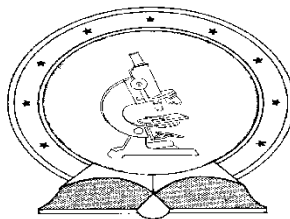


DE TTK



1949

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

Doktori (Ph.D.) értekezés

Varga-Vasas Anita

Témavezető neve: Dr. Nagy Péter

Belső konzulens neve: Prof. Dr. Fábián István

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi Doktori Tanács

Kémia Doktori Iskola

Debrecen, 2016.

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Kémia Doktori Iskola Koordinációs és Analitikai Kémia programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (Ph.D.) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2016. január 25.

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Varga-Vasas Anita doktorjelölt 2011–2014 között a fent megnevezett Doktori Iskola Koordinációs és Analitikai Kémia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2016. január 25.

a témavezető aláírása

Tanúsítom, hogy Varga-Vasas Anita doktorjelölt 2011–2014 között a fent megnevezett Doktori Iskola Koordinációs és Analitikai Kémia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2016. január 25.

a belső konzulens aláírása

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

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a kémia tudományágban

Írta: Varga-Vasas Anita okleveles környezetkutató

Készült a Debreceni Egyetem kémia doktori iskolája
(Koordinációs és Analitikai Kémia programja) keretében

Témavezető: Dr. Nagy Péter

Belső konzulens: Prof. Dr. Fábíán István

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.

A doktori szigorlat időpontja: 2015. november 4.

Az értekezés bírálói:

Dr.
.
Dr.
Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.
Dr.
Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 2016.

Köszönetnyilvánítás

Összinte hálámat szeretném kifejezni témavezetőmnek Dr. Nagy Péternek az Országos Onkológiai Intézet Molekuláris, Immunológiai és Toxikológiai Osztály tudományos osztályvezetőjének szakmai tanácsaiért, türelméért, bizalmáért és biztatásáért. Köszönöm belső konzulensemnek, Prof. Dr. Fábíán Istvánnak a Debreceni Egyetem egyetemi tanárának, a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék tanszékvezetőjének értékes szakmai iránymutatásait és nem csupán a szakmára vonatkozó tanácsait.

Köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak Prof. Dr. Lente Gábornak, Galajda Mónikának, Bellér Gábornak, Ditrói Tamásnak, Gombár Melindának, Dóka Évának, Dr. Kalmár Józsefnek mindennapi segítségükért és baráti támogatásukért, valamint külön köszönöm Horváth Ágnes és Csorvási Éva vegyésztechnikusoknak a laboratóriumi munkában nyújtott segítségüket. Köszönöm a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Tanszék munkatársainak az évek során nyújtott segítségüket. Köszönöm Nagyné Dombi Gizellának az adminisztratív ügyekben nyújtott segítségét.

Köszönöm az Országos Onkológiai Intézet Molekuláris, Immunológiai és Toxikológiai Osztály valamennyi munkatársának barátságukat és támogatásukat, és külön köszönettel tartozom Dr. Pálincás Zoltánnak szakmai segítségéért. Köszönetet mondok Prof. Dr. Balla Józsefnek, a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Nefrológia Tanszék vezetőjének a hemoglobinnal kapcsolatos vizsgálatokhoz nyújtott segítségéért.

Köszönöm szüleimnek, öcsémnek, párom családjának éveken át nyújtott segítő támogatásukat és szeretetüket. Külön köszönetet szeretnék mondani férjemnek, Dr. Varga Gergelynek szakmai tanácsaiért, folyamatos bátorításáért, biztató szavaiért és szeretetéért.

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5
2.1 A szulfid vizes oldatának kémiája.....	5
2.2 A H ₂ S endogén termelése, lebontása, tárolása	8
2.3 Poliszulfidok képződése és jelentősége az élő szervezetben.....	11
2.3.1 A poliszulfidok képződése a szulfid és az MPO enzim által termelt oxidálószerrek reakcióiban.....	13
2.4 Szulfid vezérelte jelátvitel fehérje-szulfhidráción keresztül	14
2.4.1 A perszulfidképződés mechanizmusai	14
2.4.2 A perszulfidképződés jelentősége	16
2.5 A szulfid és a hemfehérjék közötti kölcsönhatások és biológiai jelentőségeik.....	17
3. CÉLKITŰZÉSEK	19
4. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK	21
4.1 Vegyszerek és oldatok.....	21
4.2 Műszerek	22
4.2.1 pH-metria	22
4.2.2 UV-Vis spektrofotometria.....	23
4.2.3 A <i>stopped-flow</i> technika.....	23
4.2.4 NMR mérések	26
4.3 Számítógépes programok	26
5. EREDMÉNYEK.....	27
5.1 A hidrogén-szulfid reagensként való alkalmazásához szükséges kísérleti körülmények optimalizálása.....	27

5.1.1 A fiziológiás szulfidkoncentráció-meghatározás módszerei	27
5.1.2 Kémiai magyarázat a szervezetben detektált eltérő szulfidkoncentrációkra.....	32
5.1.3 A H ₂ S reagensként való alkalmazásához szükséges oldatkémiai tulajdonságainak tanulmányozása	34
5.2 A diszulfidok redukciója hidrogén-szulfiddal: kinetika és mechanizmus	42
5.2.1 A DTNB szulfiddal való reakciója	42
5.2.2 A cisztin és a GSSG redukciója szulfiddal	56
5.2.3 A diszulfidok szulfiddal való reakciójának biológiai jelentősége	63
5.3 A kénhidrogén és a klóraminok közötti reakciók kinetikája és mechanizmusa	65
5.4 A ferril-Hb-származék és a hidrogén-szulfid között lejátszódó reakciók.....	76
6. ÖSSZEFOGLALÁS	85
7. SUMMARY	89
8. IRODALOMJEGYZÉK	93
9. FÜGGELÉK	105

**Az egyetemi doktori (Ph.D.) értekezésben előforduló rövidítések
magyarázata:**

3MST	3-merkaptopiruvát-szulfurtransferáz enzim
AAT	aszpartát-aminotranszferáz enzim
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
CAT	cisztein-aminotranszferáz enzim
CBS	cisztationin-béta-szintetáz enzim
CcO	citokró-m-c-oxidáz enzim
Cys	cisztein
Cys-SH, Cys-tiol	cisztein-tiol
Cys-SSH, Cys-perszulfid	cisztein-perszulfid
Cys-SSSH	alkil-hidrotriszulfid
Cys-SOH	cisztein-szulfénsav
CSE	cisztationin-gamma-liáz enzim
DTNB	5,5'-ditiobisz-(2-nitrobenzoésav)
DTPA	dietilén-triamin-pentaecetsav
DTT	ditiotreitól
ferril-Hb-származék (Fe ⁴⁺ Hb ⁺)	ferril-hemoglobin-származék
GAPDH	glicerinaldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz enzim
GlyCl	N-klórglicin
Grx	glutaredoxin
GSH	glutation
GSSG	oxidált glutation
GSSH	glutation-perszulfid
Hb	hemoglobin
Hb-polimerek	hemoglobin-polimerek
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i> enzim
LPO	laktoperoxidáz enzim
Mb	mioglobin
metHb, ferri-Hb (Fe ³⁺ Hb)	methemoglobin
MPO	mieloperoxidáz enzim

NADPH-oxidáz, NOX	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát-oxidáz enzim
NMR	mágneses magrezonancia spektroszkópia
Nrf2	<i>nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i> enzim
oxiHb, ferro-Hb (Fe ²⁺ Hb)	oxihemoglobin
PBS	foszfátpuffer sóoldat
PDI	fehérje-diszulfid-izomeráz enzim
PTEN	foszfatáz és tenzinhomológ enzim
PTP1B	fehérje-tirozin-foszfatáz-1B enzim
ROS	reaktív oxigénszármazékok
SDB	szulfid-dibimán
SDO	szulfid-dioxigenáz enzim
SO	szulfid-oxidáz enzim
SQR	szulfid-kinon-reduktáz enzim
SQR-SSH	szulfid-kinon-reduktáz-perszulfid
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i> enzim
TauCl	<i>N</i> -klórtaurin
TNB	5-tio-(2-nitrobenzoésav)
TNB-SH, TNB-tiol	5-tio-(2-nitrobenzoésav)-tiol
TNB-SSH, TNB-perszulfid	5-tio-(2-nitrobenzoésav)-perszulfid
TPO	tiroid-peroxidáz enzim
TRIS	tris(hidroximetil)-aminometán
Trx	tioredoxin
TSH	thyrotropin
TST	tiosulfát-glutation-szulfurtranszferáz enzim
UV-Vis	UV-látható spektrofotometria

1. BEVEZETÉS

Az emberiség számára már ősidők óta ismert a színtelen, „záptojás” szagú toxikus gáz a hidrogén-szulfid. Köztudott, hogy a természetben némely vulkáni gázban, kénes ásványvízben fordul elő, valamint bakteriális tevékenység révén és egyes gyári folyamatok toxikus melléktermékeként (pl.: kőolaj-finomítás) keletkezik.

A hidrogén-szulfid még a híres francia regényíró, Victor Hugot *A nyomorultak* (1862) című művében is megihlette:¹

„... a földalatti fertők undok kiömlése, amit a kövezet rejt a szem elől; tudjátok-e, mindez micsoda? Virágzó rét... meleg vér az erekben, egészség, öröm, élet.”

A kén egyetlen, termodinamikailag stabilis hidridje a hidrogén-szulfid vagy más néven kén-hidrogén (H_2S), melynek moláris tömege 34,08 g/mol, forráspontja $-60,3\text{ }^\circ\text{C}$,² olvadáspontja $-82,3\text{ }^\circ\text{C}$,³ fagyáspontja $-86\text{ }^\circ\text{C}$.³

A H_2S -ban lévő kén a kalkogén elemek csoportjába tartozik, a periódusos rendszer 16. eleme, és a földkéregben az elemek előfordulási sorrendjének tekintetében szintén a 16. Elektronkonfigurációja $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^4$ szerkezetű, és két párosítatlan spinű p elektronja van. A kén oxidációs állapotainak ($-2 - +6$) széles skálája lehetővé teszi számos redoxireakcióban való részvételét.

A levegőnél nagyobb sűrűségű gáz savas és bázikus közegben egyaránt jól oldódik vízben ($25\text{ }^\circ\text{C}$ -on a telített oldat koncentrációja $0,1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$), de oldódik például abszolút etanolban és dietil-éterben is.² A vízhez hasonló

molekulaszerkezete van, de a kén-hidrogénben nincs észlelhető hidrogénkötés, mivel a kén elektronegativitása kisebb, atomsugara nagyobb, ezért a S–H kötések poláros jellege és kötési energiája sokkal kisebb az O–H kötésekénél, részben emiatt a hidrogén-szulfid molekulái nem asszociálódnak.⁴

A kén-hidrogén-oldatot gyakran készítik Kipp-készülék segítségével vas-szulfid és híg sósav reakciójával előállított gáz vizes közegbe való átbuborékoltatásával vagy szulfid sók feloldásával. A különböző nehézfém-szulfidok soft karakterűek (pl.: PbS, Ag₂S) és nehezen oldódnak (pl.: a hidrogén-szulfid-ion (HS⁻) oldékonysága pH 7,00-en $1 \cdot 10^{-3}$ M Pb²⁺-t tartalmazó oldatban $6 \cdot 10^{-20}$ M), amíg a nátrium-hidrogén-szulfid (NaHS), dinátrium-szulfid (Na₂S) jól oldhatók vízben, ezért gyakran használják biológiai célú kutatások reagens H₂S-oldat forrásaként a NaHS-ot és a Na₂S-ot.

A köztudatban a H₂S-ről elterjedt vélemény az, hogy kellemetlen szagú, és a humán szervezet számára toxikus. Az ember már 0,1–1,0 ppm koncentráció-tartományban képes érzékelni. Akut mérgezés esetén már 50–100 ppm között ideg-, ér- és szívrendszeri rendellenességek kialakulásához vezet. Amikor a környezet kén-hidrogén koncentrációja eléri a 100–150 ppm-et a szaglószer megbénul, 320–530 ppm közötti koncentráció-intervallumban tüdőödéma alakul ki, 530–1000 ppm-től a gáz belégzése súlyosan károsítja a központi idegrendszert, és gyors halálhoz vezet.³

A H₂S toxikus hatása leginkább a mitokondriális sejtlégzés gátlásának tulajdonítható,⁵ ami a mitokondriumban az elektrontranszfer szerepet betöltő citokró-m-c-oxidáz (CcO) enzim gátlásán keresztül valósul meg. A CcO egy terminális enzim, mely a ferrocitokró-m-c oxidációját katalizálja oxigénmolekula (O₂) segítségével.

Ennek ellenére nagy szulfidkoncentrációt¹ mértek patkányok agyszövetében (1,6 µg/g szulfidkoncentrációt)⁶ és posztmortem humán agyszövetben (0,7 µg/g szulfidkoncentrációt)^{6,7}. További kutatások alátámasztották azt is, hogy a szulfid az emberi szervezetben enzimátikus és nem enzimátikus utakon is termelődik.⁸ De a szulfid kutatás területén a legfontosabb

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.

felfedezésnek a szulfid neuromodulátorként való működésének igazolása volt,⁹ ezzel a nitrogén-monoxid (NO) és a szén-monoxid (CO) után a szulfidot is jelátviteli gázmolekulaként² azonosították. Ezek a gázmolekulák a szervezetben enzimatikus úton képződnek, termelésük szabályozott, szabadon átjutnak a sejtmembránon, jól definiált működésük van, specifikus celluláris és molekuláris célponttal rendelkeznek.⁸

A szulfid biológiai hatásainak tekintetében fizioiógias és patofizioiógias funkciókat szabályoz például: a bélrendszerben,¹⁰ az agyban,¹¹ az érrendszerben¹² és más szervekben is. Fizioiógias szerepe révén részt vesz a gyulladás,¹³ a vérnyomás,¹⁴ az energiatermelés¹⁵ és az oxidatív stressz¹⁶ szabályozásában.

Fizioiógias körülmények között jó nukleofil ágensként és reaktív molekulaként a szulfidnak a redoxi-jelátvitelben kiemelkedő fontosságú szerepe van. Ezen jelátviteli folyamatok közül a perszulfidképződés,¹⁷ a szulfidnak metalloenzimekkel való kölcsönhatásai¹⁸ és a NO által vezérelt jelátviteli folyamatokkal való kölcsönhatások¹⁹ a leggyakrabban tanulmányozott mechanizmusok.²⁰

Annak ellenére, hogy az elmúlt évtizedben számos nemzetközileg elismert felfedezés született a kén-hidrogén biokémiájának, és biológiai hatásának feltérképezésére, mégis a szervezetben lejátszódó számos reakciójának a kinetikája és molekuláris mechanizmusa máig ismeretlen, vitatott vagy helytelenül leírt. Például az utóbbi közé tartozik a perszulfidok (R-SSH) képződése, ahol a terméként képződő perszulfid a szulfid funkcionális fehérje-ciszteinnel való reakciójában keletkezik. Ma már köztudott, hogy ez a reakció vagy a szulfid és a cisztein (Cys) oxidált formái vagy a szulfid oxidált származékai és a Cys között mennek végbe,²¹ míg egy korábbi helytelen értelmezés szerint, a perszulfidok a HS⁻-nak ciszteinnel való reakciójában képződnek.²² Ez a reakció azért sem játszódhat le, mert a HS⁻-ban és a

² A gázmolekula Rui Wang által definiált, a biológia területén elterjedt kifejezés a NO, a CO és a H₂S jelátviteli gázmolekulákra (gáztranszmitterekre). Bár ezen molekulák – szigorúan véve – normál légköri nyomáson és hőmérsékleten gáz halmazállapotúak, esetünkben a vizes közegben oldott formáit értjük és tanulmányoztuk. (Ezen oldatokban fizioiógias körülmények között a protonálódási egyensúly jelentőségét lentebb részletezzük.)

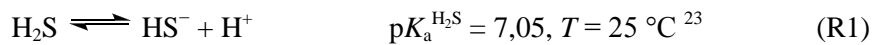
ciszteiben is a kén oxidációs száma -2 , viszont a perszulfidok képződése redoxireakciókat feltételez.²¹

A szulfid biológiai hatásaiért felelős molekuláris mechanizmusok tisztázatlanok. Doktori munkám ezeknek a mechanizmusoknak a mélyebb megértéséhez járul hozzá a szulfid reakcióinak a kémiai vizsgálatai révén.

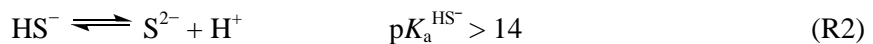
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A szulfid vizes oldatának kémiája

A hidrogén-szulfiddal való laboratóriumi kísérletezés alkalmával akár kémiai, akár biológiai célú az adott kutatás a leggyakrabban vagy H_2S -gázt vezetnek vizes oldatba, vagy NaHS vagy Na_2S só vizes oldatát használják reagens forrásként. Ezen sók oldódását disszociáció kíséri, amely során szolvatált nátrium- és hidrogén-szulfid- és/vagy szulfid-ionok (S^{2-}) keletkeznek az oldatban. Vizes közegben a következő protonálódási egyensúlyi reakciók fordulhatnak elő:



$$(\text{p}K_{\text{a}}^{\text{H}_2\text{S}} = 6,76, T = 37 \text{ }^\circ\text{C})^3$$



$$K_{\text{a}}^{\text{H}_2\text{S}} = \frac{[\text{HS}^-][\text{H}^+]}{[\text{H}_2\text{S}]} \quad (\text{R3})$$

$$K_{\text{a}}^{\text{HS}^-} = \frac{[\text{S}^{2-}][\text{H}^+]}{[\text{HS}^-]} \quad (\text{R4})$$

Fiziológiás körülmények között ennek nagy jelentősége van, mivel pH 7,40-on a $\text{H}_2\text{S}:\text{HS}^-:\text{S}^{2-}$ arány 30:70:0,000002-nak adódik. Meg kell, hogy jegyezzük, hogy ebből az arányból adódóan a S^{2-} egyensúlyi koncentrációja nagyon alacsony pH 7,40-on, de ez nem szükségszerűen jelenti azt, hogy a szulfidion nem lehet a reakciópartner egy reakcióban. Például a szulfidion-

szelektív elektródok által mért szulfidion-koncentrációt a készülék már szubmikromoláris koncentrációban is méri, és kis koncentrációjának ellenére az egyes mérési folyamatokban kimutatták, hogy reaktív részecske (amire az 5.1.1.4 részben kitérünk.)

Abban az esetben, amikor a hőmérséklet 20 °C-ról 37 °C-ra növekszik, akkor az oldott H₂S egyensúlyi koncentrációja 30%-kal csökken (a HS⁻ koncentrációja 30%-kal nő a pK_a^{H₂S} hőmérsékletfüggésének köszönhetően).^{24,25} Ez a különböző protonálódási állapotok eloszlásában bekövetkező változás a szulfidoldat különböző rendszerekben való reaktivitását befolyásolhatja, de a totál aktív szulfidkoncentrációt nem, hiszen némely reakcióban a főszerepet a H₂S játssza (5. reakció), míg másokban a HS⁻ (6. reakció). Például a HS⁻ jobb nukleofil révén nukleofil-elektrofil reakciókban valószínűbben vesz részt, mint reakciópartner a H₂S-dal összehasonlítva. Míg a töltés nélküli H₂S könnyedén átjut a sejtmembránon.²⁶ A protonálódási egyensúlyban történő eltolódás az aktuálisan reaktív forma *steady-state* koncentrációjának változásához vezet; ezért is van, hogy 37 °C-on nem 30%-kal kevesebb szulfid lép be a sejtbe, hanem a membrántranszport sebessége lassul magasabb hőmérsékleten a membránpermeábilis H₂S kisebb *steady-state* koncentrációja miatt.



A reakciópartner feleslege esetén a teljes szulfid mennyisége elfogy mindkét említett hőmérsékleten, bár eltérő sebességgel. Például, ha a protonálódási egyensúlyra az előegyensúlyi feltételezést használjuk és kikötjük, hogy a reakció kizárólag a HS⁻-on keresztül történik (6. reakció), akkor a sebességi egyenlet a következő formában írható le:

$$\frac{d[\text{termék}]}{dt} = k_{\text{app}}[\text{reakciópartner}][\text{szulfid}]_{\text{tot}} \quad (\text{R7})$$

$$\text{ahol } k_{\text{app}} = k_6 \frac{K_a^{\text{H}_2\text{S}}}{(K_a^{\text{H}_2\text{S}} + [\text{H}^+])}$$

Tehát a 7. egyenlet szerint a reakciórendszerben a teljes szulfid mennyisége fogy a reakciópartner feleslege esetén, de a látszólagos másodrendű sebességi állandó (k_{app}) egy adott pH-nál függ a $pK_a^{H_2S}$ -értékétől, ami változik a hőmérséklettel.

