксидази, дегідрогенази, трансферази, моно- і ди-оксигенази [7, 9, 21]. У численній біохімічній літературі важко знайти будь-яке обговорення фізичних причин і рушійної сили для квантової інверсії спіну (T-S перехід) в окисненні флавінів по схемі Мессі (3), якщо не брати до уваги наших винятків [1-6,23,26]. Можна припустити, що автор роботи [7] вважав, що причини для T-S переходу у радикальній парі в клітині розчинника (3) можна обґрунтувати у рамках теорії радикальних пар (ТРП) [17]. Теорія РП була досить популярною у вісімдесятих-дев'яностих роках [17], тому її використання автором роботи [7] вважається досить логічним. ТРП розглядає кінцеву ймовірність вторинних зіткнень у відокремлених (розділених) радикальних парах у клітині розчинника. Головною рушійною силою T-S переходів у відокремленій РП є електронно-ядерна спін-спінова взаємодія всередині кожного радикалу [17]. Ця надтонка взаємодія (НТВ) надзвичайно слабка (близько 0,01 Дж/моль) і може визвати T-S перехід тільки в тому випадку, коли енергії T і S станів РП однакові (вироджені). Тобто коли радикали далекі один від одного, а відстань між ними перевищує десятки нанометрів. Це потрібно для того, щоб обмінна взаємодія між радикалами, яка визначає енергетичну різницю T і S ста-

нів, була незначною і щоб ці стани були квазі-виродженими. Для радикальних пар у розбавлених розчинниках ця теорія цілком справедлива і застосовувалася з великим успіхом [17]. Вона пояснювала також численні ефекти зовнішніх магнітних полів в реакціях радикальної рекомбінації і дизпропорціювання [17]. Але можна вважати, що інший механізм (відмінний від передбаченого класичною теорією РП) діє в ферментах [2] і навіть у вільних флавінових реакціях з киснем, описаними у формулі (3).

Для флавопротеїнів в реакційному центрі ферменту з щільним білковим середовищем РП між FlH^* і O_2^{-*} радикалами, врахованими в рівнянні (3), не можна забезпечити переверот спіна згідно з постулатами теорії РП [17], оскільки обидва радикали не є сильно віддаленими один від одного. Внутрішні надтонкі взаємодії зв'язків всередині радикалів є доволі слабкими для того, щоб індукувати T-S переверот спіна в щільно зв'язаній РП флавопротеїну, рівн. (3), де радикали РП відокремлені не більше ніж на 3-4 Å, або сумою ван дер-ваальсових радіусів [2]. У цьому випадку S і T стани РП зовсім невироджені, а T-S щілина може на порядок перевищувати енергію електронних надтонких взаємодій зі спінами ядер. Як показано в роботі [2], зовсім різні внутрішні магнітні сили діють всередині цієї РП, які по-справжньому не враховувалися в класичній теорії РП [17]. Автор посилання [2] вперше ввів спін-орбітальну взаємодію (COB) як новий тип внутрішньої магнітної сили, специфічний лише для РП, що складаються з супероксидного аніона.

Відомо, що COB дорівнює нулю для типової радикальної пари в динамічній клітці розчинника, коли у формуванні S і T станів такої РП беруть участь так звані одно-топічні радикали [4,17,19]. Концепція топичності була введена вперше для класифікації діаграм кореляції в фотохімічних реакціях радикальних пар [18]. Типові органічні радикали, такі як CH_3 , які є продуктами розщеплення однарного C-C-зв'язку, є одно-топічними. Тобто, вони мають один неспарений електрон, розташований на одній атомній орбіталі. Але інші радикали, такі як ROO^* , HOO^* , OH^* , O_2^{-*} , що формують активні форми кисню, є більш складними і їх топичність перевищує одиницю [18]. Топичність залежить від характеру і кількості радикальних центрів у первинному продукті [18, 19]. Пізніше концепція топичності була використана в роботах [6, 19] для класифікації ефектів COB у хімічних реакціях радикалів та бірадикалів, а також при активації кисню ферментами [1, 2].

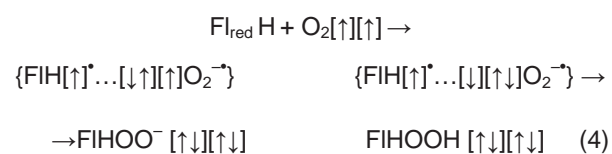
Іонний радикал супероксиду O_2^{-*} володіє специфічною і високою топичністю, що визначається його «більш ніж напівзайнятою» електронною відкритою

оболонкою π_g^3 . З точки зору методу валентних зв'язків це можна пояснити наступними канонічними структурами: O^--O^+ , O^+-O^- , O^--O^+ , O^+-O^- , і т.д., де $2p_x$ і $2p_y$ атомні орбіталі (АО), які є зайнятими, позначаються різними точковими позначеннями. Це дає можливість створити великий інтеграл СОВ у T–S матричному елементі $w = \langle T|H_{SO}|S \rangle$ для клітинних РП, як показано в рівнянні типу (4) [2, 24]. Для флавопротеїдів цей w -інтеграл пояснює головне питання про те, як ферменти забезпечують T–S перехід і долають сувору квантову заборону на окиснення триплетною молекулою O_2 . Константа швидкості T–S переходу визначається значенням $|w|^2$, де береться модуль від комплексних величин. Будучи достатньо великим ($|w|$ становить близько кДж/моль), це значення гарантує конкурентну швидкість перевероту спіна для триплетної $[FH^+ \uparrow\uparrow O_2^-]$ радикальної пари в формулі (3) [1–6]. Велика кінетична різноманітність в вимірних швидкостях реакції між киснем і різними флавопротеїнами визначається відмінностями в композиції амінокислотних залишків, яка є дуже важливою в процесі електронного переносу. Останній фактор переносу електрону є надзвичайно важливим для індукування процесу перевероту спіна, про який йдеться нижче.

3. Природа спін-орбітальної взаємодії, яка індукує переверот спіна в радикальній парі $FH^+ \uparrow\uparrow O_2^-$.

Багато ферментів, що активують кисень, включають органічний флавіновий кофактор, тому що останній має розгалужену π -систему і легко змінює потенціал іонізації в залежності від зв'язування неподілених пар атомів нітрогену [4]. Наприклад, загальна схема каталітичного циклу монооксигенази, що містить FAD, показана на **рис. 2**. Цикл, зазвичай, починається з редукції FAD-простетичної групи за допомогою $NADPH+H^+$ (**рис. 2, крок 1**). Але квантові спінові перетворення під час процесу оксигенації (**рис. 2, крок 2**) зазвичай не розглядаються [7, 20, 21].

При обговоренні стадії оксигенації (**рис. 2, крок 2**) біохіміки завжди намагаються уникнути належного обговорення за звичайними посиланнями на концепцію Мессі [7, 9, 20, 31]. За пропозицією Мессі [7], що супроводжується незалежним аналізом СОВ в супероксид-іоні, представленим в [2, 3] і заснованим на попередніх роботах [28–30], можна узагальнити процес оксигенації (3), у відновлених флавінах і флавопротеїнах за наступною схемою молекулярних орбіталей (МО):



У рівнянні (4) перша квадратна дужка означає найвищу зайняту МО відновленого флавіну; наступні дві кисневі дужки позначають $\pi_{g,x}$ і $\pi_{g,y}$ вироджені орбіталі молекули O_2 [2]. Фігурні дужки в рівнянні (4) позначають клітину розчину, або білкову порожнину ферменту в області активного центру спін-каталізу.

