

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ
АРМЕНИЯ

Հայաստանի քիմիական հանդես 66, №3, 2013 Химический журнал Армении

УДК 541.65:543:422

ДИОКСИГЕНАЦИЯ МОНОКСИДА АЗОТА (NO) МОДЕЛЯМИ
АКТИВНОГО ЦЕНТРА ОКСИ-ГЛОБИНОВ

Т. С. КУРТИКЯН и Ш. Р. ЭКСУЗЯН

Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии
НАН Республики Армения

Центр исследования строения молекулы НАН Республики Армения
Армения, 0014, Ереван, пр. Азатутян, 26

Факс: (+37410) 282267 E-mail: kurto@netsys.am

Поступило 30 VII 2013

В работе приведены литературные данные и наши попытки выяснения механизма реакции диоксигенации оксида азота (ДОА) окси-глобинами. Эта реакция ответственна за нейтрализацию избыточного NO в условиях его перепроизводства в организме, перевода его в нитрат-анион, легко выводимый из организма. С использованием микропористых слоев металлопорфиринов $M(\text{Por})$ ($M = \text{Fe}, \text{Co}$; Por – мезо-тетрафенил- и мезо-тетра-*p*-толил-порфиринов дианионы), полученных сублимацией на низкотемпературную ($T = 80 \text{ K}$) подложку, сконструированы модели активного центра окси-глобинов общей формулы $(L)M(\text{Por})(\text{O}_2)$ (L – N-электронодонорный лиганд). Взаимодействие этих систем с NO контролировалось спектрально (ИК и электронные спектры поглощения), начиная от 80 K до комнатных температур. В случае Fe-порфиринов реакция ДОА протекает уже при 80-100 K. При этом нет спектральных признаков образования каких-либо промежуточных соединений. Таким образом, либо реакция идет по согласованному механизму в одну стадию, либо активационные барьеры перехода между промежуточными структурами настолько низки, что не дают возможности их накопления в спектрально-регистрируемых количествах. Показано, что Co-порфирины также промотируют реакцию ДОА. В этом случае, однако, образование 6-координационных нитратных комплексов начинается при 180 K, а при более низких температурах наблюдаются интермедиаты, проливающие свет на механизм процесса. На основании измерения ИК-спектров изотопных соединений, содержащих $^{18}\text{O}_2$, ^{15}NO , N^{18}O , $^{15}\text{N}^{18}\text{O}$, и расчетов по теории функционала плотности колебательных частот и их изотопных сдвигов показано, что исходной структурой в реакции ДОА является 6-координированный пероксинитритный комплекс $(L)\text{Co}(\text{Por})(\eta^1\text{-OONO})$. Это первое надежное доказательство реализации такой структуры при взаимодействии NO с кислородными комплексами переходных металлов. Дальнейшие стадии реакции включают гомолитический разрыв пероксидной связи, атаку кобальтильного кислорода азотом NO_2 с образованием 6-координированного нитратно-го комплекса и его элиминирование в виде нитрат-аниона при нагреве до комнатной температуры.

Библ. ссылок 48.

Оксид азота(II) (NO) – двухатомная свободнорадикальная молекула, играющая чрезвычайно важные роли в живых организмах. Интерес к NO был вначале вызван его способностью регулировать тонус сосудов [1]. Очень скоро, однако, список биологических функций NO существенно расширился. Оксид азота оказался связан с передачей сигналов нейронами, иммунными реакциями, ингибированием агрегации тромбоцитов, регулированием свертываемости крови и другими функциями [2-4]. Таким образом, молекула, долгое время считавшаяся токсичной и потенциально канцерогенной, проявила разнообразные биологические свойства, и в 1992 г. журнал “Science” присвоил ей статус “молекулы года”, а в 1998 г. за исследование физиологической роли оксида азота Р. Фуршготту, Л. Иньяро и Ф. Мураду была присуждена Нобелевская премия.

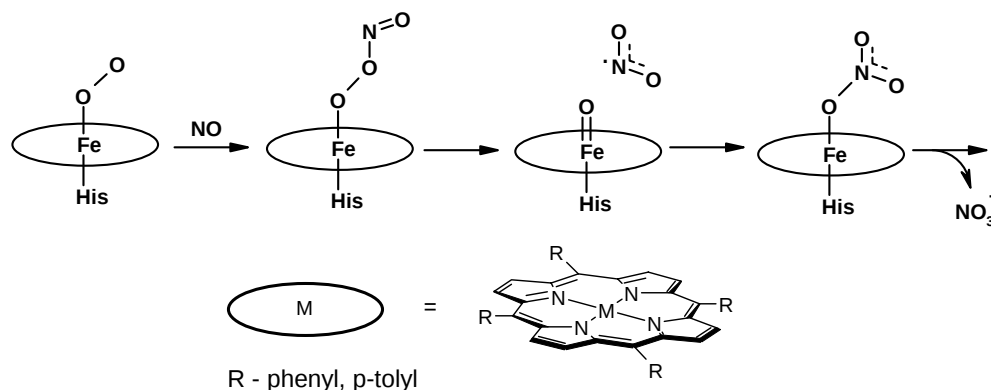
Физиологическая активность NO во многих случаях связана с его взаимодействием с железопорфиринами, которые являются активными центрами многочисленных жизненно важных ферментов – гемопротеинов [3]. Свои функции они выполняют в основном посредством координации центральным ионом металла лигандов различной природы и последующими их превращениями.

Оксид азота(II) в организмах млекопитающих постоянно образуется в малых количествах из L-аргинина с участием гем-содержащих NO-синтаз. В то время как субмикромольные концентрации NO достаточны для осуществления важнейших физиологических функций, его перепроизводство может привести к вредным для организма последствиям, главным образом, вследствие образования в результате реакции с супероксид-ионом пероксинитрит-аниона – сильного окисляющего и нитрующего агента [5]. В настоящее время общепринято, что основными агентами, осуществляющими нейтрализацию избыточного NO, являются гемопротеины. Взаимодействие NO с MbO₂ или HbO₂ ведет к образованию относительно безвредного нитрат-аниона (NO₃⁻) и окисленных форм гемопротеинов metMb или metHb [6].

