

STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ

**“Metal complexes in the activation of nitric oxide and dioxygen.
Mechanistic studies on model systems of biomedical relevance.”**

Maria Oszajca

Praca wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierownictwem:

Prof. dr hab. Grażyny Stochel (promotor)

oraz

dr Małgorzaty Brindell (promotor pomocniczy)

Aktywacja małych cząsteczek tj. tlenku azotu(II) (NO) i ditlenu (O₂) wiąże się najczęściej z oddziaływaniem z kompleksami metali przejściowych i odgrywa istotną rolę w wielu procesach biologicznych, środowiskowych i przemysłowych. W procesie aktywacji dochodzi do zmiany właściwości redoksowych na skutek koordynacji do centrum metalicznego. Porównanie reaktywności tych dwóch cząsteczek w stanie podstawowym pozwala stwierdzić, że tlenek azotu(II) jako rodnik charakteryzuje się znaczną reaktywnością i dlatego też jest zaliczany do grupy reaktywnych form azotu, natomiast tlen, ze względu na trypletowy stan podstawowy odznacza się stosunkowo niską reaktywnością spowodowaną znaczną barierą kinetyczną. W związku z tym proces aktywacji NO na centrum metalicznym ma głównie na celu modyfikację jego aktywności. W procesie aktywacji NO główną rolę odgrywa przeniesienie elektronu, podczas gdy w procesie aktywacji O₂ zarówno przeniesienie elektronu jak i transfer energii mają istotne znaczenie.

Celem niniejszej pracy było pogłębienie wiedzy z zakresu mechanizmów aktywacji małych cząsteczek (NO i O₂) z zastosowaniem modelowych kompleksów żelazo(III) porfiryny [Fe^{III}(TMPS)]³⁻ ([*mezo*-terakis(2,4,6-trimetylo-3-sulfonianofenylo)-porfiryno]żelazian(III)). Szczególną uwagę poświęcono zrozumieniu mechanistycznych aspektów odgrywających istotną rolę w oddziaływaniu wybranych małych cząsteczek z centrum żelazowym w badanych związkach kompleksowych. Jednym z głównych zadań badawczych było określenie wpływu typu ligandów skoordynowanych do jonu metalu na mechanizm aktywacji małych cząsteczek. Przedstawione w pracy badania obejmują nie tylko zaproponowanie

mechanizmu aktywacji małych cząsteczek, ale również w przypadku aktywacji O₂ obejmują badania kinetyczne oraz określenie mechanizmu procesów następczych prowadzących do odtworzenia pierwotnej formy badanego kompleksu metalu.

Podstawę merytoryczną rozprawy doktorskiej stanowią trzy publikacje w renomowanych czasopismach wchodzących w skład listy filadelfijskiej (2 – Inorganic Chemistry, 1 – Chemistry - A European Journal).

W **publikacji I** przedstawiono szczegółowe badania kinetyczne i mechanistyczne wpływu anionu cyjankowego (CN⁻) na dynamikę wiązania tlenu azotu(II) przez rozpuszczalną w wodzie żelazoporfirynę [Fe^{III}(TMPS)]³⁻. W pierwszym etapie wykonano badania spektrofotometryczne i kinetyczne tworzenia cyjanopochodnych Fe^{III}(TMPS), w celu lepszego zrozumienia mechanizmu wiązania NO do kompleksów [Fe^{III}(TMPS)(CN)(H₂O)]⁴⁻ i [Fe^{III}(TMPS)(CN)₂]⁵⁻. Analiza uzyskanych wyników wykazała, że oba kompleksy cyjankowe w reakcji z NO tworzą ten sam nitrozyłowy kompleks, mianowicie [Fe^{II}(TMPS)(CN)(NO⁺)]⁴⁻. Szczegółowe badania mechanizmu wiązania NO do [Fe^{III}(TMPS)(CN)₂]⁵⁻ pozwoliły na określenie wpływu liganda skoordynowanego do żelaza na reaktywność NO. Dodatkowo wartości entropii aktywacji (ΔS^\ddagger) oraz objętości aktywacji (ΔV^\ddagger) dla wiązania NO przez Fe^{III}(TMPS)(CN)₂ oraz brak zależności obserwowanej stałej szybkości reakcji od stężenia NO wskazują na dysocjacyjny mechanizm reakcji, gdzie odejście liganda CN⁻ stanowi etap determinujący szybkość całego procesu nitrozytacji. Uzyskane wyniki wskazują, iż w badanych reakcjach tlenek azotu(II) może być silniejszym ligandem niż CN⁻, co może mieć istotne znaczenie w badaniach aktywacji zablokowanej jonem cyjankowym oksydazy cytochromowej *c*.

Modelowe układy oparte na porfiryńowych kompleksach żelaza(III) znalazły szerokie zastosowanie w badaniach mechanizmów aktywacji tlenu cząsteczkowego oraz następczego utleniania słabo reaktywnych związków organicznych w procesach katalitycznych z udziałem takich enzymów jak np. cytochrom P450. Wykorzystana w badaniach aktywacji NO żelazoporfiryna Fe^{III}(TMPS) okazała się bardzo dobrym, układem modelowym ze względu na dobrą rozpuszczalność w wodzie pozwalającą na badania tworzenia krótko żyjących form katalizatora tzw. Compound I / *związek I* (kationorodnik oksoporfirynożelaza(IV)) i Compound II / *związek II* (okso-porfirynożelazo(IV)) w funkcji pH.

Kolejnym zagadnieniem poruszonym w niniejszej pracy był wpływ ligandów aksjalnych skoordynowanych do porfiryńowego żelaza (III) na tworzenie

modelowego związku II oraz na jego reaktywność (**publikacja II**). W ramach tego zadania badawczego porównano wpływ dwóch ligandów OH⁻ i N-metylimidazolu (N-MeIm). N-metylimidazol został wybrany w celu uzyskania kompleksu modelowego naśladującego centrum aktywne peroksydazy gdzie histydyna skoordynowana jest aksjalnie do żelaza hemowego. Odpowiednik związku II ([Fe^{IV}(TMPS)(O)(OH)]⁵⁻ lub [Fe^{IV}(TMPS)(O)(N-MeIm)]⁴⁻) był generowany z wykorzystaniem egzogennych donorów tlenu takich jak nadtlenek wodoru (H₂O₂) lub kwas *m*-chloronadbenzoesowy (*m*-CPBA). Tego typu podejście nazywane obejściem nadtlenkowym (ang. *peroxo-shunt*) polegające na skróceniu cyklu katalitycznego cytochromu P450 i zastąpieniu O₂, 2H⁺ i 2e⁻ przez H₂O₂, kwasy nadtlenowe czy też organiczne nadtlenki jest powszechnie stosowane w modelowych badaniach mechanizmu aktywacji wiązania O-O.

W ramach tego zagadnienia badawczego wykonano szczegółowe badania kinetyczne dla reakcji [Fe^{III}(TMPS)(OH)]⁴⁻ z H₂O₂ w funkcji, temperatury i ciśnienia co pozwoliło na wyznaczenie parametrów aktywacji (ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔV^\ddagger). Badania tworzenia [Fe^{IV}(TMPS)(O)(OH)]⁵⁻ w funkcji pH wykazały, że stała szybkości tworzenia [Fe^{IV}(TMPS)(O)(OH)]⁵⁻ wzrasta o dwa rzędy wielkości w zakresie pH 9-12.6. Oznacza to znacznie większą reaktywność OOH⁻ niż H₂O₂ względem [Fe^{III}(TMPS)(OH)]⁴⁻.