Ключовий момент пояснення СОВ у формулі (4) стосується двох можливих електронних конфігурацій супероксидного іон-радикала O_2^- [2, 30]. Триплетна і синглетна структури, з'єднані за рахунок СОВ у формулі (4), відрізняються різною зайнятістю $\pi_{g,x}$ і $\pi_{g,y}$ орбіталей супероксиду (форми цих МО майже однакові, як і у молекулі O_2 [1], хоча між'ядерні відстані різні). Можна побачити на **рис. 2**, що T→S перехід відповідає одноелектронному «стрибку» з $\pi_{g,x}$ до $\pi_{g,y}$ орбіталі (з одночасним обертанням спіну). Такий квантовий «стрибок» означає обертання орбіталі π_g навколо молекулярної осі z. Це також означає обертання густини перехідної «електронної хмари», або кругового струму навколо осі, що створює магнітний момент. Останній взаємодіє з моментом спіну і забезпечує магнітну рушійну силу, яка індукує T–S перехід, тобто переверот спіну. Ця чітка «візуальна» картина не є строго адекватною квантовому процесу T→S переходу, але треба знати, що квантова реальність не є очевидною. Орбітальний «круговий струм» створює обертальний момент, відомий як «спалах» під час переходу, стимулюючи одночасний переверот спіна – це можливий спосіб подумати про рівняння (4).

Таким чином, супероксидний іон-радикал O_2^- володіє унікальною здатністю обертати спіни у контакті з донорним органічним субстратом. Процес переносу електронів, перший етап у формулі (4), завжди створює триплетну радикальну пару. Перебуваючи в тісному контакті, ця РП «запам'ятовує» свою спінову пам'ять і не може створити синглетний S_{4a} пероксид без перевероту спіна всередині себе. Це значною мірою відрізняється від ініціації горіння (пам'ять втрачається при утворенні радикалів) і звичайної теорії РП [17], де спін-кореляція втрачається при вторинних зіткненнях після тривалого розділення радикалів РП у великій кінетичній клітці розчинника.

3.1. Нові підтвердження теорії СОВ в оксигеназах вільних від кофактору

В останні роки виявлено цікаву групу окремих моно- та диоксигеназ [20–25]. Ці, структурно не пов'язані, ферменти об'єднуються в один рід, тому що всі вони можуть працювати у відсутності будь-якого кофактора, який раніше був необхідний для активації кисню (**рис. 2, крок 2**). Тому проблема порушення спінової заборони в цих оксигеназах є

найбільш інтригуючою [20–27, 31]. Перша механічна концепція вільної від кофактору оксигенації [9, 20, 21] була запозичена з теорії Мессі про перенесення електронів і генерування іону супероксиду як і в флавінозалежних оксигеназах [7]. Альтернативний механізм був запропонований нещодавно на основі квантово-хімічних розрахунків [22], але рушійну силу для перевертання спіна не було розглянуто. Розрахунки COB можуть забезпечити певний вибір між двома альтернативними механізмами [22] і [20] для вільних від кофактору оксигеназ та вирішити актуальну для них проблему подолання спінової заборони.

Аналогічна схема активації кисню за допомогою індукованого спін-орбітальною взаємодією перевертання спіна може бути легко узагальнена для монооксигенази, для глюкозооксидази (GO) [3] (рис. 2) та інших флавінвмісних ферментів [1, 2, 24].

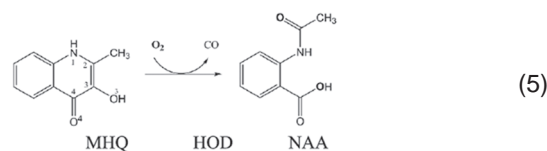
Варто зауважити, що відновлений флавін Fl_{red} $H[\uparrow\uparrow]$, показаний на початковій стадії (рис. 2), після перенесення електрону на кисень дає $FlH_{radical}$, а кінцеве протонування в оксидазі типу ГО (крок 2) супроводжується перенесенням атома гідрогену від атому N^5 через зовнішню сферу білкових залишків з утворенням H_2O_2 [3, 9]. Багато флавінвмісних оксидаз проходять стадію проміжного C(4a)гідропероксиду здійснюючи крок 4. Права нижня частина рис. 2 відповідає монооксигеназі; на останній стадії (не показана) після утворення проміжного C(4a)гідропероксиду йде окиснення органічного субстрату шляхом приєднання до нього одного атома кисню та з передачею другого атома кисню на утворення молекули води. Окиснений субстрат і вода не позначені на рис. 2 як кінцеві продукти монооксигенази.

Диоксигенази здійснюють приєднання обох атомів молекули кисню до субстрату. Ці ферменти грають важливу роль в метаболізмі ароматичних амінокислот, сахаридів, вітамінів, жирних кислот і в синтезі колагену. В наступному розділі ми розглянемо диоксигенази, які долають спіновий бар'єр не маючи флавінового кофактору.

3.2. Бактеріальна 2,4-диоксигеназа виділена з бактерії *Arthrobacter nitroguajacolicus* Rū-61a, яка може розкласти хінолони

Спочатку розглянемо конкретний приклад бактеріальної 1–Н–3–гідрокси–4–оксохінальдин 2,4-диоксигенази (HOD), що каталізує триплетну O_2 -реакцію з N-гетероциклічним оксохінальдиновим субстратом [21]. Це є кофактор-незалежний фермент, здатний розкласти субстрат 2–метил–3–гідрокси–4(1H)-хінолону (MHQ) і продукувати продукт CO + N-ацетил-антранілат (NAA), рівн. (5). Ця спін-заборонена реакція включає зв'язування з

киснем і розщеплення, що супроводжується значним перетворенням субстрату з подальшим розкладом. Жирним символом у формулі (5) позначимо атоми кисню, що надходять в систему в ході реакції окиснення [31].



Вихідний реагент (MHQ) і продукт (N-ацетилантранілат, NAA) в лівій і правій частинах рівняння (5) так само, як і HOD-фермент, є діаманітними сполуками зі всіма спареними спінами, у той час як двоатомні молекули, зв'язані стрілкою, знаходяться в триплетних (O_2) і синглетних (CO) основних станах відповідно. Таким чином, спінова заборона реакції (5) очевидна. Каталізована бактеріальною HOD-диоксигеназою реакція (5) протікає без будь-якого кофактору і викликається спеціальним розташуванням амінокислотних залишків, що оточують активний центр ферменту. Вони сприяють відновленню субстрату MHQ шляхом перенесення протона від O^3H на найближчий залишок гістидину (His251), і цей перший етап каталізу підтверджується всіма дослідженнями [20–23, 31]. Ряд подібних 4-хінолонових субстратів також каталізується HOD [21]. Структуру ферменту HOD визначали рентгенівською кристалографією [20], а його активний центр моделювали з різним числом амінокислотних залишків і в різних наближеннях теорії функціоналу густини та молекулярної механіки [22, 23].