Принято считать, что эта реакция, носящая название реакции диоксигенации оксида азота, идет по механизму, включающему последовательность стадий, представленных в схеме 1 [7]. Предполагается, что реакция инициируется образованием короткоживущего пероксинитритного комплекса, в котором пероксидная связь рвется, приводя к находящейся в клетке свободнорадикальной паре, состоящей из феррил-гемоглобина и диоксида азота. Атака феррильного кислорода атомом азота NO₂ должна привести к образованию 6-координированного нитратного комплекса, из которого нитрат элиминируется в виде нитрат-аниона, окисляя гемоглобин в metHb. Тем не менее, ни для представляющих особый интерес гемопротеинов, ни для модельных железо-порфиринов к

настоящему времени нет прямых доказательств реализации в реакции ДОА вышеприведенных структур.

Схема 1



Исследуя методом быстросканирующей электронной спектроскопии взаимодействие NO с окси-гемоглобином в щелочном растворе, Herold обнаружила в миллисекундном диапазоне времен интермедиат, который отнесла к высокоспиновому пероксинитритному комплексу [8]. В свою очередь, в спектрах ЭПР быстро замороженных образцов этой реакции в том же временном интервале наблюдали сигнал, свидетельствующий об образовании высокоспинового соединения. Хотя ЭПР спектроскопия не может достоверно почувствовать разницу между координированным пероксинитритом $\text{Hb}(\eta^1\text{-OONO})$ и нитратом $\text{Hb}(\eta^1\text{-ONO}_2)$ на основании совпадения электронных спектров поглощения образцов, использованных для съемки спектров ЭПР, с наблюдаемыми Herold, авторы [9] остановили свой выбор на координированном пероксинитрите.

В то же самое время Goldstein с сотр. регистрировала те же самые электронные спектры, что и Herold, при исследовании взаимодействия феррил-гемоглобина HbFe=O с NO_2 и пришла к резонному выводу, что наблюдаемые Herold спектры, скорее всего, принадлежат нитратному, а не пероксинитритному комплексу [10]. В свою очередь, спектры резонансного комбинационного рассеяния (РКР) быстро замороженных образцов реакции NO с окси-Hb в тех же экспериментальных условиях, что и у Herold, выявили линии РКР в тех же областях спектра, что и в охарактеризованных нами 6-координационных нитратных комплексах Fe-порфиринов [11, 12]. На основании этого авторы пришли к заключению, что миллисекундный интервал реакции слишком большой для обнаружения пероксинитритного интермедиата и, если он образуется, его надо искать в микросекундном диапазоне времен [13].

Таким образом, к настоящему времени нет доказательств, свидетельствующих о том, что реакция ДОА идет с первоначальным образованием промежуточного пероксинитритного комплекса. Более того, в недавнем исследовании [14], проведенном методом временно-разрешенной УФ-видимой спектроскопии, не

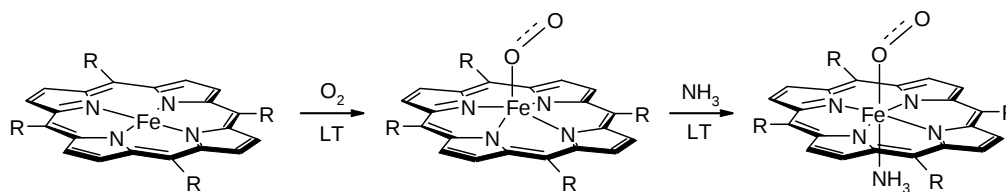
было получено свидетельств образования радикальной пары, состоящей из феррил-гемоглобина и NO_2 , тем самым ставя под сомнение наличие в реакции ДОА второй из представленных в схеме 1 стадий.

Мы полагали, что наиболее достоверную информацию о механизме реакции ДОА могла бы дать колебательная, в частности ИК-спектроскопия, подкрепленная данными по расчетам частот колебаний промежуточных соединений современными квантово-химическими методами. При этом основным инструментом для однозначной интерпретации ИК спектров должны были служить изотопсодержащие кислород и оксид азота. Необходимо было также максимально упростить систему и использовать в качестве модели активного центра гемопротеинов железо-порфириновое соединение с соответствующим лигандным окружением.

Разработанная в нашей лаборатории методика [15, 16] предоставляла такую возможность. Комплексы *мезо*-тетраарилпорфиринов отличаются тем замечательным свойством, что при повышенных температурах их можно сублимировать в высоком вакууме без разложения. Осаждение их на подложку, охлаждаемую жидким азотом, приводит к формированию аморфных микропористых слоев, способных взаимодействовать с летучими лигандами по всей толщине. Такие слои являются исключительно удобными объектами для исследования методами колебательной и электронной абсорбционной спектроскопии, поскольку, с одной стороны, в спектрах отсутствуют ограничивающие информативность методов полосы поглощения растворителей, с другой, нет температурных ограничений, связанных с их замерзанием. Последнее замечание особенно важно, поскольку процессы, протекающие в активном центре ферментов, обычно характеризуются очень высокими скоростями и, поэтому, чтобы следить за их ходом, необходимо либо применение высокоскоростных временно-разрешенных спектральных методов, либо низких температур, позволяющих стабилизировать интермедиаты для их описания тем или иным способом.

Модели окси-гемов с *транс*-электронодонорным аммиачным лигандом были сконструированы с помощью последовательности реакций, приведенных в схеме 2 [17].

Схема 2



Их образование было подтверждено измерениями ИК и электронных спектров поглощения с применением также изотопного кислорода $^{18}\text{O}_2$, в экспери

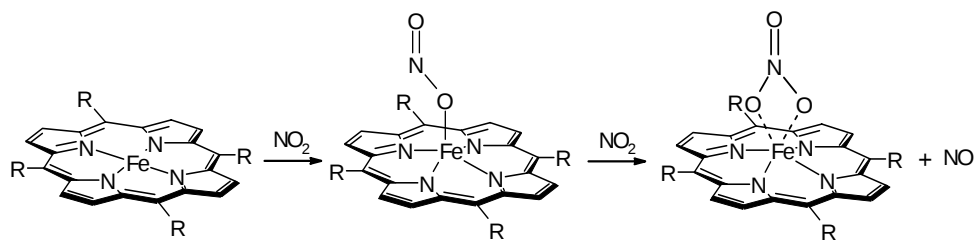
ментах с которым полоса валентного колебания координированного кислорода смещалась в низкочастотную область на 68 см^{-1} в хорошем согласии с расчетами, проведенными в приближении возмущенного гармонического осциллятора.

На слой, содержащий 6-координационный кислородный комплекс, при температуре жидкого азота были поданы небольшие порции NO и последующие превращения прослеживались *in-situ* спектральными измерениями в процессе медленного нагрева системы до комнатной температуры.