A szulfid redukáló partnerként egy- és kételektronos reakciókban is részt vesz. Habár sok tanulmány beszámol a szulfid szabad gyökös oxidációjáról, ennek ellenére a mechanizmus még mindig több reakció esetén vitatott (pl.: az O_2 -nel lejátszódó oxidáció)^{27,28}. A feltételezések szerint az egyelektronos oxidációs folyamatban az első köztitermék a nagyon reaktív tiolgyök (HS^\cdot), azonban ezen reakciók sajátosságait és a HS^\cdot szerepét csak korlátozottan vizsgálták.

Érdeemes megemlíteni, hogy a szulfid törzsoldatot a levegő oxidálja, aminek első lépése egy O_2 általi egyelektronos oxidáció, de ez termodinamikailag nem kedvező.²⁸ Annak ellenére, hogy a szulfid O_2 -nel való kételektronos oxidációnak termodinamikailag kedvezőnek kellene lennie, az O_2 -nel létrejövő spin pár probléma miatt ennek komoly kinetikai gátja van;²⁸ ezért a szulfid O_2 -nel történő oxidációja leggyakrabban átmenetifémionok által katalizált egyelektronos reakcióban valósul meg.²⁹ A szulfid törzsoldatok általában tartalmaznak nyomnyi fémion-szennyeződést, ami általában a szilárd pufferból jön, ezért vizes oldatban a szulfidot az oldott O_2 fémion által katalizált reakcióban oxidálhatja,²⁷ ezért a szulfid törzsoldatokban sárga színű poliszulfidok képződhetnek.³⁰

A szulfid számos kételektronos redoxireakcióban vesz részt. Biológiai rendszerekben reagál reaktív oxigénszármazékokkal (ROS), bár a hipoklórossav (HOCl) kivételével nem kimagaslóan nagy sebességgel.^{21,31,32} A biológiai rendszerekben a szulfidnak antioxidáns szerepet is tulajdonítanak. Nézőpontunk szerint ez a tulajdonság a szulfid kis koncentrációja miatt valószínűleg nem a ROS közömbösítésén keresztül, hanem enzimatisz folyamatok szabályozása révén valósul meg.

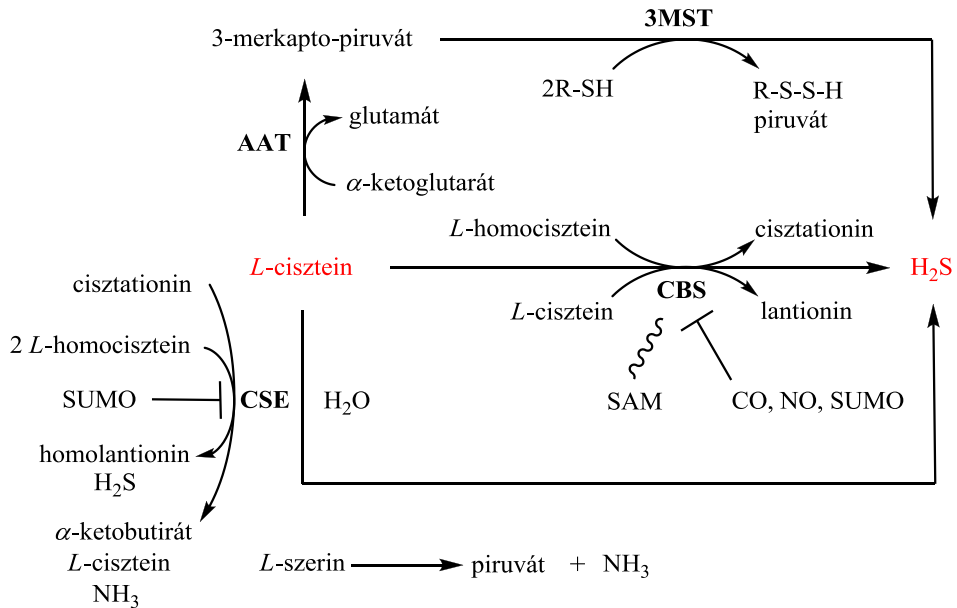
Fiziológiás körülmények között – ahogy azt már említettük – a szulfid közvetített redoxi-jelátvitel megvalósulhat a következő leggyakrabban vizsgált reakciók által: *i*) perszulfidképződésen át, *ii*) hemfehérjékhez való kötődésen keresztül, *iii*) NO-dal való kölcsönhatáson át. Ha ezek közül kiemeljük a perszulfidokat, akkor képződésüknek három leginkább tanulmányozott reakcióútjai: *I*) a szulfid oxidált formája, a poliszulfidok ciszteinnel való

reakciója,¹⁷ 2) a Cys oxidált származékának, a szulfénsavnak (HSOH) redukciója szulfiddal,³³ 3) a szulfid általi fehérje diszulfidok (azaz a Cys oxidált formái) redukciója.³⁴ (Az utóbbi a doktori munka publikálása révén került be az irodalomba (lásd az 5.2 fejezetben).)

2.2 A H₂S endogén termelése, lebontása, tárolása

Többek között Awata és munkatársai (mitsai) is igazolták,³⁵ hogy patkányok agyában enzimatis úton cisztationin- β -szintetáz (CBS) és cisztationin- α -liáz (CSE) enzimek közreműködésével endogén termelődik H₂S. A CBS és CSE enzimek aktivitását hat különböző agyi régióban detektálták. További kutatások támasztották alá, hogy az emberi szervezetben enzimatis úton nem enzimatis úton egyaránt termelődik kén-hidrogén.⁸

Az endogén szulfidtermelés főként enzimatis utakon valósul meg. Legalább három különböző enzimrendszer katalizálja a szulfid képződését a Cys metabolizmusa révén, a folyamatot a CBS és CSE enzimek, mint piridoxál-5'-foszfát függő enzimek, illetve az aszpartát-/cisztein-aminotranszferáz (AAT, CAT) és a 3-merkaptopiruvát-szulfurtranszferáz (3MST) együttműködése határozza meg (1. ábra).²⁰ A Cys metabolizmus által vezérelt szulfidtermelés részben a CBS:CSE:3MST/AAT relatív koncentrációjának arányától függ, másrészt az enzimek aktivitását módosító tényezőktől (pl.: az enzimek szubsztrátjainak jelenléte, különböző biomolekulák általi gátlás vagy aktiválás, biológiai környezet stb.).²⁰



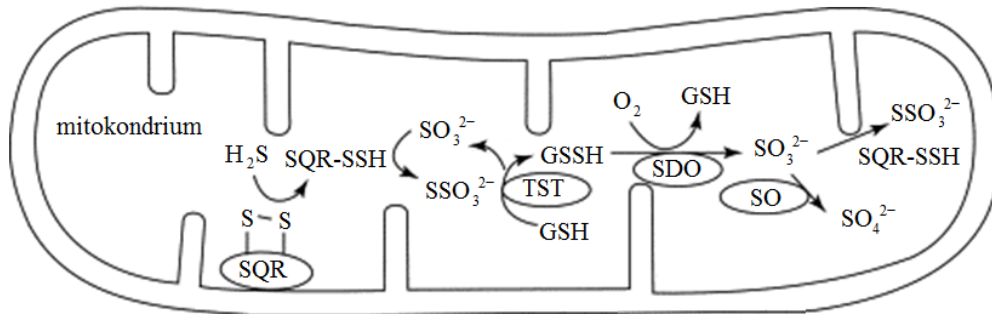
1. ábra. A fő szulfidtermelő enzimatikus utak a Cys metabolizmusának során.²⁰

A szervezetben a szulfid termelésében a CSE és CBS enzimeknek van fő szerepük, melyek a Cys α,β -eliminációs és β -replikációs reakcióit katalizálják. Mindkét enzim működését gátolja a *small ubiquitin-like modifier* (SUMO) enzim, valamint a CBS enzim aktivitását a CO és a NO is akadályozza.³⁶

A szulfidtermelésnek van még két további mechanizmusa, ahol a szulfid a cisztein-perszulfid (Cys-perszulfid vagy Cys-SSH) és a glutation-perszulfid (GSSH) közttermékek redukálása révén szabadul fel. A cisztinból a CSE³⁷ és CBS³⁸ enzimek katalizálják a β -eliminációt, így közvetlenül képződik ezen folyamatokban a Cys-SSH. A Cys-SSH-ből transzszulfuráció révén GSSH képződik. Továbbá a tioszulfát-glutation-szulfurtransferáz (TST) enzim is termelhet GSSH-t a szulfid lebontása során, aminek lehet egy szulfidszállító szerepe is. A polyszulfidokból (és egyéb szulfán-kén tartalmú vegyületekből) a szulfidot endogén rendszerekben a tioredoxin (Trx) és a thyrotropin (TSH) rendszerek szabadítják fel.³⁹

A mitokondriumban az oxidatív szulfidlebontás⁴⁰ elsősorban szulfidkinon-reduktáz (SQR) enzim által vezérelt (2. ábra).⁴¹ Egy kezdeti reakcióban az SQR enzim egy intramolekuláris diszulfidesoportjának redukciója révén szulfidkinon-reduktáz-perszulfid (SQR-SSH) köztitermék képződik.⁴² Az SQR-SSH

funkciós csoport a TST enzim révén a glutationhoz (GSH) szállítódik és termékként GSSH-t ad, ami a szulfid-dioxigenáz (SDO) enzim szubsztrátjaként eredményezi a szulfidot.⁴³ A szulfittal a szulfid-oxidáz (SO) enzim vagy az SQR enzim reagál, és szulfát vagy tioszulfát képződik.^{20,43}



2. ábra. A szulfidbontás folyamata a mitokondriumban.²⁰

A szulfid biológiai hasznosulásában az endogén szulfidtermelés és szulfidbontás mellett fontos kérdés a biomolekulákban tárolt szulfid mennyisége. Korábbi irodalmi adatok szerint a szulfid koncentrációja 0,1 μM -tól akár 500–600 μM -ig terjedhet. Valójában a szabad szulfid koncentrációjának nagyon alacsonynak, 1 μM alattinak kell lennie, hiszen ennél nagyobb mennyiségben lévő szulfid már toxikus hatású, a mitokondriális elektrontranszportláncban a CcO enzim gátlásán keresztül akadályozza a sejtlégzést. Ugyanakkor a biológiai rendszerekben lévő szulfid-pufferrendszerek miatt 500–600 μM koncentráció is mérhető. A biomolekulákban tárolt szulfid szükség esetén felszabadulhat, mert azokban a szulfid reverzibilisen kötődik. Általában a szulfid indukálta biológiai folyamatok többsége 1 μM -nál nagyobb szulfidkoncentrációt igényel, és a szükséges szulfid mennyiséget ez a pufferrendszer szolgáltathatja. Javaslatunk szerint ennek a pufferrendszernek fontos szerep juthat a szulfid vezérelte jelátviteli folyamatokban.²⁰

2.3 Poliszulfidok képződése és jelentősége az élő szervezetben

A poliszulfidok szervezetbeli jelentősége felértékelődni látszik, mivel egyre több biológiai hatást tulajdonítanak a poliszulfidoknak, köztük olyanokat is, melyeket korábban a szulfiddal hoztak összefüggésbe. A szulfid fontos szerepének felismerését követően ellentmondások születtek a szulfid irodalmában, de a poliszulfidok biokémiájának megismerése révén ezen viták némelyike megoldódni látszik.

Az irodalomban található ellentmondások egy része abból adódik, hogy a még napról napra ugyanazon vegyszerből frissen készített szulfid törzsoldat koncentrációja is eltérő lehet. Ennek részben az az oka, hogy a szulfid törzsoldatok leggyakoribb forrásaként használt NaHS kristályok felszínén (már a frissen felbontott gyári vegyszer esetén is) sárga színnel megjelenő poliszulfid-szennyeződés van,¹⁷ másrészt az oldatban nyomnyi mennyiségben jelenlévő fémionok is katalizálják a szulfid poliszulfiddá való alakulását. Ezen okok miatt eltérő eredmények születhettek még elvileg hasonló körülmények mellett végzett vizsgálatok során is, mert más és más lehetett a mérőoldatok szulfid- és/vagy poliszulfid-tartalma.

Ez sok esetben döntő jelentőségű lehet, például Dick és mtsai megmutatták, hogy a szulfid törzsoldatban jelenlévő nyomnyi poliszulfid-szennyeződés elegendő ahhoz, hogy a foszfataz és tenzinhológ (PTEN) enzimet teljesen inaktíválja, ezzel alátámasztották, hogy a poliszulfidnak biológiai rendszerekben, kis koncentrációban is fiziológiás jelentősége van.¹⁷

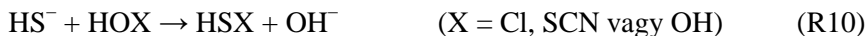
A poliszulfidok főszerepet játszanak a szulfán-kén tartalmú vegyületek biokémiájában,^{17,38,44} és részt vesznek a NO-jelátviteli és a szulfid-jelátviteli folyamatok közötti kapcsolatban,¹⁹ valamint a szulfid vezérelte redoxi-jelátviteli folyamatokban is.^{17,44,45} A poliszulfidok savi disszociációs állandója csökken a növekvő lánchosszal, mivel $pK_a^{H_2S} = \sim 7$, ezért valószínűleg a poliszulfidok pK_a -értékei 7-nél kisebbek lesznek, tehát anionos formában fordulnak elő biológiai körülmények között.³² Giggenbach UV-tartományban végzett kísérletei alátámasztották, hogy a poliszulfidok speciációja nagymértékben függ a szulfán-kén:szulfid aránytól és a pH-tól.⁴⁶

A poliszulfidok a szulfid egy- és kételektronos oxidációjában képződnek. A szulfid egyelektronos oxidációs reakciói szabad gyökökkel (pl.:

szuperoxid-gyökcanion ($O_2^{\bullet-}$)⁴⁷ vagy fémcentrumokkal (pl.: mieloperoxidáz (MPO) enzim)¹⁸ a HS^- reakcióiban HS^\bullet köztiterméken át eredményezik a poliszulfidok képződését. A $HS^\bullet HS^-$ -ionnal diffúziókontrollált reakcióban adja a diszulfidgyökcanion-származékot ($HSSH^{\bullet-}$),⁴⁸ ami tovább oxidálódva képi a poliszulfidot (és a $O_2^{\bullet-}$ -t, ha a reakciópartner az O_2) a 8. és 9. reakció szerint.



Valószínűleg a poliszulfidok képződésének meghatározó reakciótípusa a szulfidok kételektronos oxidációja (pl.: HOCl-val, hipotiocianátsavval (HOSCN), hidrogén-peroxiddal (H_2O_2), lipid-, peptid- vagy fehérje-peroxidokkal). Ezen reakciók egyes oxidálószerekkel lassan játszódnak le (pl.: H_2O_2 -dal $k_{app}^{pH6,8} = 0,2 M^{-1}s^{-1}$)³², más reakciók viszont közel diffúziókontrolláltak (pl.: HOCl-val $k_{app}^{pH7,4} = 2,3 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$)²¹ (10. és 11. reakció).



Elképzelhető, hogy a Cys-nel analóg módon a szervesetlen diszulfid keletkezése mellett reaktív köztitermékként HSOH képződik (10. reakció).^{49,50} A HSOH kételektronos oxidációs reakcióban tovább reagálhat a szulfiddal (11. reakció), vagy egyéb nukleofilekkel. Ezt a vegyületet nagy reaktivitása miatt, eddig még oldatban nem sikerült detektálni, de kiterjedt kutatások folynak gázfázisban való jellemzésére.⁵¹ A HSOH-ban lévő kénatomnak az oxidációs állapota 0, ezért mind redukálószerként, mind oxidálószerként előfordulhat.

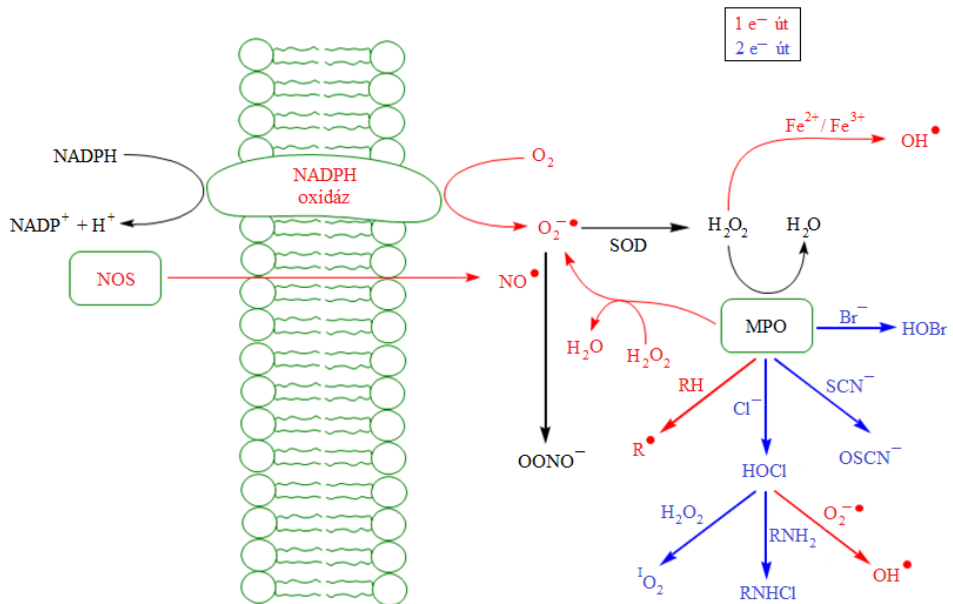
A képződő poliszulfidok fiziológias körülmények között termodinamikailag nem stabilak,⁴⁶ könnyen diszproporcionálódnak H_2S -dá és S_8 -né (12. reakció), de biológiai rendszerekben elképzelhető, hogy biomolekulákkal (pl.: cisztein-tiolátokkal) még a diszproporciót megelőzően gyorsabban reagálnak.²¹



A 12. reakció miatt nem készíthetünk szulfidtól mentes poliszulfidoldatot, mert az oldatban a szulfid fogyása megkönnyíti a poliszulfid bomlását és a kén csapadék képződését.²⁰

2.3.1 A poliszulfidok képződése a szulfid és az MPO enzim által termelt oxidálószerke reakcióiban

Az endogén ROS fő forrása a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát-oxidáz (NADPH-oxidáz vagy NOX) enzim. Ilyen például a neutrofil granulociták NOX rendszere, mely a sejt membránjában helyezkedik el és stimuláció hatására az O_2 redukciója révén nagy mennyiségű $O_2^{\cdot-}$ -t termel a fagoszómás térbe. A $O_2^{\cdot-}$ gyors diszproporcionálódása H_2O_2 -ot ad, ami a neutrofil fehérvérsejtekben (melyek a veleszületett immunitás fő alkotóelemei, a fehérvérsejtek 70%-át képzik) az MPO enzim szubsztrátjaként oxidálószerke, szabad gyökök, ROS széles spektrumát adja (3. ábra).^{52,53}



3. ábra. Oxidálószerke, szabad gyökök, ROS keletkezésének mechanizmusa granulociták fagoszómájában.^{52,53}

Ezen oxidálószerke az extracelluláris térbe is kijutnak, ahol vagy reagálnak egyes redukálószerkekkkel vagy gyulladásserkentő hatásuk érvényesül.

A HOCl,²¹ a H₂O₂,^{31,32} a peroxinitrit (OONO⁻),³¹ az *N*-klórtaurin,³¹ és még számos MPO termelte oxidálószer reagálhat a szulfiddal a 10. és 11. reakció szerint például poliszulfidok keletkezése mellett.