Усі моделі формуються [22] на основі кристалографічних координат анаеробних HOD-MHQ і HOD-хлоридних комплексів [20]. Фермент HOD належить до суперсімейства α/β -гідролаз, що підтверджено аналізом і дослідженнями порівняльної послідовності [21]. Об'ємна конформація активного центру (АЦ) включає бічний ланцюг Trp160 що спостерігається на верхній поверхні кишені АЦ ферменту. Разом з іншими аміно-кислотними залишками (His251-Asp126) Trp160 стабілізує положення субстрату в активному центрі ферменту за допомогою водневих зв'язків. Порожнина в АЦ відповідає α/β -гідролазному отвору для супероксид аніона [20, 22]. Амінокислотна діада His251-Asp126, координувана з групою O^3H MHQ [20], віднімає протон і активує субстрат (перший крок на схемі 1), тоді як нуклеофільний залишок Ser101 координує O^4 карбонільний атом MHQ і стабілізує весь активний центр [22]. Атом O^3 субстрату MHQ знаходиться на відстані 2.68 Å від атома N_{E2} залишку His251 кислотної діади [20]. Дослідження з місцево спрямованим мутагенезом із заміною His251 аланіном свідчить

про величезне зниження каталітичної активності [20, 22], але заміна нуклеофільного залишку Ser₁₀₁ не впливає на швидкість каталізу (вона впливає тільки на зв'язування МНҚ, як показано постійним збільшенням константи Міхаеліса) [22]. Для розрахунку різних моделей поліпептидного середовища в стані спокою НОД було проведено багато розрахунків ТФГ [22, 23, 31]. Однак спінова активація кисню (другий крок на схемі 1) залишається незрозумілою [20–22, 31].

Гіпотетичний механізм каталітичного циклу НОД може бути представлений на **Схемі 1**, де механізм обертання спіна опущений. Механізм цієї реакції був нещодавно проаналізований в багатьох деталях роботи [22] (як за допомогою розрахунків ТФГ, так і за допомогою кінетичних експериментів), але рушійна сила для подолання заборони за спіном не розглядалася. У той же час розрахунок СОВ є вирішальним моментом у механізмі каталізу НОД. Автори роботи [22] розраховували оптимізовані структури методом ТФГ всіх запропонованих проміжних та перехідних станів для моделі активної центру НОД (**Схема 1**). Вони запропонували, що переверот спіна відбувається на перетині з мінімальною енергією між проміжними продуктами ³I₁ та ¹I₁ (схема 1), а стан ³I₁ утворюється в результаті первинної прямої атаки кисню на субстрат МНҚ (**рис. 3, а**).

Перша стадія активації субстрату МНҚ ферментом НОД типова для багатьох подібних діоксигеназ [21]. Це депротонування шляхом перенесення Н⁺ до пептидних залишків діади His251, Asp126 [21, 22] в активному центрі. Депротонований МНҚ (синглетний аніон S⁻) може забезпечити перенесення електрону (ПЕ) до O₂ і утворити триплетну

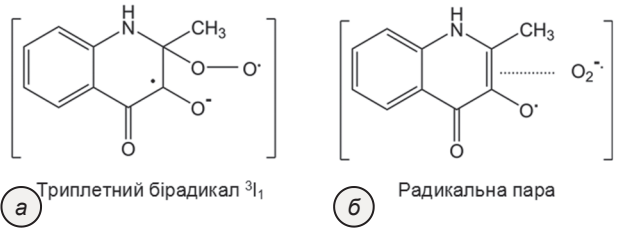
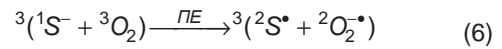


Рис. 3. Дві можливі форми триплетного інтермедіату: ковалентно зв'язаний ³I₁ бірадикал (а) і слабо зв'язана радикальна пара між іоном супероксиду і радикалом субстрату, де неспарений спін умовно позначений на атомі O³ (б)

радикальну пару (**рис. 3, б**) між субстратним радикалом (S^{*}) і супероксидним аніон–радикалом, запропонований в роботах [20, 21], як початковий крок, рівняння (6), в процесі оксигенації:



Яким чином триплетна РП може перейти в синглетний стан щоб надати потім синглетні продукти реакції (N–ацетил антранілат + CO), якщо ніякого кофактора діоксигеназа НОД не має?

Необхідний переверот–спіна від початкової триплетної РП до синглетного стану вважався [21] аналогічним з припущенням, яке висував Мессі в рівнянні (3), але без кофактора флавіна. Роль відновленого флавіна тепер відіграє аніон депротонованого субстрату (S⁻), Схема 1, рівн. (6), хоча магнітна природа триплет–синглетного переходу в радикальній парі (**рис. 3, б**) не пояснюється як звичайно [20, 21, 31].

З іншого боку, автори посилання [22] на підставі розрахунків ТФГ розглянули пряму атаку кисню на атом C₂ МНҚ і утворення проміжного триплетного

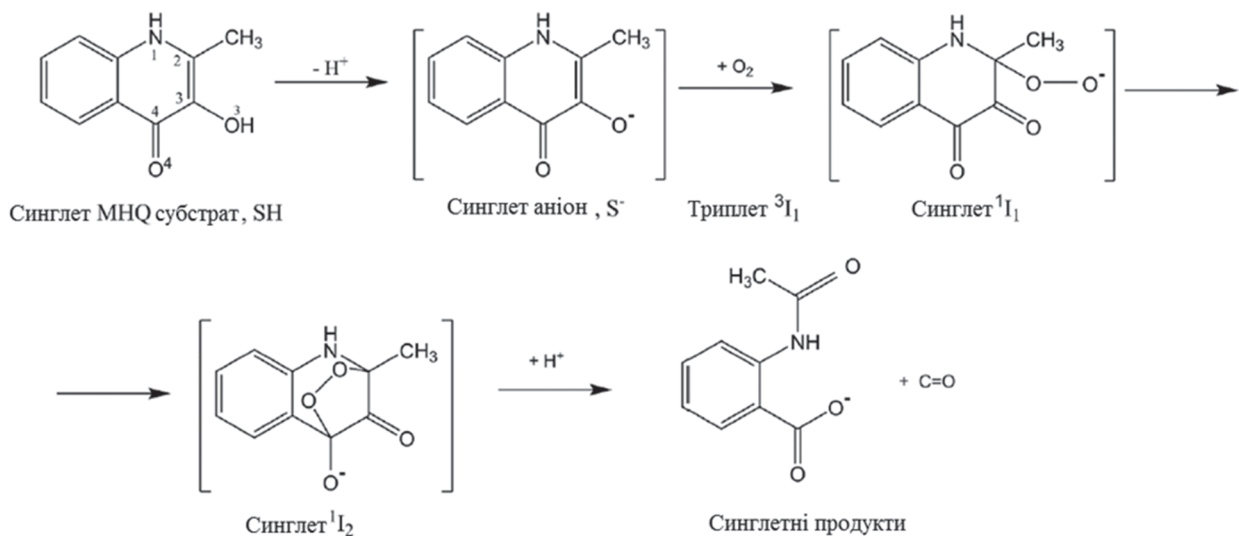


Схема 1. Механізм реакції НОД–каталізованого 2,4–діоксигенолізу МНҚ, запропонований у роботі [20]

стану 3I_1 (рис. 3, а), як основного попередника перевероту спіна до синглетного аналога (стан 1I_1 , схема 1).). Таким чином, було запропоновано два альтернативних механізми HOD–каталізованої реакції: [20] і [22], які відрізняються первинним триплетним інтермедіатом (рис. 3, а, б), який є прекурсором перевероту спіна. Обидві ковалентні структури триплетного проміжного продукту на рис. 3 досить спрощені за нашими розрахунками. При слабкому міжмолекулярному зв'язуванні супероксидного аніона з субстратним радикалом не відбувається великого перерозподілу електронної густини (рис. 3, б), але при щільно зв'язаному бірадикалі (рис. 3, а) часткове зворотне перенесення електронів на субстратне кільце прогнозується розрахунками ТФГ. Негативний заряд і спінова густина досить делокалізовані всередині циклу бірадикалу у якому контрасті з простою ковалентною структурою, показаною на рис. 3, а.