Здесь следует отметить, что до наших исследований 6-координационные нитратные комплексы не были известны ни для гемопротеинов, ни для модельных систем, хотя очевидно, что нитрат должен был бы хотя бы кратковременно оставаться координированным с металлоцентром в той же реакции ДОА. Очевидно, не были известны и колебательные спектры этих комплексов. В то же время для надежной интерпретации спектров интермедиатов, образующихся в ходе реакции ДОА, надо было располагать спектрами 6-координационных нитратных комплексов металлопорфиринов. Мы полагали, что действием электронодонорных лигандов на аморфные слои 5-координационных нитратных комплексов в условиях низких температур можно будет стабилизировать и спектрально охарактеризовать такие комплексы.

5-Координационные нитратные комплексы Fe-порфиринов можно получить реакцией замещения хлора в $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Por})\text{Cl}$ нитрат-анионом в присутствии избытка AgNO_3 [18]. Однако эксперименты показали, что полученные таким образом комплексы не удастся сублимировать в высоком вакууме без частичного их разложения. Таким образом, 5-координированные нитратные комплексы следовало получить, исходя из сублимированных слоев Fe^{II}-порфиринов. В этом нам помогла реакция, обнаруженная в работе [19], в которой было показано, что взаимодействие газообразного NO_2 с микропористыми слоями Fe^{II}-порфиринов ведет в итоге к образованию нитратного комплекса. Как было показано в дальнейшем, реакция эта идет в две стадии. Вначале образуется нитритный комплекс, который при взаимодействии с дополнительными порциями диоксида азота ведет к образованию нитратного комплекса и выделению NO [20] (схема 3).

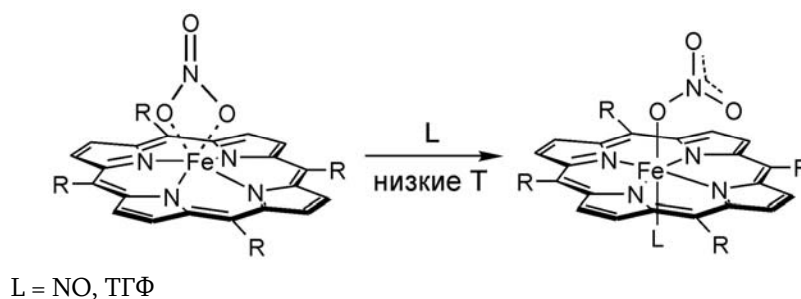
Схема 3



Нитритные комплексы, полученные таким образом, были первыми 5-координационными нитритными комплексами железопорфиринов $\text{Fe}(\text{Por})(\eta^1\text{-ONO})$ (Por – мезо-тетрафенилпорфириinato- и мезо-тетра-р-толилпорфириinato-дианионы) [21], колебательные спектры которых говорили в пользу координации нитритного лиганда через кислородный атом, а не атом азота, как в нитрокомплексах Со-порфиринов [22], а спин-чувствительные полосы указывали на высокоспиновое состояние иона железа. Комплекс в твердом состоянии был довольно устойчив и в вакууме разлагался в течение нескольких дней, образуя, в основном, нитрозильный комплекс $\text{Fe}(\text{Por})(\text{NO})$.

Действием NO и тетрагидрофурана (ТГФ) на аморфные слои нитратных комплексов железопорфиринов при низких температурах были стабилизированы и спектрально охарактеризованы 6-координационные нитратные комплексы. Их образование сопровождалось переходом нитратного лиганда из биденатной [23] в монодентатно-координированную форму (схема 4), а спиновое состояние металла зависело от природы 6-го лиганда, оставаясь высокоспиновым при $L = \text{ТГФ}$ и переходя в низкоспиновое состояние в случае NO.

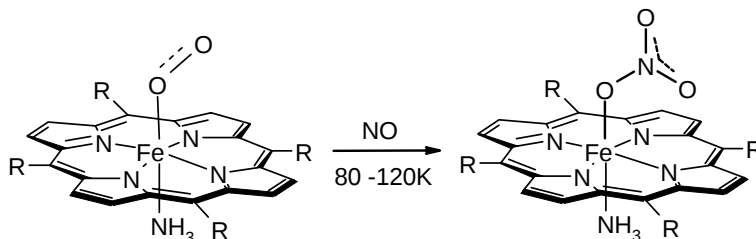
Схема 4



Располагая спектральными данными по колебательным частотам монодентатно-координированной нитратной группы, мы приступили к спектральному мониторингу реакции NO с моделью окси-глобина $(\text{NH}_3)\text{Fe}(\text{Por})(\text{O}_2)$, начиная от температур жидкого азота до комнатных. Однако, к нашему большому удивлению, уже в температурном интервале 80-100 К наблюдалось образование 6-координированных нитратных комплексов $(\text{NH}_3)\text{Fe}(\text{Por})(\text{ONO}_2)$ без каких-либо признаков образования промежуточных соединений [17]. Таким образом, если предполагаемый пероксинитритный комплекс первоначально и формировался, активационный барьер его изомеризации в нитратный комплекс должен был быть очень низким, $\leq \sim 7 \text{ ккал/моль}$, принимая во внимание низкотемпературные условия эксперимента. Образовавшийся нитратокомплекс был стабилен вплоть до 200 К, но затем отщеплял нитрат-анион с одновременным окислением железопорфирина. Хотя этот процесс в точности воспроизводил реакцию NO с оксигемоглобинами, исследованный температурный интервал (80-293 К) не позволил охарактеризовать интермедиаты, предшествующие образованию 6-коорди-

нированного нитратного комплекса. Имея намерения понизить низкотемпературную границу проводимых исследований до 30-40 К, мы все же не исключаем возможности, что реакция ДОА, осуществляемая гемопротейнами, идет по согласованному механизму в одну стадию. Здесь, однако, следует отметить, что при взаимодействии пероксинитрит-аниона с metHb и metMb стадия образования радикальной пары, состоящей из феррилы и диоксида азота, действительно наблюдается [24].

