

УДК 577.1

РАДИКАЛЫ В СТРУКТУРАХ КЛЕТКИ

© 2020 г. Ю.А. Шаповалов*, П.П. Гладышев**, С.Т. Тулеуханов*,
Е.В. Швецова*, Ж.Т. Абдрасулова*

*Казахский национальный университет им. аль-Фараби,
050040, Алматы, просп. аль-Фараби, 71, Республика Казахстан

**Государственный университет «Дубна», 141982, Дубна Московской области, ул. Университетская, 19

E-mail: yu.shapovalov@mail.ru

Поступила в редакцию 05.12.2019 г.

После доработки 18.02.2020 г.

Принята к публикации 25.05.2020 г.

Рассмотрено участие природных радикалов в одноэлектронных процессах жизнедеятельности клеток. Показано, что коферменты, имея промежуточные свободно-радикальные хиноидные и семихиноидные формы, могут взаимодействовать с каротиноидами, образуя комплексы с переносом заряда с полосой поглощения 1030 нм. При этом комплекс может выполнять активную светособирающую функцию при фотосинтезе вплоть до 1100 нм с передачей энергии от хлорофиллов *a* и *b* на комплекс. Исследования сорбции фермент-кофакторной системы «алкогольдегидрогеназа–никотинамидадениндинуклеотид» на гидрофобном электропроводном носителе показали, что максимальная активность фермент-кофакторной системы проявляется при последовательной сорбции кофермента, а затем апофермента. Важную роль играет ориентация биокаталитической системы на матрице иммобилизации.

Ключевые слова: радикалы, коферменты, каротиноиды, комплекс с переносом заряда, сорбция, иммобилизация.

DOI: 10.31857/S0006302920040092

Известно, что к радикалам относят атомы или молекулы, имеющие неспаренный электрон, который определяет их высокую нестабильность и активность, связанную со стремлением радикалов захватить или отдать лишний электрон. В биологических объектах различают природные и чужеродные радикалы. Известно, что чужеродные радикалы на основе кислорода образуются в результате физического или химического воздействия на клетки живых организмов. Радикалы повреждают аминокислоты и белки, дезорганизуют клеточные структуры и биологические мембраны. Доказана роль чужеродных свободных радикалов в развитии таких болезней, как рак, атеросклероз, инфаркт миокарда, инсульт, ишемия; заболеваний нервной и иммунной систем, легких, печени, почек, крови, кожи; также они вызывают преждевременное старение [1, 2].

Для снижения агрессивного влияния радикалов на организм человека и животных в биологических объектах имеются специализированные ферментные системы, а также природные биоорганические соединения и синтетические соеди-

нения антиоксидантной защиты для нейтрализации радикалов. Роль антиоксидантной защиты выполняют биокатализаторы: супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионзависимая пероксидаза, трансфераза, которые понижают негативное воздействие радикалов путем удаления перекисных соединений. В настоящее время выделено большое число фенольных соединений, которые обладают антиоксидантными свойствами, например, витамины E (α -токоферол), K₁ (филлохинон) и K₂ (менахинон), убихиноны, триптофан, фенилаланин, а также значительное количество растительных и животных пигментов: каротиноиды, флавоноиды, фенолкарбоксильные кислоты [3]. Механизм антиоксидантной защиты сводится к их взаимодействию со свободными радикалами и превращению последних в неактивные молекулы, обеспечивая таким образом обрыв цепи свободнорадикального окисления.

В отличие от чужеродных радикалов, в живых системах преобладают природные радикалы [4], которые образуются в результате ферментативных реакций и выполняют ключевую роль в процессах жизнедеятельности клеток: в реакциях биосинтеза, окислительного фосфорилирования, регуляции липидного обмена, процессах митоза,

Сокращения: ADH — алкогольдегидрогеназа, LDH — лактатдегидрогеназа.

метаболизма и др. Ежедневно каждая клетка генерирует миллионы соединений, обладающих естественной радикальной природой, которые участвуют в жизненно важных одноэлектронных биохимических процессах, связанных с отдачей или приобретением электронов. Существенную роль в радикальных окислительно-восстановительных реакциях клетки выполняют коферменты NAD, NADP, FAD, FMN, CoQ и др., которые являются акцепторами электронов для одной группы ферментов в полиферментном комплексе и донорами для другой. Коферменты способны образовывать промежуточные радикальные структуры и комплексы с переносом заряда в биологических мембранах, обеспечивая перенос энергии и транспорт электронов. При этом восстановление и окисление метаболитов сопровождается циклической ферментативной регенерацией коферментов. Основными из ряда переносчиков redox-эквивалентов (протонов и электронов) в клетках являются коферменты NAD, NADP, FAD, FMN, CoQ. Установлено, что в молекулах NAD и NADP в каталитическом акте участвует никотинамидный нуклеотид. Во многих биохимических redox-реакциях никотинамидный нуклеотид NAD и NADP восстанавливается либо окисляется с присоединением или отдачей электронов и протонов. Реакция протекает через две одноэлектронные стадии, образуя промежуточный свободный радикал NAD•.

Коферменты FAD, FMN, а также их предшественник рибофлавин (витамин B₂) имеют изоаллоксазиновую гетероциклическую систему, участвующую в окислительно-восстановительных ферментативных процессах. Восстановление изоаллоксазинового кольца протекает в две стадии. На первой в результате переноса электрона образуется свободный радикал семихинон, который затем присоединяет второй электрон, переходя в восстановленную форму кофермента.

Отличительным признаком FAD по отношению к FMN является наличие дополнительной гетероциклической системы — аденина, присоединенного к изоаллоксазиновому нуклеотиду гибкой пирофосфатной цепью. Исследования флюоресценции FAD показали, что в водных растворах изоаллоксазиновый и адениновый нуклеотиды кофермента располагаются параллельно друг другу, вследствие чего наблюдается сильное тушение флюоресценции кофермента. Это стало основанием для предположения об образовании комплексов с переносом заряда между адениновым и изоаллоксазиновым нуклеотидами [5]. Существование комплексов с переносом заряда в FAD объясняют гидрофобным взаимодействием нуклеотидов и их параллельным расположением в молекуле.

Важнейшая роль в транспорте окислительно-восстановительных эквивалентов в мембранах митохондрии и хлоропластах отводится мобильному небелковому переносчику — убихинону (коферменту Q₆ и Q₁₀). Убихинон (CoQ) имеет структуру хинона, он широко распространен в митохондриальной мембране. Известно, что железо-серные центры биокатализаторов передают электроны коферменту Q. В процессе восстановления кофермент Q изменяет свою химическую структуру через форму свободного радикала — семихинона [6]. Принимая при этом один электрон, убихинон приобретает радикальную форму коэнзима Q, образуя полувосстановленную форму — убисемихинон-радикал. Второй электрон переводит этот радикал в полностью восстановленный гидрохинон.

На основании вышеизложенного можно заключить, что коферменты в клетках образуют высокоактивные промежуточные свободные радикалы в виде хиноидов и семихинонов, которые участвуют в ферментативных окислительно-восстановительных реакциях. Приобретая электрон и протон от субстрата, кофермент восстанавливается и, обратно, при отдаче электрона и протона наблюдается его окисление. Перенос энергии и электронов в фермент-кофакторный комплекс возможен через систему образования комплексов с переносом заряда.

В работе рассматриваются вопросы о роли природных радикалов коферментов в окислительно-восстановительных биокаталитических реакциях и в процессах, связанных с переносом энергии и электронов в активный центр оксидоредуктаз с участием липидо-каротиноидной структуры клетки. Приводятся данные по ориентации оксидоредуктаз: алкогольдегидрогеназы (ADH) и лактатдегидрогеназы (LDH) на электропроводном обратнофазовом сорбенте, моделирующем гидрофобный монослой биологической мембраны.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментальной работе использовали фермент алкогольдегидрогеназу (КФ 1.1.1.1) из печени лошади, коферменты — динатриевую соль восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (NADH-Na₂) 80%-й чистоты с молекулярной массой 709,43 и окисленный никотинамидадениндинуклеотид (NAD⁺) 85%-й чистоты с молекулярной массой 663,45 (Merck, США). Дополнительную очистку ADH и кофермента NAD осуществляли, используя карбоксиметил- и ДЭАЭ-целлюлозу, а также сефадексы G-10 и G-200 (Pharmacia, Швеция). Также в работе использовали β-каротин; кардиолипин и ликопин (Sigma, США). Для получения обратнофазового сорбента применяли линолевую, линоленовую и

олеиновую кислоты, глицерин, трех- и пятихлористый фосфор, хлористый тионил, N,N-диметилформамид, пиридин, одно- и двухзамещенный фосфат натрия, хлорид натрия, этанол, лактальдегид, хлороформ, четыреххлористый углерод, бикарбонат натрия, азотную и серную кислоты, гидрат окиси натрия. Все реактивы — производства компании «Химмед» (Россия), имели квалификацию «х.ч.».