Перехід в синглетний інтермедіат 1I_1 (схема 1) може бути індукований лише спін–орбітальною взаємодією (COB), оскільки інші магнітні збурення (наприклад, надтонка електронно–ядерна спін–взаємодія) незначні у порівнянні з T–S щільною в порожнині ферменту HOD, через жорстке зв'язування з α/β –гідролазним каркасом. Дійсно, T–S розщеплення (7 ккал/моль) для бірадикалу 3I_1 (рис. 3, а) [22] є досить великим. Такий тип реакційної схеми був представлений у роботі [22] і до недавнього часу розглядається як важлива альтернатива схемі переносу електрона та РП (рис. 3, б) [20]; це вказує на приєднання кисню до атома C^2 депротонованого субстрату. Розрахунки ТФГ [22] показують, що радикальна пара $S^{\cdot-}O_2^{\cdot-}$ не може бути сформована в розглянутій моделі HOD–порожнини. Для всіх досліджених моделей реагентів ферменту розрахованих методом ТФГ [20] спроби зближення триплетної РП–структури (рис. 3, б) повертаються до початкового комплексу $^1S^{\cdot-}O_2$, (6). Це було головною перешкодою проти концепції радикальної пари [20]. Але слід зазначити, що поточні комп'ютерні програми самоузгодженого поля стикаються з проблемами конвергенції, коли роблять спроби досягти розподілу електронів для радикальної пари, що лежить вище енергії, ніж стан замкнутої оболонки [23]. Тому, цей аргумент не може бути вирішальним [27].

Ще одна причина, згідно з роботою [22], чому реакція через радикальну пару (рис. 3, б) неможлива, пов'язана з розрахунком енергії. Автори [22] розраховували вільну енергію Гіббса для реакції (6) переносу електрона $\Delta G = 11,2$ ккал/моль з урахуванням корекції розчинника з діелектричною проникністю $\epsilon = 5,7$, тоді як для води ($\epsilon = 78$) вони отримують $\Delta G = 8,0$ ккал/мол. На цій zasadі зроб-

лено висновок, що перенесення електрону є ендотермічним процесом і навряд чи відбувається спонтанно [22]. В той же час автори роботи [22] розглядають прямий шлях реакції через інтермедіат 3I_1 (рис. 3, а) як найбільш ймовірний шлях, незважаючи на вищу вільну енергію Гіббса (17,4 ккал/моль) для формації бірадикалу 3I_1 .

Інший альтернативний механізм, запропонований Сусанн Фетцнер з співавторами [20, 21] розглядає формування радикальної пари, рівн. (6), як перший крок. Перенесення електрона на кисень відбувається спонтанно, оскільки кисень надходить в активну частину ферменту HOD у вигляді $S^{\cdot-}O_2-His^+$. Циклічна вольтамперометрія показує, що аніон субстрату ($S^{\cdot-}$) має достатньо низький потенціал для перенесення електрону на кисень [21]. Рушійною силою переносу електрону є додаткове притягання заряду e^- до позитивно зарядженого протонованого гістидину. Крім цього врахуємо [27] низький потенціал іонізації відновленого субстрату $S^{\cdot-}$ і відносно високій спорідненості кисню до електрону; остання дорівнює 10,4 ккал/моль у газовій фазі, але вона збільшується в активному центрі HOD з близьким протонуваним гістидином [3]. П. Сільва виконав додаткові розрахунки методами ТФГ різних триплетних проміжних продуктів на рис. 3 і прийшов до висновку, що проміжний пероксид 3I_1 (рис. 3, а) не може бути сформований в реакції (5) [23]. Замість цього реакція протікає через перенесення електрону (6) на стадії триплетної РП (рис. 3, б), після чого відбувається T–S перехід і рекомбінація пари радикалів безпосередньо до проміжного інтермедіату 1I_1 [23]. Для спінової T–S інверсії в радикальній парі П. Сільва приймає механізм COB, запропонований Прабхакармом та ін. [3] для глюкозо оксидази, подібно до рівняння (4). П. Сільва також виступає проти прямого механізму реакції O_2 (рис. 3, а) на основі теорії Маркуса, яка віддає перевагу етапу перенесення електрону (6) для ряду 4–хінолонових субстратів у HOD [23].

Матричний елемент COB для T→S переходу в точці перетину мінімальної енергії (ТПМЕ) між проміжними продуктами 3I_1 і 1I_1 не розглядався в попередніх квантових хімічних дослідженнях [22, 23]. Розрахунок спінової зв'язки при цьому ТПМЕ було проведено нещодавно [26, 27] і перераховано в даній роботі. Структура ТПМЕ оптимізована методом багатоконфігураційного самоузгодженого поля (MC SCF) з повним набором конфігурацій активного простору (CAS) [26]. Оптимізація ТПМЕ почалася з інтермедіату 3I_1 без врахування розчинників. У структурі ТПМЕ як триплетні, так і синглетні стани близькі до бірадикальних хвильових функцій відкритої оболонки, тоді як оптимізований 1I_1 –проміжний стан стабілізується як синглет з

закритою оболонкою. Нова перерахункова структура ТПМЕ аналогічна результату, оптимізованому П. Сілвою в моделі розчинника з включенням кислотної діади His₂₅₁–Asp₁₂₆ [23] для іншого субстрату (2–фтор–3–гідрокси–4 (1H)–хінолон) відрізняється від MNQ, де група CH₃ заміщена атомом фтору. Для MNQ субстрату наш ТПМЕ чомусь відрізняється від результату Сілви, оскільки відстань субстрату – O₂ більше (2,23 Å [23]), ніж наше прогнозування. Наша структура ТПМЕ досить близька до інтермедіату ³I₁, оптимізованого в роботі. [20]. Результати розрахунків ТПМЕ і COB сильно залежать від вихідної геометрії ³I₁ [23] та від моделювання розчинника [22]. Наші попередні дані для розрахунків ТПМЕ і COB для ³I₁–¹I₁ переходу [26, 27] передбачали значення |w| порядку 2.1–2.7 см⁻¹. Наш новий розрахунок підтвердив порядок величини COB.