Схема 5

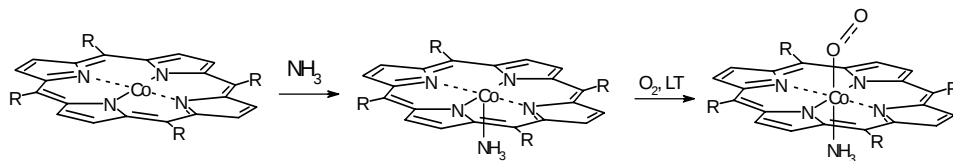


Способностью обратимо связывать кислород обладают не только аморфные сублиматы порфиринов Fe с лигандами различной природы в *транс*-положении к координированному кислороду [25, 26], но и соседствующие с ним в периодической таблице порфирины Co [27-29] и Mn [30], и нельзя было исключить, что и эти металлопорфирины способны осуществлять реакцию ДОА. Очевидно при этом, что изменение природы металла могло бы внести свои коррективы в характер процесса, и спектральный мониторинг реакции мог бы дать более богатую информацию, нежели в случае с Fe-порфиринами. Следует отметить, что техника замещения в гемопротейнах железопорфиринового центра порфирином какого-либо иного переходного металла весьма полезна [31] в особенности при работе с Co-порфиринами, которые, в отличие от не активных в ЭПР Fe(II)-порфиринов (d^6), могут быть исследованы этим методом вследствие нечетного числа электронов (d^7). ЭПР исследования дали много ценной информации об электронной и геометрической структуре кобоглобинов, которая была недоступна для диамагнитных дезокси- и окси-гемопротейнов [31].

При применении в качестве модельных соединений порфиринов кобальта, Co(Por), метод приготовления моделей окси-кобоглобинов несколько отличался от того же для железных аналогов. Поскольку в отличие от Fe(II)-порфиринов константа связывания первого аксиального лиганда K_1 в Co(II)-порфиринах значительно больше, чем второго K_2 ($K_1 \gg K_2$) [32], действием малых количеств лиганда L на аморфные слои Co-порфиринов можно было получить 5-координированные комплексы Co(Por)(L), последующее взаимодействие которых с O_2 приводило к образованию 6-координированных кислородных комплексов, как это представлено в схеме 5. По сравнению с Fe-порфиринами, это

создает большие преимущества, поскольку можно работать с лигандами с относительно высокими температурами замерзания. В частности, это относится к 1-метилимидазольному лиганду, моделирующему имидазол гистидина – наиболее часто встречающегося в гемопротеинах аксиального лиганда.

Схема 6



R - phenyl, p - tolyl

Нами было впервые показано, что реакцию ДОА осуществляют и Со-порфирины [33]. В отличие от Fe-аналогов, однако, образование 6-координационных нитратных комплексов шло при значительно более высоких температурах, и при низких температурах удалось зафиксировать и спектрально охарактеризовать интермедиаты, пролившие свет на ход реакции. В ИК-спектрах системы $(\text{NH}_3)\text{Co}(\text{Por})(\text{O}_2) + \text{NO}$ в температурном интервале 80-120 К наблюдался рост коррелирующих по интенсивности полос, которые претерпевали соответствующие сдвиги при использовании изотопных $^{18}\text{O}_2$, ^{15}NO и N^{18}O . В предположении образования 6-координированного пероксинитритного комплекса в рамках теории функционала плотности были проведены расчеты частот колебаний вместе с предсказываемыми сдвигами частот при изотопозамещении. Эти данные суммированы в табл. 1.

Вначале была определена равновесная геометрия пероксинитритного лиганда для простейшей модельной системы $(\text{NH}_3)\text{Co}(\text{P})(\text{OONO})$, включающей порфиновый лиганд (P – порфинато дианион). В этом случае при 77 К *цис*-изомер был на 12 кДж/моль более стабилен, чем *транс*-изомер. В исследованном экспериментально мезо-тетра-фенилпорфирином производном $(\text{NH}_3)\text{Co}(\text{TPP})(\text{OONO})$ стерические факторы играют важную роль, поскольку, как показали вычисления, в этом случае *цис*-изомер менее стабилен, чем *транс*-изомер, на 56 кДж/моль. По этой причине и исходя из того, что рассчитанные значения частот для *транс*-изомера были ближе к экспериментально наблюдаемым, вычисление относительных изотопных сдвигов частот колебаний было проведено для *транс*-изомера.

Следует отметить, что в подобных расчетах величины изотопных сдвигов заслуживают большего доверия, чем абсолютные значения частот. Как видно из табл. 1, рассчитанные и экспериментальные сдвиги очень близки, что дает вес

кие основания утверждать, что нам впервые удалось зафиксировать и спектрально охарактеризовать координированный пероксинитрит (схема 7) [33].

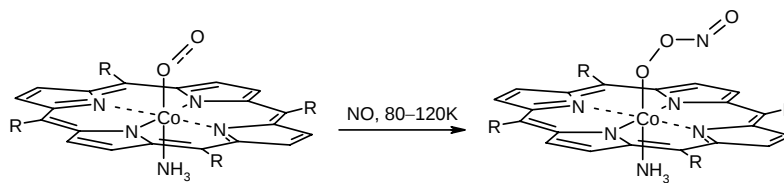
Таблица 1

Частоты ИК-полос и их отнесение для группы Co-OONO.

Расчеты проведены для (NH₃)Co(P)(OONO) (P – порфинато дианион), в которой равновесная геометрия предполагает транс-конфигурацию OONO лиганда (диэдральный угол равен 174.44°). Проведены расчеты также для (NH₃)Co(TPP)(OONO) для обоих цис- и транс-изомеров.

Аддукт	ν (N=O), $[\Delta\nu]=\nu$ - визотоп		ν (O-O-N)s, δ (O-N=O), $[\Delta\nu]=\nu$ -визо- топ		ν (O-O-N)a, δ (O-N=O), $[\Delta\nu]=\nu$ -визо- топ		ν (Co-O), $[\Delta\nu]=\nu$ - визотоп	
	Экспер.	Расчет	Экспер.	Расчет	Экспер.	Расчет	Экспер.	Расчет
(NH ₃)Co(TTP)(OONO)	1596	1678	954	967	740	711	544	560
(NH ₃)Co(TTP)(¹⁸ O ¹⁸ ONO)	1594 [2]	1677 [1]	924 [30]	930 [37]	~710 [30]	686 [25]	522 [22]	536 [24]
(NH ₃)Co(TTP)(OO ¹⁵ NO)	1564 [32]	1647 [31]	946 [8]	960 [7]	737 [3]	708 [3]	542 [2]	559 [1]
(NH ₃)Co(TTP)(¹⁸ O ¹⁸ O ¹⁵ NO)	1564 [32]	1646 [32]	914 [40]	922 [45]	~710 [30]	683 [27]	523 [21]	536 [24]
(NH ₃)Co(TTP)(¹⁸ O ¹⁸ ON ¹⁸ O)	1555 [41]	1635 [42]	916 [38]	925 [42]	~707 [33]	681 [30]	522 [22]	536 [24]
цис-(NH ₃)Co(P)(OONO)	–	1702	–	910	–	796	–	575
транс-(NH ₃)Co(TPP)(OONO)	–	1665	–	967	–	704	–	565
цис-(NH ₃)Co(TPP)(OONO)	–	1673	–	–	–	798	–	573