Przeprowadzone badania wykazały, istotny wpływ typu liganda skoordynowanego do żelaza(III) na tworzenie oksoporfirynożelaza(IV). Spośród badanych kompleksów (Fe^{III}(TMPS)(OH), Fe^{III}(TMPS)(N-MeIm)(H₂O), Fe^{III}(TMPS)(N-MeIm)₂) największą reaktywnością charakteryzował się [Fe^{III}(TMPS)(N-MeIm)(H₂O)]³⁻. Obecność N-metylimidazolu w pozycji *trans* do wiązania O-O w przejściowym kompleksie [Fe^{III}(TMPS)(N-MeIm)(OOH)]⁴⁻ prowadzi do przesunięcia gęstości elektronowej do antywiążących orbitali liganda OOH⁻. Skutkuje to obniżeniem energii aktywacji rozerwania wiązania O-O mającej odzwierciedlenie w znacznie wyższej stałej szybkości reakcji.

W kolejnym etapie wykonano badania kinetyczne utleniania wybranych substratów (alkoholu 4-metoksybenzylowego, aldehydu 4-metoksy-benzoesowego) przez modelowe kompleksy oksoporfirynożelaza(IV). Uzyskane wyniki eksperymentalne wykazały, że typ liganda (N-MeIm, OH⁻) skoordynowanego do żelaza(IV) w pozycji *trans* do liganda okso nie ma znaczącego wpływu na reaktywność modelowego związku II. Wniosek ten został dodatkowo potwierdzony

przez obliczenia kwantowo-mechaniczne, które wykazały, że typ liganda skoordynowanego do żelaza(IV) w związku II nie wpływa istotnie na barierę energetyczną reakcji utleniania badanych substratów.

Ponadto wykonano szczegółowe badania mechanistyczne mające na celu porównanie reaktywności modeli związku I – $[\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{TMPS}^{\bullet})(\text{O})(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ i związku II – $[\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{TMPS})(\text{O})(\text{OH})]^{5-}$ względem wybranych substratów organicznych (alkoholu 4-metoksybenzylowego, aldehydu 4-metoksybenzoesowego oraz 1-fenyletanolu) (**publikacja III**). Stabilność związków I i II w roztworze wodnym silnie zależy od pH, dlatego też poprzez zmianę odczynu roztworu możemy selektywnie otrzymać każdą z reaktywnych form żelazoporfiryny. W $\text{pH} < 5.5$ jedynym produktem utleniania jest kationorodnik oksoporfirynożelaza(IV) $(\text{TMPS}^{\bullet})\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$, w $\text{pH} > 7.5$ tworzy się głównie oksoporfirynożelazo(IV) $(\text{TMPS})\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ podczas gdy mieszanina obu form powstaje w pH pośrednim. Obserwacja ta koreluje z zależnością potencjału E° ($E^\circ\text{Fe}(\text{IV})/\text{Fe}(\text{III})$ i $E^\circ(\text{P}^{\bullet})/\text{P}$) od pH dla elektrochemicznego utleniania $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TMPS})$ w środowisku wodnym.

Porównawcze badania reaktywności $[\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{TMPS}^{\bullet})(\text{O})(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ i $[\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{TMPS})(\text{O})(\text{OH})]^{5-}$ wykazały, istotną rolę zarówno typu substratu jak i reaktywnej formy żelazoporfiryny. Badania wpływu temperatury na szybkość reakcji utleniania wybranych substratów, gdzie w każdym przypadku rozerwanie wiązania C-H jest etapem determinującym szybkość reakcji utleniania wykazały, że utlenianie alkoholu 4-metoksybenzylowego oraz aldehydu 4-metoksybenzoesowego przez związek II jest procesem kontrolowanym entalpowo ($\Delta H^\ddagger > -T\Delta S^\ddagger$), podczas gdy utlenianie tych samych substratów przez związek I jest procesem kontrolowanym entropowo ($\Delta H^\ddagger < -T\Delta S^\ddagger$). W przypadku trzeciego substratu 1-fenyletanolu reakcja zarówno z udziałem związku I jak i związku II jest kontrolowana entalpowo.

Badania wpływu ciśnienia na rozerwanie wiązania C-H z udziałem obu reaktywnych form oksoporfirynożelaza(IV) pozwoliły na wyznaczenie objętości aktywacji badanych reakcji. Dodatkowo wartości ΔV^\ddagger wyznaczone dla reakcji z udziałem związku II wskazują, że stan przejściowy zdeterminowany jest w znacznym stopniu przez homolityczne rozerwanie wiązania C-H powiązane z redukcją centrum metalicznego, natomiast w przypadku związku I główną rolę odgrywa tworzenie wiązania O-H, co znajduje odzwierciedlenie w nieznacznie ujemnych wartościach objętości aktywacji.

Podsumowując, zagadnienia badawcze zrealizowane w ramach niniejszej pracy doktorskiej (publikacje I-III) pozwoliły na określenie wpływu wybranych ligandów aksjalnych skoordynowanych do żelaza w modelowym kompleksie $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TMPS})]^{3-}$ porfiryny na mechanizm aktywacji NO oraz tworzenie i reaktywność oksoporfirynożelaza(IV). Ponadto porównawcze badania reaktywności *związku I i II* w funkcji temperatury i ciśnienia dostarczyły istotnych informacji na temat mechanistycznych aspektów wpływających na reaktywność obu kompleksów.

Uzyskane wyniki pozwoliły na wskazanie nowych aspektów mających istotne znaczenie w mechanizmie aktywacji małych cząsteczek (NO i O₂) z udziałem żelazoporfirynowych kompleksów, oraz mogących się przyczynić do pełniejszego poznania mechanizmów procesów biologicznych z udziałem badanych małych cząsteczek.

Do przedstawionej pracy doktorskiej (publikacje I-III) dodano komentarz oraz jako materiał dodatkowy manuskrypt publikacji „*Interaction of NAMI-A complex with nitric oxide under physiological conditions*” stanowiący przykład rozszerzenia tematyki pracy doktorskiej na kompleksy metali egzogennych o znaczeniu biomedycznym (Appendix).

Summary

The activation of small molecules such as nitric oxide (NO) and dioxygen (O₂) plays an important role in multiple biological, environmental and industrial processes and is most commonly connected with their interaction with transition metal complexes. Coordination to the metal center leads to a change in redox properties of these small molecules. Comparison of their reactivity in the ground state, shows that the nitric oxide radical is characterized by a significant reactivity and is thus included in a group of so called “reactive nitrogen oxide species”. Therefore, in the case of NO activation on metal centers, this process rather leads to the modification of the NO reactivity than typical activation. On the other hand, the reactivity of dioxygen due to the triplet ground state and the resulting kinetic barrier is rather low. In the activation of NO, electron transfer plays the main role, whereas in the case of O₂ both electron and energy transfer are important.

The aim of the thesis was to deepen the knowledge on the activation mechanism of small molecules (NO and O₂) with the use of model iron(III) [Fe^{III}(TMPS)]³⁻ ([*meso*-tetrakis(2,4,6-trimethyl-3-sulfonatophenyl)-porphinato] iron(III)) complexes. Special attention was given towards the understanding of the mechanistic factors that have an important role in the interactions of the selected small molecules with the metal center in the studied complexes. Furthermore, one of the main goals was to determine the influence of the ligands coordinated to the metal on the activation mechanism.

The three papers published or accepted for publication in established journals listed in the “Thomson Reuters Master Journal List” form the basis for this thesis (two in “Inorganic Chemistry” and one in “Chemistry a European Journal”).