Точка перетину з мінімальною енергією між інтермедіатами ³I₁ і ¹I₁, оптимізованими за методом CAS SCF (18:12) мало відрізняється від ТПМЕ структури, одержаної в роботі [27]. Як впливає з розрахункового аналізу CAS SCF, бірадикальна хімічна структура (рис. 3, а) не може дозволити великий матричний елемент COB між інтермедіатами ³I₁ (а) і ¹I₁. Для того, щоб бути з'єднаним великим інтегралом COB, ці два проміжні продукти повинні мати різні орбітальні структури, які, в жодному разі, не матимуть подібних енергій. Що стосується радикалу ROO[•], то ця структура буде відповідати основному і збудженому станам з різними орбітальними симетріями ²A' і ²A", які зазвичай відрізняються на 0,87 eV [6,19], і тому досить далекі від ТПМЕ. За тією ж причиною матричний елемент COB буде знехтувально малим для механізму, запропонованого в [32], де розглядається атака OOH радикалу. Таким чином, ефективний COB інтеграл між проміжними продуктами ³I₁ (а) і ¹I₁ в ході механізму реакції, запропонований у роботі [22], неможливий [27]. Мінімальна по енергії точка перетину між інтермедіатами ³I₁ (а) і ¹I₁, оптимізована методом CAS SCF у даній роботі, забезпечує низький інтеграл COB |w| = 2.26 см⁻¹, у той час як елемент матриці спін–орбітальної T→S взаємодії у слабо зв'язаних РП (рис. 3, б) дорівнює |w| = 77 см⁻¹ [2, 3, 24]. Крім того, згідно з нашим розрахунком ХМС–QDPT2 [26] у вакуумі енергія ТПМЕ вища, ніж рівень реагентів на 11,95 ккал/моль. Таким чином, запропонований у роботі [22] механізм і початкове формування проміжного ³I₁ перокси–бірадикалу (рис. 3, а) є ненадійними з точки зору слабкої спін–орбітальної взаємодії в точці ТПМЕ між інтермедіатами ³I₁ (а) і ¹I₁ (|w| = 2,26 см⁻¹) і відповідна низька константа швидкості для переходу T→S (2,316×10 с⁻¹), оцінена за золотим правилом Фермі [3]. Ця швидкість несумісна з спостережуваною

кінетикою HOD–каталізу [20–22]; вона не може конкурувати з розпадом ³I₁ та іншими процесами, включаючи викид супероксиду, який є небезпечним для клітини і призводить до утворення АФК [11]. Основною причиною слабого COB є невелика різниця в орбітальних електронних структурах на O₂–фрагменті в інтермедіатах ³I₁ (а) і ¹I₁ при геометрії ТПМЕ. Таким чином, вони не можуть забезпечити великий матричний елемент COB w та ефективний T–S перехід на стадії ³I₁, константа швидкості якого пропорційна |w|² [3–6].

Щоб остаточно підтвердити механізм С. Фетцнер та ін. [20, 21], можна повернутися до схеми COB (4), узагальненої для слабо зв'язаної триплетної радикальної пари, одержаної в реакції відновленого флавіну, рівняння (3), або субстрату (¹S⁻ + ³O₂ \xrightarrow{PE} (²S^{*} + ²O₂^{*}) [24]. Неспарений спін у флавіновому радикалі (або в S–радикалі) є одноким у триплетних (T) і синглетних (S) станах, пов'язаних COB–індукованою стрілкою у рівн. (4). Інтеграл COB w між цими станами визначається тими молекулярними орбіталями, які мають різну зайнятість в T і S станах [2]. Органічний кофактор (або флавіновий радикал) не впливає на COB і не сприяє магнітному збуренню, яке відповідає за квантовий перехід T–S в таких ферментах. Магнітну силу індукують тільки обертання орбіталей в супероксидній частині радикальної пари (4). Тому, кофактор–незалежні оксигенази [20–25] задовольняють квантову вимогу переходу T–S тим же самим механізмом COB, який діє у флавінвісних ферментах типу ГО і визначається формулою (4) [2]. Тільки π_{g,x} та π_{g,y} орбіталі головного реагенту, O₂ та його реактивної похідної, O₂^{*}, є відповідальними за швидкий переверот спіна, викликаний незвичайно сильною спін–орбітальною взаємодією [2, 3]. Найважливіша особливість COB у рівн. (4) визначається тим, що триплетні та синглетні стани включають в себе різні зайняті орбіталі в O₂^{*} (і різні орієнтації спіна), будучи одночасно майже виродженими. З врахуванням COB дві електронні конфігурації [↑↑][↑↑] і [↓][↑↓] іона O₂^{*} у рівн. (4) відповідають спіновим підрівням ²Π_{g,3/2} і ²Π_{g,1/2} вільного супероксидного іона. Вони визначаються по константі COB A_{so}(²Π_g, O₂^{*}) = -160 ± 16 см⁻¹, що визначається з обертальних спектрів цього двоатомного аніона [27–30] і легко обчислюється за теорією МО рівною -154 см⁻¹, (знак мінус відповідає більш ніж наполовину зайнятої π_g³ відкритої оболонки супероксидного іона) [28]. Інтеграл COB w між триплетними і синглетними станами в рівн. (4) дорівнює в хорошому наближенні [2]: w = -i A_{so} (²Π_g, O₂^{*})/2, де

Інтеграл T–S є уявною величиною, але оператори імпульсу і кутового моменту в квантовій

механіці є уявними величинами і тільки значення $|w|^2$ пов'язане з постійною спостережуваною швидкістю. Розрахункове значення $|w| = 77 \text{ см}^{-1}$ для механізму переносу електронів Фетцнера та ін. [18, 23, 24] забезпечує константу швидкості переходу $T \rightarrow S$, яка більш ніж на три порядки перевищує швидкість для прямого механізму атаки O_2 [20] з незначним значенням COB ($|w| = 2,26 \text{ см}^{-1}$) для ТПМЕ між проміжними сполуками 3I_1 і 1I_1 .

Наші оцінки константи швидкості досить грубі і являють собою приблизно якісний характер [7, 25]. Слід розуміти, що РП в порожнині ферменту (рис. 3, б) слабо зв'язані, а радикал $O_2^{\cdot-}$ може виконувати загальмовані обертання, перешкоджати руховим і лібраційним рухам, а також іншим міжмолекулярним коливанням. Густину ровібронних станів, зважених факторами Франка-Кондона для $T \rightarrow S$ переходу [3], досить важко оцінити для реального активного центру ферменту. Обертання малого двоатомного $O_2^{\cdot-}$ радикала в порожнині ферменту є дуже важливим фактором для належної оцінки COB інтегралу $|w|$ в стаціонарному рівнянні Шредінгера і в динамічному підході до константи швидкості; вище вказане значення (77 см^{-1}) відповідає ідеальному перетину енергії $T \rightarrow S$ станів з різними комбінаціями обертальних квантових чисел [3, 7].

Що стосується спінового перевороту в радикальній парі (рис. 3, б), то він здійснюється за допомогою $T \rightarrow S$ переходу з швидкою релаксацією до інтермедіату 1I_1 . Тому наступні реакції схеми 1 в синглетному стані мають низькі енергії активації, як вірно пораховано в роботі [22] і протікають швидко. Таким чином, механізм Фетцнер та ін. [18, 22–24], здається, набагато надійнішим, ніж **схема 1**, що ґрунтується на утворенні інтермедіату 3I_1 (рис. 3, а), що є результатом прямого додавання O_2 до атома вуглецю C_2 субстрату MHQ [22]. Ця реакція повільна і не призводить до будь-яких результатів.