Схема 7

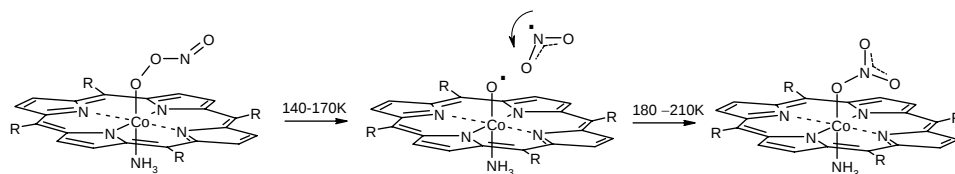


Хотелось бы отметить, что промежуточное образование пероксинитритного комплекса постулируется во многих исследованиях, посвященных реакции NO с кислородными аддуктами различных металлоорганических соединений [34-36]. Однако ни в одном из этих исследований четких доказательств реализации такой структуры не имеется. Более того, нет подтвержденных изотопозамеще-

нием спектральных характеристик координированной пероксинитритной группы, хотя таковые имеются для пероксинитрит аниона [37] и соответствующей кислоты [38]. Между тем, обнаруженные в нашей работе данные по колебательным спектрам координированной пероксинитритной группы могут быть весьма полезны для работ, в которых такая структура предлагается. Природа металла при этом не должна будет существенным образом повлиять на общий характер спектра. Таким образом, колебательные спектры (ИК и КР) становятся надежным методом идентификации интермедиатов, содержащих координированную пероксинитритную группу.

При нагреве слоя, содержащего 6-координационный пероксинитритный комплекс, в области 150-170 К наблюдалось разложение пероксинитрита. При этом полоса в области 950 см^{-1} , которая представляет собой преимущественно валентное колебание пероксидной связи, исчезала полностью, свидетельствуя о ее разрыве (схема 8). В спектрах появлялись полосы, свидетельствующие об образовании на этой стадии реакции NO_2 , однако изотопочувствительная полоса, которую можно было бы отнести к колебанию Co-O кобальтильного фрагмента, в спектрах не наблюдалась, по-видимому, из-за ее низкой интенсивности.

Схема 8



Дополнительные доказательства образования свободнорадикальной пары в клетке, содержащей кобальтильный фрагмент и молекулу NO_2 , были получены в экспериментах, в которых в качестве аксиального лиганда L был использован другой N -донорный лиганд – пиридин. В сконструированных с этим лигандом кислородных комплексах $(\text{Py})\text{Co}(\text{Por})(\text{O}_2)$ молекулярный кислород связан слабее, о чем свидетельствуют как значения частот координированного кислорода $\nu(\text{O}_2)$ в ИК-спектрах [39], так и эксперименты по спектрально-контролируемой откачке слоя при повышении температуры. Лабильный характер связывания кислорода в этом комплексе приводит к тому, что при взаимодействии с NO , наряду с образованием пероксинитритного комплекса, идет частичное окисление NO . В условиях низких температур это приводит к образованию в слое относительно стабильных форм *asym*- N_2O_3 [40] и *sym*- N_2O_4 [41]. Как следствие, в результате нагрева системы до 210 К вместе с 6-координационным нитратным комплексом $(\text{Py})\text{Co}(\text{Por})(\eta^1\text{-ONO}_2)$ образуются и небольшие количества нитритного $(\text{Py})\text{Co}(\text{Por})(\text{NO}_2)$ [42] и стабильного при этих температурах 6-координационного нитрозильного $(\text{Py})\text{Co}(\text{Por})(\text{NO})$ [43] комплексов вследствие взаимодействия NO_2 и NO с 5-координационным пиридиновым комплексом $(\text{Py})\text{Co}(\text{Por})$.

Для доказательства образования свободнорадикальной пары в клетке были поставлены следующие эксперименты. На слой $(\text{Py})\text{Co}(\text{Por})(\text{O}_2)$ при температурах жидкого азота были поданы небольшие инкременты ^{15}NO и система была нагрета до 170 К. В этих условиях слой содержал разложившийся пероксинитритный комплекс и небольшие количества $\text{asym-}^{15}\text{N}_2\text{O}_3$ и $\text{sym-}^{15}\text{N}_2\text{O}_4$. Слой был охлажден до 150 К, свободный ^{15}NO был откачан и в криостат были поданы большие порции NO с естественным содержанием азота. Нагрев системы до 180 К приводил к полному изотопному обмену в $\text{asym-}^{15}\text{N}_2\text{O}_3$ и $\text{sym-}^{15}\text{N}_2\text{O}_4$ с образованием N_2O_3 и N_2O_4 [44] с естественным содержанием азота. Дальнейшее повышение температуры до 210 К приводило к образованию небольших количеств $(\text{Py})\text{Co}(\text{Por})(\text{NO})$ и $(\text{Py})\text{Co}(\text{Por})(\text{NO}_2)$, с натуральным азотом во фрагментах, содержащих оксиды азота, в то время как основной продукт реакции – 6-координационный нитратный комплекс $(\text{Py})\text{Co}(\text{Por})(\eta^1\text{-O}^{15}\text{NO}_2)$ в нитратном фрагменте на ~90% содержал изотопный азот [45]. Полученные данные можно интерпретировать непротиворечивым образом, если предположить, что высвободившийся после разрыва пероксидной связи диоксид азота, находясь в клетке, не подвергается изотопному обмену, протекание которого связано с образованием нестабильных форм триоксида диазота. В условиях эксперимента лишь небольшая часть (~10%) NO_2 покидает клетку, судя по количеству нитратного комплекса с натуральным азотом в нитратной группе.