2.4 Szulfid vezérelte jelátvitel fehérje-szulfhidráción keresztül

2.4.1 A perszulfidképződés mechanizmusa

Egy korábbi helytelen értelmezés szerint a perszulfidok képződhetnek a szulfid redukált Cys-származékokkal való közvetlen reakcióiban.⁵⁴ Mára már tisztázott, hogy a szulfid közvetített perszulfidképződés a szulfid oxidált Cys-származékokkal való reakcióin keresztül vagy a szulfid oxidációs termékeinek cisztein-tiolokkal (Cys-SH vagy Cys-tiol) történő reakcióin át megy végbe.^{17,21,55}

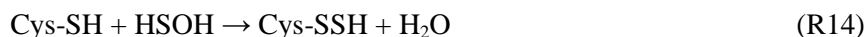
A perszulfidképződés egyik lehetséges mechanizmusa szerint a szulfid a Cys–Cys diszulfid kötésekot redukálja.⁵⁶⁻⁵⁸ Ezen reakcióút fiziológiai relevanciáját azonban több kutató megkérdőjelezi termodinamikai és kinetikai okok miatt.⁵⁹⁻⁶² Ugyanakkor a Cys-SH – diszulfid cserereakciók analógiájára ez a reakcióút véleményünk szerint nem elvethető, hiszen várható, hogy az aktivált diszulfidokat, mint például a fehérje-diszulfid-izomeráz (PDI) enzimet vagy az SQR-t gyorsan redukálja a szulfid. Kiemelendő az a példa miszerint az említett mechanizmussal összhangban van a már korábban leírt szulfidbontás első lépése, ahol az SQR intramolekuláris Cys160–Cys356 diszulfid kötését a szulfid redukálja.^{42,59} Ezért oxidatívabb környezetben, mint az endoplazmatikus retikulum vagy a mitokondrium, mégis lehetséges a reaktív funkciók csoportok redukciója az endogén szulfiddal (pl.: a PDI-nél vagy az SQR-nél).

A perszulfidok képződésének egy másik lehetséges útja a szulfid és a Cys nagyon reaktív oxidációs módosulata a cisztein-szulfénsav (Cys-SOH) között lejátszódó reakció (13. reakció). Biológiai környezetben ilyen Cys-SOH-származékokat már számos alkalommal detektáltak.⁶³



Ezen nagyon reaktív Cys-SOH-származékok a szervezetben lévő tiollokkal gyors reakcióban diszulfidokat képeznek. A Cys-SOH redukció sebességi állandója – sztérikus gátlás hiányában – pH 7,40-on nagyobb, mint $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$,^{64,65} tehát biológiai tiollokkal gyorsan reagálnak. Viszont vannak olyan fehérjék, amelyeknek az aktív centrumában sztérikus hatások stabilizálhatják ezeket a Cys-SOH-származékokat,^{49,50} ekkor a biológiai környezetben lévő tiolok nem férnek hozzá, hogy diszulfidot adjanak és e miatt nagy élettartamúak lehetnek biológiai környezetben. Azonban a szulfid semleges töltésű kismolekulaként könnyebben hozzáfér az aktív centrumhoz, ezért ez a reakció egy potenciális perszulfidképződési reakció is lehet. Vagyis a kinetikai tényezők, és a Cys-SOH kémiai természete és *steady-state* koncentrációja alapján lehetőség nyílik a fehérje-szulfénsav szulfiddal való reakciójára, mely valószínűleg gyors és bizonyosan gyorsabb, mint szervezetben lévő tiollokkal.

A perszulfidképződés a szulfid oxidációs termékeinek Cys-tiollokkal történő reakcióin keresztül is végbemehet. A poliszulfidok hatékonyan oxidálják a Cys-származékokat (lásd pl.: a PTEN enzim esetében)¹⁷. A korábban már említett poliszulfid-képződés egy többlépéses oxidatív folyamat, amely magába foglalja reaktív köztitermékek képződését, olyanokat, mint a HSOH (14. reakció), a HSX (ahol $X = \text{Cl}^-, \text{Br}^-, \text{I}^-$ és SCN^-) vagy hidrogén-diszulfid-ion (HS_2^-) képződését. A biológiai rendszerekben ezen köztitermékek a Cys-tiollal reagálhatnak. Például:



Emellett a Cys-származékok poliszulfidokkal való reakciója Cys-perszulfidokat (lásd 5.2 fejezet) és cisztein-poliszulfidokat is eredményezhet (15. reakció).



A perszulfidképződés gyökös reakciókon keresztül is megvalósulhat. A HS^\bullet a szulfidok egyelektronos reakciójában képződik. A HS^\bullet egy fehérje-tiollal reagálva adja a megfelelő diszulfid-gyököniont (R-SSH^\bullet) (16. reakció),⁴⁸ mely

például az O₂-nel lezajló gyors reakcióban O₂^{•-}-t és perszulfidot szolgáltat (17. reakció).



2.4.2 A perszulfidképződés jelentősége

A perszulfidok a sejtes rendszerekben bőséges mennyiségben fordulnak elő, és nagy valószínűséggel részt vesznek fiziológias folyamatokban.³⁹ Többek között fontos köztitermékként szolgálhatnak egyes szulfid által közvetített reakciókban,^{43,45} védő hatásuk lehet az oxidatív stresszel szemben, és a redoxi-jelátvitelben közvetítő szerepet játszhatnak,^{22,38,45} valamint fokozhatják⁶⁶⁻⁶⁸ vagy gátolhatják^{17,69-71} az enzimek aktivitását.

A perszulfidképződés általában inaktíváló hatású. Például a PTEN enzim esetén igazolták, hogy a Cys71 és Cys124 aktív centrumában keletkező perszulfid hatékonyan gátolta az enzim működését poliszulfid hatására,¹⁷ illetve a fehérje-tirozin-foszfátáz-1B (PTP1B) enzim esetében a Cys215 aktív centrumában a perszulfidképződés szintén az enzim inaktíválását eredményezte.⁷⁰

Bár a perszulfidképződés leginkább az enzim működésének gátlását okozza, indirekt módon enzimaktiváló hatású is lehet. Például a *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1) enzim Cys151 aktív centrumában végbemenő perszulfidképződés – a Keap1 inaktíválása mellett – kiváltja egy másik enzim, a *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* (Nrf2) enzim aktiválását.⁷¹ Kivétel ez alól a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) enzim, amely esetén hétszer nagyobb glikolitikus aktivitását figyelték meg, amikor a Cys150 aktív centrumában perszulfid képződött,²² de kutatócsoportunknak ezt nem sikerült reprodukálnia, amit egy új tanulmány is alátámaszt.⁷²

2.5 A szulfid és a hemfehérjék közötti kölcsönhatások és biológiai jelentőségeik

A szulfid gazdag koordinációs kémiájának köszönhetően hatékonyan kötődik az átmenetifémionokhoz. A szulfid és a hemfehérje közötti kölcsönhatásban a fémcentrum tulajdonságain túl elsősorban a fehérje aktív centrumának a megközelíthetősége, a szulfidkoncentráció, a szomszédos funkciós csoportok kémiai tulajdonságai és a pH játszanak főszerepet.^{73,74}

A mitokondriális légzés gátlása miatt széleskörűen tanulmányozták a szulfid kölcsönhatásait a CcO enzim hem a_3 és Cu_B centrumain.⁷³ A nagyobb szulfidkoncentráció inaktíválja a CcO enzim működését, ezáltal akadályozva az oxidatív foszforilációt, aminek következtében az adenzin-5'-trifoszfát (ATP) termelődése csökken. A szulfid az ATP termelődését fokozhatja is kis koncentrációja esetén, mert szubsztrátként szolgál a CcO enzim számára.^{75,76} Közepes szulfidkoncentrációnál az enzim működése nem teljesen gátolt, hanem a reverzibilis inaktíválás hatására kialakulhat egy hibernációs állapot az egerekben.⁷⁷

A szulfid kölcsönhatásba léphet hemfehérjék Fe^{3+} -tartalmú fémcentrumával. A hemfehérjék képesek reverzibilisen kötni a szulfidot, ezáltal a nagy spinszámú Fe^{3+} -centrumaiból kis spinszámú ferri-szulfid-komplex képződik. A szulfid nagyobb koncentrációja esetén egy második, de már lassabb reakcióban a szulfid redukálhatja a hemfehérjék Fe^{3+} -centrumait Fe^{2+} -ná, adva a ferro-szulfid-komplexeket.²⁰ Ilyen hemfehérje például a hemoglobin (Hb) vagy a mioglobin (Mb) is.

A szulfid kölcsönhatását részletesen tanulmányozták a Hb-nal és a Mb-nal a szulfhemoglobinémia kialakulása miatt.⁷⁸ Ez a ritka betegség egy hem modifikációval párosul, ahol a szulfid a vas-porfirin-pirrolgyűrűvel reagálva nem toxikus szulfhemszármazékokat képez (mint a szulfhemoglobint vagy a szulfmioglobint).⁷⁹ Ezen vegyületek szerkezetét részletesen vizsgálták, de képződésük részleteit még nem tisztázták.⁷³

A szulfhemképződés egy irreverzibilis reakció, ezért feltételezhetően a szulfid által vezérelt jelátviteli folyamatokban nincs számottevő szerepe. A szulfhemképződésről azt feltételezték, hogy a reakció magasabb vegyértékű vas-komplexek (pl.: a ferril-hemek), mint köztitermékek képződésén keresztül megy

végbe.⁸⁰ Ezért ennek a reakciónak a funkciója jelentős lehet a nagyon reaktív vegyületek inaktivációjában, ami akár maga után vonhat egy antioxidáns hatást is.^{20,81}

A szulfid kölcsönhatásba léphet a hem-peroxidázokkal is (pl.: az MPO enzimmel,¹⁸ a laktoperoxidáz (LPO)⁸² enzimmel és a tiroid-peroxidáz (TPO)⁸³ enzimmel). Ezeknek az enzimeknek nagyon fontos szerepük van a ROS-nak a termelésében, lebontásában és átalakításában, ezért redoxi-jelátviteli folyamatokban potenciálisan fontos szerepet töltenek be.

Egy nem régen publikált tanulmány szerint az MPO enzim natív szerkezetének Fe^{3+} -os formája hatékonyan koordinálja a szulfidot.¹⁸ Nagyobb szulfidfelesleg mellett a Fe^{3+} -os forma Fe^{2+} -os formává is redukálódhat.¹⁸ Ezek a kölcsönhatások gátolják az enzim aktivitását, ezért szerepet játszhatnak jelátviteli folyamatokban, mivel ezek a peroxidázok részben felelősek a ROS termeléséért. Ugyanebben a cikkben leírták azt is, hogy az MPO enzimátikus körfolyamatában képződő nagyon reaktív redoxi köztitermékek, mint a *Compound I* vagy a *Compound II* szulfid által hatékonyan redukálhatók ($k^{\text{Compound I}} = 1,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k^{\text{Compound II}} = 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).¹⁸ (Hasonló reakció lejátszódását feltételezték LPO-val, TPO-val is.)

A szulfidnak a nagyon oxidatív, köztitermékeket redukáló hatása szerepet gyakorolhat néhány biológiai környezetben tapasztalt antioxidáns hatására. Ezek a folyamatok arra is rávilágítanak, hogy a szulfid nemcsak szabályozza a peroxidáz enzimek működését, hanem szubsztrátjaikként is szolgálhat. Ezekben a reakciókban bioaktív szulfid oxidációs termékek képződhetnek, amelyek sajátos kémiai és biológiai sajátosságokkal rendelkezhetnek. Vagyis nemcsak a szulfid szabályozza a peroxidáz enzimek reaktív oxigénszármazék-termelő képességét, és ebből kifolyólag a redoxi-jelátviteli folyamatokat, hanem a peroxidáz enzim is szabályozhatja a szulfid által vezérelt jelátviteli folyamatokat, hiszen a szulfidnak és a szulfid oxidációs formáinak nagyon különböző biológiai hatásai vannak.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A szulfidnak nemcsak a szerkezetbeli koncentrációja vitatott, hanem a biológiai hatásainak értelmezéséhez fontos reakcióinak molekuláris szintű leírása is hiányos és ellentmondásokkal terhelt.

Doktori munkám egyik célja, hogy az egyes szulfid-detektálási módszerek előnyeit és hátrányait elemezve értelmezzük a biológiai rendszerekben detektált szulfidkoncentrációk között észlelt nagy eltéréseket, illetve optimalizáljuk a szulfid reagensként való alkalmazásához szükséges kísérleti körülményeket.

A kutatások további célja, hogy tisztázzuk a szulfid néhány fontos biomolekulával való reakciójának a mechanizmusát, ezáltal elősegítve a szulfid egyes biológiai hatásainak értelmezését. Ennek érdekében a szulfidjelátvitelben fontos szerepet játszó perszulfidképződés molekuláris mechanizmusait vizsgáltuk, ezért az endogén rendszerekben viszonylag nagy gyakorisággal előforduló diszulfidok szulfiddal való redukcióját tanulmányoztuk.

A perszulfidképződés másik potenciális modellje a fehérje-Cys-tiolok poliszulfidokkal való reakciói. A poliszulfidok képződhetnek a szervezetben külső hatás következtében a sejtes rendszerekbe bejutó illetve endogén termelt ROS és a szulfid reakciójával; ezért célul tűztük ki, hogy kinetikailag vizsgáljuk a neutrofil fagociták MPO enzime által katalizált reakciók másodlagos termékeként képződő klóraminok szulfid általi redukcióit, melyek poliszulfidot eredményeznek. A szulfid oxidációs reakcióinak biológiai potenciálja mellett kutatócsoportunk szilárd meggyőződése, hogy a szulfid antioxidáns hatásai nem a ROS közvetlen közömbösítése által megy végbe, hanem enzimreakciókon keresztül zajlik le.

A szulfid antioxidáns hatásának egyik potenciális modellje a hemfehérjék szulfiddal való reakciói. A hemfehérjéknek aktív szerepet tulajdonítottak a ROS képződésében. Ilyen hemfehérje például a ferril-hemoglobin-származék (ferril-Hb-származék, $\text{Fe}^{4+}\text{Hb}^{*+}$) is, ami az atheroszklerotikus plakkok komplikált plakokká való alakulásához szükséges oxidatív stressz kialakításában vesz részt. További célunk annak feltárása volt a ferril-Hb-származék szulfiddal való reakciójának vizsgálatán keresztül, hogy az érlelmeszesedéses megbetegedésekben leírt szulfid védőhatásai vajon tulajdoníthatók-e a nagyon reaktív ferril-Hb-származékok közömbösítésének szulfid által.

4. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK

4.1 Vegyszerek és oldatok

A kísérletek során analitikailag legtisztább (a.l.t.) minőségű és a *Sigma-Aldrich*től vásárolt vegyszerekkel dolgoztunk. Valamennyi reagensoldat elkészítéséhez a *MILLI-Q* (*Millipore*) tisztítórendszerrel készített háromszorosan ionmentesített és ultraszűrt vizet ($R_{H_2O} \geq 18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ $25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C-on}$) használtunk. A mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR) mérésekhez deuterált vizet (99,9% D-atom) alkalmaztunk.

Amennyiben kinetikai és a spektrofotometriás méréseket végeztünk – vizsgálva egy adott reakció sebességének változását a pH függvényében – a következő vegyszereket alkalmaztuk pufferoldatként: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ és KH_2PO_4 ($6,20 \geq \text{pH} \geq 8,20$) vagy foszfátpuffer sóoldat (PBS) ($6,20 \geq \text{pH} \geq 8,20$), trisz(hidroximetil)-aminometán (TRIS) ($7,07 \geq \text{pH} \geq 9,05$), KH_2PO_4 és $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ($8,20 \geq \text{pH} \geq 9,20$), illetve karbonátmentes NaOH ($\text{pH} \geq 9,20$). Az NMR kísérleteket pD 7,40-on és pD 8,00-on végeztük, így alkalmas pufferként trikálium-foszfátot és deuterált kénsavat (*Alfa Aesar*, 96% D_2O -ban, Németország, Karlsruhe) választottunk. A pufferoldatok közvetlenül a mérések előtt naponta frissen készültek. Az oldatok ionerősségének állításához nátrium-kloridot alkalmaztunk, és az $I = 1,00 \text{ M}$ volt.

A szilárd $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (ACS reagens, $\geq 98\%$) kristályokat argongáz (4.6, *Messer*, Németország, Krefeld) alatt hűtőben tároltuk. A szulfid törzsoldatokat a kristályok legalább háromszori háromszorosan ionmentesített vízzel történő lemosását követően ionmentes vízben való oldódásával állítottuk elő. A

törzsoldatokat jégen, sötétben tároltuk, és koncentrációjukat kétféle módszerrel határoztuk meg (a részletek az 5.1.3 részben találhatóak).⁸⁴ A törzsoldatokat minden nap frissen készítettük, és a munkaoldatokat közvetlenül a mérések előtt hígítottuk a megfelelő pufferrel.

A klóraminoldatokat, nevezetesen az *N*-klórtaurint (TauCl) és az *N*-klórglicint (GlyCl) taurin- vagy glicinoldat HOCl-oldattal való reagáltatás segítségével erőteljes kevertetéssel állítottuk elő minden nap frissen 10:1 koncentráció arányban *VORTEX* segítségével. A HOCl-oldatot úgy állítottuk elő, hogy klórgázt (*Messer*) vezetünk ~0,2 M-os karbonátmentes NaOH-oldatba. Az így készített OCl⁻-oldatok koncentrációja kb. 0,1 M-os volt. Ezeket az oldatokat kb. 3 hónapig használtuk és hűtőben tároltuk. A HOCl-oldat koncentrációját a jodometriás titrálással kapott koncentráció és a 292 nm-en ($\epsilon_{292\text{nm}} = 351 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) spektrofotométer segítségével mért abszorbanciaértékből nyert koncentráció átlagolásával határoztuk meg a mérések előtt.

A poliszulfidot a szulfid törzsoldatban állítottuk elő. $1,01 \cdot 10^{-4}$ M OCl⁻-oldatot $4,04 \cdot 10^{-4}$ M szulfiddal kevertetve deuterált foszfátpufferben pD 8,00-nál.²¹ A fennmaradó szulfidkoncentrációt megbecsültük, azt a feltételezést használva, hogy 1 mól HOCl fogy 2 mól szulfidra, és 1 mól poliszulfid keletkezik (10. és 11. reakció).

A methemoglobint (metHb, ferri-Hb, Fe³⁺Hb) és az oxihemoglobint (oxiHb, ferro-Hb, Fe²⁺Hb) a Debreceni Egyetemen Prof. Dr. Balla József kutatócsoportja állította elő humán vérből.

4.2 Műszerek

Az oldatok készítéséhez *Rainin E4 XLS* elektronikus pipettákat használtunk, melyeket rendszeresen kalibráltunk.

4.2.1 pH-metria

A pH-méréseket a *785 DMP Titrino* (*Metrohm AG*, Svájc, Herisau) készülék segítségével végeztük. Elektrodként *double-junction* kombinált pH-üvegelektrodót (*6.255.100*, *Metrohm AG*, Svájc, Herisau) használtunk, kétpontos

kalibrációját kálium-hidrogén-ftaláttal ($\text{pH} = 4,008$) és nátrium-tetraboráttal ($\text{pH} = 9,177$) végeztük, majd a pH-mérő által kijelzett értéket $-\lg[\text{H}^+]$ -ra konvertáltuk. A *785 DMP Titrino* készülék segítségével az oldatok pH-ját a kinetikai és fotometriás mérések előtt és után is megmértük.

Amikor deuterált körülmények mellett dolgoztunk, a pH-mérő által kijelzett értéket a következő kifejezés szerint: $\text{pD} = \text{pH}^* + 0,4$ korrigáltuk, ahol pH^* a pH-mérő által jelzett érték.

4.2.2 UV-Vis spektrofotometria

Perkin Elmer Lambda 2S UV-látható (UV-Vis) kétsugaras spektrofotométer (Németország, Überlingen) segítségével rögzítettük a reaktánsok és a termékek spektrumait 1,00 cm úthosszú kvarc küvettákban. A reaktánsok koncentrációját az abszorbanciából a megfelelő moláris abszorbanciák (ϵ) ismeretében számítottuk. Referenciaoldatként háromszorosan ultraszűrt vizet használtunk. A reakcióelegyek hőmérsékletét *Techne RB-12, TU-16D* termosztáttal szabályoztuk $25,0 \pm 0,1$ °C-ra.