3.4. Інші ферменти вільні від кофактору

П. Сілва також обчислив деякі інші кофактор-вільні ферменти: урат оксидази та копропорфіриноген оксидази, HOD і вітамін К-залежні карбоксилази [23]. Розрахунки по методам ТФГ всіх цих кофактор-незалежних ферментів свідчать про те, що досліджені каталітичні реакції протікають через перенесення електрона з депротонованих субстратів на кисень, як у формулі (6), за яким йде $T \rightarrow S$ перехід у радикальній парі типу $S^{\cdot-}-O_2^{\cdot-}$. Цей режим ферментативної активації O_2 дуже поширений і надійний, оскільки наступна хімія синглетного стану (до співвідношення продуктів) добре відтворюється за допомогою загальних підходів ТФГ [22]. В посил. [23] прямий розрахунок COB у таких РП для копропорфіриноген оксидази забезпечував значення

інтегралу $|w|=77.45 \text{ см}^{-1}$ для $T \rightarrow S$ переходу, що є дуже близьким до нашої оцінки [2, 3].

Точне розташування ТПМЕ між проміжними продуктами 3I_1 і 1I_1 (рис. 3, а) може бути дещо різним для різних ферментів оксигенації, що розглядаються в роботі [23], для прямої атаки киснем на субстрат. У глютаматній карбоксилазі вітаміну К SOC інтеграл $|w|$ лежить між $12,7$ і $2,16 \text{ см}^{-1}$, залежно від того, чи проводиться пошук ТПМЕ в континуумі розчинника або в газовій фазі [23]. Цілком подібні результати отримані в даній роботі та в роботі [26] для ферменту HOD. Хоча ці точки перетину лежать у досить різних частинах поверхні глобальної потенційної енергії і відрізняються відстанню O_2 до субстрату у вітаміні К-залежної карбоксилази ($1,55$ та $1,84 \text{ \AA}$), вони все ще відповідають первинній O_2 -атаці на субстрат при утворенні діоксетану [23]. В обох випадках первинний ковалентний зв'язок між O_2 і субстратом передбачає значне гасіння максимально можливої спін-орбітальної взаємодії ($|w| = 77 \text{ см}^{-1}$), яка відбувається в радикальній парі типу, наведеної у формулі (6). Будь-яке ковалентне зв'язування між O_2 і субстратом створить структурний мотив $R-OO$ фрагмента з великим енергетичним розривом для станів $^2A'$ і $2A''$ в радикалі пероксиду; ефективна точка перетину з великим COB може бути досягнута тільки у випадку дисоціації зв'язків $R-OO$, тобто всередині радикальної пари $S^{\cdot-}-O_2^{\cdot-}$. Будь-яке квантово-хімічне моделювання МЕСР в бірадикалі (рис. 3, а), з врахуванням розчинника або без нього, не може передбачити найбільший інтеграл COB і буде обмежено значеннями $2-13 \text{ см}^{-1}$. Механізм радикальної пари (рис. 3, б) забезпечує набагато більш ефективну активацію кисню для перевороту спіна; це залежить тільки від донорної активності електрона відновленого субстрату. Така активація O_2 органічним субстратом сама по собі є аналогом реакції відновлених флавінів з киснем [1–7]. Прямого доказу для цієї гіпотези бракувало до недавнього часу [21, 31]. Представлені розрахунки COB вказують на те, що механізм запропонований в роботах [20, 21] є ефективним в кофактор-незалежних діоксигеназах.

Цікавий приклад примінення теорії [2, 5] було одержано нещодавно [25]. Баас та ін. [25] визначили монооксигеназу RhCC з бактерій *Rhodococcus jostii* RHA1, яка також функціонує без кофактора. Цей фермент має трьохвимірну структуру, пов'язану з родиною таутомерази, що належить до структурного β - α - β білкового каркасу (перша монооксигеназа, що ідентифікована в цій родині) [31]. RhCC використовує 4-гідроксифеніленолпируват (4HPP) в якості субстрату і виробляється в процесі складного каталітичного оксигенлізу 3-гідрокси-3-

(4-гідроксифеніл)–піруват, 4-гідрокси-бензальдегід і щавлеву кислоту в якості основних продуктів. Всі вони є результатами розкладу гідропероксидного проміжного продукту (Схема 2).

Перший етап каталізу включає утворення аніона субстрату (4НРР⁻) через депротонування, індуковане основою (В:).

Таким чином, такий самий субстратний каталіз є загальним явищем у вільних від кофакторів оксигеназах [31], що призводить до одержання проміжної радикальної пари (4НРР⁺ ••• O₂⁻), коли кисень надходить до активної частини (схема 2). Остання РП забезпечує ефективний триплет–синглетний перехід за механізмом SOC, аналогічну рівнянню (4): замість радикалу флавіну Fln [↑]^{*} потрібно поміщати 4НРР⁺ катіон–радикал. Один і той же інтеграл СОВ ($|w| = 77 \text{ см}^{-1}$) буде стимулювати ефективний T→S перехід спіна всередині супероксидного аніона, незалежно від будь-якого характеру кофактора або субстрату. Баас та ін. [25] – перші практичні біохіміки, які використовували нашу схему супероксидних орбіталей з посилення. [5], що є аналогом рівняння (4) і до тих схем СОВ, які представлені в наших старих роботах по оксидазам і гасінню синглетного кисню [2, 3, 30]. Ідея включити різні орбітальні структури для T і S–станів зв'язаної радикальної пари, (4), вперше введена в теорію гасіння синглетного ¹Δ_g кисню амінами [30], що добре узгоджується з численними експериментами [1, 33]. Таким чином, механізм СОВ заснований на орбітальній і спіновій симетрії (4) надає дуже загальні застосування в біохімії окисно–відновних процесів з активацією кисню.

Висновки. Механістична концепція Фетцнера та ін. для кофактор–вільного ферменту HOD заснована на перенесенні електрона від відновленого субстрату S і утворення радикальної пари S[•]–O₂⁻ [20, 21]; вона запозичена з теорії Мессі, пов'язаної з флавінозалежною оксигенацією [7]. Характер рушійної сили для перевертання спіна в цій

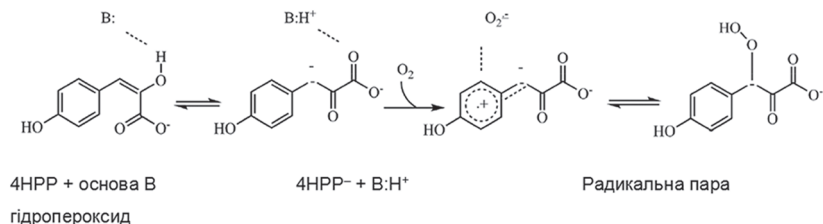


Схема 2. RhCC–каталізоване окиснення субстрату 4НРР, згідно роботи [25]

радикальній парі пояснюється у рівнянні (4). Альтернативний підхід базується на прямій атаці кисню на субстрат [22]. Але рушійна сила перевертання спіна, яка є вирішальним моментом у всіх теоріях активації оксигеназ і оксидаз киснем, не розглядалася в роботі [22]. В нашій роботі знайдена точка мінімального перетину енергії між триплетним і синглетним станами бірадикального інтермедиату ³I₁ (рис. 3, а) і матричний елемент спін–орбітальної взаємодії визначений незначним для неї. Ці результати забезпечують додатковий внесок в концепт електронного переносу [20, 21], що добре узгоджується з розрахунками [23]. Вони скасовують роль механізму прямої O₂ атаки, але розрахунок по методу ТФГ шляху реакції синглетного стану [22] залишається дуже корисним. Таким чином, загальна теорія спін–орбітального зв'язку у флавінвмісній і кофакторно–незалежній оксигенації, обговорюваний тут із застосуванням бактеріальної діоксигенази HOD, пропонує істотне доповнення до старої теорії активації кисню на основі зв'язування O₂ глюкозооксидазою [2, 3] і гемоглобіном [5].