В температурном интервале 180-210 К в ИК-спектрах росли новые полосы в тех областях, в которых были расположены полосы ранее полученных 6-координационных нитратных комплексов (табл. 2). Все они претерпевали ожидаемые изотопные сдвиги при использовании в экспериментах $^{18}\text{O}_2$, ^{15}NO , N^{18}O и $^{15}\text{N}^{18}\text{O}$, не оставляя сомнений в том, что в реакционной системе имела место реакция ДОА (схема 8). Нитратные комплексы, как и следовало ожидать, оказались термически нестабильными и при нагреве до комнатных температур отщепляли нитратную группу в виде нитрат-аниона с образованием катионного диаммиачного комплекса, как это показано в схеме 9.

Схема 9

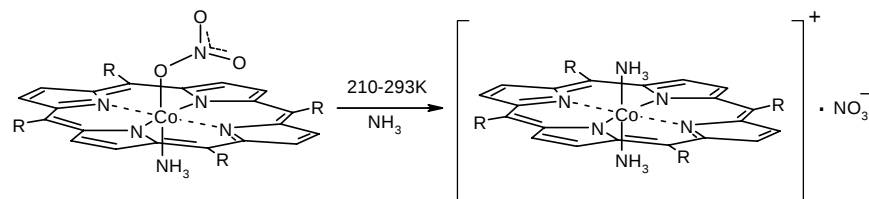


Таблица 2

**Частоты валентных колебания координированной нитратной группы
в 6-координационных комплексах металлопорфиринов.
В скобках приведены данные для производных Co(TPP)**

Соединения	$\nu_a(\text{NO}_2)$ (ср.)	$\nu_s(\text{NO}_2)$ (с.)	$\nu(\text{O-N})$ (сл.)	Ссыл- ка
$(\text{NH}_3)\text{Co}(\text{TPP})(\eta^1\text{-ONO}_2)$	1484(1485)	1270(1269)	~983(983)	33
$(\text{NH}_3)\text{Co}(\text{TPP})(\eta^1\text{-O}^{15}\text{NO}_2)$	1459(1460)	1248(1247)	~970(970)	33
$(\text{NH}_3)\text{Co}(\text{TPP})(\eta^1\text{-}^{18}\text{ON}^{18}\text{O}_2)$	1456(1460)	1244(1243)	942(935)	33
$(\text{NH}_3)\text{Co}(\text{TPP})(\eta^1\text{-}^{18}\text{ON}^{(18}\text{O})\text{O})$	1465(1470)	1252(1254)	953(955)	33
$(\text{NH}_3)\text{Co}(\text{TPP})(\eta^1\text{-}^{18}\text{O}^{15}\text{N}^{(18}\text{O})\text{O})$	1437(1438)	1228(1229)	946(946)	33
$(\text{NH}_3)\text{Fe}(\text{TPP})(\eta^1\text{-ONO}_2)$	1499(1496)	1268(1268)	938(936)	17
$(\text{NH}_3)\text{Fe}(\text{TPP})(\eta^1\text{-}^{18}\text{ON}^{(18}\text{O})\text{O})$	1481(1482)	1252(1253)	913(914)	17
$(\text{NH}_3)\text{Fe}(\text{TPP})(\eta^1\text{-O}^{15}\text{NO}_2)$	1472(1469)	1249(1249)	925(925)	17
$(\text{NO})\text{Fe}(\text{TPP})(\eta^1\text{-ONO}_2)$	1505	1265	969	11
$(\text{NO})\text{Fe}(\text{TPP})(\eta^1\text{-O}^{15}\text{NO}_2)$	1472	1246	954	11
$(\text{THF})\text{Fe}(\text{TPP})(\eta^1\text{-ONO}_2)$	1491(1486)	1280(1277)	~997(~995)	12
$(\text{THF})\text{Fe}(\text{TPP})(\eta^1\text{-O}^{15}\text{NO}_2)$	1457(1454)	1258(1258)	986(984)	12

Диаксиальные комплексы Co^{III} с N-донорными лигандами значительно прочнее, нежели с Co^{II} [46, 47]. Действительно, откачка высоким вакуумом с нагревом до 350 К не приводила к каким-либо спектральным изменениям, свидетельствуя о значительной прочности диаммиачного комплекса.

Вышеописанные стадии реакции ДОА, осуществляемые Со-порфиринами, находятся в полном согласии с механизмом, предложенным для гемопротенинов (схема 1), пока еще не получившем однозначного экспериментального подтверждения. Надо все же отметить, что Со-порфирины, хотя и весьма ценные, как модельные соединения, не могут быть отождествлены с гемовыми системами. К примеру, Со в большей степени стабилизирует супероксидный характер соответствующих дикислородных аддуктов, чем Fe, Co^{III} имеет большую тягу к образованию 6-координационных комплексов и кинетически более инертный, чем Fe^{III} и т. д. [48]. Тем не менее, хотя обнаруженные интермедиаты больше относятся к химии кобаламинов и их взаимодействию с оксидами азота, спектральная информация, полученная в данной работе, будет весьма полезна для аналогичных исследований с Fe-порфиринами и аналогичными системами.

**ԱԶՈՏԻ ՄՈՆՈՔՄԻՆԴ (NO) ԴԻՕՔՍԻԳԵՆԱՑՈՒՄԸ ՕՔՍԻ-ԳԼՈՒԲՆԵՐԻ
ԱԿՏԻՎ ԿԵՆՏՐՈՆԻ ՄՈՂԵԼՆԵՐԻ ԿՈՂՄԻՑ**

Տ. Ս. ԿՈՒՐՏԻԿՅԱՆ և Շ. Ռ. ԷՔՍՈՒԶՅԱՆ

Աշխատանքում բերված են ազոտի օքսիդի դիօքսիգենացման (ԱՕԴ) ռեակցիայի մեխանիզմի բացահայտմանը նվիրված գրականական և մեր տվյալները: Այդ ռեակցիայի շնորհիվ օրգանիզմում գերաբաղում է NO-ն վերածվում է օրգանիզմից հեշտ դուրս բերվող նիտրատ-անիոնի: Օգտվելով մետաղապորֆիրինային $M(Por)$ ($M = Fe, Co, Por$ – մեզոտետրաֆենիլ- և մեզո-տետրա-*p*-տոլիլ-պորֆիրինատո դիանիոններ) միկրոծակոտկեն թաղանթներից ստացված ցածր ջերմաստիճանային ($T=80\text{ K}$) հարթակի վրա սուբլիմացիայի միջոցով կառուցված են օքսի-գլոբինների ակտիվ կենտրոնը մոդելավորող $(L)M(Por)(O_2)$ ($L-N$ -էլեկտրոնադոնորային լիգանդ) համակարգերը: Դրանց փոխադրեցությանը NO-ի հետ հետևել ենք սպեկտրալ (ԻԿ և էլեկտրոնային կլանման սպեկտրներ) եղանակներով սկսած 80 K մինչև սենյակային ջերմաստիճաններ: Երկաթ-պորֆիրինների դեպքում ԱՕԴ ռեակցիան ընթանում է արդեն 80-100 K, ընդ որում առանց միջանկյալ միացությունների առաջացման նշանների: Այդպիսով ռեակցիան ընթանում է կամ մի փուլով համաձայնեցված մեխանիզմով, կամ էլ միջանկյալ միացությունների միջև ընկած ակտիվացիոն անջրպետները այնքան ցածր են, որ թույլ չեն տալիս նրանց կուտակումը սպեկտրալ եղանակներով դետեկտելի քանակություններով: Ցույց է տրվել, որ Co-պորֆիրինները նույնպես ընդունակ են տանելու ԱՕԴ ռեակցիան: Այս դեպքում, սակայն, 6-կոորդինացված նիտրատային կոմպլեքսի առաջացումը սկսվում է 180 K, իսկ ավելի ցածր ջերմաստիճաններում դիտվում են միջանկյալ միացություններ՝ լույս սփռելով ռեակցիայի մեխանիզմի վրա: $^{18}O_2$, ^{15}NO , $N^{18}O$ և $^{15}N^{18}O$ իզոտոպային միացությունների կիրառմամբ ԻԿ չափումներ կատարելու և խտությունների ֆունկցիոնալի տեսությամբ կատարված տատանողական հաճախականությունների և համապատասխան իզոտոպային շեղումների հաշվարկների շնորհիվ ցույց է տրված, որ ԱՕԴ ռեակցիայում մեկնարկային միացություն է հանդիսանում 6-կոորդինացված պերօքսինիտրիտային կոմպլեքսը՝ $(L)Co(Por)(\eta^1-OONO)$: Ատացված արդյունքը պետք է համարել անցողիկ մետաղների թթվածնային կոմպլեքսների հետ NO-ի փոխազդեցության ընթացքում բազմիցս ենթադրված այդ կառուցվածքի իրականացման առաջին հավաստի ապացույցը: Ռեակցիայի հետագա փուլերը ներառում են պերօքսիդային կապի հոմոլիտիկ խզումը, NO₂-ի հարձակումը կոբալտիլային թթվածնի ատոմի վրա 6-կոորդինացված նիտրատային կոմպլեքսի առաջացմամբ և նիտրատ-անիոնի անջատումը մինչև սենյակային ջերմաստիճանները տաքացնելիս:

NITRIC OXIDE DIOXYGENATION REACTION BY THE MODELS OF OXY-GLOBINS' ACTIVE CENTER

T. S. KURTIKYAN and Sh. R. EKSUZYAN

The Scientific Technological Centre of Organic and
Pharmaceutical Chemistry NAS RA
Molecule Structure Research Centre
26, Azatutyan Str. Yerevan, 0014, Armenia
Fax (+37410) 282267 E-mail: kurto@netsys.am

In this work the literature data and our studies directed to the determination of the mechanism of nitric oxide dioxygenation (NOD) reaction are described. This reaction is responsible for the scavenging of overproduced NO, transferring it to nitrate anion that is excreted from the organism. Using metalloporphyrins' M(Por) (M = Fe, Co; Por – meso-tetraphenyl- and meso-tetra-p-tolyl-porphyrinato dianions) microporous layers obtained by their sublimation on to low-temperature substrate ($T = 80\text{ K}$), the oxy-globin models of the general formula $(L)M(\text{Por})(\text{O}_2)$ (L – N-electron donor ligands) were constructed. The interaction of NO with these systems was spectrally (FTIR and electronic absorption spectra) monitored during slow warming of the layers from 80 K to room temperature (RT). In the case of Fe-porphyrins NOD reaction proceeds already at 80-100 K without spectral detection of any intermediates. Hence, either the reaction proceeds by the concerted one stage mechanism or the activation barriers between intermediates are too low to accumulate them in spectrally-detectable quantities. It is shown that Co-porphyrins are also able to promote NOD reaction. In this case, however, the formation of 6-coordinate nitrate complexes begins at 180 K and at lower temperatures the intermediates were detected throwing light on the mechanism of the process. Based on the FTIR measurements of the species containing isotopic $^{18}\text{O}_2$, ^{15}NO , N^{18}O , $^{15}\text{N}^{18}\text{O}$ and DFT calculations of vibrational frequencies and their isotopic shifts it was found that the first intermediate in NOD reaction is the 6-coordinate peroxyxynitrite complex $(L)\text{Co}(\text{Por})(\eta^1\text{-OONO})$. This is the first reliable evidence for the formation of such a structure during NO interaction with dioxygen adducts of transient metal complexes. The further reactions include homolytic cleavage of peroxide bond, subsequent attack of NO_2 through the nitrogen atom by the cobaltyl O-atom producing O-bound nitrate, decay of which upon warming to RT results in nitrate anion and oxidized Co-porphyrin complex $\text{Co}^{\text{III}}(\text{Por})(L)_2$.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Ignarro L. Nitric Oxide: Biology and Pathobiology, Academic Press, San Diego, 2000.
- [2] Tonzetic Z. J., McQuade L. E., Lippard S. J. // Inorg. Chem., 2010, v. 49, p. 6338.
- [3] Ford P. C. // Inorg. Chem., 2010, v. 49, p. 6226.
- [4] Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. // Physiol. Rev., 2007, v. 87, p. 315.
- [5] Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A. // Proc. Natl. Ac. Sci. U. S. A. 1990, v. 87, p. 1620.
- [6] Kirch M., Korth H.-G., Sustmann R., de Groth H. // Biol. Chem., 2002, v. 383, p. 389.
- [7] Schopfer M. P., Wang J., Karlin K. D. // Inorg. Chem., 2010, v. 49, p. 6267.
- [8] Herold S. // FEBS Lett., 1998, v. 439, p. 85.