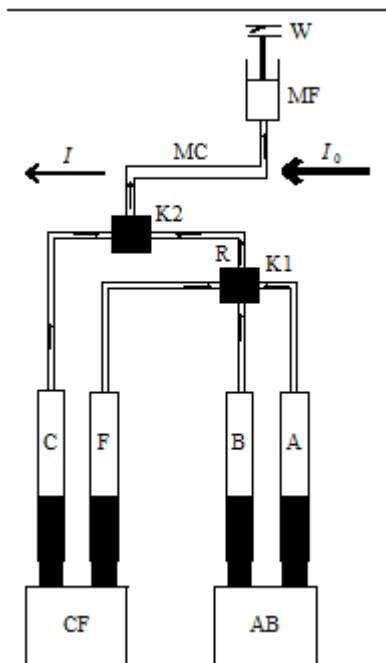
4.2.3 A *stopped-flow* technika

A kísérleti munka döntő része *stopped-flow* (megállított áramlás) technika segítségével valósult meg, ezért is érdemes részletesebben áttekinteni a módszer alapvető jellemzőit.

A *stopped-flow* módszer két oldat gyors, jól reprodukálható összekeverésén alapul. Ezen technika jó lehetőséget biztosít a másodperc vagy akár a tized-, századmásodperc élettartamú reakciók vizsgálatához. Az általunk használt készülék áramlási sémáját a 4. ábrán mutatjuk be.

Egyszerű *stopped-flow* üzemmódban a két összekeverendő oldatot a C és F jelű fecskendők tartalmazzák. Ezen mérési módban az A és B jelű fecskendőket nem használjuk. Az előbbi fecskendőket pneumatikusan, egy kb. 7,0 bar nyomású nitrogéngázzal (4.5, Messer) meghajtott dugattyú segítségével egyszerre mozgatjuk, így biztosítva a két azonos térfogatú oldat összekeverését. A keverőbe (K2) kerülés után az elegy a mérőcellába (MC) jut. Elvileg

bármilyen szelektív és gyors válaszidejű detektálási módszer használható, de a gyakorlatban leginkább optikai módszereket alkalmaznak. A MC-ból az elegy a megállító fecskendőbe (MF) kerül, ahol az elhasznált reakcióelegy összegyűlik. Ekkor a MF dugattyúja működésbe hozza a mikrokapcsolót (W), mely leállítja az áramlást és elindítja a detektálást.



4. ábra. Az *Applied Photophysics SX.18MV* szekvenciás *stopped-flow* készülék áramlási sémája. AB, CF: pneumatikus meghajtók, A, B, C, F: fecskendők, K1: első keverő, K2: második keverő, R: reakcióső, MC: mérőcella, MF: megállító fecskendő, W: mikrokapcsoló.

A módszer továbbfejlesztése a négykomponensű, azaz a szekvenciális *stopped-flow* technika. A módszer lényege, hogy két oldat gyors összekeverését és reakciójának kinetikai vizsgálatát megelőzi egy rövid élettartamú köztitermék előállítás. Először az A és B jelű fecskendők tartalma az első keverőbe (K1) jut, ahol a köztitermék képződik. Innen azonban nem a mérőcellába (más néven átfolyócellába, vagy optikai cellába) kerül, hanem egy ismert térfogatú reakciósővön (R) keresztül jut a második keverőbe (K2) az F fecskendőben lévő mosó oldat segítségével. (Az F fecskendő oldata nem reagensoldat, hanem

általában desztillált víz, így nem vesz részt a reakcióban, szerepe csupán a K1-ben képződött közttermék K2-be juttatására korlátozódik.) Az R tartalma pedig a C fecskendőben lévő reagenssel egy időben kerül a K2-be, majd onnan az átfolyócellába.

A kinetikai kísérleteket *Applied Photophysics SX.18MV* (*Applied Photophysics Ltd*, UK, Surrey, Leatherhead) és/vagy *Applied Photophysics SX.20* (*Applied Photophysics Ltd*, UK, Surrey, Leatherhead) *stopped-flow* készülék segítségével végeztük egyszerű vagy szekvenciális üzemmódban. Az *Applied Photophysics SX20* készülék csak egyszerű üzemmódban használható. A készülékek fényforrása egy 150 W-os xenonlámpa, amelynek fényét egy rácsos monokromátor bontja fel. A detektálás spektrofluorimetriával vagy spektrofotometriával lehetséges. Abszorpciós méréseknél 0,20 vagy 1,00 cm-es fényút használható a mérőcellában. Detektorként fotoelektronsokszorozó szolgál (amely lényegében egy egysugaras fotométer része). A mérést az *Applied Photophysics PDSC OS3* operációs rendszerre épülő számítógép vezérli. A résszélességeket és az összekeverendő oldatok térfogatát manuálisan kell állítani. A reakcióelegyeket $25,0 \pm 0,1$ °C-on termosztáltuk *Julabo F12*, *ED* termosztát segítségével.

A készülék holtidejét (t_d : a keverési pont és az optikai cella közötti távolság megtételéhez szükséges idő) és időeltolódását (t_s : az abszorbancia (A) detektálásának kezdete és a reakció tényleges kezdeti időpillanata közötti idő) az aszkorbinsav – 2,6-diklór-indofenol reakció segítségével határoztuk meg, $t_d = 0,89 \pm 0,02$ ms, $t_s = 0,85 \pm 0,04$ ms.^{85,86} Emellett meg kell említeni, hogy a kinetikai görbék kb. 1 ms-os kezdeti szakasza torzul, valószínűleg annak köszönhetően, hogy az áramlás hirtelen leállásakor a cellán átfolyó 7 atm-s nyomásfront a műanyag csövekből álló áramlási rendszert átmenetileg deformálja.

A reakciók tanulmányozása előtt minden reaktánst pufferrel reagáltattunk annak eldöntésére, hogy van-e a hígulásból származó vagy a pufferrel lejátszódó nem kívánatos reakció, illetve ezen vizsgálatok alapján állapítottuk meg a kezdeti abszorbanciaértékeket is. A *stopped-flow* fecskendők reagenssel történő megtöltésekor külön munkafecskendőket használtunk, a reakciók tanulmányozása előtt mindig átmostuk a készülékeket a vizsgálni kívánt reakcióeleggyel.

4.2.4 NMR mérések

Az NMR vizsgálatokat *Bruker 360 MHz (8.5 T)* NMR spektrométer (UK, Oxford) segítségével végeztünk $25,0 \pm 0,1$ °C-on a cisztin és a szulfid közötti 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 mérések során az oldatok pD-jét deuterált pufferekkel tartottuk állandó értéken.

4.3 Számítógépes programok

A pH-méréseket vagy a szükséges titrálásokat a *785 DMP Titrino* készüléket vezérlő *Tiamo 2.3 (Metrohm AG, Svájc, Herisau)* program segítségével hajtottuk végre.

A detektált kinetikai görbéket *Micromath Scientist 2.01 (Micromath Research, USA, Missouri, Saint Louis)* és/vagy *Applied Photophysics Pro-Data Viewer 4.2.0 (Applied Photophysics Ltd, UK, Surrey, Leatherhead)* programcsomagokkal a nem-lineáris legkisebb négyzetek módszerét alkalmazva illesztettük, a megfelelő matematikai egyenleteket felhasználva. A sebességi állandókat legalább három párhuzamos mérés során felvett kinetikai görbe illesztését követően átlagolással kaptuk.

Az NMR spektrumokat a *MestReNova 8.1.2-11880 (Mestrelab Research, Spanyolország, Santiago de Compostela)* szoftvercsomaggal értékeltük ki.

A kinetikai szimulációkat Dóka Éva készítette a *Micromath Scientist 2.01* programot alkalmazva a Runge-Kutta módszerrel.

A dolgozatban szereplő ábrák és táblázatok a *Microsoft Excel 2010* program, valamint a szerkezeti képletek *ChemDraw Ultra 11.0 (Perkin Elmer, UK, London)* szoftver segítségével készültek.

5. EREDMÉNYEK

5.1 A hidrogén-szulfid reagensként való alkalmazásához szükséges kísérleti körülmények optimalizálása

5.1.1 A fiziológiás szulfidkoncentráció-meghatározás módszerei

A hidrogén-szulfiddal való kísérleti munka egyik fontos alappillére a pontos koncentrációjának meghatározása. Továbbá alapvető fontosságú a biológiai rendszerekben koncentrációjának ismerete. A szulfid koordinációs és redoxikémiájára alapozva számos detektálási módszert dolgoztak ki. Ugyanakkor változatos kémiai sajátosságai és *in vivo* redoxireakciói miatt problémát jelent a megfelelő specifikus és szelektív analitikai módszer kiválasztása.

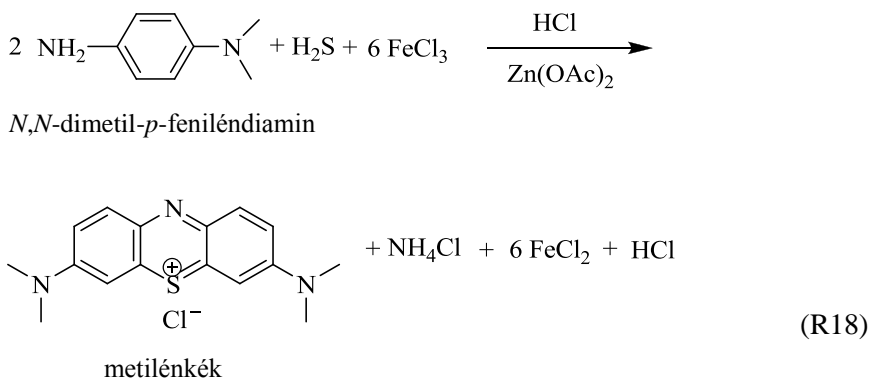
Fontos hangsúlyozni, hogy megfelelő körültekintéssel ezen módszerek mindegyike alkalmas a szulfidkoncentráció-meghatározásra egyszerű oldatokban (pl.: mikor a szulfidot reagensként használják). A leggyakrabban alkalmazott meghatározási technikák bemutatásán és többségében általunk is tanulmányozott eljárásokon keresztül, saját méréseken át, gyakorlati szempontból megközelítve szemléltetjük a módszerek előnyeit és lehetséges buktatóit. Emellett a szulfid kémiai tulajdonságai ismeretében javaslatot teszünk arra, hogy a biológiai rendszerekben detektált szulfidkoncentrációk között észlelt nagy eltérésekre milyen kémiai magyarázat adható.

5.1.1.1 Metilénkék módszer

A biológiai minták és a szulfid törzsoldatok szulfidkoncentrációjának a meghatározására leggyakrabban a metilénkék módszert alkalmazzák. A módszer lényege, hogy a szulfid az *N,N*-dimetil-*p*-feniléndiaminnal reagál egy vas-klorid által katalizált reakcióban, 1:2 sztöchiometriai arányban (18. reakció). A reakcióelegyben a metilénkéket spektrofotometriásan detektálják.

A módszer egyik gyenge pontja (és valójában minden más kolorimetriás módszeré is), hogy az esetlegesen jelen lévő más kromofórok zavarhatják a kolorimetriás-meghatározást. Ezen probléma feloldására alkalmazható például kromatográfiás elválasztás, ami az érzékenységet is növeli.^{87,88}

A szulfidnak kromofóroktól való elválasztásának másik lehetséges útja a cink-acetáttal történő csapadékos leválasztás, ami jelenleg a legszélesebb körben alkalmazott technika. A cink-szulfid (ZnS) csapadék nagyon savas körülmények között *N,N*-dimetil-*p*-feniléndiamin jelenlétében jól oldódik és a metilénkék spektrofotometriásan detektálható (18. reakció).⁸⁹ A metilénkék moláris abszorbanciája vizes közegben $71000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 650 nm-nél,⁹⁰ de erősen savas körülmények között ez az érték a metilénkék protonálódása miatt csökken, amit saját kísérletekkel igazoltunk.⁸⁴



A módszer kimutatási határa $\sim 1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, azonban egyes kutatócsoportok azt találták, hogy nagyobb szulfidkoncentrációnál a kalibrációs egyenes meredeksége nem lineárisan változik. Ennek oka az, hogy nagyobb szulfidkoncentrációnál a metilénkékoldat hígítása szükséges, annak érdekében,

hogy az $A < 1$ legyen. Ha a hígítást vízzel végezzük, akkor a pH eltolódik, és a látszólagos moláris abszorbancia jelentősen változik a pH 0–2 közötti tartományban.⁹¹ Ez a pH-tartomány egybeesik a módszer detektálási körülményeivel, mert a mintáknak savasnak kell lenniük, hiszen a ZnS csapadék feloldódása szükséges a meghatározáshoz.

A pH-korrektúra alkalmazásával a módszer a szulfidkoncentrációt 3%-os hibával határozza meg $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3}$ M-os koncentráció-tartományon belül.⁹¹ Mivel az oldat végső pH-ját nagymértékben befolyásolja a mintaoldat pufferkoncentrációja és pH-ja, nagyon fontos, hogy a szulfid detektálása során a kalibrációs méréseket a mintaoldatoknak megfelelő körülmények mellett végezzük.

5.1.1.2 DTNB módszer

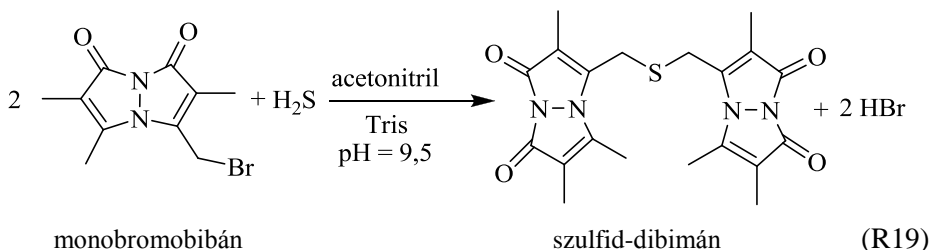
Gyakran alkalmazott módszer a szulfidkoncentráció-meghatározásra a DTNB módszer is. A DTNB egy vízzel oldékony aromás diszulfid, amely Ellman-reagensként vagy 5,5'-ditiobisz-(2-nitrobenzoész)-ként ismert.⁹² A módszer lényege, hogy egy kétlépéses reakcióban a szulfid redukálja a DTNB-t, és a reakció termékeként képződő 5-tio-(2-nitrobenzoész) (TNB) karakterisztikus elnyeléséből ($\epsilon_{412} = 14100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁹³ számítható az oldat szulfidkoncentrációja szulfid:TNB 1:2 sztöchiometriai arányban (25. és 26. reakció). Ezen reakciót az 5.2 fejezetben részletesen is tárgyaljuk.

A módszernek szintén az a hátránya, hogy kromofórok jelenléte zavarhatja a spektrofotometriás-meghatározást, valamint ezen módszer csak egy korlátozott pH-tartományban használható, mert pH ~ 6 alatt az oldatban kén csapadék kiválása történik,³⁴ és pH > 9 esetben pedig a DTNB már érzékeny a pH-változásra.⁹⁴

5.1.1.3 Monobromobimán módszer

A monobromobimán módszer a szulfid és két monobromobimán-molekula konszekutív nukleofil szubsztitúciós reakcióján alapszik, amely egy stabil és erősen fluorescens szulfid-dibimán (SDB) terméket ad (19. reakció). Az SDB-t könnyen elválaszthatjuk fordított fázisú kromatográfia segítségével a

monobromobimántól, mert két hidrofób bimánszármazékot tartalmaz. Az SDB koncentrációja fluorescens detektálással határozható meg 390 nm, extinkciós és 475 nm, emissziós hullámhosszaknál.⁹⁵



A detektálási határ nagyon alacsony (nM), ezért a módszer alkalmas biológiai minták szulfidtartalmának a meghatározására. Kutatócsoportunk alátámasztotta, hogy a szulfid mennyiségi meghatározását zavarja a monobromobimán csúcsa, ha a szulfid $1 \cdot 10^{-6}$ M alatti koncentrációban van jelen,⁸⁴ bár az érzékenység javítható SDB etilacetáttal történő extrakciójával.^{95,96}

A szulfid különböző oxidálószerrel való reakcióiban képződő poliszulfidok mennyiségi meghatározására is használtuk ezt a módszert. Az analízis során ditiotreitollal (DTT) redukáltuk a reakcióelegyben képződött poliszulfidot, majd meghatároztuk a reakció előtti állapothoz képest megnövekedett szulfidkoncentrációt.

5.1.1.4 Szulfidion-szelektív elektród

A szulfidion-szelektív elektródot széles körben használják a biológiai rendszerek szulfidkoncentrációjának mérésére.^{14,97,98} A mért elektromotoros erő nemcsak a szulfidkoncentrációtól, hanem az oldat pH-jától is függ,⁹⁹ ezért nagyon fontos a mérések és a kalibráció alatt is a pH állandó értéken tartása.

A módszer fő hátrányának a redukáló lúgos közeg fenntartását tekintették, melyet az magyarázott, hogy az elektród által mért S^{2-} -ionok csak igen lúgos pH-nál fordulnak elő nagyobb koncentrációban.^{24,25} A lúgos közegre valójában nincs szükség, amit az is bizonyít, hogy az elektród lineáris választ adott 10^{-15} M szulfidkoncentrációig pH 7,00-nél.¹⁰⁰ A standard oldatok sorozatos hígítását követően nagyon alacsony szulfidkoncentrációkat nem tudunk megmérni, mert nyomnyi fémion-szennyeződés is fogyasztja a szulfidot a

reakcióedényben. Kelátképző és aszkorbinsav hozzáadása kismértékben csökkenti a szulfidvesztést, de a kalibráló görbe $1 \cdot 10^{-6}$ M alatti koncentrációnál már így is eltért a lineáristól.⁹⁹

A módszer előnye, hogy lehetővé teszi a szabad szulfid mérését, mivel nincs szükség a szulfidszármazék képzésére, valamint a gyors elektród válasz (akár kevesebb, mint 1 perc) lehetővé teszi a szulfidkoncentráció dinamikus követését. A módszer hátránya, hogy az elektród felszínén Ag_2S alakul ki, ezért szükséges az elektród rendszeres regenerálása és mindennapi kalibrálása is. Emellett a mérni kívánt oldatban lévő biomolekulák jelenléte zavarhatja a meghatározást, melynek legvalószínűbb oka, hogy kölcsönhatásba lépnek az $\text{Ag}^{2+}/\text{Ag}_2\text{S}$ rendszerrel.

Egy polarográfiás szulfid szenzort kifejlesztve lehetővé vált, hogy a szenzor membránja megvédje a katódot, az anódot és az elektrolitot az oldat alkotóelemeitől (pl.: tioszulfácion, homocisztein, glutation, *L*-cisztein).¹⁰¹ Ez a technika megőrizte a fent leírt előnyöket és lehetővé tette a biológiai minták szulfidkoncentrációjának mérését *in vivo*.^{24,25,96,101}

5.1.1.5 Gázkromatográfia

Kezdetben a szulfid gázkromatográfiás (GC) analízisét a származékképzésen alapuló bisz(pentafluorobenzil)szulfid mérésével végezték.¹⁰² A terméket szerves oldószerben extrahálva, a szerves fázist vizsgálták GC segítségével. Ezen technológiát használták a szulfid koncentrációjának vérben történő meghatározására az oldat lúgosítását követően.¹⁰³ A módszer továbbfejlesztésével lehetőség nyílt a fehérjékhez kötődő perszulfidcsoportok és poliszulfidok detektálására, miután a mintát redukálták, lúgosították és extrahálták hexánban,¹⁰⁴ valamint a szövetek szulfidtartalmának mérésére is.

A módszer hátránya a hosszú inkubálási idő, ami részben a gőztérben történő gázfejlődéshez,²⁵ továbbá a szolvatált és gázfázis közötti egyensúly beállításához szükséges. Mindezt nagymértékben befolyásolják a kísérleti körülmények, mint például: a hőmérséklet, a nyomás, a pH, a gázfázis kémiai összetétele, a szulfid fogyásaért és termelődésért felelős reakciók sajátosságai és egymáshoz viszonyított hatásuk, azon biomolekulák koncentrációja, amelyek

reverzibilisen vagy gyakorlatilag irreverzibilisen kötik a szulfidot és ezen reakciók egyensúlyi állandói folyadékfázisban, stb.

5.1.1.6 Fluorescens szonda

Az eddig említett módszerek többsége megköveteli a szulfid extrakcióját a sejtekből, szövetekből, így a mérések alatt a biológiai és kémiai körülmények megváltoznak. Ahhoz azonban, hogy megértsük a szulfid biológiáját elengedhetetlen olyan módszerek kifejlesztése, melyek lehetővé teszik az endogén szulfid koncentrációjának pontos meghatározását. Ennek okán nagy erővel dolgoznak érzékeny és specifikus fluorescens szondák előállításán. Ahhoz, hogy ez a módszer a legvalóságosabb képet fesse az endogén szulfidról a fluorescens szondákkal szemben támasztott főbb követelmények a következők: *i)* legyen specifikus, *ii)* legyen megfelelő érzékenységgű, *iii)* membránpermeábilis legyen, *iv)* biztosítson gyors válaszjelet, *v)* ne legyen fotoszenzitív, *vi)* adjon időben stabil fluorescens jelet, *vii)* más biológiai molekulákkal szemben legyen inert, *viii)* ne hasson a biológiai rendszerek működésére.

A módszerrel kapcsolatos fő kihívást az jelenti, hogy a szonda ne lépjen kölcsönhatásba más tiolcsoportokkal, például olyanokkal, mint a glutation- vagy a Cys-származékok, amelyek nagy mennyiségben fordulnak elő biológiai rendszerekben és nagyon hasonló tulajdonsággal rendelkeznek, mint a szulfid.⁵⁰

5.1.2 Kémiai magyarázat a szervezetben detektált eltérő szulfidkoncentrációkra

Biológiai mintákban nagyon eltérő szulfidkoncentrációkat detektálnak az 5.1.1 pontban leírt szulfidkoncentráció-meghatározására irányuló módszerekkel. Például viszonylag nagy szulfidkoncentrációt ($1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$ M) mértek vérben metilénkék módszerrel,⁹⁰ míg Kevil és mtsai sub- μ M-os koncentrációban mérték a szulfidkoncentrációt és μ M-os koncentrációban a perszulfidtartalmat.^{95,105} Wintner és mtsai állati vérben a szabad szulfid koncentrációját $3 \cdot 10^{-8} - 1,2 \cdot 10^{-6}$ M-os tartományon belül határozták meg és hasonló értékeket mértek humán vérben is monobromobimán módszerrel.⁹⁶

Megemlítendő, hogy a szervezetben a szabad szulfid koncentrációja nem haladhatja meg az $1 \cdot 10^{-6}$ M-os koncentrációt, mert ezen érték felett már érvényesülne toxikus hatása. Éppen ezért úgy véljük, hogy egyes biomolekulákhoz reverzibilisen kötött szulfid a detektálás közben való irreverzibilis megkötődésének hatására bekövetkező fogyása miatt felszabadul, vagyis a biomolekulákhoz kötve nagyobb mennyiségű mobilizálható szulfidtartalmú anyagok vannak biológiai rendszerekben. Ez a szulfidtartalom mintegy pufferként viselkedve fontos szerepet játszhat a szulfid biológiai hatásaiban. Ezért feltételezésünk szerint a szulfid detektálása során a fő problémát biológiai rendszerekben az okozza, hogy a szabad szulfid mellett biomolekulákhoz reverzibilisen kötődő szulfidmolekulák vannak, melyek a különböző detektálási módszerek alkalmazásával eltérő mértékben felszabadulhatnak.

A származékképzésen alapuló módszerek (pl.: a metilénkék módszer, monobromobimán módszer) estében a szabad szulfid mellett egyes szulfidtartalmú komplexben lazán kötődő szulfidot is mérik. Továbbá azon eljárások, melyek a szulfid csapadék formájában történő eltávolításán vagy elpárologtatásán alapulnak szintén a biomolekulákhoz kötött szulfidot is detektálják. Az alkalmazott kísérleti körülmények függvényében eltolják a kötött és a szabad szulfid egyensúlyát és emiatt túlbecsülik a szabad szulfidkoncentrációt. A metilénkék módszert például erősen savas körülmények között alkalmazzák és relatíve nagy szulfidkoncentrációkat mérnek biológiai mintákban amiatt, hogy a reverzibilisen kötött szulfidot savanyítással felszabadítják, illetve a savas környezetben a vas-kén klaszterek elbomlása is szulfid felszabadulással jár. A monobromobimán és a gázkromatográfiai módszerekkel a szulfidot már kisebb koncentrációban detektálják, mivel a mérések fiziológiai pH-n történnek, bár ezen technikákkal is felszabadíthatjuk a lazán kötődő szulfidmolekulát.

Emellett az eltérő kísérleti körülmények alkalmazása (pl.: pH, inkubálási idő stb.) akár ugyanazon mintánál is, okozhat eltérő eredményeket. Például a gázkromatográfiai módszer *headspace*-ében alkalmazott eltérő pH, hőmérséklet és nyomás körülmények megteremtésével a szulfid protonálódása és fázis transzlációs egyensúlya változik. Az ionszelektív elektródok nagy előnye, hogy specifikusan mérik a szabad szulfidkoncentrációt, mert csak a nem kötött szabad

szulfidot detektálják, és a korábbi vélekedéssel ellentétben nem igényelnek lúgos körülményeket.

A különböző szövetek szulfidkoncentrációját még nehezebb meghatározni, mint a fiziológus folyadékokét, mert a szövetekben különböző enzimek termelik és fogyasztják a szulfidot. Ahhoz azonban, hogy valós képet kapjunk a szulfid szervezetbeli szabad *steady-state* koncentrációjáról a vizsgálatokat *in vivo* kellene végezni nagyobb szöveti mélységben elkerülve a pH, a hőmérséklet stb. okozta, a szulfidkoncentráció mérését zavaró hatásokat.

5.1.3 A H₂S reagensként való alkalmazásához szükséges oldatkémiai tulajdonságainak tanulmányozása

Doktori munkám során a szulfid néhány biológiailag fontos redoxireakciójának tanulmányozásához elengedhetetlen volt a szulfid reagensként való alkalmazásához szükséges alapvető oldatkémiai tulajdonságainak megismerése. Az oldatban lévő H₂S illékony tulajdonsága, a szulfid nagy reaktivitása, és a szulfidoldatokban lévő nyomnyi mennyiségben előforduló szennyeződések jelenléte miatt szükség volt egy, a mérések reprodukálhatóságát biztosító, kísérleti protokoll kialakítására.

A kísérleti tapasztalatok alapján a szulfid törzsoldatok készítésénél lényeges szempont, hogy mely vegyszerből indulunk ki, hiszen a kereskedelemben forgalmazott eltérő gyártmányú, tisztaságú vegyszerekkel valóban eltérő eredményeket kaphatunk. A kutatási munka kezdetén a kereskedelemben forgalmazott szulfid tartalmú vegyszerek tisztaságát tanulmányoztuk, és szulfid-, poliszulfid-tartalmát hasonlítottuk össze (1. táblázat).

Az 1. táblázat a frissen felbontott szulfid sókból készített törzsoldatok DTNB⁹³ (1. táblázatban szulfidtartalom II) és metilénkék (1. táblázatban szulfidtartalom III) módszerek segítségével meghatározott szulfidtartalmát foglalja össze. E módszerek esetén kapott koncentrációértékek jó egyezést mutattak. Emellett a törzsoldatok szulfidkoncentrációját 230 nm-nél a HS⁻ elnyeléséből is számoltuk (1. táblázatban szulfidtartalom I). Ezen módszer esetén a törzsoldatot $5,0 \times 10^{-5}$ M-ra hígítottuk. Amint az látható, a 230 nm-nél mért szulfidtartalom általában nagyobb a másik két módszerrel meghatározott

értékeknél. A szulfid közvetlen fotometriás módszerrel történő koncentrációmeghatározása során kapott mérési eredmények értelmezésénél figyelembe kell vennünk, hogy a szulfid oxidációs termékeinek elnyelése is hozzájárul a mért abszorbanciához. Ugyanakkor néhány vegyszer esetében a szulfid már részleges bomlást szenvedett, aminek a következtében az analízisre használt oldatok pH-ja 8,00 alá csökkenhet a vízzel való hígítási lépés után. A pH csökkenésével a HS^- részben protonálódik és a kisebb moláris abszorbanciájú H_2S -né alakul. Ezen spektrális hatások együttes eredményeként a közvetlen mérés eredményei lényeges eltérést mutathatnak a DTNB vagy a metilénkék módszerek segítségével kapott értékektől.

1. táblázat. Néhány kereskedelemben forgalmazott vegyszer szulfid- és poliszulfid-tartalmának összehasonlítása.^a

Vegyszer	Tisztaság	Poliszulfid-tartalom 290 nm-nél	Szulfidtartalom I 230 nm-nél	Szulfidtartalom II 412 nm-nél	Szulfidtartalom III 667 nm-nél
$\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ <i>Sigma-Aldrich</i>	ACS reagens $\geq 98,0\%$	$(138 \pm 33) \mu\text{M}$	$(156 \pm 56) \text{mM}$	$(112 \pm 8) \text{mM}$	$(117 \pm 23) \text{mM}$
$\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ <i>Sigma-Aldrich</i>	$\geq 99,99\%$	$(332 \pm 26) \mu\text{M}$	$(138 \pm 33) \text{mM}$	$(117 \pm 5) \text{mM}$	$(110 \pm 16) \text{mM}$
Na_2S <i>Sigma-Aldrich</i>	97 – 103 %	$(154 \pm 18) \mu\text{M}$	$(139 \pm 24) \text{mM}$	$(117 \pm 11) \text{mM}$	$(114 \pm 11) \text{mM}$
Na_2S <i>Alfa Aesar</i>	96,12 %	$(403 \pm 118) \mu\text{M}$	$(126 \pm 38) \text{mM}$	$(112 \pm 14) \text{mM}$	$(94 \pm 8) \text{mM}$
$\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ <i>Sigma-Aldrich</i>	$\geq 98\%$	$(103 \pm 10) \mu\text{M}$	$(169 \pm 55) \text{mM}$	$(125 \pm 15) \text{mM}$	$(120 \pm 12) \text{mM}$
$\text{NaHS}\cdot \text{XH}_2\text{O}$ <i>Sigma-Aldrich</i>	$\geq 60\%$	$(952 \pm 51) \mu\text{M}$	$(82 \pm 11) \text{mM}$	$(105 \pm 20) \text{mM}$	$(97 \pm 14) \text{mM}$
$\text{Na}_2\text{S}\cdot \text{XH}_2\text{O}$ <i>Sigma-Aldrich</i>	$\geq 60\%$	$(593 \pm 28) \mu\text{M}$	$(90 \pm 25) \text{mM}$	$(79 \pm 7) \text{mM}$	$(72 \pm 8) \text{mM}$
$\text{Na}_2\text{S}\cdot \text{XH}_2\text{O}$ <i>Sigma-Aldrich</i>	59 – 65 %	$(537 \pm 31) \mu\text{M}$	$(71 \pm 11) \text{mM}$	$(77 \pm 8) \text{mM}$	$(75 \pm 7) \text{mM}$

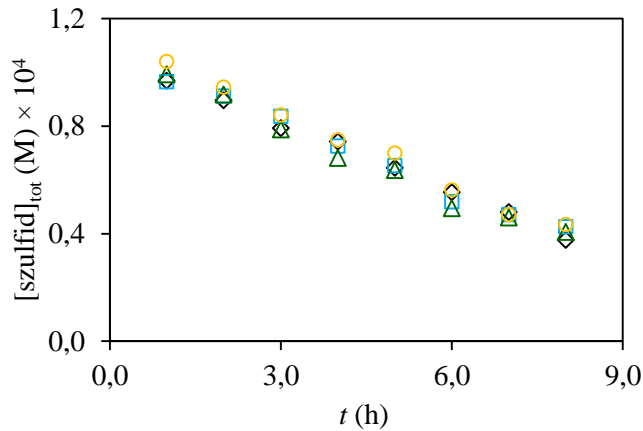
a: Kísérleti körülmények: 0,150 M szulfid törzsoldatot készítettünk tömegméréssel kétszeresen desztillált vízben. Az oldatokat jégen és sötétben tároltuk. Az oldatok poliszulfid-tartalmát a vizes oldatok elnyeléséből határoztuk meg 290 nm-nél, $\varepsilon = 811 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.²¹ A szulfidkoncentráció meghatározásához a törzsoldatokat $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ -ra hígítottuk kétszeresen desztillált vízzel (szulfidtartalom I) vagy 0,10 M foszfátpufferrel (szulfidtartalom II és III). A közvetlen fotometriás mérés (szulfidtartalom I) esetében a 230 nm-nél mért abszorbanciából számoltuk a koncentrációt, $\varepsilon_{230\text{nm}} = 7700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A

DTNB módszer (szulfidtartalom II) esetében a 412 nm-nél mért abszorbanciát használtuk, $\epsilon_{412\text{nm}} = 14100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.⁹³ A metilénkék módszer (szulfidtartalom III) esetében 667 nm-nél mértük az abszorbanciát, saját kísérleteink alapján meghatározott $\epsilon_{667\text{nm}} = 30200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ felhasználásával pH 0,45-nál.

A vizsgált vegyszerek mindegyikében poliszulfid-tartalmat is mértünk (1. táblázat). A vegyszerek felbontását követően a kristályokat azonnal desztillált vízben oldottuk fel. Némely kristály esetén sárga színű levegő általi oxidáció okozta szennyeződések figyeltünk meg, még felbontás előtt. Ugyanakkor megállapítottuk, hogy a kristályok felszínének többszöri lemosásával a főként poliszulfid- és más kénoxid-tartalmú szennyeződések nagymértékben eltávolíthatók.

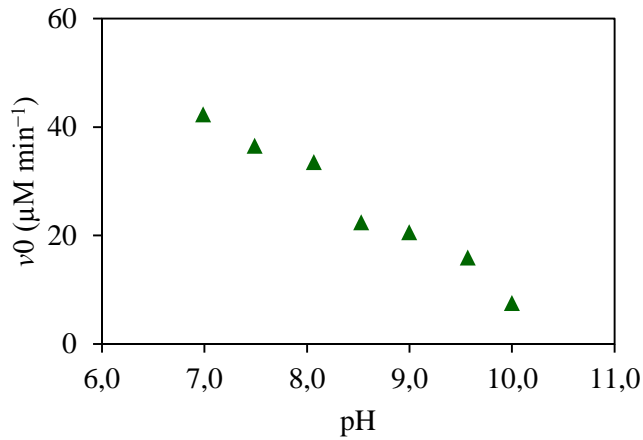
A poliszulfidok a tiszta szulfid törzsoldatokban is képződnek az O_2 általi fémionok-katalizálta oxidáció révén. A legtöbb fémion a pufferekből származik, ezért a puffer sajátságai és koncentrációja is befolyásolja a szulfid törzsoldatok O_2 általi oxidációjának sebességét, mértékét. Megfigyeltük, hogy a TRIS jobb puffer, mint a PBS, mert kisebb fémszennyező-tartalma miatt kevésbé gyorsan bomlik benne a szulfid.⁸⁴ Mivel az oldatokban a szulfid oxidációját szinte lehetetlen elkerülni, ezért is szükséges biológiai minták vizsgálatakor a nagyfokú elővigyázatosság, hogy az adott esetben valóban a szulfid és ne a szulfid oxidációs termékeinek hatásait mérjük. (Ahogy már erre kutatócsoportunk korábban is rámutatott, a szulfid munkaoldatban lévő nyomnyi poliszulfid-szennyeződés elegendő volt ahhoz, hogy biológiai folyamatokat indukáljon.¹⁷)

Bár az átmenetifémion-katalizált szulfidoxidáció növelheti a nyomnyi mennyiségben jelenlévő poliszulfid-tartalmat és más kén-oxid-származékok koncentrációját, korábban közölt eredményekkel⁹⁰ ellentétben azt állapítottuk meg, hogy az oldathoz adott dietilén-triamin-pentaecetsav (DTPA) csak kevésbé akadályozza a szulfidvesztést pH 7,40-nál PBS-ben (5. ábra). Hughes és mtsai szerint a DTPA-nak nyomnyi mennyiségben jelenlévő fémszennyeződések kelátként történő megkötésével drasztikusan csökkentenie kellene a szulfidbomlás sebességét. Ennek ellenére az oldat argonnal való telítése és fénytől való elzárása sem járul jelentősen a szulfidvesztés megakadályozásához (5. ábra).



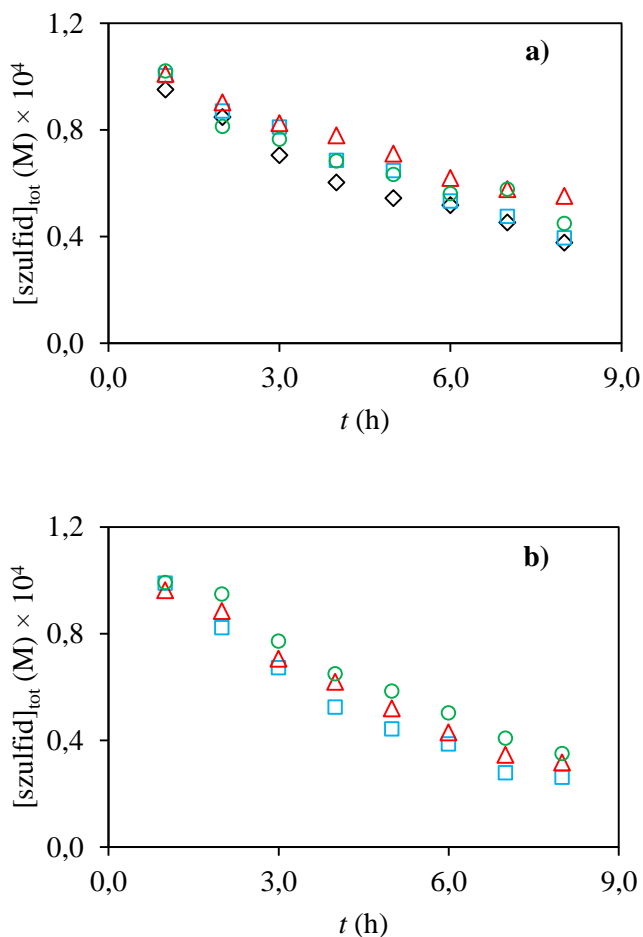
5. ábra. A PBS-ben lévő nátrium-szulfid törzsoldat stabilitása különböző kísérleti körülmények mellett. \diamond : laboratóriumi fénynél, \square : sötétben, Δ : sötétben, $[DTPA] = 1,0 \cdot 10^{-4}$ M, \circ : sötétben, $[DTPA] = 1,0 \cdot 10^{-4}$ M, argonozva. $[\text{szulfid}]_{\text{tot}} = 1,0 \cdot 10^{-4}$ M, $1,0 \cdot 10^{-2}$ M PBS, $\text{pH} = 7,40$, $T = 25$ °C. (A metilénkék módszerrel meghatározott szulfidkoncentrációkat hétszeres hígítással kapott kalibrációból számítottuk $\text{pH} 7,40$ -nél $1,0 \cdot 10^{-2}$ M PBS-ben.)

Az oxidációs folyamatokra fókuszálva korábban feltételezték, hogy a szulfidoxidáció gyorsabb nagyobb pH-nál, mert a HS^- nukleofilabb, mint a H_2S . Ennek ellenére saját vizsgálataink során azt találtuk, hogy a puffertelt oldatok szulfidtartalma gyorsabban csökkent savas tartományban (6. ábra). Az említett megfigyelés DeLeon és mtsai eredményeivel összhangban azt támasztja alá,¹⁰⁶ hogy fiziológiás pH-nál a relatíve gyors szulfidvesztés főként a H_2S párolgásának tulajdonítható és nem az oxidációnak.



6. ábra. A szulfidvesztés kezdeti sebességének pH-függése. $[\text{szulfid}]_{\text{tot}} = 3,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ M PBS}$, $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ M TRIS-puffer}$, sötétben, $[\text{DTPA}] = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. (A metilénkék módszerrel meghatározott szulfidkoncentrációkat hétszeres hígítással kapott kalibrációból számítottuk pH 7,40-nál $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ M PBS}$ -ben. A kísérleti adatok három független mérés egyikét reprezentálják, melyek azonos tendenciát mutattak.)

Tanulmányoztuk az oldat hőmérsékletének hatását a szulfidvesztés mértékére. A törzsoldat szulfidkoncentráció-vesztését $4,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ -on hűtőben, jégen való tárolás mellett TRIS-pufferben (7. a) ábra) és PBS-ben (7. b) ábra) metilénkék módszerrel vizsgáltuk. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a hőmérséklet csökkentésével nem kerülhető el a főként H_2S párolgásának köszönhető szulfidvesztés.

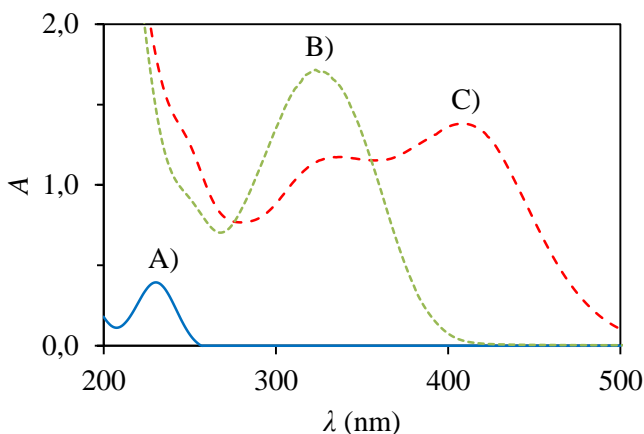


7. ábra. A Na_2S törzsoldat szulfidvesztésének vizsgálata különböző kísérleti körülmények mellett **a)** $1,0 \cdot 10^{-2}$ M TRIS-pufferben és **b)** $1,0 \cdot 10^{-2}$ M PBS-ben metilénkék módszerrel. ◇: laboratóriumi fénynél, $T = 25$ °C, □: sötétben, $T = 25$ °C, △: sötétben és jégen, $T = 4$ °C, ○: sötétben, jégen, $[\text{DTPA}] = 1,0 \cdot 10^{-4}$ M, $T = 4$ °C. $[\text{szulfid}]_{\text{tot}} = 1,0 \cdot 10^{-4}$ M. (A metilénkék módszerrel meghatározott szulfidkoncentrációkat hétszeres hígítással kapott kalibrációból számítottuk pH 7,40-nál $1,0 \cdot 10^{-2}$ M PBS-ben.)

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a legstabilabb és a legtisztább vegyszer a *Sigma-Aldrich* által gyártott $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, melynek tisztasága $> 98\%$ és ACS reagens. (Ezen okból a későbbi kísérleteink során kizárólag ezt a vegyszert használtuk.)

Az analitikai eredményekkel összhangban kidolgoztunk egy eljárást a lehető legtisztább szulfid törzsoldat készítéséhez. A Na₂S kristályokat a törzsoldatok készítése előtt legalább háromszor háromszorosan ionmentesített vízzel lemostuk, majd argongáz átbuborékolatása mellett háromszorosan ionmentesített vízben oldottuk a kristályokat. Az így kapott lúgos kémhatású oldat párolgása lassabb volt (a nagy pH-nak köszönhetően) és az oldatban az oxidáció mértéke is csökkent (mivel az O₂ mennyiségét csökkentettük az oldat argonnal való telítésével).

A szulfid törzsoldatok koncentrációját két független módszerrel határoztuk meg: 1) közvetlenül spektrofotometriásan, a 230 nm-nél mért abszorbancia alapján határoztuk meg ($\epsilon_{230\text{nm}} = 7700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) úgy, hogy az oldat pH-ja mindig nagyobb volt 9-nél (8. ábra), 2) a szulfidkoncentrációt DTNB módszerrel az irodalomban leírt módon is ellenőriztük a TNB elnyelését mérve ($\epsilon_{412\text{nm}} = 14100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (8. ábra).⁹³ A szulfid törzsoldatok koncentrációját azért célszerű e két módszerrel egyidejűleg meghatározni, mert a két módszerrel kapott eredmények közötti különbségből az oldatban lévő szennyeződések mértékére lehet következtetni. Munkánk során a két módszerrel kapott koncentrációk átlagát tekintettük a szulfid törzsoldat koncentrációjának, amennyiben a két érték között kevesebb, mint 5% eltérés volt. Nagyobb hiba esetén új törzsoldatokat készítettünk.



8. ábra. A szulfidoldat koncentrációjának meghatározása 25 °C-on. A): HS⁻ spektruma, vizes közeg, $\epsilon_{230\text{nm}} = 7700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $A_{230\text{nm}} = 0,3937$, pH > 9; B): DTNB spektruma, 0,10

M foszfátpuffer, $\epsilon_{324\text{nm}} = 17780 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $A_{324\text{nm}} = 1,7436$, pH = 7,40; C): TNB spektruma, 0,10 M foszfátpuffer, $\epsilon_{412\text{nm}} = 14100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $A_{412\text{nm}} = 1,3965$, pH = 7,40.

A kísérleti adatokkal összhangban a törzsoldatot jégen, fénytől elzárva kell tárolni. Ez utóbbira azért van szükség, mert a szulfid fotokémiai reakcióban is részt vesz. Ezen túlmenően a munkaadatokat a felhasználás előtt DTPA-t tartalmazó pufferrel kell hígítani a nyomnyi mennyiségben jelenlévő fémion-szennyezések csökkentése érdekében.

5.2 A diszulfidok redukciója hidrogén-szulfiddal: kinetika és mechanizmus

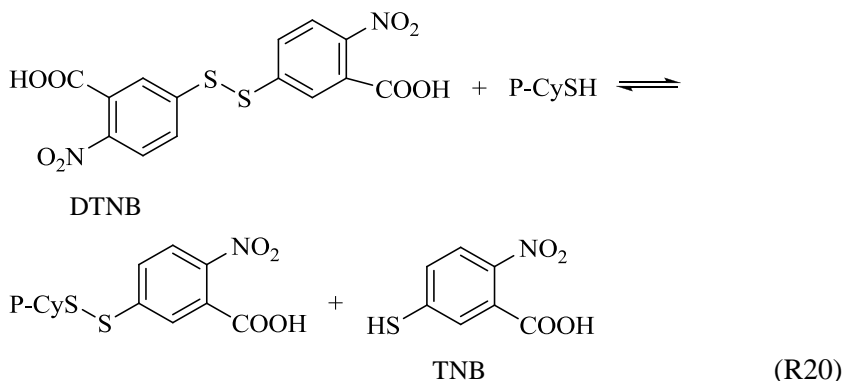
Ahogy azt a bevezetőben tárgyaltuk a kén-hidrogén biológiai funkcióiban kulcsszerep jut Cys-tiolok perszulfiddá való alakulásának. A perszulfidok képződésének egyik kézenfekvő módja a diszulfid hidak szulfiddal való szubsztitúciós reakciója. Ennek ellenére kinetikai és termodinamikai megfontolások alapján ezen útvonal lehetőségét gyakran megkérdőjelezték.^{55,59-62} Ugyanakkor a reakció mechanizmusának átfogó vizsgálatára eddig nem került sor. Ez motiválta a diszulfidok szulfiddal történő redukciójára vonatkozó kutatásainkat.

5.2.1 A DTNB szulfiddal való reakciója

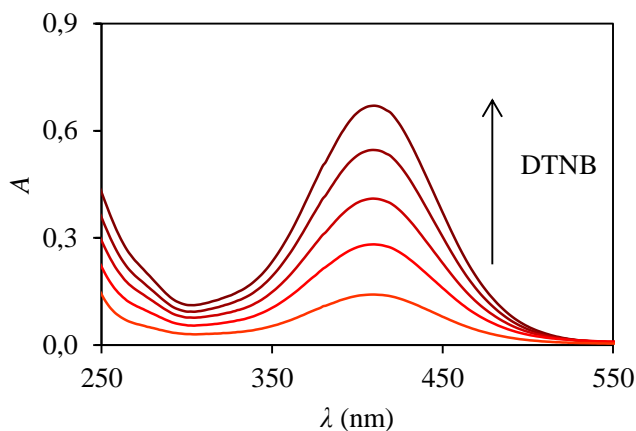
5.2.1.1 A DTNB és a szulfid közötti reakció sztöchiometriája és termékei

A diszulfid kötés a szulfid – mint legkisebb tiolmolekula – általi redukciójának tanulmányozására először modell diszulfidként az 5.1 fejezetben is használt aromás diszulfidot, a DTNB-t választottuk, aminek 320 nm-nél jelentős fényelnyelése van, és emiatt gyakran használják a redukált tiol-/szulfhidrilcsoportok koncentrációjának kvantitatív fotometriás meghatározására biológiai rendszerekben.⁹²

A tiolok kvantitatív meghatározása a DTNB szabad ciszteineken történő tiol – diszulfid cserereakción alapul,⁴⁹ amiben egy jelentős abszorbanciájú egy mól ekvivalens TNB keletkezik ($\epsilon_{412} = 14100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (20. reakció).



Hasonlóan a Cys-tiolokhoz a DTNB és a H₂S közötti reakcióban is TNB képződése detektálható a 412 nm-nél jelentkező karakterisztikus fényelnyelés alapján, aminek változását spektrofotometriásan követtük a szulfid DTNB-vel való titrálása során (9. ábra).



9. ábra. Spektrális változások a szulfid DTNB-vel történő titrálása során. $[\text{szulfid}]_{\text{tot}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{DTNB}] = 5,0 \cdot 10^{-6}, 1,0 \cdot 10^{-5}, 1,5 \cdot 10^{-5}, 2,0 \cdot 10^{-5}, 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $0,10 \text{ M}$ foszfátpuffer, $I = 1,00 \text{ M}$, $\text{pH} = 7,40$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Ezt a reakciót Nashef és mtsai is tanulmányozták, és megállapították, hogy vizes közegben a szulfid mennyiségi meghatározására is használható.⁹³ Emellett azt találták, hogy DTNB-felesleg mellett két mól ekvivalens TNB képződik, szemben a Cys-tioloknál leirtakkal. Megfigyelték, hogy kén is képződik, amit szerves extrakcióval azonosítottak. Saját vizsgálataink során kénkiválást nem észleltünk, ezért véleményünk szerint a szerves poliszulfid lehet a forrása a képződő szulfán-kénnek a szulfid által történő DTNB redukációjában.

A reakció sztöchiometriáját széles koncentráció-tartományban vizsgáltuk különböző szulfid:DTNB arányoknál. A DTNB- és szulfidoldatokat egyszerű *stopped-flow* készülékkel kevertük össze a relatív gyors reakciókra való tekintettel a turbulens keverési körülmények megteremtése végett. A reakcióelegyből termékként képződő TNB elnyeléséből számolt koncentrációt a deficitben lévő kiindulási anyag koncentrációjával összehasonlítva eredményként kaptuk a sztöchiometrikus arányokat. Abban az esetben, amikor a

szulfidot alkalmaztuk feleslegben, koncentrációjától függetlenül a sztöchiometria mindig 1:2 arányú volt, azaz 2 TNB-molekula képződött egy mól DTNB-ből (2. a) táblázat), ami arra utalt, hogy a diszulfid teljes mennyisége 5-tio-(2-nitrobenzoesav)-tiol (TNB-SH, TNB-tiol) formává redukálható szulfiddal. Ellenben, ha a DTNB nagy, legalább százszoros feleslegben volt jelen, akkor egy szulfidmolekulából már csak egy TNB-molekula képződött (2. b) táblázat), ami azzal értelmezhető, hogy a reakcióban köztitermék képződik. A DTNB koncentrációjának csökkentésével a DTNB-t feleslegben tartva a sztöchiometria 1:2 arányhoz tartott. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a reakciót egy többlépcsős, egyensúlyi lépéseket tartalmazó mechanizmus írja le, amiben feltehetően az első reakciólépésben képződő 5-tio-(2-nitrobenzoesav)-perszulfid (TNB-SSH vagy TNB-perszulfid) tovább redukálódik szulfiddal TNB-vé.

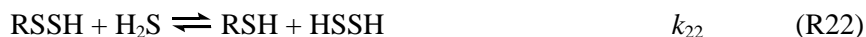
2. táblázat. A DTNB – szulfid reakció sztöchiometriája különböző reaktánskoncentrációnál **a)** szulfid- vagy **b)** DTNB-felesleg mellett.^a

a)	[DTNB] (μM)	[szulfid] _{tot} (μM)	generált TNB/DTNB
	5	50	2,05 \pm 0,22
	5	150	2,03 \pm 0,05
	5	250	1,99 \pm 0,08
	5	375	1,97 \pm 0,04
	5	500	1,98 \pm 0,03

b)	[DTNB] (μM)	[szulfid] _{tot} (μM)	generált TNB/szulfid
	50	5	1,42 \pm 0,12
	150	5	1,32 \pm 0,04
	250	5	1,21 \pm 0,05
	375	5	1,19 \pm 0,02
	500	5	1,09 \pm 0,12

a): 0,10 M foszfátpuffer, $I = 1,00$ M, $\text{pH} = 7,40$, $T = 25$ °C.

A sztöchiometriai eredmények értelmezésére a következő általános reakció kaszkádot javasoltuk:



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 21. reakció alapján az első lépésként egy egyszerű tiol – diszulfid cserereakció zajlik le, termékként egy mól ekvivalens TNB és egy TNB-SSH képződik. A TNB-SSH egy következő lépésben reagál egy másik szulfidmolekulával még egy TNB-molekulát és a szerves perszulfidok prekurzoraként egy diszulfidot (HSSH) eredményezve (22. reakció). A HSSH további reakciókban diszproporcionálódhat (23. reakció) vagy egy másik TNB-perszulfiddal reagálhat (24. reakció) poliszulfidok képződése mellett. Meg kell jegyezni, hogy ezen reakciók természetesen nagymértékben függenek az alkalmazott kísérleti körülményektől és a reaktánsok koncentrációjától.

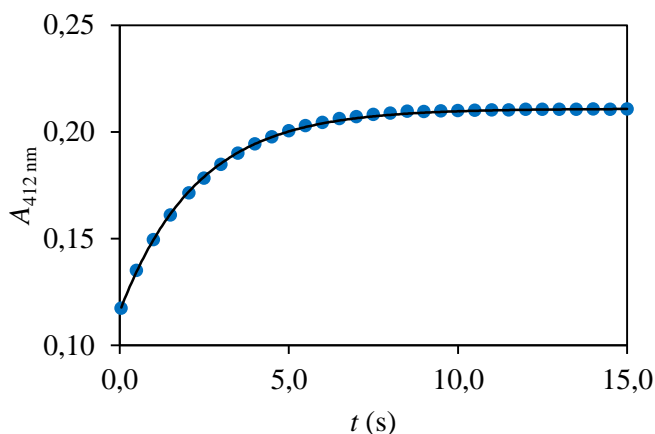
Az 21.–24. reakciók egyensúlyi állandója nagy, mivel még kis szulfidfelesleg esetén is az összes DTNB elfogy, és két mól ekvivalens TNB képződik (2. a) táblázat). Kinetikai mérések (lásd lentebb) is alátámasztották, hogy ezeknek a reakcióknak az egyensúlya eltolódik a felső nyilak irányba, azaz gyakorlatilag irreverzibilisek.

5.2.1.2 A DTNB és a szulfid közötti reakció kinetikája

A DTNB – szulfid reakció mechanizmusának mélyebb megértése érdekében átfogó kinetikai vizsgálatokat végeztünk a reaktánsok különböző koncentráció arányainál.

5.2.1.2.1 DTNB-felesleg

DTNB-felesleg mellett pseudo-elsőrendű körülményeket megteremtve vizsgáltuk a kinetikai görbék időbeli lefutását a képződő TNB elnyelési maximumán, 412 nm-en. Amint azt a 10. ábra mutatja, százszoros DTNB-felesleg mellett, amikor egy szulfidból egy TNB képződik (2. b) táblázat), a detektált kinetikai görbe jól illeszthető egy exponenciális tagból álló egyenlettel, vagyis a sebességi egyenlet a szulfidra nézve elsőrendű.

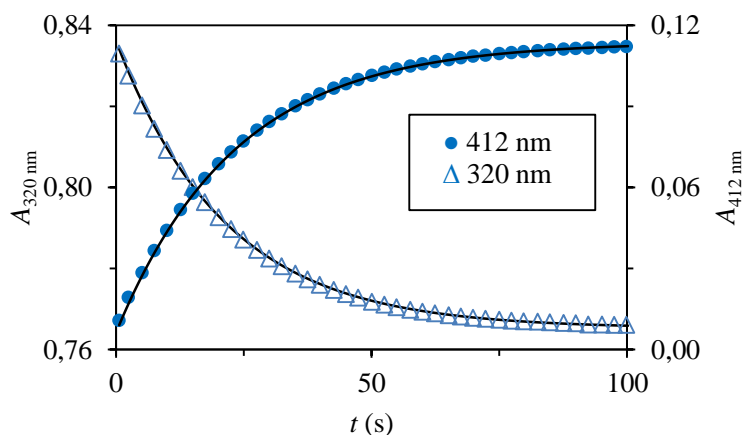


10. ábra. Jellemző *stopped-flow* kinetikai görbe (●) exponenciális egyenlettel illesztve (—). $[\text{DTNB}] = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{szulfid}]_{\text{tot}} = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $0,10 \text{ M}$ foszfátpuffer, $I = 1,00 \text{ M}$, $\text{pH} = 7,40$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. ($k_{\text{obs}} = 0,43 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$)

Feltételezzük, hogy a detektált reakció a modellnek megfelelően a DTNB szulfid általi bimolekuláris redukciója (21. reakció). A sztöchiometriai adatokat figyelembe véve (2. táblázat) azt mondhatjuk, hogy legalább százszoros DTNB-felesleg alkalmazása biztosítja azt, hogy a 21. reakció meghatározó legyen a 22. reakcióval szemben az alkalmazott kísérleti körülmények mellett.

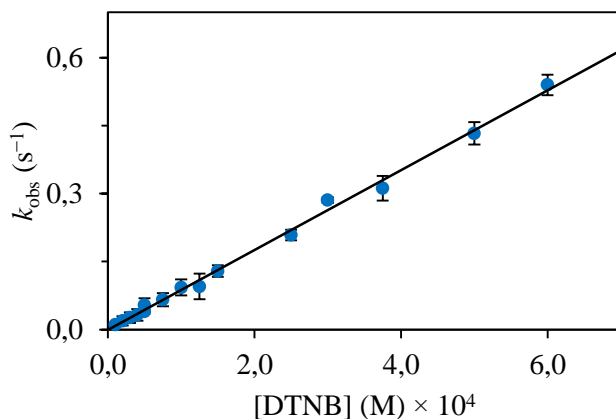
Abban az esetben, amikor a szulfidból több mint egy TNB képződik, azaz kisebb DTNB-koncentrációknál, a 412 nm-nél rögzített kinetikai görbék továbbra is megőrzik exponenciális karakterüket. A DTNB elnyelési maximumán, 320 nm-nél követve a reakciót szintén elsőrendű viselkedést tapasztaltunk, az ezekből a görbékéből számolt pseudo-elsőrendű sebességi állandók (k_{obs}) azonosak voltak a 412 nm-en kapott értékekkel az összes

koncentráció arány esetén (11. ábra). Ez alapján megállapítható, hogy a két hullámhosszon ugyanazt a folyamatot követjük. Másfelől az a következtetés vonható le, hogy a folyamat sebességmeghatározó lépése a 2:1 sztöchiometriai aránynál a 21. reakció. A sztöchiometriát a reaktánskoncentráció függvényében ennek, és az ezt követő lépéseknek az egymáshoz viszonyított sebessége (kinetikai súlya) határozza meg. Más szóval százszoros DTNB-koncentrációra van szükség ahhoz, hogy a 21. reakció gyorsabb legyen a 22. reakciónál.



11. ábra. Reprezentatív kinetikai görbék 320 nm-nél (Δ) és 412 nm-nél (\bullet). A folytonos vonalak az elsődrendű illesztéssel kapott eredményeket mutatják. $[\text{DTNB}] = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{szulfid}]_{\text{tot}} = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, 0,10 M foszfátpuffer, $I = 1,00 \text{ M}$, $\text{pH} = 7,40$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. ($k_{\text{obs}}^{320\text{nm}} = (4,68 \pm 0,01) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ és $k_{\text{obs}}^{412\text{nm}} = (4,27 \pm 0,01) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. (1 mól szulfidból $1,42 \pm 0,12$ mól TNB képződik.)

DTNB-felesleg alkalmazása esetén azt állapítottuk meg, hogy a k_{obs} lineáris függést mutat a DTNB-koncentrációtól, így a reakció a DTNB-re nézve is elsőrendű (12. ábra). Az adatpontokra történő lineáris illesztésből kapott meredekség, azaz a látszólagos másodrendű sebességi állandó értéke a 2:1 reakció aránynál 21. reakció esetén $k_{21}^{\text{DTNB-felesleg}} = (8,8 \pm 0,2) \times 10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pH 7,40-on.

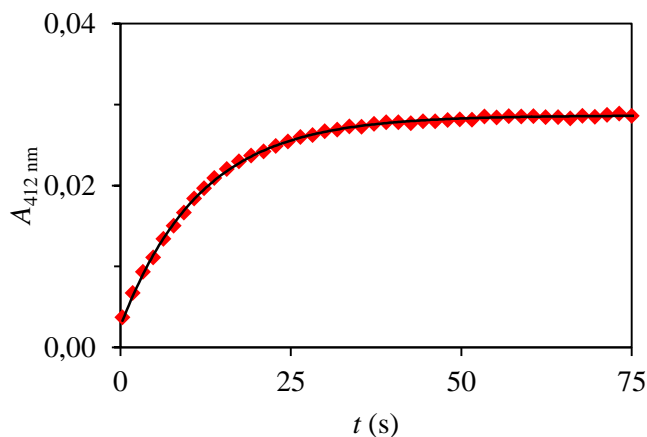


12. ábra. A k_{obs} -függése a DTNB-koncentrációtól, DTNB-felesleg mellett. ●: mért adatsorok, —: illesztett egyenes. 0,10 M foszfátpuffer, $I = 1,00$ M, $\text{pH} = 7,40$, $T = 25$ °C, $\lambda = 412$ nm.

A kapott kinetikai eredmények tehát azt támasztják alá, hogy a szulfid az RSSH-val gyorsabban reagál, mint az RSSR-rel. A 12. ábrán látható egyenes 0-ba menő tengelymetszete pedig arra utal, hogy az egyensúly a 21. reakcióban gyakorlatilag irreverzibilis.

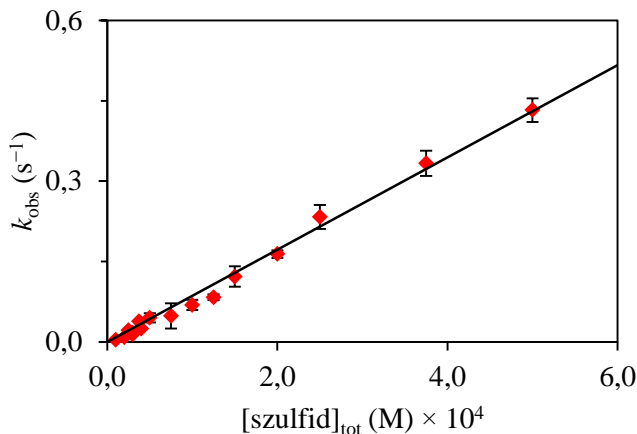
5.2.1.2.2 Szulfidfelesleg

Annak ellenére, hogy szulfidfelesleg mellett egy többlépéses folyamatban egy DTNB-molekulából két mól ekvivalens TNB képződik (2. a táblázat), a detektált kinetikai görbék jól illeszthetők voltak egy exponenciális tagból álló egyenlettel az összes koncentrációnál (13. ábra).



13. ábra. Tipikus kinetikai görbe szulfidfelesleg mellett. \blacklozenge : kísérleti adatok, —: illesztett görbe. $[\text{szulfid}]_{\text{tot}} = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{DTNB}] = 1,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $0,10 \text{ M}$ foszfátpuffer, $I = 1,00 \text{ M}$, $\text{pH} = 7,40$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. ($k_{\text{obs}} = (8,11 \pm 0,06) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$)

Szulfidfelesleg alkalmazása esetén is a 412 nm-en (TNB-képződés hullámhosszán) és 320 nm-en (DTNB-fogyás hullámhosszán) mért kinetikai görbékből számolt pszeudo-elsőrendű sebességi állandók megegyeztek és lineáris szulfidkoncentráció-függést mutattak (14. ábra). Szulfidfeleslegnél az illesztésből kapott látszólagos másodrendű sebességi állandó, $k_{21}^{\text{szulfidfelesleg}} = (8,9 \pm 0,2) \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ nagyon jó egyezésben van a DTNB-feleslegnél meghatározott értékkel ($k_{21}^{\text{DTNB-felesleg}} = (8,1 \pm 0,2) \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), ezért a detektált reakciót ugyanannak a reakciónak (21. reakció) feleltettük meg DTNB- és szulfidfelesleg mellett; így a 21. reakció látszólagos másodrendű sebességi állandóját a DTNB- és szulfidfelesleg mellett kapott látszólagos másodrendű sebességi állandók átlagából számoltuk, ami $k_{21} = (8,9 \pm 0,1) \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $\text{pH} = 7,40$ -on.



14. ábra. Szulfidfelesleg mellett a k_{obs} -függése a szulfidkoncentrációtól. \blacklozenge : kísérleti adatok, —: illesztett egyenes. 0,10 M foszfátpuffer, $I = 1,00$ M, $\text{pH} = 7,40$, $T = 25$ °C, $\lambda = 412$ nm.

Ezek a megfigyelések alátámasztják a javasolt modell (21.–24. reakciók) érvényességét, azzal a módosítással, hogy a 21. reakció irreverzibilis (mint igazoltuk (12. ábra és 14. ábra)). A modellben a 22. reakció sebességi állandója a kinetikai mérések értelmében több, mint tízezerszer nagyobb kell legyen, mint a 21. reakcióé az alkalmazott kísérleti körülmények mellett.

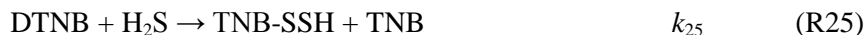
Meg kell jegyezni, hogy lényegesen hosszabb reakcióidőknél egy további nagyon lassú és kismértékű abszorbanciaváltozást detektáltunk mind szulfidfelesleg, mind pedig DTNB feleslege mellett. Szulfidfelesleg mellett a változás jelentősebb volt, illetve százszoros DTNB-felesleg esetén már nem volt detektálható egy ilyen folyamat. Feltételezéseink szerint ez az abszorbanciaváltozás a lassabban reagáló poliszulfidok diszproporciójának felel meg, ami csak a DTNB és TNB-SSH teljes fogyását követően játszódik le. Ezt a magyarázatot támasztja alá az is, hogy ennek a folyamatnak a sebessége független a szulfidkoncentrációtól. Ezt a reakciót nem vizsgáltuk részletesen.

5.2.1.3 A DTNB és a szulfid közötti reakció kinetikai szimulációja

A kísérleti kinetikai görbéket a javasolt mechanizmus alapján modelleztük (21.–24. reakciók).³⁴ A mért látszólagos másodrendű sebességi állandók átlagát használtuk a kinetikai szimulációknál, ami $k_{21} = (8,9 \pm 0,1) \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

A szimulációhoz használt egyes lépéseket irreverzibilisnek tekintettük, és feltételeztük, hogy a szervesetlen poliszulfidok a köztitermék HSSH és TNB-SSH reakciójában képződnek, így egy háromlépéses modellt felállítva (25.–27. reakciók) szimuláltuk a kinetikai görbéket és koncentrációeloszlásokat. A szimulációkat csak pH 7,40-on végeztük el, így a pH-függést figyelmen kívül hagyhattuk.

Tehát a reaktánsok, a köztitermékek és a termékek reprezentatív szimulált eloszlásához a korábban általánosan felírt modell egy egyszerűsített háromlépéses változatát használtuk fel.



A szimuláció során alkalmazott sebességi egyenletek:

$$\frac{d[A]}{dt} = -k[A][B] \quad (\text{R28})$$

$$\frac{d[B]}{dt} = -k[A][B] - rk[B][C] \quad (\text{R29})$$

$$\frac{d[C]}{dt} = k[A][B] - rk[B][C] - sk[C][E] \quad (\text{R30})$$

$$\frac{d[D]}{dt} = k[A][B] + rk[B][C] + sk[C][E] \quad (\text{R31})$$

$$\frac{d[E]}{dt} = rk[B][C] - sk[C][E] \quad (\text{R32})$$

$$\frac{d[F]}{dt} = sk[C][E] \quad (\text{R33})$$

ahol: $k = k_{25}$ (k_{25} valójában az általános modellben leírt k_{21} -értékkel azonos. $k_{21} = (8,9 \pm 0,1) \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pH = 7,40-on)

$$r = k_{26}/k_{25} \text{ (ahol a } k_{26} = k_{22} \text{ és } k_{25} = k_{21})$$

$$s = k_{27}/k_{25} \text{ (ahol a } k_{27} = k_{24} \text{ és } k_{25} = k_{21})$$

A = DTNB

B = H₂S

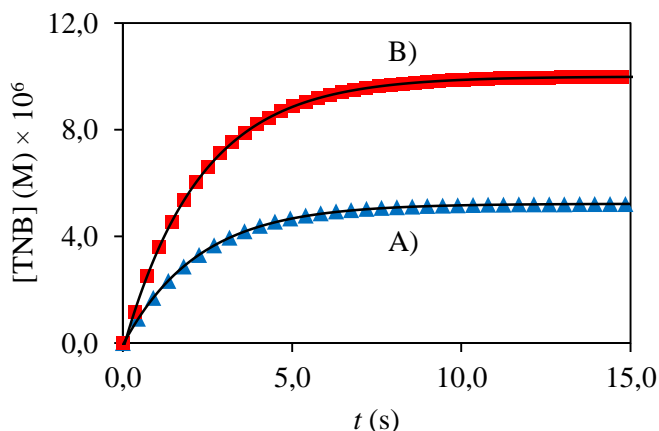
C = TNB-SSH

D = HSSH

F = HS_nH

(függő változók = A, B, C, D, E, F)

A szimulált kinetikai görbék hasonló pszeudo-elsőrendű sebességi állandó értékeket adtak, mint a tapasztalati görbék (15. ábrán két, jelentősen eltérő koncentráció-viszonyok mellett felvett kinetikai görbét ábrázoltunk). A szimuláció során kapott eredmények összhangban vannak a különböző sztöchiometria mellett kapott kísérleti eredményekkel, és a görbék exponenciális jellege is megmaradt annak ellenére, hogy a szimulációban figyelembe vettük, hogy a TNB képződéséhez hozzájárulnak a 22. és 24. reakciók is.

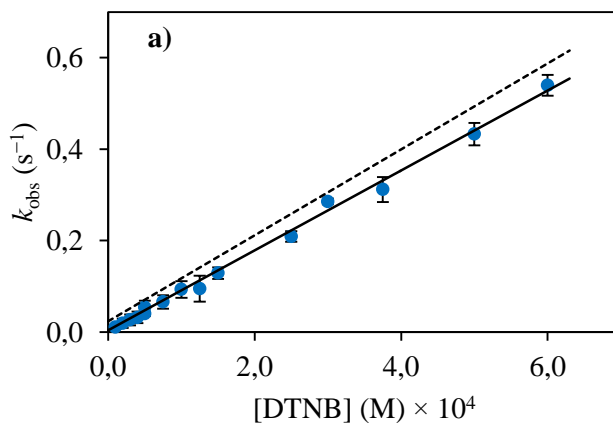


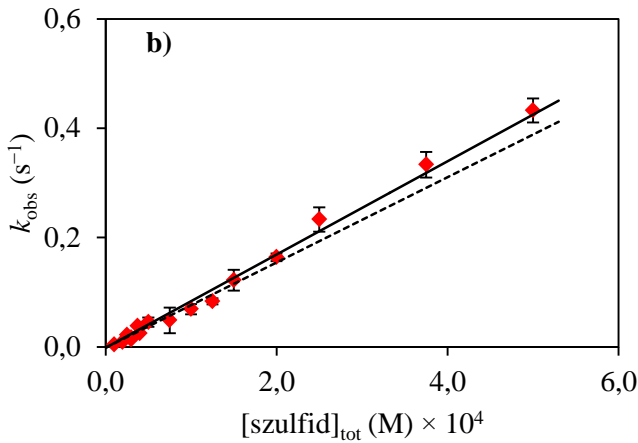
15. ábra. A szulfid – DTNB reakció szimulált kinetikai görbéi. ▲ és ■: szimulált adatsorok, —: exponenciális egyenlettel illesztett görbék. A): [DTNB] = $5,0 \cdot 10^{-4}$ M, [szulfid]_{tot} = $5,0 \cdot 10^{-6}$ M, számolt $k_{\text{obs}} = 0,45 \text{ s}^{-1}$, mért $k_{\text{obs}} = 0,43 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$; B): [DTNB]

$= 5,0 \cdot 10^{-6}$ M, $[\text{szulfid}]_{\text{tot}} = 5,0 \cdot 10^{-4}$ M, számolt $k_{\text{obs}} = 0,44 \text{ s}^{-1}$, mért $k_{\text{obs}} = 0,46 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$, —: exponenciális egyenlettel való illesztés. (Szimuláció alapja 21.–24. reakciók)

A kísérleti adatokkal összhangban a szimulált kinetikai görbékől számolt k_{obs} -értékek lineárisan függenek az aktuális reaktáns koncentrációjától, így DTNB-felesleg esetén $8,7 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, míg szulfidfelesleg esetén $8,5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ értékeket kaptunk a látszólagos másodrendű sebességi állandóra kinetikai szimuláció segítségével (16. a) és 16. b) ábra). A szimulációval számolt eredmények jó egyezést mutatnak a kísérletileg számolt látszólagos másodrendű sebességi állandókkal (a 16. a) és 16. b) ábrák folytonos vonalai). Így a 21.–24. reakciók megfelelően írják le a kísérleti adatokat, melyeket széles koncentrációtartományban gyűjtöttünk.

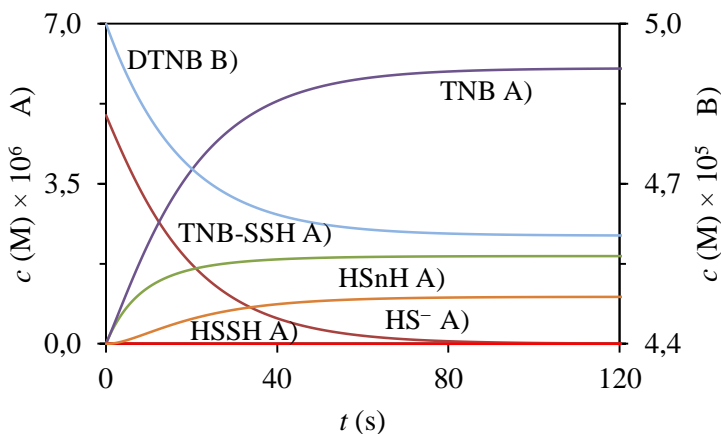
A szimuláció alapján a TNB-SSH szulfiddal való reakciójának (22. reakció) látszólagos másodrendű sebességi állandója pH 7,40-on az $5 \times 10^3 - 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ tartományba esik. Ha a szimulációkat a kérdéses sebességi állandó, k_{22} ezen tartományon kívül eső értékeivel végeztük, akkor a szimulált koncentrációfüggések jelentősen eltértek a kísérlet adatoktól (16. a) és 16. b) ábra szaggatott vonalai).





16. ábra. A szulfid – DTNB reakció kinetikai szimulációval kapott k_{obs} -függése a DTNB- vagy szulfidkoncentrációtól **a)** DTNB- vagy **b)** szulfidfelesleg mellett. ● és ◆: mért adatsorok, —: azok a szimulált görbék, ahol a $k_{22}/k_{21} = 10$, ezekben az esetekben a kapott egyenesek egyenletei: **a)** $y = 0,874x + 0,004$ és **b)** $y = 0,853x - 0,002$; ---: azon szimulált görbék, ahol viszont az **a)** esetében $k_{22}/k_{21} = 100$, akkor $y = 0,940x + 0,024$, illetve ha $k_{21}/k_{20} = 3$ **b)** esetén $y = 0,740x - 0,002$.

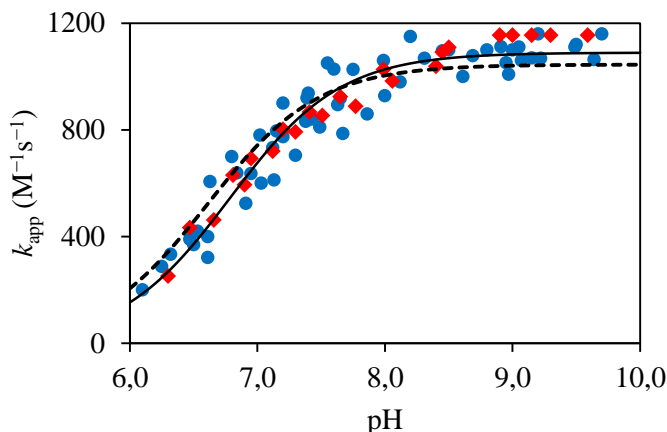
A reaktánsok, közttermékek és termékek koncentrációinak számolt időbeli változását egy adott kísérleti körülmény mellett a 17. ábra szemlélteti.



17. ábra. A reaktánsok, a közttermékek és a termékek koncentrációváltozása a reakció során a javasolt kinetikai modell alapján. $[\text{DTNB}]_0 = 5,0 \cdot 10^{-5}$ M, $[\text{szulfid}]_{\text{tot},0} = 5,0 \cdot 10^{-6}$ M, $k = 8,9 \cdot 10^2$, $r = 10$, $s = 1,0 \cdot 10^4$, minden görbe adatpontjainak száma: 500. (A kinetikai görbéket a modell alapján számoltuk.)

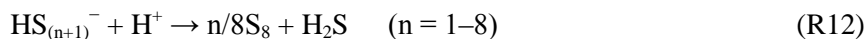
5.2.1.4 A DTNB és a szulfid közötti reakció pH-függése

Részletesen tanulmányoztuk a látszólagos (pH függő) másodrendű sebességi állandók ($k_{21}^{\text{DTNB-felesleg}} = k_{\text{app}}$ és $k_{21}^{\text{szulfidfelesleg}} = k_{\text{app}}$) pH-függését a $6 < \text{pH} < 10$ pH-tartományban (18. ábra).



18. ábra. A látszólagos másodrendű sebességi állandó pH-függése. ●: DTNB-feleslegnél mért adatsorok, ◆: szulfidfeleslegnél mért adatsorok, —: illesztett görbe a 35. egyenlet alapján, ahol $K_a^{\text{H}_2\text{S}}$ rögzített, ---: illesztett görbe a 35. egyenlet alapján, ahol $K_a^{\text{H}_2\text{S}}$ is illesztett. 0,10 M foszfátpuffer, pH = 7,40, $I = 1,00$ M, $T = 25$ °C, $\lambda = 412$ nm. (Adatpontok: DTNB-feleslegnél 9, szulfidfeleslegnél 4 független mérést reprezentálnak.)

A reakció sebessége nő a pH növekedésével és a látszólagos másodrendű sebességi állandó egy szigmoid típusú görbét ad a pH függvényében, illetve $\text{pH} > 9$ esetben pedig telítési értéket ér el. Savas tartományban ($\text{pH} < 6$) nem tudtuk a reakciót *stopped-flow* módszerrel követni, mert a szulfidoldatban kén csapadék megjelenését tapasztaltuk. Ez a kísérleti tapasztalat összhangban van azzal, hogy a polisulfidok savkatalizált diszproporciós reakciójában kén és H_2S képződik a következő egyenlet szerint:



Figyelembe véve, hogy i) két ionizálható karboxil funkciós csoport van a DTNB-n, melyek csak nagyon alacsony pH-értéken protonálódnak ($\text{p}K_a \sim 1,6$),¹⁰⁷

ii) a HS^- savi disszociációs állandója nagy ($\text{p}K_a \geq 14$),⁸⁴ iii) a tiol – diszulfid reakció a tiolát nukleofil támadásával indul az egyik diszulfid-kéven,⁴⁹ ezért a bemutatott pH profilt jól értelmezi a hidrogén-szulfid savi disszociációs egyensúlya. Megállapítható, hogy a reakcióban a HS^- a meghatározó reakciópartner és a kinetikai modell a következőképpen finomítandó:



$$K_a^{\text{H}_2\text{S}} = \frac{[\text{HS}^-][\text{H}^+]}{[\text{H}_2\text{S}]} \quad (\text{R3})$$



A 1. reakcióra az előegyensúlyi feltételezést használva a következő sebességi egyenlet írható le:

$$\frac{d[\text{DTNB}]}{dt} = k_{34} \frac{K_a^{\text{H}_2\text{S}}}{(K_a^{\text{H}_2\text{S}} + [\text{H}^+])} [\text{szulfid}]_{\text{tot}}[\text{DTNB}] \quad (\text{R35})$$

A 18. ábrán a jól illeszkedő folytonos vonal mutatja a 35. egyenlet illeszkedését a kísérleti adatokra. A hidrogén-szulfid $\text{p}K_a$ -ját ($\text{p}K_a^{\text{H}_2\text{S}} = 6,61$ ($I = 1$ M-nál))¹⁰⁸ rögzítve az illesztési eljárás során a pH független sebességi állandó értékét becsültük: $k_{34} = (1,05 \pm 0,1) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Az ábrán a szaggatott vonal azt az illesztést mutatja, amiben a $K_a^{\text{H}_2\text{S}}$ -t is illesztendő paraméterként használtuk. Ekkor a következő eredményt kaptuk: $k_{34} = (1,09 \pm 0,1) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ és $\text{p}K_a^{\text{H}_2\text{S}} = 6,79$ ($I = 1$ M).