Перспективи подальших досліджень. Наша теорія вперше надає фізично обґрунтований механізм перевертання спіна в ферментах оксигеназ, як маючих, – так і не маючих кофактора. Це відкриває широкі перспективи для цілеспрямованого впливу на функціонування цих оксигеназ як *in vitro*, так і *in vivo*, для розробки лікарських препаратів та фізіотерапевтичних методів лікування відповідних захворювань, пов'язаних з порушеннями метаболічних процесів, які каталізуються оксигеназами.

References

1. Minaev BF. Electronic mechanisms of molecular oxygen activation. *Russian Chemical Review*. 2007; 76(11): 988–1010. PMID: 15040259. DOI: 10.1038/nrmicro821
2. Minaev BF. Spin effects in reductive activation of O₂ by oxidase enzymes. *RIKEN Review*. Tokyo. 2002; 44: 147–9.
3. Prabhakar R, Siegbahn PEM, Minaev BF, Agren H. Activation of triplet dioxygen by glucose oxidase: spin–orbit coupling in superoxide ion. *Journal of Physical Chemistry*. B. 2002; 106(14): 3742–50. DOI: 10.1021/jp014013q
4. Minaev BF. Electronic mechanisms of molecular oxygen bioactivation. *Ukrainsky Biokhimichnyi Zhurnal*. 2002; 74(3): 11–9. [Russian]
5. Minaev BF, Minaeva VA. Spin–dependent binding of dioxygen to heme and charge–transfer mechanism of spin–orbit coupling enhancement. *Ukrainica Bioorganica Acta*. 2008; 2(1): 56–64.

6. Minaev BF, Minaeva VO, Agren H. Spin-orbit coupling in enzymatic reactions and the role of spin in biochemistry. In: Leszczynski J, editor. *Handbook of Computational Chemistry*. Springer Netherlands. 2017; 1557–87. Doi: 10.1007/978-3-319-27282-5_29
7. Massey V. Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269(36): 22459–62. PMID: 8077188
8. Zavorodnia VA, Kovalenko SO, Minaev BF. Interaction of myoglobin model with ligands of gas exchange. *Cherkasy University Bulletin: Biological Sciences Series*. 2019; 1: 13–23. DOI: 10.31651/2076-5835-2018-1-2019-1-13-23
9. Romero E, Castellanos JRG, Gadda G, Marco W, Fraaije MW, Mattevi A. Same substrate, many reactions: Oxygen activation in flavoenzymes. *Chemical Review*. 2018; 118: 1742–69. PMID: 29323892. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00650
10. Mittler R. ROS are good. *Trends in Plant Science*. 2017; 22(1): 11–8. PMID: 27666517. doi: 10.1016/j.tplants.2016.08.002
11. Ortega-Villasante C, Burén S, Blázquez-Castro A, Barón-Sola Á, Hernández LE. Fluorescent in vivo imaging of reactive oxygen species and redox potential in plants. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2018; 122: 202–20. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.005
12. Mulliken RS. The assignment of quantum numbers for electrons in molecules. *Physical Review*. 1928; 32: 186–99. Doi: 10.1002/qua.560010106
13. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, et al. *Gaussian 09, Revision D.01*. Gaussian Inc., Wallingford CT; 2009.
14. Granovsky AA. Extended multi-configuration quasi-degenerate perturbation theory: the new approach to multi-state multi-reference perturbation theory. *Journal of Chemical Physics*. 2011; 134(21): 214113. Doi: 10.1063/1.3596699
15. Granovsky AA. Firefly 8.0.0. system of codes. 2013. Available from: <http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index/html>
16. Harvey JN, Aschi M, Schwarz H, Koch W. The singlet and triplet states of phenyl cation. A hybrid approach for locating minimum energy crossing points between non-interacting potential energy surfaces. *Theoretical Chemistry Accounts*. 1998; 99(2): 95–99. DOI: 10.1007/s002140050309
17. Salikhov KM, Molin YuN, Sagdeev RZ, Buchachenko AL. *Spin polarization and magnetic effects in radical reactions*. Elsevier Amsterdam–Budapest: Akademiai Kiado; 1984. 419 p.
18. Salem L. *Electrons in chemical reactions: First principles. A Wiley-Interscience publication*. New York, Brisbane, Toronto, Singapore; 1982. 159–167. 286 p. Doi: 10.1002/ange.19830950732
19. Minaev BF, Lunnell S. Classification of spin-orbit coupling effects in organic chemical reactions. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*. 1993; 182: 263–75. DOI: 10.1524/zpch.1993.182.Part_1_2.263
20. Steiner RA, Janssen HJ, Roversi P, Oakley AJ, Fetzner S. Structural basis for cofactor-independent dioxygenation of N-heteroaromatic compounds at the alpha/beta-hydrolase fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2010; 107(2): 657–62. PMID: 20080731. PMCID: PMC2818892. doi: 10.1073/pnas.0909033107
21. Thierbach S, Bui N, Zapp J, Chhabra SR, Kappl R, Fetzner S. Substrate-assisted O₂ activation in a cofactor-independent dioxygenase. *Chemical Biology* 2014; 21(2): 217–25. doi: 10.1016/j.chembiol.2013.11.013
22. Hernández-Ortega A, Quesne MG, Bui S, Heyes DJ, Steiner RA, Scrutton NS, de Visser SP. Catalytic mechanism of cofactor-free dioxygenases and how they circumvent spin forbidden oxygenation of their substrates. *Journal of American Chemical Society*. 2015; 137(23): 7474–87. DOI: 10.1021/jacs.5b03836
23. Silva PJ. Refining the reaction mechanism of O₂ towards its co-substrate in cofactor-free dioxygenases. *Peer J*. 2016; 4: e2805–e2813. PMID: 28028471. PMCID: PMC5178339. doi 10.7717/peerj.2805
24. Prabhakar R, Siegbahn PE, Minaev BF. A theoretical study of the dioxygen activation by glucose oxidase and copper amine oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics*. 2003; 1647(1–2): 173–8. doi: 10.1016/S1570-9639(03)00090-6
25. Baas BJ, Poddar H, Geertsema EM, Rozeboom HJ, de Vries MP, Permentier HP, Thunnissen AM, Poelarends GJ. Functional and structural characterization of an unusual cofactor-independent oxygenase. *Biochemistry*. 2015; 54(5): 1219–32. doi: 10.1021/bi501200j
26. Minaev BF, Valiev RR. Spin-orbit coupling effects in O₂ activation by cofactor-independent 2,4-dioxygenase. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2019; 91(1): 38–46. doi: 10.15407/ubj91.01.038
27. Minaev BF. How cofactor-free oxygenases can overcome spin prohibition in substrates oxygenation by dioxygen. *Chemical Physics*. 2019; 251: 61–8. doi: 10.1016/j.chemphys.2019.01.021
28. Minaev BF, Terpugova AF. Spin-orbit interaction in charge-transfer complexes. *Soviet Physics Journal*. 1969; 12(10): 1260–3.
29. Minaev BF, Minaeva VA. MCSCF response calculations of the excited states properties of the O₂ molecule and a part of its spectrum. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2001; 3(5): 720–9. DOI: 10.1039/B006712L
30. Minaev BF. Spin-orbit coupling of charge-transfer states and the mechanism for quenching singlet oxygen by amines. *Theoretical and Experimental Chemistry*. 1984; 20(2): 209–12.
31. Bui S, Steiner RA. New insight into cofactor-free oxygenation from combined experimental and computational approaches. *Current Opinion in Structural Biology*. 2016; 41: 109–18. Doi: 10.1016/j.sbi.2016.06.015