- [9] *Olson J.S., Folley E. W., Rogge C., Tsai A.-L., Dohle M.L., Lemon D.D.* // Free Radical Biol. Med., 2004, v. 36, p. 685.
- [10] *Goldstein S., Merenyi G., Samuni A.* // J. Am. Chem. Soc., 2004, v. 126, p. 15694.
- [11] *Kurtikyan T.S., Martirosyan G.G., Hakobyan M.E., Ford P.C.* // Chem. Comm., 2003, p. 1706.
- [12] *Gulyan G.M., Kurtikyan T.S., Ford P.C.* // Inorg. Chem., 2008, v. 47, p. 787.
- [13] *Yukl E. T., de Vries S., Moenne-Loccoz P.* // J. Am. Chem. Soc., 2009, v. 131, p. 7234.
- [14] *Koebke K.J., Pauly D.J., Lerner L., Liu X., Pacheco A.A.* // Inorg. Chem., 2013, v. 52, p. 7623.
- [15] *Куртиякн Т.С., Гаспарян А.В., Мартиросян Г.Г., Жамкочян Г.А.* // Ж. прикладной спектроскопии, 1995, т. 62, с. 62.
- [16] *Kurtikyan T.S., Ford P.C.* // Coord. Chem., Rev., 2008, v. 252, p. 1486.
- [17] *Kurtikyan T.S., Ford P.C.* // Chem. Comm., 2010, v. 46, p. 8570.
- [18] *Suslick K.S., Watson R.A.* // Inorg. Chem., 1991, v. 30, 912.
- [19] *Куртиякн Т.С., Степанян Т.Г., Акопян М.Е.* // Координационная химия, 1999, т. 25, с. 772.
- [20] *Kurtikyan T.S., Hovhannisyan A.A., Hakobyan M.E., Patterson J.C., Iretskii A., Ford P.C.* // J. Amer. Chem. Soc., 2007, v. 129, p. 3576.
- [21] *Kurtikyan T.S., Ford P.C.* // Angew. Chem. Intern. Edit., 2006, v. 45, p. 492.
- [22] *Куртиякн Т.С., Степанян Т.Г., Гаспарян А.В.* // Координационная химия, 1997, т. 23, с. 604.
- [23] *Wyllie G.R.A., Munro O.Q., Schulz Ch.E., Scheidt W.R.* // Polyhedron, 2007, v. 26, p. 4664.
- [24] *Su J., Groves J.T.* // Inorg. Chem., 2010, v. 49, p. 6317.
- [25] *Куртиякн Т.С., Мартиросян Г.Г., Гаспарян А.В., Акопян М.Е., Жамкочян Г.А.* // Ж. прикладной спектроскопии, 1990, т. 53, с. 67.
- [26] *Martirosyan G.G., Chinaryan V.H., Dalaloyan A.M., Kurtikyan T.S.* // Vibrational spectr., 2009, v. 51, p. 294.
- [27] *Куртиякн Т.С., Гаспарян А.В., Мартиросян Г.Г., Жамкочян Г.А.* // Ж. прикладной спектроскопии, 1990, т. 52, с. 106.
- [28] *Куртиякн Т.С., Мартиросян Г.Г., Акопян М.Е.* // Кинетика и катализ, 2001, т. 42, с. 312.
- [29] *Куртиякн Т.С., Мартиросян Г.Г., Гаспарян А.В., Жамкочян Г.А.* // Ж. прикладной спектроскопии, 1993, т. 59, с. 452.
- [30] *Куртиякн Т.С., Степанян Т.Г., Мартиросян Г. Г., Казарян Р.К., Мадакян В.Н.* // Изв. РАН, Сер. хим., 2000, с. 1551.
- [31] *Hayashi T.* In Porphyrin Handbook. K. M. Kadish, K. M. Smith., R. Guillard Eds., World Publishing Company, Singapour, 2010, v. 5, p. 2.
- [32] *Walker F.A.* // J. Am. Chem. Soc., 1973, v. 95, p. 1150.
- [33] *Kurtikyan T.S., Eksuzyan Sh.R., Hayrapetyan V.A., Martirosyan G.G., Hovhannisyan G.S., Goodwin J.A.* // J. Am. Chem. Soc., 2012, v. 134, p. 13861.
- [34] *Herold S., Koppenol W. H.* // Coord. Chem. Rev., 2005, v. 249, 499.
- [35] *Park G.Y., Deepalatha S., Puiiu S. C., Lee D.-H., Mondal B., Narducci Sargeant A.A., del Rio D., Pau M.Y.M., Solomon E.I., Karlin K.D.* // J. Biol. Inorg. Chem., 2009, v. 14, p. 1301.
- [36] *Yokoyama A., Han J.E., Cho J., Kubo M., Ogura T., Siegler M.A., Karlin K.D., Nam W.J.* // J. Am. Chem. Soc., 2012, v. 134, p. 15269.
- [37] *Lo W.-J., Lee Y.-P., Tsai J.H.M., Hamilton T.P., Harrison J.G., Beckman J.S.* // J. Chem. Phys., 1995, v. 103, p. 4026.
- [38] *Lo W.-J., Lee Y.-P.* // J. Phys. Chem., 1994, v. 101, p. 5494.

- [39] *Эксузян Ш.Р.* // Хим. ж. Армении., 2013, т. 66, '2, с. 162.
- [40] *Lee C.-I., Lee Y.-P., Wang X., Qin Q.-Z.* // J. Chem. Phys., 1998, v. 109, p. 10446.
- [41] *Hisatsune I.C., Devlin J.P., Wada Y.* // J. Chem. Phys., 1960, v. 30, p. 714.
- [42] *Степанян Т.Г., Акопян М.Е., Куртикян Т.С.* // Координационная химия, 2000, т. 26, с. 453.
- [43] *Kurtikyan T.S., Markaryan E.R., Mardukov A.N., Goodwin J.A.* // Inorg. Chem., 2007, v. 46, p. 1526.
- [44] *Kurtikyan T.S., Gulyan G. M., Martirosyan G.G., Lim M.D., Ford P.C.* // J. Amer. Chem. Soc., 2005, v. 127, p. 6216.
- [45] *Kurtikyan T.S., Eksuzyan Sh.R., Goodwin J.A., Hovhannisyan G.S.* // Submitted, 2013.
- [46] *Scheidt W.R., Cunningham J.A., Hoard L.G.* // J. Am. Chem. Soc., 1973, v. 95, p. 8289.
- [47] *Sugimoto H., Ueda N., Mori M.* // Bull. Chem. Soc. Jpn., 1981, v. 54, p. 3425.
- [48] *Roat-Malone R.M.* Bioinorganic Chemistry: A Short Course. A John Wiley & Sons Inc. Publication, 2007, 501 pp.