Количество фермента и кофермента определяли на спектрофотометре СФ-56 («ЛОМО», Россия). При препаративной очистке использовали жидкостной хроматограф Agilent 1260 Infinity Preparative Scale (Agilent, США). Удельную поверхность сорбентов определяли, используя Surfer Gas Adsorption Porosimeter (Thermo Scientific, Италия). Экспериментальные исследования образования комплекса с переносом заряда между β -каротином и кардиолипином или лецитином осуществляли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре Specord 200 Plus (Analytik Jena, Germany), формирование мицелл или липосом проводили с помощью ультразвукового гомогенизатора Sonopuls HD 2070 (Bandelin, Германия). В электрохимических исследованиях использовали потенциостат-гальваностат Р-20Х («Electrochemical Instruments», Черноголовка Московской области). Буферные растворы и смеси прокачивали через проточные спектрофотометрические и электрохимические ячейки перистальтическими насосами Zalimp-305 и Unipan-304 (Польша). Очистку и выделение ферментов и коферментов проводили на центрифуге К-24 (MLW, Германия).

Получение обратнофазового сорбента. Размеленный спектральный уголь фракционировали, используя лабораторные сита. Фракцию с размерами частиц 0.2–0.3 мм обрабатывали концентрированной азотной кислотой в колбе с обратным холодильником. Окисление проводили при температуре кипения кислоты в течение 6 ч с постоянным перемешиванием. Затем сорбент отделяли от раствора и многократно промывали дистиллированной водой до отсутствия кислой реакции. Отмытый носитель высушивали при 120°C. Полученный карбоксилированный уголь включал поликарбоновые кислоты, в частности меллитовую кислоту, прочно удерживаемую сорбентом в водных растворах при pH 1.0–8.0. Для получения углеродного носителя, не содержащего сорбированных поликарбоновых кислот, обработанный уголь экстрагировали 96%-м этиловым спиртом в аппарате Сокслета. Контроль за степенью отмывки носителя осуществляли спектрофотометрически в интервале длин волн 200–350 нм. Сорбент фильтровали и промывали дистиллированной водой с последующей обработкой 0.1 н раствора гидроокиси натрия при температуре 96°C в течение 1 ч. Полученный носитель тща-

тельно отмывали водой и высушивали. Окисленный уголь активировали треххлористым фосфором при 20°C в течение 5–6 ч при периодическом перемешивании, а затем отмывали обезвоженным четыреххлористым углеродом или хлороформом.

Связывание глицерина осуществляли по следующей методике. К 10 г активированного сорбента приливали смесь обезвоженного глицерина (1 мл), N,N-диметилформамида (2 мл), хлороформа (15 мл) и пиридина (5 мл). Смесь перемешивали при 20°C в течение 2 ч. Раствор сливали, а носитель последовательно промывали на фильтре Шотта хлороформом, серным эфиром, 0.5 н серной кислотой, 5%-м раствором бикарбоната натрия и дистиллированной водой, затем высушивали.

Получение хлорангидридов жирных кислот. В трехгорлую колбу емкостью 100 мл с обратным холодильником приливали 10 мл охлажденной смеси олеиновой и линолевой кислот (1 : 1.25). В эту смесь по каплям в течение 3 ч при перемешивании добавляли 22 мл свежеперегнанного тионилхлорида, охлаждая реакцию холодной проточной водой. По завершении реакции избыток тионилхлорида отгоняли при 75–80°C, а продукт очищали перегонкой при 136°C и давлении 1.5–2.0 мм рт. ст.

Связывание хлорангидридов жирных кислот с модифицированными носителями. В круглодонную колбу помещали 5 мл хлорангидридов жирных кислот и 45 мл хлороформа, не содержащего воды, затем добавляли 20 г углеродного сорбента с «пришитым» глицерином, после чего раствор с сорбентом перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Выделяющийся в процессе реакции газообразный хлористый водород удаляли, используя водоструйный насос; растворитель отделяли на фильтре Шотта, а сорбент промывали хлороформом в аппарате Сокслета. Контроль за степенью отмывки обратнофазового сорбента осуществляли спектрофотометрически в интервале длин волн 200–350 нм. Носитель отмывали дистиллированной водой, высушивали и использовали для исследований сорбции кофермента НАД и фермента АДН.

Сорбция кофермента NAD и апофермента алкогольдегидрогеназы. Сорбцию очищенных апофермента и кофермента изучали в термостатируемых ячейках при $25.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ при постоянном перемешивании магнитной мешалкой со скоростью 600 об/мин. Величина навески носителя (на абсолютно сухой вес) была равна 0.1000 г, пределы исходных концентраций белка и кофермента составили $2.4 \cdot 10^{-6}$ – $7.3 \cdot 10^{-6}$ М и $4.5 \cdot 10^{-5}$ – $5.6 \cdot 10^{-4}$ М соответственно. Для каждого опыта брали по 5 мл исследуемых растворов, пробы на анализ отбирали в течение 1–2 с, а их объем как правило не пре-

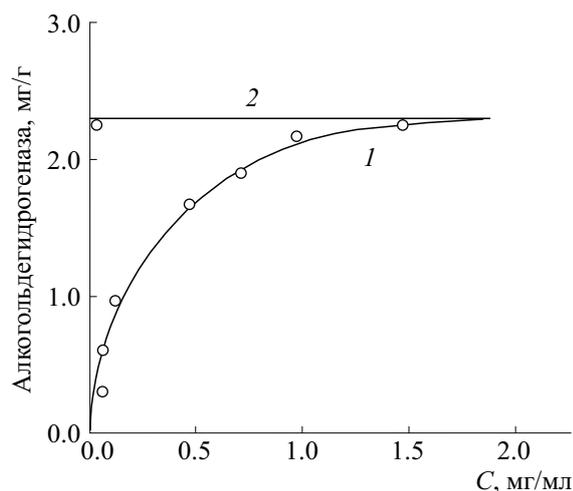


Рис. 1. Изохрона сорбции АДН на гидрофобонизированном угле: 1 — сорбционная ветвь, 2 — десорбционная ветвь. Условия эксперимента: навеска 0.1 г, концентрация буферного раствора 0.015 М, объем 5.1 мл, скорость перемешивания 600 об/мин, температура 25°C.

вышал 10% от начального объема раствора. Концентрацию АДН определяли флуоресцентным методом при $\lambda = 310$ нм, затем пробы возвращали обратно в ячейку. Концентрации окисленной и восстановленной форм NAD определяли при $\lambda = 260$ и 340 нм соответственно. Анализ осуществляли в кварцевой кювете объемом 0.5 мл. До проведения анализа проверяли соблюдение линейной зависимости флуоресценции, а также оптической плотности растворов NAD от концентрации в области рабочих концентраций. Количество сорбированного белка и кофермента определяли по разности исходного и оставшегося к моменту отбора пробы количества сорбата в растворе. Каждая точка на кривой являлась средним результатом трех-четырех экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Иммобилизация фермент-кофакторного комплекса АДН—NAD на модифицированных электропроводных углеродных носителях. Для иммобилизации фермент-кофакторной системы АДН—NAD был применен метод сорбционного связывания на угле с привитыми углеводородными цепями, моделирующими липидный монослой. Принимая во внимание предложенный метод иммобилизации, который заключался в последовательной сорбции кофермента и апофермента, проводили исследования сорбции каждого компонента ферментативной системы в отдельности. Образование фермент-кофакторного комплекса осуществляли по принципу «самосборки» из отдельных компонентов ферментативной системы. Для проведения исследований сорбционной им-

мобилизации NAD необходимо было экспериментально изучить кинетику сорбции, обратимость сорбционных процессов и, наконец, определить оптимальные условия осуществления иммобилизации.