32. Visitsathawong S, Chenprakhon P, Chaiyen P, Surawatanawong P. Mechanism of Oxygen Activation in a Flavin-Dependent Monooxygenase: A Nearly Barrierless Formation of C4a-Hydroperoxyflavin via Proton-Coupled Electron Transfer. *Journal of the American Chemical Society*. 2015; 137(29): 9363–74. doi: 10.1021/jacs.5b04328
33. Bregnhøj M, Westberg M, Minaev BF, Ogilby PR. Singlet Oxygen Photophysics in Liquid Solvents: Converging on a Unified Picture. *Accounts Chemical Research*. 2017; 50: 1920–7. doi: 10.1021/acs.accounts.7b00169.

УДК 577.115+577.122;

**СПИН-КАТАЛИЗ ОКИСЛЕНИЯ НЕНАСЫЩЕННЫХ СУБСТРАТОВ
МОНО- И ДИ-ОКСИГЕНАЗАМИ, СВОБОДНЫМИ ОТ КОФАКТОРА.
КАК ТРИПЛЕТНЫЙ КИСЛОРОД МОЖЕТ ПРЕОДОЛЕТЬ СПИНОВЫЙ ЗАПРЕТ**

Минаев Б. П., Панченко А. А.

Резюме. Кислород воздуха – это молекула O_2 в основном триплетном состоянии, которая не может из-за запрета по спину вступать в реакции с органическими веществами. Последние всегда имеют четное число электронов со спаренными спинами и являются диамагнитными (имеют полный спин равный нулю и синглетное основное состояние). Поэтому реакции органических веществ с кислородом при нормальных условиях запрещены по спину. Оксидазы и оксигеназы могут активировать триплетную молекулу O_2 , которая пребывает в основном состоянии, для контролируемого химического синтеза, инициированного процессом переноса электрона, что приводит к восстановлению кислорода и получению ион-радикала супероксида. Как правило, эти ферменты используют органический кофактор, либо парамагнитный ион металла, чтобы инициировать активацию кислорода и преодолеть спиновый запрет для реакций триплетной молекулы O_2 . В последнее время найдены ряд моно- и диоксигеназ, которые могут функционировать даже при отсутствии какого-либо кофактора. Анализ спин-орбитального взаимодействия в таких ферментах помогает разгадать некоторые трудно-разрешимые загадки механизма активации кислорода и пояснить, почему ароматический субстрат действует вместо кофактора. В работе показано, что общий атрибут всех таких ферментов, анион-радикал супероксида $O_2^{\cdot-}$, даёт хорошую возможность индуцировать триплет-синглетный квантовый переход в активном центре оксигеназы за счет внутренних магнитных возмущений в частице $O_2^{\cdot-}$ и выполнять переворот спина, как обычный способ преодоления спинового запрета при биохимической активации кислорода. Движущей силой переворота спина является спин-орбитальное взаимодействие внутри аниона супероксида, которое не зависит от партнера радикальной пары $M^{\cdot+} \dots O_2^{\cdot-}$ (где M – кофактор или субстрат); при этом π-делокализованная электронная оболочка субстрата способна отдавать электрон на кислород и может работать вместо кофактора, подобного флавины или птерины. До сих пор в биохимии ферментов окисления использовалась модель Мессе для спиновой конверсии в радикальной паре, где M – восстановленный флавин в растворе. Механизм конверсии при этом никак не обсуждался. Наша теория даёт впервые физически обоснованный механизм переворота спина в ферментах оксигеназ, как имеющих, – так и не имеющих кофактор. Это открывает широкие перспективы для целенаправленного воздействия на функционирование этих оксигеназ как *in vitro*, так и *in vivo*, для разработки лекарств и физиотерапевтических методов лечения соответствующих заболеваний, связанных с нарушением метаболических процессов, катализируемых оксигеназами.

Ключевые слова: активация кислорода, глюкозооксидаза, монооксигеназы, диоксигеназа свободные от кофактора, электронный спин, супероксид анион радикал, спин-орбитальное взаимодействие, биология.

UDC 577.115+577.122;

**Spin-catalysis of Unsaturated Substrates Oxidation by Cofactor-free
Mono- and Di-oxygenases. How Triplet Oxygen Can Overcome Spin Prohibition**
Minaev B. F., Panchenko A. A.

Abstract. Oxygen from the air is O_2 molecule in the ground triplet state, which can not react because of spin prohibition with organic substances. The late always have even number of electrons with paired spins and are diamagnetic (they have total spin equal to zero and the singlet ground state). That is why reactions of organic substances with oxygen are spin forbidden. Oxidases and oxygenases can activate the triplet O_2 molecule which is in the ground state for the controlled chemical synthesis initiated by electron transfer, which leads to oxygen reduction and formation of superoxide ion-radical. As a rule, these enzymes use organic cofactor or paramagnetic metal ion in order to initiate oxygen activation and to overcome spin prohibition for the triplet O_2 reactions. A number of mono- and di-oxygenases are found recently which can operate even in the absence of any cofactor.

Analysis of spin-orbit coupling in such enzymes assists to unravel some puzzles of reaction mechanisms and to explain why aromatic substrate operates instead cofactor. In the present work we have shown that the common attribute of all such enzymes – superoxide anion radical $O_2^{\cdot-}$ – implements a good opportunity to induce the triplet-singlet quantum transition in the active center of oxygenase due to internal magnetic perturbations in the $O_2^{\cdot-}$ species and provides a spin flip being a common trick in order to overcome spin prohibition for biochemical oxygen activation. Driving force for such spin flip is spin-orbit coupling inside the superoxide ion radical, which is independent of the organic partner in the radical pair $M^{\cdot+} \dots O_2^{\cdot-}$ (where M – is a cofactor or substrate). At the same time the π -delocalized electronic shell of substrate is able to give up an electron to oxygen and to work instead of cofactor like flavin or pterin.

Thus, the substrate with a long π -delocalized conjugation chain can successfully imitate typical cofactor; its main destination is to provide electron transfer to oxygen. We showed that neither cofactor nor substrate contributed into spin-orbit coupling matrix element which governed the triplet-singlet transition rate constant in the radical pair $M^{\cdot+} \dots O_2^{\cdot-}$ of the enzyme active center. In the biochemistry of oxidative enzymes the Vincent Massey's model for spin conversion was widely used for radical pairs, where M was reduced flavin in solvent. The driving force for the spin conversion has never been discussed in the model of Massey. Our theory of spin-orbit coupling in superoxide ion provides the first well-grounded physical mechanism for spin flip in oxidative enzymes. Understanding of driving force for triplet-singlet transition in oxygen activation by oxygenases and oxidases opens new perspectives in medicine and practical biology.

Keywords: oxygen activation, glucose oxidase, monooxygenases, cofactor-free dioxygenases, electron spin, superoxide anion radical, spin-orbital interaction, biology.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 07.08.2019 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування