

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A HIDROGÉN-SZULFID NÉHÁNY BIOLÓGIAILAG
FONTOS REDOXIREAKCIÓJÁNAK MECHANIZMUSA**

Varga-Vasas Anita

Témavezető: Dr. Nagy Péter

Belső konzulens: Prof. Dr. Fábián István



Debreceni Egyetem
Kémiai Tudományok Doktori Iskola
Debrecen, 2016.

A tézisben előforduló rövidítések magyarázata:

3MST	3-merkaptopiruv��t-szulfurtranszfer��z enzim
AAT	aszpartát-aminotranszferáz enzim
CAT	ciszte��n-aminotranszferáz enzim
CBS	cisztation��n-béta-szintetáz enzim
CcO	citokróm-c-oxidáz enzim
Cys	ciszte��n
Cys-SH	ciszte��n-tiol
Cys-SSH	ciszte��n-perszulfid
CSE	cisztation��n-gamma-liáz enzim
DTNB	5,5'-ditiobisz-(2-nitrobenzoesav)
DTPA	dietilén-triam��n-pentaecetsav
ferril-Hb-származék	
(Fe ⁴⁺ Hb ⁺)	ferril-hemoglobin-származék
GlyCl	N-kl��rglic��n
GSSG	oxidált glutation
metHb (Fe ³⁺ Hb)	methemoglobin
MPO	mieloperoxidáz enzim
NMR	mágneses magrezonancia spektroszkópia
oxiHb (Fe ²⁺ Hb)	oxihemoglobin
PBS	foszfátpuffer sóoldat
ROS	reaktív oxigénszármazékok
SQR	szulfid-kinon-reduktáz enzim
TauCl	N-kl��rtaur��n
TNB	5-tio-(2-nitrobenzoesav)
TNB-SH	5-tio-(2-nitrobenzoesav)-tiol
TNB-SSH	5-tio-(2-nitrobenzoesav)-perszulfid
TRIS	tris(hidroximetil)-aminometán
UV-Vis	UV-látható spektrofotometria

I. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

A hidrogén-szulfid (H_2S) kellemetlen szagú mérgező gáz, a mitokondriális elektrontranszportláncban a citokró-m-c-oxidáz (CcO) enzim gátlásán keresztül akadályozza a sejtlégzést. Ennek ismeretében különösen érdekes, hogy $0,7 \mu\text{g/g}$ szulfidkoncentrációt¹ mértek posztmortem humán agyszövetben, igazolva a szulfid jelenlétét az emberi szervezetben. Bebizonyosodott, hogy termelődése nem enzimatis és enzimatis utakon egyaránt megtörténik. Az endogén szulfid enzimatis úton a cisztein (Cys) aminosav metabolizmusa által az *L*-ciszteinből a cisztationin-gamma-liáz (CSE), a cisztationin-béta-szintetáz (CBS) enzimek révén képződik, valamint az aszpartát-/cisztein-aminotranszferáz (AAT/CAT) és a 3-merkaptopiruvát-szulfurtranszferáz (3MST) enzimek együttműködése révén keletkezik. A szulfid lebontása a mitokondriumban oxidatív folyamatokon át elsősorban a szulfid-kinon-reduktáz (SQR) enzim által vezérelt útvonalon megy végbe. Ezen folyamatokban a szulfid szulfáttá vagy tioszulfáttá oxidálódik.

A szulfid kutatás területén az egyik legfontosabb felfedezés a szulfid neuromodulátorként való működésének igazolása volt, ezzel a nitrogén-monoxid (NO) és a szén-monoxid (CO) után a szulfidot is jelátviteli gázmolekulaként azonosították.

Annak ellenére, hogy számos fontos biológiai szerepet tulajdonítanak a szulfidnak, a szervezetbeli pontos koncentrációja vitatott. Például a vérben $0,1 \mu\text{M}$ -tól akár $500\text{--}600 \mu\text{M}$ -ig terjedő szabad szulfidkoncentráció értékeket mértek különböző szulfid-detektálási módszerekkel. Ezért is tűztük ki célul, hogy az irodalomban szereplő szulfid-meghatározásra leggyakrabban alkalmazott módszereket értékeljük és a szulfiddal való munka kísérleti feltételeit kidolgozzuk.

A szakirodalomban megjelenő, a szervezetben nagy szulfidkoncentrációt detektáló eredmények arra utalnak, hogy biomolekulákhoz kötve nagyobb mennyiségű mobilizálható

¹ A szulfid kifejezés alatt a hidrogén-szulfid különböző protonáltságú formáit értjük. A különböző protonáltságú formákat csak abban az esetben különböztetjük meg, amikor az a jelenségek értelmezéséhez feltétlenül szükséges.

szulfidtartalékok vannak biológiai rendszerekben, mivel már 1 μM feletti szabad szulfidkoncentráció is toxikus hatású. Ez a szulfidtartalék mintegy pufferként viselkedve fontos szerepet játszhat a szulfid biológiai hatásaiban.

A szulfid fontos szerepet tölt be sejten belüli jelátviteli folyamatokban. Jelátviteli tulajdonságának három fő mechanizmusát írták le eddig az irodalomban: i) a perszulfidok képződésén keresztül a tiol-fehérjék működését szabályozza, ii) a metalloenzimek fémcentrumához való kötődés és redoxireakció révén azok funkciót vezérli, iii) a NO által vezérelt jelátviteli folyamatokat szabályozza.

A fehérje-perszulfidoknak egyértelműen fontos szerepet tulajdonítottak a szulfid által vezérelt jelátvitelben, ugyanakkor képződési mechanizmusuk a mai napig tisztázatlan. A perszulfidok képződését korábban helytelenül a hidrogén-szulfid-ion (HS^-) Cys-nel való direkt reakciójának tulajdonították. Mivel a perszulfidok oxidációs folyamatok eredményeként jelennek meg az élő szervezetben, képződésük a Cys oxidált formáinak szulfiddal való, vagy a szulfid oxidált származékainak Cys-nel való reakcióiban képzelhető el. Munkám egyik célja a perszulfidképződés molekuláris mechanizmusainak vizsgálata volt.

Az oxidált Cys-származékok közül a diszulfidok reakcióit vizsgáltuk szulfiddal. Ezeknek a reakcióknak a létezését korábban elvetették, mert feltételezték, hogy kinetikailag és termodinamikailag egyaránt gátoltak. Ezzel ellentétben, kinetikai vizsgálataink rávilágítottak arra, hogy ezek a reakciók lejátszódnak, nagyon specifikusak, és nagymértékben függenek a diszulfidok kémiai tulajdonságaitól és valószínűsíthetően fontos szerepet töltenek be a szulfid biológiai hatásaiban.

Az előzőekben leírtaknak megfelelően a perszulfidok a szulfid oxidált formáinak redukált cisztein-tiolokkal (Cys-SH) való reakcióiban is képződhetnek. A szulfid oxidációja a szervezetben képződő reaktív oxigénszármazékokon (ROS) keresztül valósulhat meg. Ezek közül a neutrofil fagociták mieloperoxidáz (MPO) enzim által termelt hipoklórossav (HOCl) másodlagos termékeként keletkező klóraminok szulfiddal való reakcióit vizsgáltuk.

Biológiai rendszerekben a szulfidnak antioxidáns szerepet is tulajdonítottak, de valószínűsíthető, hogy ezen tulajdonságait nem a ROS-kal való direkt reakcióin keresztül feje ki, hanem különböző enzimaktiválások befolyásolásával. Ilyen lehet például a metalloenzimek

nagy reaktivitású oxidált köztitermékeinek a redukciója, amit például már az MPO enzim esetén kutatócsoportunk korábban igazolt. Mindezek fényében célkitűzéseink között szerepelt annak a molekuláris mechanizmusnak a feltárása is, amely értelmezi, hogy a szulfid hogyan közömbösíti az atheroszklerózisban fontos szerepet játszó hemoglobin oxidált köztitermékeinek az oxidatív stresszt okozó hatásait. Mindezt a hemoglobin oxidált származékainak szulfiddal való direkt reakcióinak kinetikai vizsgálatán keresztül tanulmányoztuk.

II. ALKALMAZOTT VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

A kísérletek során analitikailag legtisztább (a.l.t.) minőségű vegyszerekkel dolgoztunk és valamennyi reagensoldat elkészítéséhez *MILLI-Q (Millipore)* rendszerrel készített háromszorosan ionmentesített és ultraszűrt vizet használtunk. A methemoglobint (metHb, Fe^{3+}Hb) és az oxihemoglobint (oxiHb, Fe^{2+}Hb) a Debreceni Egyetemen Prof. Dr. Balla József kutatócsoportja állította elő humán vérből.

A szulfid törzsoldatok koncentrációjának ellenőrzése céljából egyrészt a $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ kristályokat vízben oldva, a HS^- -koncentrációját közvetlenül spektrofotometriásan határoztuk meg 230 nm-en ($\epsilon_{230\text{nm}} = 7700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) úgy, hogy az oldat pH-ja nagyobb volt 9-nél. Másrészt a szulfidot 5,5'-ditiobisz-(2-nitrobenzoesav)-val (DTNB) reagáltatva a képződött 5-tio-(2-nitrobenzoesav) (TNB) abszorbanciáját mérve ($\epsilon_{412\text{nm}} = 14100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a koncentrációt az irodalomban leírt módon is ellenőriztük. A két módszerrel kapott koncentrációk átlagát tekintettük a szulfid törzsoldat pontos koncentrációjának, amennyiben a két érték között kevesebb, mint 5% eltérés volt. Nagyobb hiba esetén új törzsoldatokat készítettünk.

A vizes oldatok pH-ját pufferek segítségével és karbonátmentes nátrium-hidroxiddal állítottuk be a megkívánt értékre. A **pH-méréseket** 785 *DMP Titrino* készülék segítségével végeztük, amit *Tiamo 2.3* programcsomag vezérelt. Elektrodként *double-junction* kombinált pH-üvegelektrodot (*Metrohm 6.255.100*) használtunk, melynek kétpontos kalibrációját kálium-hidrogén-ftaláttal (pH 4,008) és nátrium-tetraboráttal (pH 9,177) végeztük, majd a pH-mérő által kijelzett értéket $-\lg[\text{H}^+]$ -ra konvertáltuk. Az oldatok pH-ját a kinetikai és fotometriás mérések előtt és után is megmértük.

Perkin Elmer Lambda 2S UV-látható (UV-Vis) kétsugaras spektrofotométer segítségével vettük fel a reaktsók és a termékek spektrumait. A reaktsók koncentrációját az abszorbanciából a megfelelő moláris abszorbanciák (ϵ) ismeretében számítottuk. A reakcióelegyek hőmérsékletét *Techne RB-12, TU-16D* termosztáttal szabályoztuk $25,0 \pm 0,1$ °C-ra.

A kinetikai méréseket **stopped-flow módszerrel** végeztük *Applied Photophysics SX.18MV* és/vagy *Applied Photophysics SX.20* stopped-flow készülékkel egyszerű vagy szekvenciális üzemmódban. A reakciók tanulmányozása előtt minden reaktánst reagáltattuk a pufferral annak eldöntésére, hogy van-e a hígulásból származó vagy a pufferral lejátszódó nem kívánatos reakció, továbbá ezen vizsgálatok alapján állapítottuk meg a kezdeti abszorbanciaértékeket is. A reakciólegyeket $25,0 \pm 0,1$ °C-on termosztáltuk *Julabo F12*, *ED* termosztát segítségével. A kapott kinetikai görbéket *Micromath Scientist 2.01* és/vagy *Applied Photophysics Pro-Data Viewer 4.2.0* programcsomagokkal a nem-lineáris legkisebb négyzetek módszerét alkalmazva illesztettük, megfelelő matematikai egyenleteket felhasználva. A sebességi állandókat legalább három párhuzamos mérés során felvett kinetikai görbe illesztését követően átlagolással kaptuk.

Mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR) vizsgálatokat végeztünk *Bruker 360 MHz (8.5 T)* NMR spektrométer segítségével $25,0 \pm 0,5$ °C-on a cisztin és a szulfid között lejátszódó reakció kiindulási anyagainak, közti- és végtermékeinek tanulmányozására. A reakció ^1H -NMR spektrumait az egyensúly beálltát követően rögzítettük. Az NMR spektrumok kémiai eltolódás skáláit a 4,4-dimetil-4-szilapentán-1-szulfonsav belső standard segítségével kalibráltuk. Az NMR spektrumokat *MestReNova 8.1.2-11880* szoftvercsomag segítségével értékeltük ki. Az NMR mérések során az oldatok pD-jét deuterált pufferekkel tartottuk állandó értéken. A pH-mérő által kijelzett értéket korrigáltuk a következő kifejezés szerint: $\text{pD} = \text{pH}^* + 0,4$, ahol pH^* a pH-mérő által jelzett érték.

III. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A hidrogén-szulfid reagensként való alkalmazásához szükséges kísérleti körülmények optimalizálása

A szulfid reaktív molekula, számos redoxireakciója révén a szulfidkoncentráció-meghatározás módszereinek széles skálája ismert, de ezen tulajdonsága miatt a szulfid törzsoldatok készítése, tárolása és használata nem magától értetődő.

1.1 Értelmeztük, hogy a biológiai rendszerekben miért detektáltak nagyon eltérő szabad szulfidkoncentrációkat.

A legtöbb szulfidkoncentráció mérésre alkalmazott módszer irreverzibilis származékképzésen, a szulfid elpárolgotatásán, illetve a szulfid csapadék formájában való eltávolításán alapul. Ezen módszerek alkalmazása során, valamint az eltérő kísérleti körülmények használatával a kötött és a szabad szulfid között beálló egyensúlyt eltolják, ezáltal túlbecsülik a szabad szulfid koncentrációját.

1.2 Kimutattuk, hogy az általunk megvizsgált, a kereskedelemben forgalmazott szulfid tartalmú vegyszerek mindegyike nem elhanyagolható mennyiségű koncentrációban tartalmaz poliszulfid-szennyeződések.

1.3 Kidolgoztunk egy eljárást, aminek alkalmazásával viszonylag tiszta, és stabil vizes szulfidoldatot készíthetünk és tárolhatunk, valamint javaslatot tettünk a vizes oldatok szulfidkoncentrációjának meghatározására.

A $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ kristályok felszínének legalább háromszori háromszorosan ionmentesített vízzel történő lemosását követően ionmentesített vízben argongáz átbuborékoltatásával segített oldódással készítettük a szulfid törzsoldatokat. Megállapítottuk, hogy a legjobb módszer a szulfid törzsoldatok tárolására, ha sötétben, jégén, argonnal telített háromszorosan ionmentesített vízben tároljuk, és használat előtt dietilén-triamin-pentaecetsavat (DTPA) tartalmazó pufferral hígítjuk. A törzsoldatok szulfid koncentrációjának ellenőrzésére két módszer használatát javasoltuk, mely módszerek együttes alkalmazásával megállapítható az oldatok szennyezettségének mértéke.

1.4 Megállapítottuk, hogy a szulfid reakcióinak tanulmányozásához a trisz(hidroximetil)-aminometán (TRIS) jobb puffer, mint a foszfátpuffer sóoldat (PBS), mert kisebb mennyiségben tartalmaz fémszennyeződések.

A nyomnyi mennyiségben jelenlévő fémszennyeződések kelátképződéssel történő megkötése érdekében DTPA-t használtunk. Mindemellett igazoltuk, hogy a DTPA önmagában nem alkalmas az oldatok szulfidtartalmának stabilizálására.

1.5 Igazoltuk, hogy a törzsoldatokban a szulfidvesztés elsősorban a kipárolgás eredménye.

Az irodalomban széles körben elfogadott vélekedés szerint a szulfid törzsoldatok koncentrációjának csökkenése a levegő tartalmazta oxigén általi oxidációnak tulajdonítható. Megállapítottuk a szulfidoldat készítésére és tárolására vonatkozó kísérleteink során, hogy különböző puffertelt oldatok szulfidtartalma gyorsabban csökkent savas pH-tartományban, és a koncentrációváltozás túlnyomórészt a kipárolgás eredménye.

2. A diszulfidok redukciója hidrogén-szulfiddal: kinetika és mechanizmus

A perszulfidképződés molekuláris mechanizmusára korábban már több javaslatot tettek. Annak érdekében, hogy jobban megértsük a reakció kinetikai és termodinamikai viselkedését különböző modell diszulfidok, a DTNB, a cisztin és az oxidált glutation (GSSG) reakcióját vizsgáltunk szulfiddal.

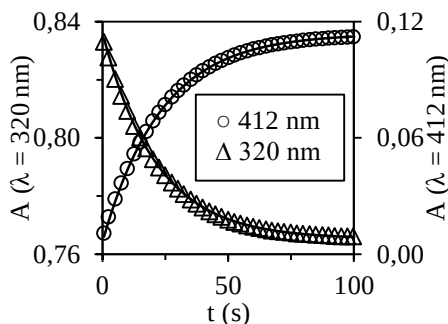
2.1 Megállapítottuk a DTNB és a szulfid közötti reakció tanulmányozása során, hogy egy többlépéses, egyensúlyi lépéseket tartalmazó mechanizmus írja le a reakciót.

Sztöchiometriai kísérletekkel igazoltuk, hogy szulfidfelesleg mellett minden esetben 2 mól TNB képződik 1 mól DTNB-ből, ami arra utalt, hogy a diszulfid 5-tio-(2-nitrobenzoesav)-tiol (TNB-SH) formává redukálható szulfiddal. Nagy DTNB-felesleg mellett 1 mól szulfid 1 mól TNB képződését eredményezi, ami azzal értelmezhető, hogy valószínűleg 5-tio-(2-nitrobenzoesav)-perszulfid (TNB-SSH) képződik a reakcióban, ami

a szulfid koncentráció növelésével tovább redukálódik szulfid által TNB-vé. Ezzel összhangban DTNB-felesleg csökkentésével a sztöchiometria 1:2 arányhoz tart.

2.2 Kimutattuk részletes kinetikai vizsgálatok alapján szulfid-, illetve DTNB-felesleg mellett, pszeudo-elsőrendű körülmények között, hogy a koncentrációarányoktól függetlenül a kinetikai görbék minden esetben illeszthetők voltak egy exponenciális összefüggéssel (1. ábra), valamint a DTNB fogyásának és a TNB keletkezésének megfelelő hullámhosszokon mért kinetikai görbék azonos pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat adtak.

Meghatároztuk a sebességi állandók koncentrációfüggéseiből a DTNB – szulfid reakció látszólagos másodrendű sebességi állandóját, ami $(8,9 \pm 0,1) \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pH = 7,40-nál. A sztöchiometriai méréseket is figyelembe véve a látszólagos másodrendű sebességi állandó a sebességmeghatározó, szulfid általi DTNB redukciós lépéshez rendelhető a modellben, az összes többi lépés ennél gyorsabb.

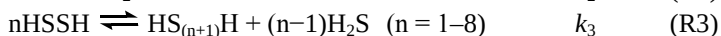


1. ábra. Jellemző kinetikai görbék (○, △) elsőrendű illesztéssel (—) 320 nm-nél (△) és 412 nm-nél (○). $[\text{DTNB}] = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{szulfid}]_{\text{tot}} = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, 0,10 M foszfátpuffer, $I = 1,00 \text{ M}$, pH = 7,40, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. ($k_{\text{obs}}^{320\text{nm}} = (4,68 \pm 0,01) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ és $k_{\text{obs}}^{412\text{nm}} = (4,27 \pm 0,01) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$.)

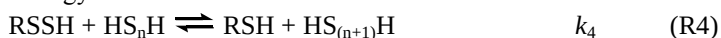
2.3 Felállítottunk egy általános kinetikai modellt a diszulfidok szulfid általi redukciójára a DTNB szulfiddal való reakciójának kinetikai és sztöchiometrikus tanulmányozása alapján.

A modell sebességmeghatározó lépése a DTNB és a szulfid bimolekuláris reakciója (1. reakció), amely 1 mól TNB-SSH-t és 1 mól

TNB-molekulát ad. A második reakciólépésben a TNB-SSH reagál egy másik szulfidmolekulával TNB és diszulfid (HSSH) képződése mellett (2. reakció). Az ezt követő lépésben a HSSH diszproporcionálódik (3. reakció) vagy reagál egy TNB-SSH-dal (4. reakció), mindkét reakció polisulfidokat eredményez.



és/vagy



ahol RSSR, RSSH és RSH a diszulfidok, a perszulfidok és a tiolok általános jelölése; ebben a rendszerben RSSR = DTNB, RSSH = TNB-SSH, RSH = TNB.

A sebességmeghatározó lépés pH-függését tanulmányozva igazoltuk, hogy a pH-profil jól tükrözi a szulfid savi disszociációs egyensúlyait, ezért a reakcióban a HS^- -forma a meghatározó reakciópartner, és a reakció a HS^- nukleofil támadásával indul. A pH-függésből nyert adatokat a modell alapján levezetett sebességi egyenlettel illetve meghatároztuk a pH-független sebességi állandót, amire $(1,09 \pm 0,01) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ értéket kaptunk.

A TNB-SSH szulfiddal való reakciójának látszólagos másodrendű sebességi állandójára kinetikai szimulációk segítségével becslést tettünk. Ez a sebességi állandó várhatóan az $5 \times 10^3 - 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ tartományba esik.

2.4 Igazoltuk, hogy a cisztin és a GSSG szulfiddal való reakciói egy többlépéses reakcióban játszódnak le, de lassabb sebességgel, mint a DTNB reakciója szulfiddal.

A cisztin – szulfid és a GSSG – szulfid reakciók spektrofotometriás vizsgálatakor megállapítottuk, hogy a karakterisztikus elnyelési sávok hiánya miatt a reakciók kinetikája bonyolult, de a polisulfidok és a perszulfidok elnyelési hullámhosszán vizsgálva a reakciók kinetikai viselkedését megállapítottuk, hogy a kinetikai görbék egy kezdeti indukciós periódussal rendelkeztek, ami többlépéses reakció mechanizmusra utal.

2.5 Megállapítottuk, hogy a cisztin szulfiddal lejátszódó reakciója egy egyensúlyi reakció, és azonos mechanizmus szerint megy végbe, mint a DTNB szulfid általi redukciója.

A cisztin – szulfid reakció reaktánsainak, közti- és végtermékeinek NMR spektrumait tanulmányozva szulfidfelesleg mellett megállapítottuk, hogy az egyensúlyok nincsenek a poliszulfid képződésének irányába eltolva, és az egyensúly beállása után jelentős mennyiségű ciszteinperszulfid (Cys-SSH) detektálható; vagyis a Cys-SSH-származékok jóval stabilabbak, mint a TNB-SSH. Poliszulfid hozzáadásával igazoltuk, hogy az egyensúlyok eltolhatók.

2.6 Megállapítottuk a diszulfid szulfid általi redukciójáról, hogy biológiailag feltehetően jelentőséggel bír, nagyon specifikus reakciórendszer, ami a diszulfidok eltérő kinetikai és kémiai tulajdonságainak tulajdonítható.

3. A kénhidrogén és a klóraminok közötti reakciók kinetikája és mechanizmusa

A poliszulfidok potenciális képződése végbemehet a szulfid ROS-kal való reakcióiban. A szervezetben található ilyen ROS például a klóraminok, amelyek a neutrofilok által termelt HOCl és szabad amincsoportok reakciója révén keletkeznek és fontos szerepet töltenek be a mikroorganizmusok elpusztításában.

3.1 Megállapítottuk a poliszulfidok UV-Vis spektrális tulajdonságainak ismeretében, hogy az N-klórtaurin (TauCl) és az N-klórglicin (GlyCl), mint modell klóraminok szulfiddal való reakcióiban, szulfidfelesleg mellett, poliszulfidok képződnek.

3.2 Kimutattuk, hogy mindkét rendszerben szulfidfelesleg mellett, pszeudo-elsőrendű körülmények között, minden koncentráció-tartományban két reakciólépéssel jellemezhetők a kinetikai sajátosságok. Míg a gyorsabb reakciólépések sebessége TauCl-ra és GlyCl-re nézve különböző volt, a lassabb reakciók a TauCl és a GlyCl rendszerekben azonos sebességgel játszódtak le.

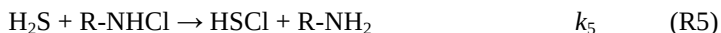
A gyorsabb reakció sebességének szulfid- és klóramin-koncentráció-függését tanulmányozva megállapítottuk, hogy a folyamat klóraminra és a szulfidra nézve egyaránt elsőrendű. A pseudo-elsőrendű sebességi állandók szulfidkoncentrációtól való függése alapján a látszólagos másodrendű sebességi állandók: $k_5^{\text{TauCl}} = (5,44 \pm 0,01) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_5^{\text{GlyCl}} = (1,13 \pm 0,02) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Megállapítottuk, hogy a lassabb reakciók nem mutattak szulfidkoncentráció-függést egyik klóramin esetében sem, de a reakciók felezési ideje függött a klóraminok kezdeti koncentrációjától. A detektált második reakciók másodrendű kinetikai egyenlettel voltak illeszthetők, melyek alapján meghatároztuk a látszólagos másodrendű sebességi állandókat: $k_9^{\text{TauCl}} = (6,5 \pm 0,4) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_9^{\text{GlyCl}} = (5,3 \pm 0,6) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a lassabb reakciók a GlyCl és a TauCl rendszerek esetében is azonos közttermékhez rendelhetők.

A látszólagos másodrendű sebességi állandók alapján ezek a reakciók lejátszódhatnak fiziológias körülmények között is, ezáltal potenciálisan befolyásolhatják a szulfid biológiai viselkedését.

3.3 Felállítottunk a klóraminok és a szulfid között lejátszódó reakcióra egy kinetikai modellt.

A modellben az első detektált reakció a modell szerinti első reakciólépéshez rendelhető. Megállapítottuk ezen reakció pH-függését vizsgálva, hogy ez a reakciólépés a deprotonált HS^- és a protonált klóramin között megy végbe (5. reakció). Az irodalmi adatok alapján az ezt követő lépések gyorsak (6.–8. reakciók). A második detektált reakció a HSSH diszproporcionálódásához rendelhető, ami poliszulfidok és H_2S képződéséhez vezet (9. reakció).

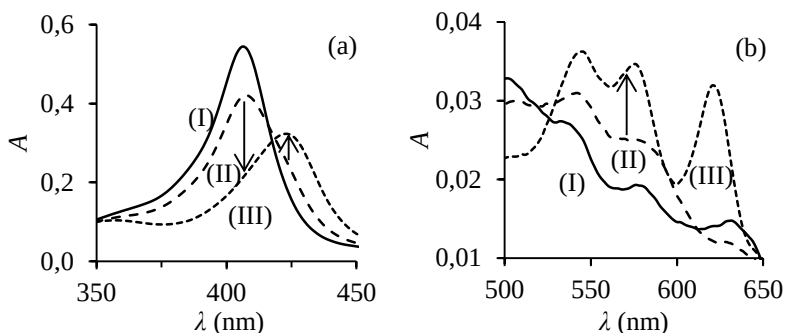


4. A ferril-Hb-származék és a hidrogén-szulfid között lejátszódó reakciók

A hemoglobin hemcsoportjának különböző peroxid-származékokkal való reakcióiban nagyon reaktív Fe^{4+} centrumokat tartalmazó ferril-hemoglobin-származékok (ferril-Hb-származék, $\text{Fe}^{4+}\text{Hb}^{+}$) képződnek. Ezeknek a ferril-Hb-származékoknak a szerkezete, illetve a kémiai tulajdonságai az irodalomban még nem tisztázottak, de mindezek ellenére tudjuk, hogy oxidatív stresszt okozó biológiai hatásúak, amit Balla és munkatársai az atheroszklerózis esetén demonstráltak.

4.1 Megállapítottuk, hogy a ferril-Hb-származék – szulfid reakciórendszerben az UV-Vis spektrumtartományban több hullámhosszon is gyors és jelentős spektrális változás következik be.

A ferril-Hb-származékot a metHb hidrogén-peroxiddal (H_2O_2) való reakcióiban generáltuk, majd a szulfiddal lejátszódó reakció spektrális változásait követtük (2. ábra). Megfigyeltük, hogy a ferril-Hb-származékhoz szulfidot feleslegben adva a spektrumban 400 nm-nél egy nagymértékű jobb irányú eltolódás jelent meg, míg 530 és 580 nm-nél az abszorbanancia növekedését követhettük nyomon. Ezenfelül egy új csúcs megjelenését tapasztaltuk 620 nm-nél, ami a szulfhemoglobin képződést illusztrálja.

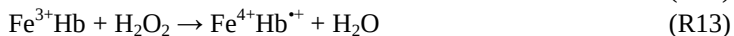


2. ábra. A metHb (I), a H_2O_2 – metHb reakció 400 s utáni (II), és a metHb – H_2O_2 reakcióelegy és a szulfid közötti reakció 60 s utáni (III) UV-Vis spektruma. (a): $\lambda = 350\text{--}450$ nm, (b): $\lambda = 500\text{--}650$ nm. $[\text{metHb}] = 4,0 \cdot 10^{-6}$ M, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 8,0 \cdot 10^{-6}$ M, $[\text{szulfid}]_{\text{tot}} = 1,0 \cdot 10^{-4}$ M, $2 \cdot 10^{-2}$ M foszfátpuffer, pH = 7,40, $T = 25$ °C. (A nyilak jelzik a kinetikai vizsgálatokra használt hullámhosszakokat: 406, 425, 570 nm.)

4.2 Igazoltuk a ferril-Hb-származék szulfiddal való reakciójának szekvenciális stopped-flow készülékkel történő tanulmányozása során, hogy ugyanazon ferril-Hb-származék képződik a metHb – H₂O₂ reakcióban, mint az oxiHb H₂O₂-dal lejátszódó reakcióban. Továbbá a látszólagos sebességi állandók értékei alapján igazoltuk, hogy a reakciókban a hemoglobin alfa és a béta láncainak reaktivitása eltérő.

Megfigyeltük a metHb és H₂O₂ reakciójával előállított ferril-Hb-származék szulfiddal való reakciója során, hogy két reakciólépés detektálható az alkalmazott kísérleti körülmények között 406, 425 és 570 nm-nél. A rögzített kinetikai görbék minden esetben két exponenciális tagot tartalmazó egyenlettel jól illeszthetők voltak, és a különböző hullámhosszakon számolt sebességi állandók hibahatáron belül megegyeztek. Irodalmi eredmények szerint ezek a reakciók a hemoglobin alfa- és béta-láncainak különböző hemcsoportjaihoz rendelhetők, melyek eltérő reaktivitásúak. Mindkét reakció sebességi állandója lineáris szulfidkoncentráció-függést mutatott, amiből a számolt látszólagos másodrendű sebességi állandók $(1,4 \pm 0,1) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ és $(6,5 \pm 0,2) \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ becslült értékeknek adódtak.

A ferril-Hb-származékot az irodalmi adatok alapján nemcsak a metHb – H₂O₂ reakcióban képeztük, hanem az oxiHb H₂O₂-dal történő oxidációval is előállítottuk:



Az így képződő ferril-Hb-származék reaktivitását vizsgáltuk szulfiddal 406, 425 és 570 nm-en. A szulfidkoncentráció-függés és a látszólagos másodrendű sebességi állandók mind az alfa-, mind a béta-lánc reaktivitására vonatkozóan nagyon hasonlóan adódtak mindhárom vizsgált hullámhosszon, ahol a gyorsabb reakcióra $(1,7 \pm 0,2) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ és a lassabb reakcióra $(7,0 \pm 0,8) \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a becslült sebességi állandók értéke.

4.3 Megállapítottuk, hogy a szulfhemoglobin-képződéshez rendelhető reakciók sebessége nagyságrendekkel gyorsabb, mint a 600 nm alatt detektált reakcióké.

A reakció 620 nm-nél is kétlépéses volt, ami az alfa- és béta-láncok eltérő reaktivitásával értelmezhető. A sebességi állandó lineárisan függ a szulfid koncentrációjától. A szulfhemoglobin képződéséhez rendelt látszólagos másodrendű sebességi állandókra a következő becsült értékeket kaptuk: $(1,7 \pm 0,2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ és $(6,5 \pm 0,3) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

4.4 Igazoltuk a képződő ferril-Hb-származékok szulfiddal való titrálása révén, hogy a 600 nm felett és alatt detektálható reakciók nem konszekutív, hanem párhuzamos reakciók.

4.5 A paralel reakciók abszorbanciaváltozásait vizsgálva megállapítottuk, hogy a H_2O_2 és a hemoglobin-származékok reakcióiban képződő ferril-Hb-származék két különböző reaktivitású terméket ad, kb. 50–50 % kitermelés mellett. A reakcióban képződő szulfhemoglobin kizárólag a gyorsabban reagáló ferrilforma reakciójának köszönhető.

IV. AZ EREDMÉNYEK HASZNOSÍTÁSI LEHETŐSÉGEI

A hidrogén-szulfid reagensként való alkalmazásához szükséges optimális kísérleti körülmények feltárásával, és az egyes szulfidkoncentráció-meghatározási módszerekkel kapott eltérő eredmények magyarázatával a doktori munka erősíti azt a kialakulóban lévő szemléletet, miszerint az élő szervezetben egy szulfidpufferrendszer létezik, mely biztosítja a jelátviteli folyamatokhoz szükséges szulfidkoncentrációt és a szabad szulfid koncentrációját 1 μM érték alatt stabilizálja.

A tudományos eredmények a szulfid néhány biológiai fontos redoxireakciójának molekuláris mechanizmusának tisztázásával hozzájárul ahhoz, hogy jobban megértsük a szulfid szerkezetbeli reakcióit, melyek értékes információt nyújthatnak egy-egy reakció lezajlásának valószínűségéről, valamint közti- és melléktermékek képződéséről, azok toxikus voltáról elsősorban a szulfid biológiai hatásainak, jelátviteli folyamatainak a megértése céljából.

Doktori munkám rámutat arra, hogy a szulfidnak oxidatív stresszt csökkentő hatása van, mert a szulfid védi a Fe^{4+} oxidált forma redukciója révén az atheroszklerózisos léziókat a komplikációt okozó oxidatív stressz hatásaitól. Ezen eredmények kiindulópontjai lehetnek a jövőbeli, célirányosabb orvosi és biológiai jellegű kutatásoknak, melyeknek célja olyan új gyógyszerhatóanyagok kifejlesztése, amik a verőerek rugalmasságának megőrzése által lehetővé teszik pl.: a szívinfarktus vagy stroke megelőzését.

V. TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés alapját képző közlemények

4. Anita Vasas, István Fábián and Péter Nagy

Kinetics and mechanism of the reactions of hydrogen sulfide with amino acid chloramines

Kézirat előkészítés alatt

3. Viktória Jeney, László Potor, Péter Nagy, Emese Tolnai, Anita Vasas, Enikő Balogh, Ágnes Gyetvai, Gábor Méhes, Matthew Whiteman, Mark E. Wood, Sándor Olvasztó, György Balla, József Balla

Elevated levels of H₂S inhibit hemoglobin-lipid interactions in atherosclerotic lesions

Antioxidants and Redox Signaling, **2016**, revízió alatt

2. Anita Vasas, Éva Dóka, István Fábián and Péter Nagy

Kinetic and thermodynamic studies on the disulfide-bond reducing potential of hydrogen sulfide

Nitric Oxide – Biology and Chemistry, **2015**, 46, 93-101

Impakt faktor: 3,521

1. Péter Nagy, Zoltán Pálincás, Attila Nagy, Barna Budai, Imre Tóth, Anita Vasas **Chemical aspects of hydrogen sulfide measurements in physiological samples**

Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects, **2014**, 1840, 876-891

Impakt faktor: 4,381

Poszterek

5. Anita Vasas, Éva Dóka István Fábián and Péter Nagy

Kinetic and thermodynamic studies on the disulfide-bond reducing potential of hydrogen sulfide

3rd European Conference on the Biology of Hydrogen Sulfide H₂S, 3-6. May 2015., Athens, Greece

4. Péter Nagy, Tobias P. Dick, Romy Greiner, Zoltán Pálinkás, Budai Barna, Anita Vasas, Attila Nagy

Redox-, coordination- and solution-chemistry of sulfide in relation to some of its biological actions

2nd European Conference on the Biology of Hydrogen Sulfide, 8-11. September 2013., University of Exeter, England

3. Anita Vasas, István Fábián and Péter Nagy

Kinetics and Mechanism of the Reactions of Hydrogen Sulfide with Amino Acid Chloramines

Debrecen Colloquium on Inorganic Reaction Mechanisms, 11-15. June 2013., Debrecen, Hungary

2. Anita Vasas, István Fábián and Péter Nagy

Kinetics and Mechanism of the Reactions of Hydrogen Sulfide with Amino Acid Chloramines

Gordon Research Conferences, Inorganic Reaction Mechanisms, 3-8. March 2013., Galveston, Texas, USA

1. Anita Vasas, István Fábián and Péter Nagy

Kinetics and Mechanism of the Reactions of Hydrogen Sulfide with Amino Acid Chloramines

First European Conference on the Biology of Hydrogen Sulfide, 15-18. June 2012., Smolenice, Slovakia

Előadások

4. Vasas Anita, Dóka Éva, Fábián István, Nagy Péter

A diszulfidok H_2S általi redukciójának kinetikai és mechanisztikus vizsgálata

IV. Interdiszciplinális Doktorandusz Konferencia, 2015. május 14-15., Pécs, Magyarország

3. Vasas Anita, Fábíán István, Nagy Péter

A hidrogén-szulfid diszulfidokkal való reakcióinak kinetikája és mechanizmusa

MTA Reakciókinetikai és Fotokémiai Munkabizottsági Ülése, 2014. június 26-27., Siófok, Magyarország

2. Péter Nagy, Zoltán Pálinkás, Attila Nagy, Anita Vasas

Chemical Aspects of Hydrogen Sulfide Measurements in Physiological Samples

WG3 COST Gasotransmitters Meeting, 18. May 2013., Athens, Greece

1. Vasas Anita, Fábíán István, Nagy Péter

A hidrogén-szulfid klóraminokkal való reakcióinak kinetikája és mechanizmusa

MTA Reakciókinetikai és Fotokémiai Munkabizottsági Ülése, 2012. október 25-26., Gyöngyöstarján, Magyarország



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/24/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Varga-Vasas Anita
Neptun kód: F4A6M6
Doktori Iskola: Kémiai Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemény(ek) külföldi folyóiratban (2)

1. **Vasas, A.**, Dóka, É., Fábán, I., Nagy, P.: Kinetic and thermodynamic studies on the disulfide-bond reducing potential of hydrogen sulfide.
Nitric Oxide-Biol. Chem. 46, 93-101, 2015. ISSN: 1089-8603.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2014.12.003>
IF: 3.521 (2014)
2. Nagy, P., Pálinskás, Z., Nagy, A., Budai, B., Tóth, I., **Vasas, A.**: Chemical aspects of hydrogen sulfide measurements in physiological samples.
Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj. 1840 (2), 876-891, 2014. ISSN: 0304-4165.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.037>
IF: 4.381

A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 7,902

A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7,902

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudásmetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2016.02.04.

