



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie

Wydział Chemii

Zakład Chemii Nieorganicznej

Zespół Fizykochemii Koordynacyjnej i Bionieorganicznej

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

NO versus HNO chemistry.

**Studies on the formation, stability and reactivity
of nitrosylcobalamin and model complexes**

mgr inż. Justyna Anna Polaczek

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem:

Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Rudiego van Eldika

dr Łukasza Orła

Reakcje generowania nitrozylkobalaminy (CblNO) oraz właściwości chemiczne i biochemiczne tego kompleksu były przedmiotem intensywnych badań na przestrzeni ostatnich 20 lat. Szczegółowe badania przeprowadzone przez Marię Wolak i współpracowników,¹ które obejmowały reakcje kobalaminy z tlenkiem azotu(II) (NO), skłoniły wielu naukowców do podjęcia dalszych starań nad poszerzeniem stanu wiedzy dotyczącej tworzenia, trwałości oraz biologicznego znaczenia CblNO.

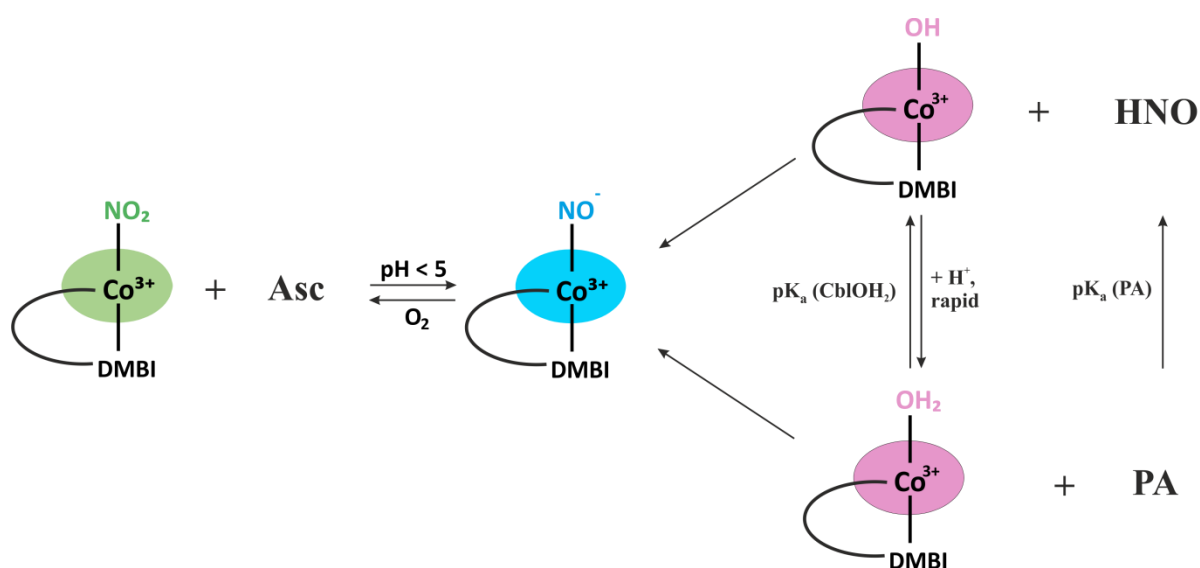
Tematem niniejszej pracy było zbadanie reakcji prowadzących do powstawania nitrozyłowej pochodnej witaminy B₁₂ czyli nitrozylokobalaminy (CblNO) oraz pokrewnych związków modelowych: porfiryny Co^{III} i Fe^{III}(edta) w środowisku wodnym. Wszystkie wspomniane reakcje monitorowano stosując metody spektroskopowe i kinetyczne, a wyniki tychże pomiarów pozwoliły na lepsze zrozumienie mechanizmów obserwowanych przemian.

Mechanistyczne badania przeprowadzone w ramach prezentowanej rozprawy doktorskiej koncentrują się na dwóch prawdopodobnych ścieżkach reakcji prowadzących do generowania CblNO. Pomimo, że wspomniane wcześniej tworzenie nitrozylkobalaminy na drodze bezpośredniej reakcji zredukowanej formy Witaminy B₁₂ (CblCo(II)) i tlenku azotu(II) zostały szczegółowo opisane;¹ do tej pory nie udowodniono czy możliwe jest również otrzymanie tego związku w wyniku redukcji nitrokobalaminy (CblNO₂). W związku z tym pierwsza z analizowanych ścieżek reakcji obejmowała badanie możliwości wewnątrzkomórkowego generowania CblNO poprzez redukcję CblNO₂ oraz dobór odpowiedniego czynnika redukującego. Zaprezentowane w tej pracy badania wykazały, że nitrozylkobalamina (CblNO) powstaje podczas reakcji między nitrokobalamina i kwasem askorbinowym w pH < 5, w kilkietapowym procesie, który obejmuje: tworzenie zredukowanej formy witaminy B₁₂ (CblCo(II)) oraz tlenku azotu(II) jako produktów pośrednich. Jednocześnie stwierdzono, że ta sama reakcja przeprowadzona w pH 7 prowadzi do otrzymania zredukowanej formy Witaminy B₁₂ (CblCo(II)), natomiast brak jest jakichkolwiek dowodów na możliwą redukcję skoordynowanego w nitrokobalaminie jonu azotanowego(III). Wykazano również, że w środowisku pH = 7.2, ze względu na wysoką wydajność tworzenia nitrokobalaminy, jon azotanowy(III) spowalnia redukcję akwakobalaminy przez Asc aż 200 razy, co dowodzi jak ważną rolę pełnią jony NO₂⁻ w kontrolowaniu biologicznych procesów redoks.

Drugim badanym procesem było tworzenie CblNO w wyniku reakcji pomiędzy akwa/hydroksykobalaminą i nitroksylenem (HNO) uwalnianym przez kwas Piloty’ego (PA). Przedstawione w niniejszej rozprawie badania wykazały, że pomimo inertnego charakteru CblOH, w środowisku zasadowym HNO reaguje z CblOH tworząc CblNO. Udowodniono, że przy małym stężeniu kwasu Piloty’ego, etapem limitującym szybkość reakcji jest jego rozkład w celu uwolnienia HNO. Z kolei reakcja pomiędzy CblOH i HNO jest czynnikiem limitującym szybkość reakcji przy wysokim stężeniu kwasu Piloty’ego. Ponadto wykazano, że tylko HNO (a nie ${}^3\text{NO}^-$), reaguje z CblOH, a otrzymane dane kinetyczne dla reakcji CblOH z nadmiarem HNO pozwoliły na określenie pK_a (HNO) z wykresu zależności szybkości początkowej reakcji w funkcji pH ($\text{pK}_a = 11,47 \pm 0,04$).

Szczególnie interesującym zagadnieniem są obserwacje przeprowadzone w neutralnym pH, w którym to kwas Piloty’ego jest trwały i nie uwalnia nitroksylu. We wspomnianych warunkach zaobserwowano szybkie tworzenie CblNO, a otrzymane wyniki sugerują, że CblOH_2 reaguje bezpośrednio z PA tworząc produkt pośredni, który deprotonuje w pH obojętnym. Następnie w wyniku zerwania wiązania S-N we wspomnianym kompleksie pośrednim, następuje tworzenie CblNO przy jednoczesnym uwolnieniu PhSO_2^- . Można zatem stwierdzić, że skoordynowanie PA do CblOH_2 powoduje obniżenie jego wartości pK_a w stosunku do wolnego PA aż o 4 jednostki, co indukuje wewnątrzcząsteczkowe tworzenie HNO i uwalnianie PhSO_2^- w pH obojętnym.

Obie badane ścieżki otrzymywania CblNO można podsumować posługując się schematem A.



Schemat A. Badane ścieżki otrzymywania CblNO.

Dalsze badania reakcji dwóch modelowych związków kompleksowych tj. $\text{Co}^{\text{III}}(\text{TPPS})$ i $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{edta})$ z nitroksylenem uwolnionym z kwasu Piloty'ego pozwoliły na porównanie mechanizmów reakcji tworzenia nitrozylowych pochodnych trzech różnych kompleksów.

Analiza reakcji $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{TPPS})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}/[\text{Co}^{\text{III}}(\text{TPPS})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^{4-}/[\text{Co}^{\text{III}}(\text{TPPS})(\text{OH})_2]^{5-}$ z kwasem Piloty'ego wskazuje na tworzenie $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{TPPS})(\text{NO}^-)]$ jako produktu końcowego, który otrzymać można także w trakcie reakcji $\text{Co}^{\text{II}}(\text{TPPS})$ z $\text{NO}(\text{g})$. Ponadto przeprowadzone badania oddziaływania $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{TPPS})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}/[\text{Co}^{\text{III}}(\text{TPPS})(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^{4-}$ z PA przy $\text{pH} < 10$ dowodzą, że $\text{Co}^{\text{III}}(\text{TPPS})$ w przeciwieństwie do CblOH_2 nie przyspiesza uwalniania nitroksylu z kwasu Piloty'ego. Nie wykazano także bezpośredniego wiązania PA z $\text{Co}^{\text{III}}(\text{TPPS})$, jak to miało miejsce w przypadku CblOH_2 .

Badania przeprowadzone dla reakcji HNO z $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{edta})(\text{H}_2\text{O})]^-$ sugerują generowanie $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{edta})(\text{HNO}/\text{NO})]^{-/2-}$, produktu tworzącego się również w trakcie reakcji pomiędzy $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{edta})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ i $\text{NO}(\text{g})$. Otrzymana zależność pH reakcji sugeruje, że przebiega ona według mechanizmu zakładającego tworzenie kompleksu pośredniego: $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{edta})(\text{OH})]^{2-}$ - PA, który następnie ulega przegrupowaniu i ostatecznie uwalnia wodę i PhSO_2^- , a jako ostateczny produkt powstaje $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{edta})(\text{HNO}/\text{NO})]^{-/2-}$.

Podsumowując, wyniki przedstawione w niniejszej pracy stanowią ważny wkład w lepsze zrozumienie mechanizmów powstawania nitrozylowego kompleksu witaminy B_{12} (nitrozylokobalaminy) i związków modelowych: $\text{Co}^{\text{III}}(\text{TPPS})(\text{NO}^-)$ i $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{edta})(\text{HNO}/\text{NO})]^{-/2-}$, a także chemii koordynacyjnej HNO/NO^- .