Сорбция кофермента NAD на обратнофазовом углеродном сорбенте. Результаты кинетических исследований сорбции окисленной формы NAD^+ на гидрофобонизированном угле при интенсивном перемешивании показали, что сорбция завершается практически в течение 60 мин. Полученные изохроны сорбции свидетельствовали о необратимом характере сорбции NAD^+ на гидрофобонизированном угле. Обратные ветви изохрон указывали на прочную иммобилизацию кофермента и невозможность снятия его с сорбента раствором, в котором осуществляли сорбцию кофермента. Попытки десорбировать иммобилизованный NAD даже 4 М раствором хлористого натрия, а также при изменении pH раствора в диапазоне 5.0—9.0 не приводили к заметной десорбции кофермента, что указывало на гидрофобное взаимодействие кофермента на поверхности углеродного модифицированного носителя. Результаты проведенных исследований показали необратимый характер сорбции NAD на гидрофобном носителе, которую нельзя рассматривать с позиции равновесных представлений.

Сорбция апофермента АДН на обратнофазовом сорбенте. Аналогичные исследования сорбции были проведены для зависимого от кофермента NAD апофермента АДН. Сорбционная иммобилизация АДН на гидрофобной матрице осуществлялась за счет водородного, гидрофобного и электростатического взаимодействия. При этом не исключалась возможность многоточечного ориентированного контакта белковой глобулы с поверхностью матрицы сорбента. Для определения параметров иммобилизации АДН изучали кинетику сорбции фермента. Результаты сорбции фермента на гидрофобонизированном угле показали, что процесс сорбции протекает от одного до двух часов, не достигая равновесия. На неравновесный характер сорбции белка АДН на гидрофобонизированном угле указывало также несоответствие сорбционных и десорбционных ветвей изохроны (рис. 1). Сорбция белков на сорбентах зависит от pH раствора, свойств ионогенных групп ионита, ионной силы используемого фоновго раствора. В качестве буферных растворов при изучении влияния pH среды на сорбцию АДН мы использовали 0.015 М фосфатный буферный раствор с pH 6.0—8.4 и 0.015 М карбонатный буфер с pH 8.0—10.0. Выбор диапазона pH фоновго раствора при исследовании сорбции АА-изоформы АДН определялся устойчивостью фермента в этой области pH и проявляемой им максимальной ферментативной активности. Из-

вестно [7], что ниже pH 5.9 фермент инактивируется, а наибольшую активность AA-изоформа ADH проявляет при pH 10.0 [8]. Для гидрофобонизированного угля в этом диапазоне pH не отмечалось какого-либо изменения сорбции, что можно объяснить гидрофобной природой связывания фермента с носителем (рис. 2). Другим фактором, подтверждающим наличие многочисленных гидрофобных связей, является то, что при попытке десорбировать иммобилизованную ADH водными растворами сорбированный белок не удалось обнаружить в растворе, тогда как 50%-й раствор этанола легко и практически полностью десорбировал фермент. Сорбцию ADH проводили из 0.015 М фосфатного буферного раствора с pH 7.8 при перемешивании в течение 2 ч при концентрации ADH от $1.35 \cdot 10^{-7}$ до $1.08 \cdot 10^{-6}$ М растворов. Количество сорбированного апофермента находилось в пределах 1.0–3.0 мг/г. Каталитическая активность ферментативной системы оставалась практически неизменной при комнатной температуре в течение 180 ч.

Следует отметить, что при сорбции ADH на углеродных сорбентах, как и в случае кофермента существенную роль играют гидрофобные взаимодействия. Об этом свидетельствует прочное удержание фермента при высоких концентрациях хлористого натрия (вплоть до 2 М) в фосфатном буферном растворе, а также результаты десорбции фермента спиртом. С увеличением концентрации спирта до 50% десорбция фермента в результате разрушения гидрофобных связей растет. Дальнейшее увеличение концентрации спирта ведет к уменьшению десорбции, что, по-видимому, связано с противодействующим влиянием высаливающего эффекта. Значительная денатурация иммобилизованной ADH наблюдается при концентрации спирта выше 70%.

Формирование биокаталитического комплекса ADH–NAD на углеродном электропроводном носителе. Ввиду необратимости сорбционных процессов, следует ожидать влияния последовательности проведения сорбции компонентов на конечное состояние сорбционного комплекса системы и проявляемую им каталитическую активность. Экспериментально было изучено влияние последовательности сорбции на гидрофобонизированном угле ADH и NAD на активность иммобилизованной фермент-кофакторной системы. Сорбция фермента и кофермента осуществлялась в идентичных условиях при pH 7.8 из 0.015 М фосфатного буфера. Фермент сорбировали из раствора с концентрацией 3 мг/мл, а кофермент NADH – 0.79 мг/мл при соотношении сорбент : раствор, равном 1 : 10. Было установлено, что при «сборке» иммобилизованной фермент-кофакторной системы в последовательности NADH–ADH ко-

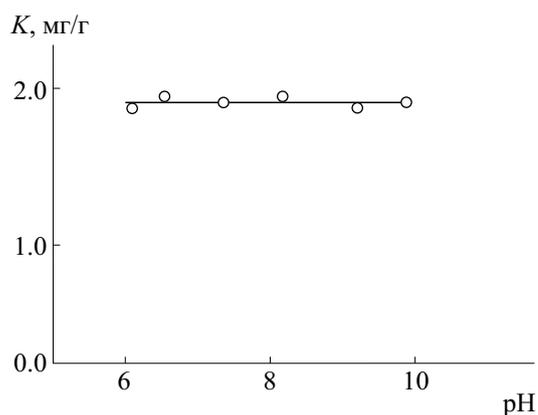


Рис. 2. Зависимость коэффициентов распределения ADH между гидрофобным углем и буферным раствором от pH.

личество сорбированного кофермента и фермента составляло 1.1 мг/г и 6.42 мг/г (массовое соотношение 1 : 6) соответственно, а удельная активность полученной системы – 0.012 Е/г. Для полученного массового соотношения возникает вопрос о структуре молекулярного комплекса ADH–NAD. Известно, что в комплексе на одну молекулу ADH, содержащую два активных центра, приходится две молекулы кофермента NAD. Из полученных экспериментальных данных можно рассчитать, что количество сорбированного кофермента на порядок больше его количества, необходимого для образования комплекса. При последовательной сорбции NAD, а затем ADH происходит перераспределение кофермента между сорбентом и активными центрами биокатализатора. В связи с последним часть молекул кофермента NAD оказывается в активном центре фермента, тогда как другая была сорбирована носителем. Таким образом, массовое соотношение не имеет прямого отношения к составу комплекса.

При сорбции фермент-кофакторной системы в последовательности ADH–NAD количество сорбированных кофермента и фермента соответствовало 0.50 и 3.56 мг/г, удельная активность составляла 0.0083 Е/г. Как видно из приведенных данных, активность системы, полученной по первому способу, примерно в полтора раза выше, чем по второму.

Повышенную активность систем, полученных при сорбции в последовательности NAD–ADH, нельзя однозначно объяснить стерическими особенностями иммобилизованного фермент-кофакторного комплекса, так как повышение активности может быть связано с повышением концентрации кофермента и фермента на поверхности носителя. Тем не менее из соображений стерического блокирования NAD в ката-

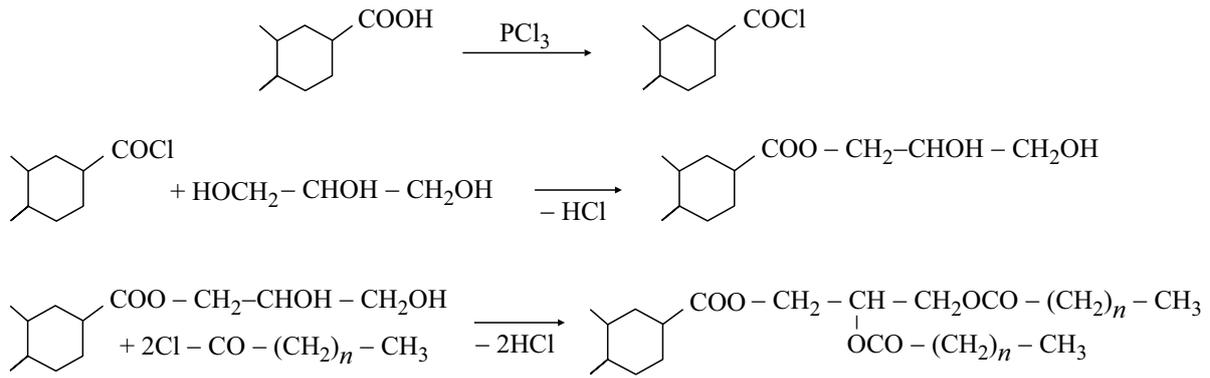


Рис. 3. Схема синтеза обратнофазового сорбента.

литической щели апофермента целесообразно осуществлять сначала сорбцию кофермента, а затем фермента. Различия в количествах сорбированных фермента и кофермента при изменении последовательности сорбции объясняются тем, что при предварительной сорбции NAD происходит существенное изменение свойств поверхности сорбента, в частности, увеличивается ее отрицательный заряд, что при pH 7.8 < pI 8.7 означает усиление электростатического взаимодействия положительно заряженного белка с сорбентом. Подобная модификация сорбента низкомолекулярными органическими соединениями (хотя и не ионного характера) широко используется на практике для ориентированной иммобилизации ферментов, управляемой гидрофобными взаимодействиями. Уменьшение сорбции NADH после сорбции ADH, по-видимому, связано с блокированием белком гидрофобной поверхности сорбента.

Полученные результаты сорбции ADH и NAD на обратнофазовом углеродном носителе указывают на прочную необратимую сорбцию фермент-кофакторного комплекса на матрице сорбента за счет гидрофобного связывания. Каталитическая активность комплекса существенно зависит от последовательности формирования ферментативной системы. Наибольшую активность биокаталитический комплекс проявляет при последовательной сорбции сначала кофермента, а затем апофермента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование ориентации алкогольдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы на обратнофазовых сорбентах. Практический интерес представляет ориентация глобулярных белков на обратнофазовых матрицах за счет сил гидрофобного взаимодействия. В качестве носителей могут быть использованы электропроводные углеводородные сорбенты или их модифицированные формы. Получе-

ние такого электропроводного гидрофобного сорбента, моделирующего монослой биологических мембран на углеродной матрице, приводится на рис. 3. Оптимальной считается ориентация фермента на гидрофобном сорбенте, когда кофермент блокирован носителем в каталитической щели апофермента, обеспечивая тем самым эффективную регенерацию кофермента и высокую биокаталитическую активность иммобилизованной фермент-кофакторной системы.

На примере ADH нами была рассмотрена полупырическая модель взаимодействия белковой глобулы с электронейтральной гидрофобной поверхностью [9]. Ввиду того, что глобула фермента представляет собой сложную систему, расчет ее сорбционных характеристик с помощью метода атом-атомных потенциалов представляется нецелесообразным. Поэтому энергию взаимодействия ($F_{\text{сорб}}$) ADH с обратнофазовым сорбентом рассчитывали по аддитивной схеме, исходя из экспериментальных данных по взаимодействию аминокислот и пептидов с гидрофобным сорбентом [10], в соответствии с уравнениями 1 и 2:

$$F_{\text{сорб}} = \sum_{i=1}^n F_{\text{solv},i}, \quad (1)$$

$$F_{\text{solv}} = F_i \Delta L_i / L_i, \quad (2)$$

где $F_{\text{solv},i}$ — энергия гидрофобного взаимодействия i -го радикала; n — число радикалов; F_i — энергия взаимодействия i -го аминокислотного радикала при его полном погружении в гидрофобный слой сорбента; ΔL_i — длина участка радикала, погруженного в гидрофобный слой при данной ориентации глобулы белка; L_i — длина радикала.

При расчете энергии гидрофобного взаимодействия использовали значения относительных свободных энергий F/RT взаимодействия аминокислотных радикалов с обратнофазовыми сорбентами (таблица).

Значения F/RT для аминокислотных радикалов [10]

Asp 0,173	Glu 0,173	Tyr -0,694	Ser 0,106	Met -0,449	Trp -1,758	Phe -1,085
Val 0,288	Leu -0,485	Ile -0,485	Gly 0,040	Ala -0,097	Pro -0,197	His -0,149
Lys -0,554	Arg -0,197	Gln -0,108	Asn -0,108	Cys 0,090		

Полученные в результате расчета данные представлены в виде перспективной азимутальной ортографической проекции уровней взаимодействия белковой глобулы при различных направлениях касания с гидрофобной плоскостью (рис. 4).

Из приведенных данных видно, что глобула АДН имеет четыре области наиболее вероятной гидрофобной атаки сорбционной плоскости. При этом две из них находятся близко друг от друга на экваторе глобулы ($\Delta\varphi = 18$) и лежат между двумя коферментными щелями фермента. Если гидрофобная поверхность представляет собой не плоскость, а цилиндрическую или сферическую пору с $R \approx 28.0$ нм, то осуществляется одновременная гидрофобная атака по этим двум основным направлениям и их равнодействующая по направлению совпадает с осью «у». При этом в силу симметрии молекулы фермента обе коферментные щели расположены строго симметрично относительно направления наиболее вероятной гидрофобной атаки. Доступность же субстратных щелей для этанола максимальна. Важным усло-

вием сохранения физиологической активности иммобилизованных биокаталитических систем, включающих кофактор, является его нативное расположение в активном центре апоферментов.

Представлялось интересным рассмотреть, как другие NAD-зависимые дегидрогеназы, обладающие трехмерной гомологией с АДН, будут ориентироваться в липофильном слое биологической мембраны. Для решения поставленной задачи использовали лактатдегидрогеназу акулы, для которой известна пространственная структура [11, 12]. Молекула LDH состоит из четырех симметричных субъединиц, каждая из которых имеет 331 аминокислоту. В работе [12] координаты α -С-атомов аминокислот приводятся для стандартной «красной» субъединицы. Координаты других субъединиц рассчитываются путем вращения «красной» субъединицы вокруг осей P , Q , R . Координаты «голубой» субъединицы получали вращением «красной» субъединицы вокруг оси P , «желтой» – вокруг оси Q и «зеленой» – вокруг оси R . В связи с этим программа расчета энергии взаимодействия белковой глобулы с гидрофоб-

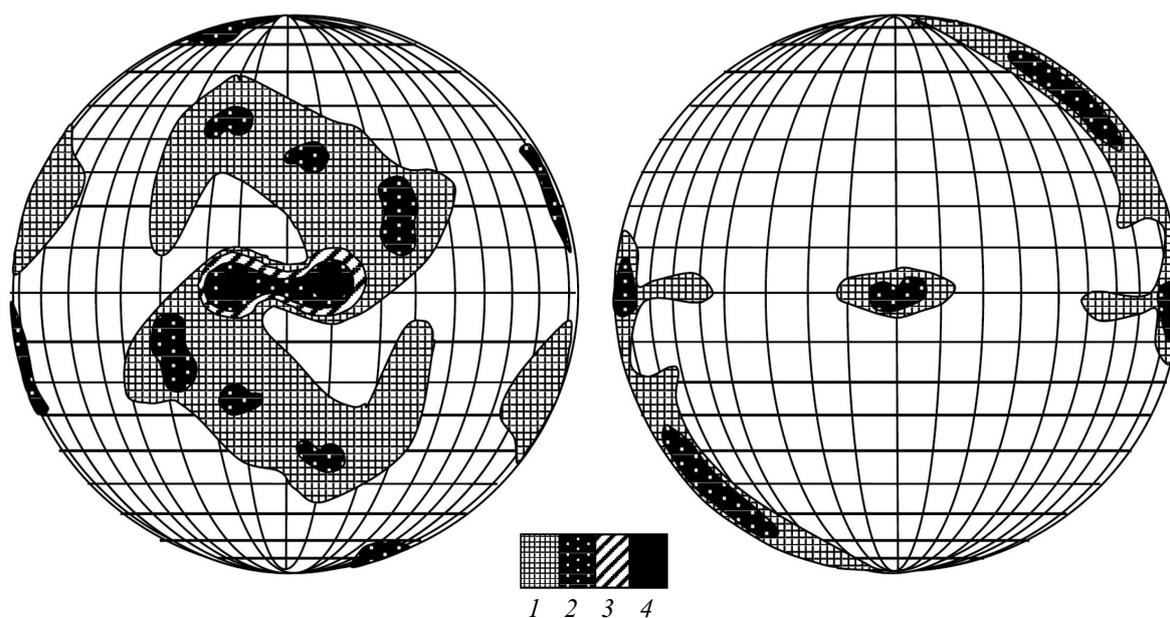


Рис. 4. Перспективная азимутальная ортографическая проекция уровней гидрофобности АДН: 1 – $5 < F/RT < 10$, 2 – $10 < F/RT < 20$, 3 – $20 < F/RT < 30$, 4 – $F/RT > 30$; «меридианы» и «параллели» проведены через 9° [9].

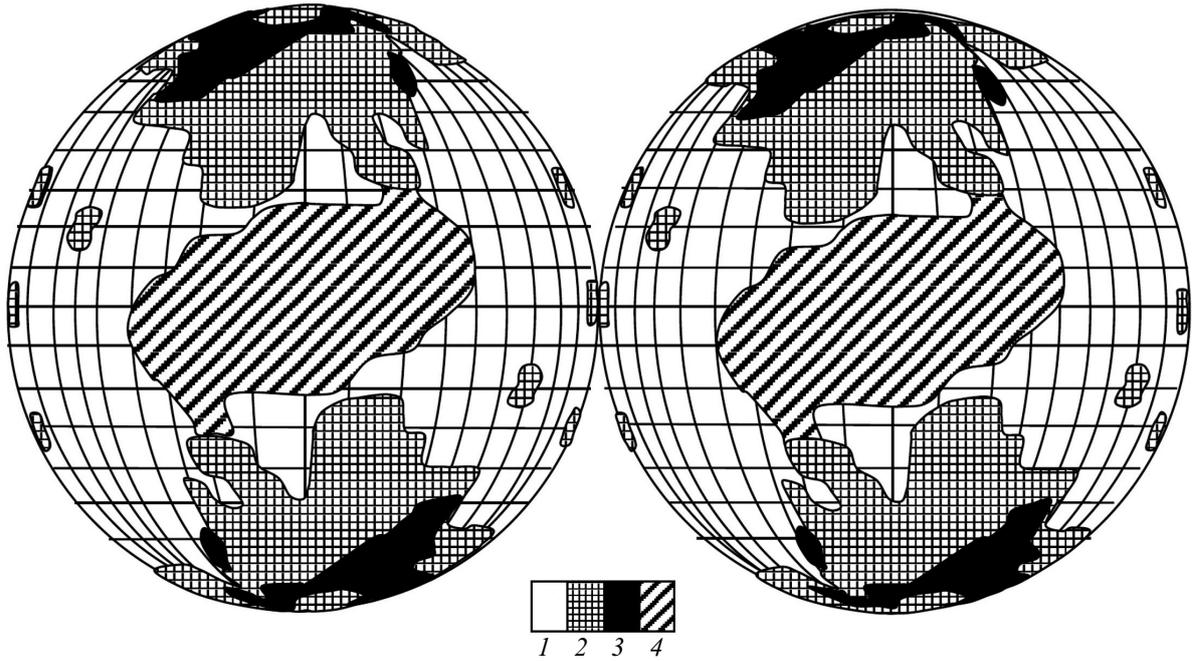


Рис. 5. Перспективная азимутальная ортографическая проекция уровней гидрофобности поверхности LDH: 1 – $0 < F/RT < 1$; 2 – $1 < F/RT < 2$; 3 – $F/RT > 2$; 4 – гидрофильная область.

ной поверхностью включала преобразование координат с установлением пространственного расположения 1324 α -С-атомов четырех субъединиц LDH. Результаты расчета ориентации LDH на гидрофобной поверхности в виде перспективной азимутальной ортографической проекции приведены на рис. 5. На рис. 6 представлено распреде-

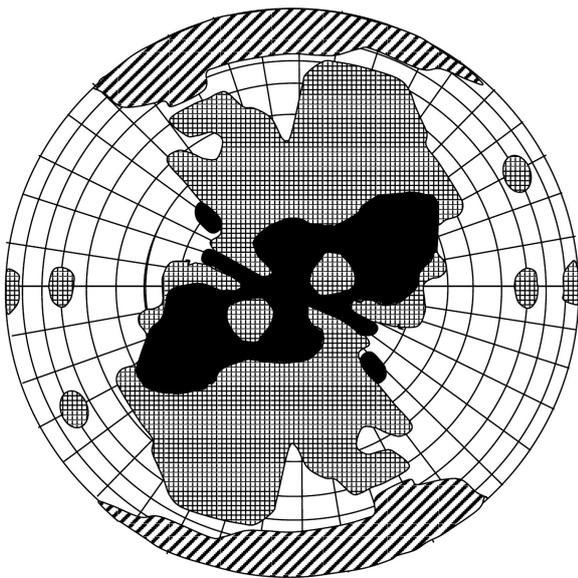


Рис. 6. Распределение уровней энергии гидрофобного связывания LDH на поверхности полусферы.

ление уровней энергии гидрофобного связывания глобулы LDH на поверхности полусферы, приведенной со стороны одного из полюсов молекулы белка. Из рисунка видно, что LDH на экваторе имеет два участка (полосы), где белковая глобула проявляет гидрофильные свойства при различных направлениях касания с гидрофобной поверхностью. Четыре активных центра биокатализатора находятся на двух противоположных полюсах (по два на каждом) в области максимальной энергии гидрофобного связывания, которые на рис. 5 и 6 обозначены черным цветом. При сорбции LDH на гидрофильных сорбентах молекула апофермента будет сориентирована экватором к поверхности, обеспечивая свободный доступ субстратов и коферментов к четырем активным центрам биокатализатора, расположенным на полюсах молекулы фермента.

При сорбции LDH на гидрофобной поверхности будет наблюдаться связывание, при котором один из полюсов с двумя активными центрами будет сориентирован к гидрофобной поверхности, тогда как другой направлен в противоположную от носителя сторону. Такой тип ориентированной посадки молекулы белка в гидрофобном слое мембраны обеспечивает блокирование NAD в активном центре апофермента, сохраняя при этом активность фермент-кофакторной системы. Этот тип ориентации белков на гидрофобных сорбентах в дальнейшем будет использован при иммобилизации фермент-кофакторных систем на гидрофобных электропроводных носителях.

Транспорт электронов и протонов в биологических структурах с участием радикалов. Функционирование коферментов в настоящее время еще полностью не изучено. Восстановление и окисление метаболитов сопровождается циклической ферментативной регенерацией. Общий радикальный механизм биокаталитических процессов, происходящих в полиферментном комплексе биологических мембран клетки и сопровождающихся переносом редокс-эквивалентов, можно представить в виде следующей схемы (схема 1).

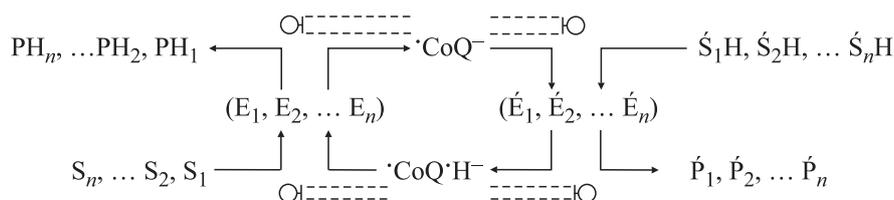


Схема 1. Общий радикальный механизм биокаталитических процессов, происходящих в полиферментном комплексе биологических мембран клетки. E_1, E_2, \dots, E_n и E'_1, E'_2, \dots, E'_n - ферменты, участвующие в восстановлении и окислении субстратов S_1, S_2, \dots, S_n и $S'_1H, S'_2H, \dots, S'_nH$ соответственно; $\cdot\text{CoQ}^-$ и $\cdot\text{CoQ}^{\cdot-}\text{H}^-$ - анион-радикал и убисемихинон радикала кофермента Q, соответственно; $\text{PH}_1, \text{PH}_2, \dots, \text{PH}_n$ и $\text{P}'_1, \text{P}'_2, \dots, \text{P}'_n$ - продукты ферментативных реакций.

Исследования аминокислотной последовательности и пространственной структуры ферментов: АДН печени человека и лошади, LDH собаки и акулы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы кальмара, свиньи и дрожжей привели к выводу о существовании трехмерной гомологии NAD-зависимых дегидрогеназ [13, 14]. Представленная схема 1 показывает, каким образом в клетке возможен радикальный механизм реализации переноса протонов и электронов через биологические мембраны.

Анион-радикал кофермента Q ($\cdot\text{CoQ}^-$), локализованного в жидкокристаллической структуре биомембраны, восстанавливается в результате ферментативной реакции E'_1 до убисемихинон-радикала ($\cdot\text{CoQ}^{\cdot-}\text{H}^-$), присоединяя протон. Субстрат $S'_1\text{H}$ в матриксе митохондрии окисляется при этом до P'_1 . Ферментативная регенерация кофермента $\cdot\text{CoQ}^-$ происходит при миграции его к другой биокаталитической системе E_1 . При этом субстрат S_1 , находящийся в межмембранном пространстве, например, митохондрии, восстанавливается до PH_1 .

Трансмембранный перенос протонов, сопровождающийся ферментативной регенерацией кофермента, может быть описан рядом последовательных радикальных реакций (схема 2):

Представленные на этой схеме ферментативные реакции, протекающие в биологических мембранах, возможны благодаря аналогии каталитических щелей апоферментов, а также подобию в фиксации коферментов в активном центре и строгой ориентации фермент-кофакторных комплексов. Наибольшее сходство было обнаружено для NAD-связывающих областей, что подтверждает аналогичность способов фиксации кофактора в коферментсвязывающей щели.

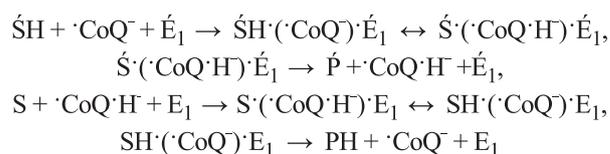


Схема 2. Последовательные радикальные реакции при трансмембранном переносе протонов.

Как видно из схемы 2, коэнзим Q восстанавливается по одноэлектронному механизму, образуя полувосстановленную форму - убисемихинон-радикал.

К группе переносчиков энергии и электронов, широко распространенных в растительном и животном мире, можно отнести природные органические пигменты - каротиноиды, имеющие сопряженную систему связей. В настоящее время известно более 800 видов структурно различающихся каротиноидов [15, 16]. По химическому строению каротиноиды делят на две группы: каротины (углеводороды) и ксантофиллы (каротиноиды, содержащие кислород). Большинство каротиноидов содержат 40 углеродных атомов, имеют сопряженные двойные связи. Благодаря наличию ненасыщенных сопряженных (конъюгированных) связей каротиноиды имеют вытянутую светочувствительную «проволочную» структуру, благодаря которой способны выполнять функцию переносчиков энергии и электронов. Каротиноиды встречаются как в свободном состоянии, так и в виде гликозидов; они способны нековалентно связываться с белками, кофак-

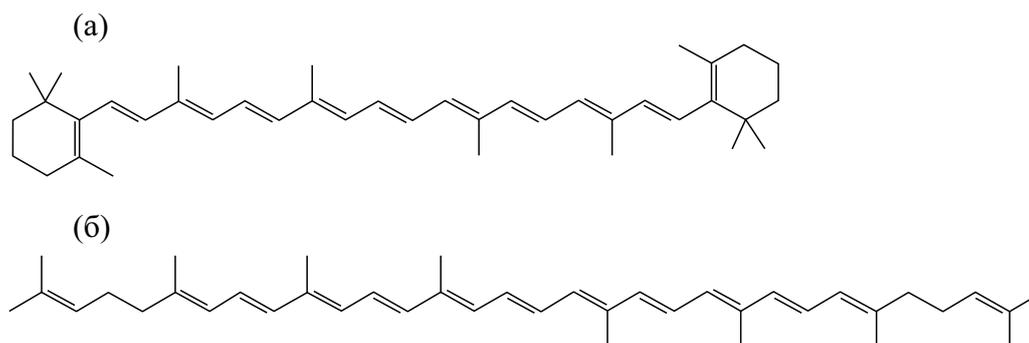


Рис. 7. Химические структуры β -каротина (а) и ликопина (б).

торами и мембранными липидами. Электроны каротиноидов легко переходят в возбужденное состояние при попадании даже небольшого количества квантов света. Ряд каротиноидов способен образовывать комплексные соединения с такими металлами, как Ca^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} и Hg^{2+} [17]. Образование металл-хелатного комплекса не только изменяет спектр поглощения каротиноидов, но и повышает его способность к перехвату свободных радикалов.

Каротиноиды в основном локализируются в липофильной области биологических мембран, образуя стабильные каротинобелковые комплексы, они модулируют физические свойства мембран, расширяя диапазон фазового перехода из состояния геля в жидкокристаллическую структуру. Длинные сопряженные углеводородные цепи каротиноидов заканчиваются кольцевой иононовой структурой (рис. 7а), хотя возможно и отсутствие гетероциклического кольца, как это можно видеть у ликопина (рис. 7б). В связи с тем, что каротиноиды содержат большое количество двойных связей, в клетках животных и человека они выполняют различные защитные функции: связывают синглетный кислород, предупреждая образование чужеродных свободных радикалов; обеспечивают защиту от жесткого электромагнитного излучения. Понижая уровень свободных радикалов, каротиноиды выступают в роли антиоксидантов. Способность к перехвату свободных радикалов в молекуле каротиноидов возрастает с увеличением числа компланарных (т.е. лежащих в одной плоскости) конъюгированных двойных связей. Различают физический и химический механизмы антиоксидантного действия каротиноидов. Физический механизм антиоксидантного действия предполагает «тушение» триплетного хлорофилла (3Chl^*) или синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$) за счет перехода каротиноидов (Car) в триплетное возбужденное состояние (3Car^*) и дальнейшего рассеивания энергии в виде тепла (схема 3) [18]:

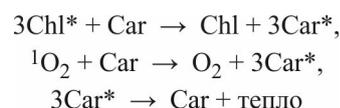
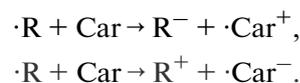


Схема 3. Физический механизм антиоксидантного действия каротиноидов.

Химический механизм «тушения» предполагает окисление каротиноидов синглетным кислородом с образованием различных альдегидов и эндопероксидов [18, 19]. Образующиеся при этом продукты окисления каротиноидов могут играть важную роль в регуляции развития растений [20].

Взаимодействие каротиноидов со свободными радикалами зависит главным образом от характера свободных радикалов, а не от типа каротиноида [18]. Каротиноиды могут взаимодействовать со свободными радикалами ($\cdot\text{R}$) тремя способами, причем во всех трех случаях образуются радикалы каротиноидов [18]:

1. Взаимодействие с полиеновой структурой каротиноидов — $\cdot\text{R} + \text{Car} \rightarrow \cdot\text{Car}-\text{R}$.
2. Реакция с отделением атома водорода — $\cdot\text{RH} + \text{Car} \rightarrow \cdot\text{Car}-\text{H} + \text{R}$.
3. Реакции, сопровождающиеся переносом электронов —



Имея светочувствительную, электропроводящую сопряженную структуру связей, каротиноиды выполняют функцию переносчиков энергии и электронов. При этом они могут образовывать комплексы с переносом заряда с биоорганическими соединениями, имеющими свободно-радикальную форму хинона, например, с коферментами FAD, FMN, имеющих в своем составе изоаллоксазиновое кольцо, которое при восстановлении образует радикал семихинона. Так, комплекс кофермента с иононовым кольцом каротиноида образуется при его контакте с изоаллоксазиновым нуклеотидом кофактора. Важную роль в транспорте окислительно-восстановительных эквивалентов в биологической мем-

бране отводится небелковому переносчику электронов и протонов – коферменту Q, который также способен приобретать форму свободного анион-радикала – семихинона ($\cdot\text{CoQH}^-$). Ферментативная реакция с участием коферментов NAD, NADP протекает через две одноэлектронные стадии, в результате первой из них образуются промежуточные свободные радикалы коферментов $\cdot\text{NAD}$ или $\cdot\text{NADP}$, имеющие хиноидную структуру в никотинамидном нуклеотиде.

Одноэлектронный характер взаимодействия каротиноидов и их комплексов с хинонами в полярных средах описан в работах [21, 22]. Образование катион-радикалов каротиноидов в реакции с хинонами показало, что на первой стадии образуется комплекс с переносом заряда, а затем ион-радикальная пара [$\cdot\text{Car}^+ + \cdot\text{Q}^-$]. Конечными продуктами являются аддукты каротиноида с хиноном (Car-Q) и *цис*-изомеры каротиноида. Образование комплексов с переносом заряда в реакциях β -каротина, кантаксантина и 8'-апо- β -каротин-8'-аля с хинонами были зарегистрированы методом оптической спектроскопии и ЭПР [21, 22].

Было изучено образование комплексов с переносом заряда между β -каротином и липидом кардиолипином. Для кардиолипина в видимой области спектра не были обнаружены полосы поглощения, тогда как β -каротин имеет характерные полосы при 340, 450 и 475 нм. Существенное расширение (до 100 нм) полосы поглощения β -каротина в длинноволновую область наблюдается при образовании комплекса кардиолипина с β -каротином. Незначительное смещение полос поглощения в длинноволновую область до 480 нм было получено для комплекса « β -каротин–лецитин» относительно исходной длины волны 450 нм. Проведенные экспериментальные исследования показали, что система «каротин–липид» способна образовывать комплекс с переносом заряда, посредством которого возможен электронный перенос через липидо-каротиноидную структуру биологических мембран.

Радикальный перенос электронов в биологических мембранах с участием радикалов коферментов (C, CoQ), каротиноидов (Car) и липидов L можно представить в виде цепи последовательных реакций (схема 4).

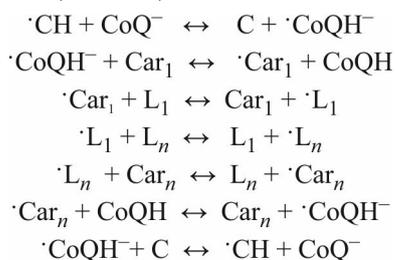


Схема 4. Цепь последовательных реакций при радикальном переносе электронов в биологических мембранах.

Эффективность электронного переноса через липидо-каротиноидную структуру существенно возрастает при воздействии на нее квантов света, что можно наблюдать в процессах фотосинтеза, протекающих в тилакоидах хлоропластов. Каротиноиды тилакоидных мембран участвуют в световых реакциях фотосинтеза и обеспечивают структурную стабильность пигмент-белковых комплексов. Как известно, мембраны тилакоидов содержат молекулы хлорофилла и каротиноидов, которые выполняют светособирающую функцию, при этом каждая из этих молекул улавливает из солнечного спектра электромагнитные волны определенной длины волн. Имеющаяся система двойных связей выполняет функцию хромофора и характеризует спектральные свойства конкретных каротиноидов, которые имеют три или два пика (максимума) поглощения света в диапазоне длин волн от 280 до 550 нм.

Сложилось представление, что передача энергии возможна только от каротиноидов на хлорофил, которая происходит резонансным путем по механизму Фёрстера и протекает для одной пары молекул на расстояние 1 нм в течение $10^{-10} - 10^{-12}$ с. Передача энергии сопровождается ее потерей: 10% при передаче от хлорофилла *a* к хлорофиллу *b* и 60% – от каротиноидов к хлорофиллу [22–25]. При этом передача энергии возможна только от пигмента с максимумом поглощения с меньшей длиной волны к пигменту с большей, причем обратный процесс невозможен. Такое упрощенное понимание процесса передачи энергии и электронов при фотосинтезе не совсем правильное, так как оно не дает ответа на вопрос: каким образом хлорофилл реализует механизм передачи энергии на другие биомолекулы тилакоидов, например, каротиноиды, липиды, кофакторы, ферменты?

В связи с этим следует отметить, что каротиноиды в структурах клетки находятся в динамическом контакте с другими биомолекулами, образуя при этом комплексы с переносом энергии и заряда, следствием чего является существенное расширение полосы поглощения каротиноидов. Комплексы каротиноидов в составе биологических мембран проявляют высокую стабильность. Проведенные спектрофотометрические исследования [21, 22] показали возможность образования комплексов с переносом заряда для смеси β -каротина с хиноном (2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохиноном) и появление интенсивной полосы поглощения β -каротина в области 1030 нм. Таким образом, передача энергии при фотосинтезе может осуществляться от хлорофилла к каротиноидам, что совсем не нарушает правила передачи энергии от пигмента с меньшей длиной волны к пигменту с большей длиной волны. Совпадение

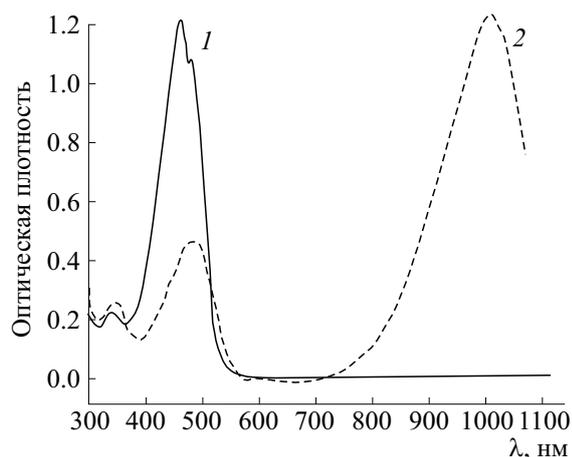


Рис. 8. Спектры поглощения β -каротина (1) и комплекса с переносом заряда (2), образованного при его смешении с хиноном (2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохиноном) [21].

полос поглощения хлорофилла и каротиноидов в диапазоне длин волн 440–460 нм говорит о том, что передача энергии от хлорофилла на молекулу β -каротина может быть реализована без энергетических затруднений.

Анализ спектра поглощения (рис. 8) указывает на то, что пигменты-каротиноиды могут выполнять активную светособирающую функцию от ультрафиолетовой до видимой области в диапазоне от 350 до 500 нм, а также 770–1100 нм. В диапазоне спектра 440–770 нм светособирающую функцию выполняют хлорофилл *a* и хлорофилл *b*.

В связи с этим можно отметить, что каротиноиды являются обязательными структурными компонентами любых фотосинтетических мембран, в виде комплексов они входят в состав хлорофилл-белковых комплексов, пронизывают мембранный бислой, образуя межмолекулярную связь с молекулами липидов [26]. Имея протяженную сопряженную систему связей с метильными ответвленными группировками, каротиноиды встраиваются в липидную мембрану и стягивают два монослоя за счет сил гидрофобного связывания, формируя высокоорганизованную структуру упакованных молекул пигмента и липидов. При этом углеводородные цепи липидов могут содержать от одной до шести двойных связей. Липиды ряда растений, так же как и каротины, могут иметь конъюгированную систему связей. Это дает основание предполагать, что энергетическая и электронная проводимость биологических мембран существенно зависит от количественного содержания полиненасыщен-

ных жирных кислот в липидных мембранах и содержания в них каротиноидов.

В ряде работ рассматривается возможность проводимости углеводородных цепей с диеновой конъюгацией [27], когда углеродные атомы разделены этиленовыми группировками или «метильновыми мостиками» $-\text{CH}_2-$. В частности, приводятся данные об электронной проводимости липида — далихола, углеводородная цепь которого имеет спиральное диеновое сопряжение. Уместно отметить, что диеновую конъюгацию имеет кофермент Q, выполняющий функцию переносчика протонов и электронов.

Установлено, что при фотоактивации ферментативной системы EC2 происходит окисление β -каротина, сопровождающееся переносом электрона от молекулы каротина (Car) к первичному донору P680^+ и образованием катион-радикала $\cdot\text{Car}^+$ [28]. Методом ЭПР было обнаружено образование анион-радикалов хинонов в EC1 и EC2 [29]. Молекулы каротиноидов легко подвергаются окислению и восстановлению, обладают хорошими электронными донорно-акцепторными свойствами по отношению к хлорофиллу, липидам и коферментам. Спектры поглощения каротиноидов изменяются при различных структурных перестройках молекулы пигмента. Образование $\cdot\text{Car}^+$ в реакции с хинонами зарегистрировано как в условиях фотолиза, так и в условиях темновой реакции.

ВЫВОДЫ

В работе рассмотрено участие природных радикалов в одноэлектронных процессах жизнедеятельности клеток. Показано, что коферменты имеют промежуточные свободно-радикальные хиноидные и семихиноидные формы, которые участвуют в жизненно важных одноэлектронных биохимических процессах, связанных с отдачей или приобретением электронов. Описывается способ получения гидрофобного электропроводного сорбента, моделирующего монослой биологической мембраны. Разработаны гетерогенные биокаталитические системы в результате сорбции ADH и NAD на обратнофазовом электропроводном углеродном сорбенте. Результаты сорбции ADH и NAD на электропроводном углеродном носителе указывают на прочную необратимую сорбцию фермент-кофакторного комплекса на матрице сорбента за счет гидрофобного связывания. Показано, что каталитическая активность комплекса существенно зависит от последовательности формирования фермент-кофакторной

системы; наибольшую активность биокаталитический комплекс проявляет при последовательной сорбции сначала кофермента, а затем апофермента. Осуществлены численные модельные исследования ориентированной сорбции АДН и лактатдегидрогеназы на гидрофобных матрицах с целью управления биокаталитическими свойствами иммобилизованной фермент-кофакторной системы.

Рассматриваются вопросы радикального трансмембранного переноса протонов и электронов, сопровождающегося ферментативной регенерацией кофермента. Отмечается важная роль радикалов природных пигментов каротиноидов в процессах переноса энергии и электронов в активный центр биокатализаторов, которые могут образовывать комплексы с переносом заряда с липидами и коферментами. Анализ спектра поглощения комплекса β -каротина с хиноном (2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохиноном) показал появление интенсивной полосы поглощения в области 1030 нм [23]. Это указывает на то, что комплекс каротина с коферментами, имеющими фрагменты хиноидной и семихиноидной структур, могут выполнять активную светособирающую функцию при фотосинтезе в области длин волн в диапазоне от 350 до 500 нм, а также 770–1100 нм. При этом перенос энергии от хлорофиллов *a* и *b* на комплекс каротиноида с коферментом не нарушает правило передачи энергии от пигмента с меньшей длиной волны к пигменту с большей длиной волны. В диапазоне спектра 440–770 нм светособирающую функцию выполняют хлорофилл *a* и хлорофилл *b*.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Н. П. Чеснокова, Е. В. Понукалина и М. Н. Бизенкова, Успехи соврем. естествознания, № 7, 29 (2006).
2. Ю. А. Владимиров, Сорос. образоват. журн. Биология **6** (12), 14 (2000).
3. Н. Т. Берберова, Сорос. образоват. журн. Химия **6** (5), 39 (2000).
4. А. Соловьев, Фармацевт практик, № 12 (2016). <http://fp.com.ua/articles/svobodnyie-radikalyi-raz-rushiteli-ili-zashhitniki-organizma>.
5. www.enzyme.chem.msu.ru/eduproc/prac/task9/part09.doc.
6. Е. В. Петрова, Дис. ... канд. хим. наук (Томский гос. университет, 2015).
7. J. T. McFarland and Yu-H. Chu, Biochemistry **14** (6), 1140 (1975).
8. U. M. Lutstarf, P. M. Shürch, and J. P. Wartburg, Eur. J. Biochem. **17** (3), 497 (1970).
9. П. П. Гладышев, М. И. Горяев и И. Г. Шпильберг, Молекул. биология **16** (5), 943 (1982).
10. E. Lundanes and T. Greibrokk, J. Chromatogr. **149**, 241 (1978).
11. *The Enzymes* (Acad. Press, New York, San Francisco, London, 1975), Vol. 11, p. 191.
12. M. J. Adams, G. C. Ford, A. Liljas, and M. G. Rossmann, Biochem. Biophys. Res. Commun. **53** (1), 46 (1973).
13. M. G. Rossmann, D. Moras, and K. W. Olsen, Nature **250** (5463), 194 (1974).
14. I. Ohlsson, B. Nordström, and C.-I. Bränden, J. Mol. Biol. **89** (2), 339 (1974).
15. H. Klaui, in *Chemistry and Biochemistry* (Pergamon Press, Oxford, (1982), pp. 309–317.
16. J. A. Olson and N. I. Krinsky, FASEB J. **9** (15), 1547 (1995).
17. E. Hernández-Marin, A. Barbosa, and A. Martínez, Molecules **17**, 1039 (2012).
18. R. Edge and G. Truscott, in *Carotenoids: Physical, Chemical, and Biological Functions and Properties* (Kluwer Acad. Publ., 2010), pp. 283–307.
19. F. Ramel, S. Birtic, and S. Cuine, Plant Physiol. **158**, 1267 (2012).
20. F. Bouvier, J.-C. Isner, O. Dogbo, and B. Camara, Trends Plant Sci. **10** (4), 187 (2005).
21. Н. Э. Поляков и Т. В. Лёшина, Успехи химии **75**, 1175 (2006).
22. N. E. Polyakov, A. L. Focsan, K. Michael, et al., J. Phys. Chem. B **23**, 16968 (2010).
23. H. Volkhard, *Fluorescence Resonance Energy Transfer. Principles of Computational Cell Biology* (Wiley-VCH, Weinheim, 2008).
24. Н. Д. Алехина, Ю. В. Балнокин, В. Ф. Гавриленко и др., *Физиология растений* (Academia, М., 2005).
25. D. C. Harris, in *Applications of Spectrophotometry. Quantitative Chemical Analysis* (W. H. Freeman and Co., New York, 2010).
26. Г. Н. Смоликова и С. С. Медведев, Физиология растений **62** (1), 3–16 (2015).
27. <http://fbm.msu.ru/education/lectures/biophys/pdf/05>.
28. D. Kuciauskas, P. A. Liddell, A. L. Moore, et al., J. Am. Chem. Soc. **120**, 10880 (1998).
29. A. Sieckmann, W. Lubitz, and D. Stehlic, Chem. Phys. **194**, 349 (1995).

Radicals in the Structures of a Cell

Yu.A. Shapovalov*, P.P. Gladyshev**, S.T. Tuleukhanov*, E.V. Schvetsova*, and Zh.T. Abdrasulova*

*Al-Farabi Kazakh National University, prosp. Al-Farabi 71, Almaty, 050040 Republic of Kazakhstan

**Dubna State University, ul. Universitetskaya 19, Dubna, Moscow Region, 141982 Russia

The participation of natural radicals in single-electron processes of cell activity is considered. It was shown that coenzymes, having intermediate free radical quinoid and semichinoid forms, can interact with carotenoids, forming complexes with charge transfer with an absorption band of 1030 nm. Moreover, the complex can perform an active light-harvesting function during photosynthesis up to 1100 nm, with the energy transfer from chlorophyll a and chlorophyll b to the complex. Studies of the sorption of the alcoholdehydrogenase–nicotinamide adenine dinucleotide enzyme-cofactor system on a hydrophobic electrically conductive carrier showed that the maximum activity of the enzyme-cofactor system is reached during sequential sorption of the coenzyme, and then the apoenzyme. The orientation of the biocatalytic system on the immobilization matrix is of great importance.

Keywords: radicals, coenzymes, carotenoids, charge-transfer complexes, sorption, immobilization