In the **first paper** detailed kinetic and mechanistic studies on the influence of the cyanide ligand (CN⁻) on the dynamics of NO binding to the water-soluble iron(III) porphyrin Fe^{III}(TMPS) were presented. In order to better understand the binding mechanism of NO to [Fe^{III}(TMPS)(CN)(H₂O)]⁴⁻ and [Fe^{III}(TMPS)(CN)₂]⁵⁻, the studies were extended to spectrophotometric and kinetic measurements on the formation of cyanido derivatives of Fe^{III}(TMPS). Analysis of the obtained results indicated that both cyanido complexes in their reactions with NO form the same nitrosyl complex, namely [Fe^{II}(TMPS)(CN)(NO⁺)]⁴⁻. A detailed mechanistic investigation of the binding of NO to [Fe^{III}(TMPS)(CN)₂]⁵⁻ allowed to determine the influence of the coordinated ligand on the reactivity of NO. Positive activation

entropy (ΔS^\ddagger) and volume (ΔV^\ddagger) data for NO binding to $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TMPS})(\text{CN})_2$, and a lack of a dependence of the observed reaction rate constant on the NO concentration, indicated a limiting dissociative reaction mechanism, where CN^- release is the rate determining step for the overall nitrosylation process. The obtained results show that in the studied reactions nitric oxide may be a stronger ligand than CN^- , which may be of importance in studies on the activation of cytochrome *c* oxidase blocked by cyanide.

Model systems based on porphyrin complexes of iron(III) have found a wide range of applications in studies on the dioxygen activation mechanism and the subsequent oxidation of inert organic compounds in catalytic enzymatic processes, e.g., cytochrome P450. $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TMPS})$ porphyrin used in the studies on the activation of NO, turned out to be a very good model system due to its good water-solubility that allowed the investigation of highly reactive catalytic forms, so called Compound I (iron(IV)-oxo porphyrin cation radical) and Compound II (iron(IV)-oxo porphyrin), as a function of pH.

Another issue covered in this thesis, is the influence of axial ligands coordinated to the iron(III) porphyrin complex on the formation of Compound II models and their reactivity (**paper II**). In pursue of this goal, a comparison of the influence of OH^- and N-methylimidazole ligands was made. N-methylimidazole was selected to obtain a model complex mimicking the active center of peroxidase, where histidine is axially coordinated to the heme iron. The Compound II mimics $[\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{TMPS})(\text{O})(\text{OH})]^{5-}$ and $[\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{TMPS})(\text{O})(\text{N-MeIm})]^{4-}$ were generated using exogeneous oxygen donors such as hydrogen peroxide (H_2O_2) or *m*-chloroperoxybenzoic acid (*m*-CPBA). This approach, referred to as a “peroxo-shunt” pathway can be described as a short-cut for the catalytic cycle of P450 cytochrome and replacement of O_2 , 2H^+ and 2e^- with H_2O_2 , peroxyacids or organic peroxides, is commonly used in model mechanistic studies on the activation of the O-O bond.

While studying this topic, detailed kinetic measurements for the reaction of $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TMPS})(\text{OH})]^{4-}$ with H_2O_2 as a function of temperature and pressure were performed. This allowed the determination of activation parameters (ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔV^\ddagger). Studies on the formation of $[\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{TMPS})(\text{O})(\text{OH})]^{5-}$ as a function of pH revealed that the reaction rate constant increases by two orders of magnitude in the pH range from 9 to 12.6. This indicates a much higher reactivity of OOH^- towards $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TMPS})(\text{OH})]^{4-}$ in comparison to H_2O_2 .

The performed studies indicated a significant influence of the axial ligand coordinated to iron(III) on the formation of iron(IV)-oxo porphyrin species. Among the studied complexes, viz. $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TMPS})(\text{OH})$, $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TMPS})(\text{N-MeIm})(\text{H}_2\text{O})$ and $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TMPS})(\text{N-MeIm})_2$, $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TMPS})(\text{N-MeIm})(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ was found to have the highest reactivity. The presence of N-methylimidazole in the *trans* position to the O-O bond in the case of the $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TMPS})(\text{N-MeIm})(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ complex pushes electron density into the anti-bonding orbitals of the OOH^- ligand. As a result, a decrease in the activation energy for O-O bond cleavage is observed, which is reflected in an increase in the reaction rate constant.

Subsequently, kinetic studies on selected substrate of 4-methoxybenzyl alcohol and 4-methoxybenzaldehyde by model iron(IV)-oxo porphyrin complexes were performed. The obtained experimental results indicated that the ligand type (N-MeIm, OH⁻) coordinated to iron(IV) in the *trans* position to the oxo ligand did not significantly influence the reactivity of Compound II models. This conclusion was further supported by quantum-mechanical calculations which showed that there is no influence of the nature of the coordinated ligand on the energy barrier for oxidation of the studied substrates.

Moreover, a detailed mechanistic study to compare the reactivity of Compound I $[\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{TMPS}^{\bullet})(\text{O})(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ and Compound II $[\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{TMPS})(\text{O})(\text{OH})]^{5-}$ models towards selected organic substrates (4-methoxybenzyl alcohol, 4-methoxybenzaldehyde and 1-phenylethanol) was performed (**paper III**). The stability of Compounds I and II in aqueous solution strongly depends on pH, thus by controlling the acidity of the solution it is possible to selectively obtain each of the reactive iron porphyrin forms. At pH lower than 5.5, the sole oxidation product formed is an iron(IV)-oxo cation radical $(\text{TMPS}^{\bullet})\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$, at pH higher than 7.5 iron(IV)-oxo porphyrin $(\text{TMPS})\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ is mainly formed, whereas a mixture of both is formed in the middle pH range. This observation correlates with the $E^{\circ'}$ potential ($E^{\circ'}\text{Fe}(\text{IV})/\text{Fe}(\text{III})$) and $E^{\circ'}$ ($\text{P}^{\bullet}/\text{P}$) dependence on pH in the electrochemical oxidation of $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TMPS})$ in aqueous medium.

Comparison of the reactivity of $[\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{TMPS}^{\bullet})(\text{O})(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ and $[\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{TMPS})(\text{O})(\text{OH})]^{5-}$ toward the selected substrates showed an important role of both substrate type and the reactive form of the iron porphyrin. Studies on the influence of temperature on the oxidation rates for selected substrates, with C-H bond abstraction as rate determining step, indicated that oxidation of 4-

methoxybenzyl alcohol and 4-methoxybenzaldehyde by Compound II is an enthalpy-controlled process ($\Delta H^\ddagger > -T\Delta S^\ddagger$), whereas the reaction of these substrates with Compound I is entropy-controlled ($\Delta H^\ddagger < -T\Delta S^\ddagger$). In the case of the third substrate (1-phenylethanol), reactions with both Compound I and II are enthalpy-controlled under ambient temperature conditions.

Pressure dependence studies on C-H abstraction in the presence of both reactive iron(IV)-oxo species, allowed the determination of activation volumes for the studied reactions. Positive values of ΔV^\ddagger obtained for the reactions with Compound II indicate that the transition state is mainly determined by a homolytic cleavage of the C-H bond coupled to reduction of the metal center, whereas in the case of Compound I O-H bond formation plays the main role which is reflected in a slightly negative activation volume.

Summarizing, the research goals reached and presented in this thesis (papers I-III) allowed to determine the influence of selected axial ligands coordinated to iron center in model $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TMPS})$ complex on the mechanism of NO activation as well as on formation and reactivity of iron(IV)-oxo porphyrin. What is more, comparative studies on the reactivity of Compounds I and II in a function of temperature and pressure provided important insight on the mechanistic aspects influencing the reactivity of both complexes.

Obtained results allowed identification of new factors of particular importance in the activation mechanisms of small molecules (NO and O_2) with the involvement of ironporphyrin complexes, and contributed to a better understanding of biological processes in which these molecules participate.

Included with the presented thesis (papers I-III) is a comment on performed studies and also a manuscript of a paper „*Interaction of NAMI-A complex with nitric oxide under physiological conditions*“ which is an example of broadening the topic of the thesis by exogenous metal complexes of biomedical relevance (Appendix).