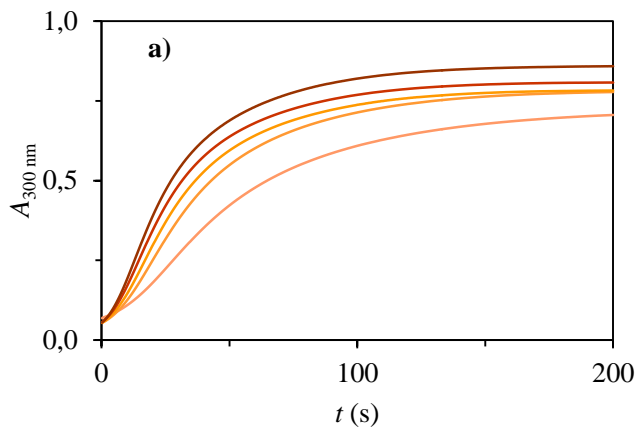
5.2.2 A cisztin és a GSSG redukciója szulfiddal

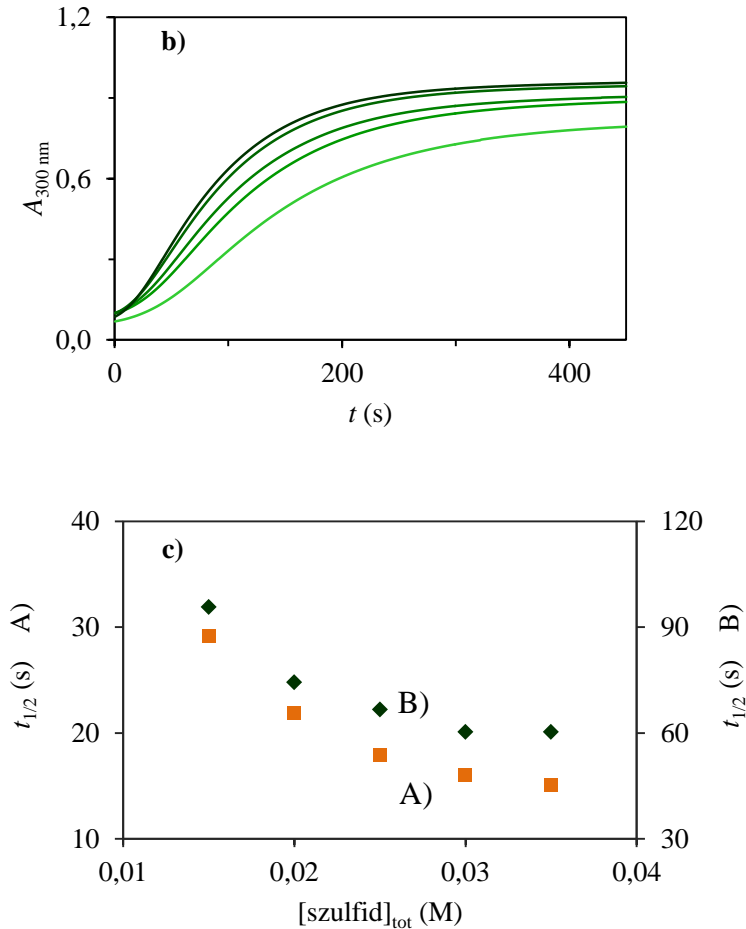
5.2.2.1 Kinetikai mérések

A hidrogén-szulfid diszulfidokkal való reakcióinak vizsgálatát kiterjesztettük biológiailag relevánsabb rendszerekre is, így tanulmányoztuk a cisztin és oxidált glutation (GSSG) szulfiddal való reakcióit. A reakció összetettsége miatt annak csak kinetikai természetét vizsgáltuk szulfidfelesleg

mellett, pH = 7,40-on (19. a) és 19. b) ábra), valamint az első detektált reakció felezési idejét becsültük meg (19. c) ábra). A kinetikai analízist bonyolította, hogy nincs egy jellemző, karakterisztikus elnyelési hullámhossztartománya a reaktánsoknak vagy a termékeknek az UV-Vis tartományban.

A kinetikai görbéket *stopped-flow* spektrofotométer segítségével detektáltuk 300 nm-en, ahol a poliszulfidoknak és a perszulfidoknak van jellegzetes fényelnyelése.^{46,109} A reakció komplexitását jelzi, hogy még huszonötösörös szulfidfelesleg mellett is a kinetikai görbék elején megfigyelhető egy indukciós periódus, mely többlépéses folyamatra utal (19. a) és 19. b) ábra). A kísérleti adatokat összevetve a DTNB rendszerrel, könnyen megállapítható, hogy a cisztin és a GSSG redukciója lényegesen lassabb, mint a DTNB redukciója a felezési idők alapján (19. c) ábra). Egy korábbi tanulmány, ahol lúgos közegben vizsgálták a cisztin szulfid általi redukcióját, összhangban áll az általunk kapott eredményekkel.¹¹⁰

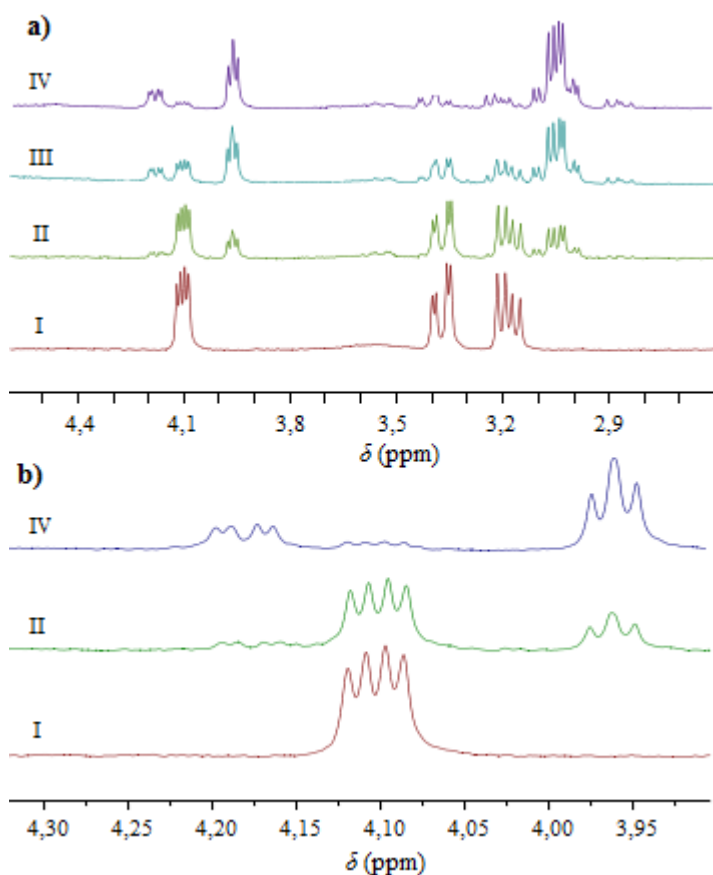




19. ábra. A cisztin – szulfid és a GSSG – szulfid reakciók **a)** és **b)** jellemző kinetikai görbéi és **c)** a becsült felezési idők. **a)** és **c)** A): $[\text{cisztin}] = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, **b)** és **c)** B): $[\text{GSSG}] = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, **a)**, **b)**, **c)**: $[\text{szulfid}]_{\text{tot}} = 1,5 \cdot 10^{-2}$, $2,0 \cdot 10^{-2}$, $2,5 \cdot 10^{-2}$, $3,0 \cdot 10^{-2}$, $3,5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $0,10 \text{ M}$ foszfátpuffer, $I = 1,00 \text{ M}$, $\text{pH} = 7,40$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

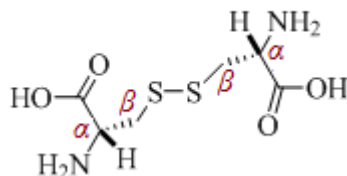
5.2.2.2 $^1\text{H-NMR}$ spektroszkópia

A kinetikai mérések során kapott eredményekből kiindulva vizsgáltuk a cisztin és GSSG szulfiddal való reakciókban képződő termékek $^1\text{H-NMR}$ spektrumát (20. a) és 20. b) ábra).



20. ábra. $3,0 \cdot 10^{-3}$ M cisztin szulfiddal való titrálásának $^1\text{H-NMR}$ spektrumai. $[\text{szulfid}]_{\text{tot}} = 0$ M (I), $3,0 \cdot 10^{-3}$ M (II), $1,0 \cdot 10^{-2}$ M (III), $3,5 \cdot 10^{-2}$ M (IV), 0,225 M deuterált foszfátpuffer, $\text{pD} = 7,40$, $T = 25$ °C. Az NMR spektrumokat a reakció egyensúlyok beállta után rögzítettük.

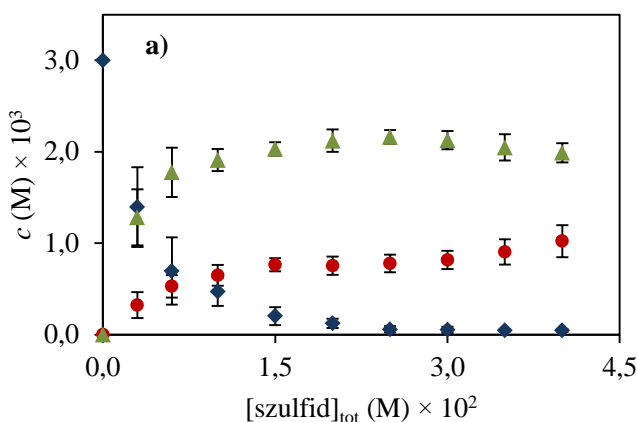
Az 20. a) és 20. b) ábrán látható piros színű spektrum a cisztin $^1\text{H-NMR}$ spektruma. A molekula szimmetriája miatt két ciszteinsoportjának α és β szénatomon lévő protonjai ekvivalensek (21. ábra).

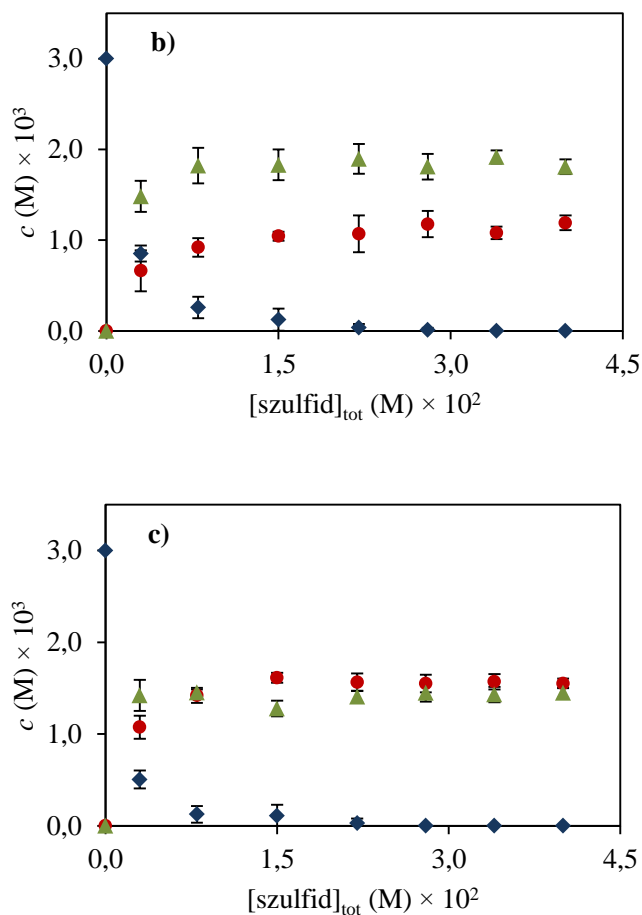


21. ábra. A cisztin szerkezeti képlete α és β szénatomok jelölésével

A β szénen lévő protonok dupla dubletet mutatnak $\delta = 3,17$ ppm-nél és $\delta = 3,36$ ppm-nél, mert egymással is, és az α szénen lévő protonnal is csatolnak. Az α szénen lévő proton kémiai eltolódása 4,11 ppm-nél figyelhető meg. Növekvő koncentrációjú szulfid hozzáadásával a cisztin egyensúlyi koncentrációja, jelintenzitása a $^1\text{H-NMR}$ spektrumban csökken. Megjelennek a termékként képződő Cys $^1\text{H-NMR}$ jelei: a β szénen lévő protonok $\delta = 3,02$ és $3,09$ ppm-nél és az α szénen lévő proton $\delta = 3,96$ ppm-nél; továbbá az új csúcsok, amik egy Cys-származékhoz rendelhetők a következők szerint: β szén protonjai $\delta = 3,15$ és $3,37$ ppm-nél és α szén protonja $\delta = 4,18$ ppm-nél a $^1\text{H-NMR}$ spektrumban.

A DTNB rendszernél kapott eredmények alapján, melyek összhangban vannak két korábbi tanulmánnyal,^{109,110} azt javasoljuk, hogy az új Cys-származék a Cys-perszulfid. Az α szénen lévő protonok kémiai eltolódásának tartományában megfigyelhető, hogy a különböző Cys-származékok α szén protonjainak jelcsoportjai egymástól jól elkülönülnek (20. b) ábra). Csak ezen protonok intenzitását figyelembe véve megbecsültük a cisztin, a Cys és az új Cys-származék egymáshoz viszonyított relatív egyensúlyi koncentrációját a szulfiddal való titrálás során (22. a), 22. b) és 22. c) ábra). Ezekben a vizsgálatokban három párhuzamos mérést végeztünk, és az ábrán látható hibatarományokat ezekből az adatokból számoltuk.





22. ábra. A szulfidkoncentráció növelésével a cisztin (♦), Cys (▲), Cys-perszulfid (●) koncentrációjának változása a szulfidkoncentráció függvényében. [cisztin] = $3,0 \cdot 10^{-3}$ M, 0,225 M deuterált foszfátpuffer, $T = 25$ °C, **a)** pH = 7,40, **b)** pH = 8,00, **c)** pH = 8,00 és 2:1 arányban a szulfidoldat polyszulfidot is tartalmazott. (Szórás: 3–3 független mérésből.)

Az NMR adatok értelmezésére feltételezzük, hogy a DTNB rendszerre felírt modellel analóg módon a kéntartalmú vegyületek egyensúlyban vannak egymással. A modell alapján azonban várható lett volna, hogy a köztiterméként képződő Cys-SSH koncentrációja egy harang alakú görbe mentén változzon a szulfid növekvő koncentrációjának hozzáadásával. Azonban, már a 22. a) ábra is mutatja pD 7,40-on, hogy a Cys és a Cys-perszulfid relatív koncentrációja kb.

1:3 cisztin:szulfid aránynál elér egy „maximumot”, amit egy viszonylag kismértékű növekedés követ a nagyobb szulfidkoncentrációknál, ahelyett hogy egy csökkenő tendenciát mutatna.

A rendszer vártakkal szembeni viselkedését azzal magyaráztuk, hogy nagyobb szulfidkoncentrációnál már éppen annyi poliszulfidot viszünk a rendszerbe (mivel elkerülhetetlen a szulfid törzsoldat poliszulfid-szennyeződése⁸⁴), hogy a cisztin – szulfid rendszerben növekvő szulfid koncentráció mellett a 21. reakció egyensúlya eltolódjon a felső nyíl irányába és a 22. reakcióé pedig az alsó nyíl irányába.

Korábban kutatócsoportunk már beszámolt arról, hogy nyomnyi poliszulfid-szennyezés nagy szulfidfelesleg mellett is elegendő ahhoz, hogy a PTEN enzim aktív centrumában lévő funkcionális cisztein-aminósavak tiolcsoportjain perszulfidot képezzen.¹⁷ Mindezen észlelések megerősítik, hogy a diszulfid poliszulfiddá alakulása perszulfid köztiterméken keresztül történik.

Az NMR kísérleteket hasonló körülmények mellett pD 8,00-en is megismételtük növekvő koncentrációjú szulfiddal (22. b) ábra) és poliszulfiddal (22. c) ábra). A vizsgálatokat azért végeztük pD 8,00-en (22. c) ábra), hogy a szulfidoldatban HOCl segítségével előállított poliszulfidok okozta esetleges kénkiválást elkerüljük. A 22. c) ábrán a poliszulfidok nagyobb koncentrációban való jelenléte miatt egyértelműen megfigyelhető, hogy a Cys:Cys-SSH arány a 22. b)-hez képest jelentős eltérést mutat, ami arra utal, hogy a 21.–24. reakciók valódi egyensúlyi reakcióknak tekinthetők. Ezek az eredmények alátámasztják a korábbi feltevésünket, és az általunk javasolt modellt a cisztin – szulfid közötti reakcióra nézve.

Meg kell említenünk, hogy nagyobb szulfidkoncentráció alkalmazása esetén a spektrumban más csúcsok is megjelentek a β szénen lévő protonokra jellemző tartományban $\delta = 2,90$ és $3,55$ ppm-nél, ami további Cys-származékok képződésére utal. Az új jelek feltételezhetően az alkil-hidrotrisulfid- (pl.: Cys-SSSH) vagy a dialkil-triszulfid-származékok képződésének tulajdoníthatók.^{45,58,111,112} Ezen „új” Cys-származékok további jellemzésére nem tértünk ki. Meg kell jegyeznünk, hogy ezek a molekulák DTT jelenlétében redukálódva Cys-t adtak.

5.2.3 A diszulfidok szulfiddal való reakciójának biológiai jelentősége

Összehasonlítva a cisztin rendszert a DTNB rendszerrel a kinetikai és az NMR mérések figyelembe vételével megállapítható, hogy a szulfid általi cisztin és GSSG redukciója lassabb, mint a DTNB redukciója, valamint a köztitermék Cys-perszulfid kevésbé reaktív összehasonlítva a TNB-perszulfiddal. A közel három nagyságrendű különbség a DTNB és cisztin vagy GSSG redukciójának sebességében jelzi, hogy biológiai környezetben hasonlóan nagy különbség várható a diszulfidok reaktivitásában szulfiddal való reakciójuk során (csak úgy, mint a Cys-tiol – diszulfid reakció esetén).⁴⁹ Ezek alapján várható, hogy az aktivált diszulfidok, mint a glutaredoxin (Grx), Trx, PDI enzim, gyorsabban fognak reagálni a szulfiddal, mint a fehérjék másodlagos szerkezetét stabilizáló diszulfidcsoportok.

Kísérleti eredményeink azt is jelzik, hogy a diszulfidok és a megfelelő perszulfidcsoportok relatív termodinamikai stabilitása (ami nyilvánvalóan meghatározza az alkalmazott körülmények melletti speciációjukat) széles skálán mozog.

Megmutattuk, hogy a szulfid hatékonyan, gyakorlatilag irreverzibilis módon redukálja a DTNB-t, amikor a reaktánsok sztöchiometrikus arányában vannak jelen. Emellett bizonyítottuk, hogy a DTNB szulfiddal való reakciójában az egyensúly a szervesetlen poliszulfidok képződésének irányába van eltolódva, termodinamikailag a poliszulfidképződés kedvező, a reakció egy TNB-SSH köztitermék képződésén keresztül valósul meg. Ezen megfigyelések azt támasztják alá, hogy az aktivált diszulfidok (olyanok, mint például a DTNB) kedvezően és gyorsan reagálnak a szulfiddal és potenciálisan poliszulfid-származékokat állítanak elő, melyekről megállapították, hogy fontos közvetítő szerepük van a szulfid biológiájában.^{16,113,114}

Ezzel szemben kutatócsoportunk korábban demonstrálta, hogy a törzsoldatban elkerülhetetlenül jelenlévő, nyomnyi mennyiségben előforduló poliszulfid még nagy szulfidfelesleg mellett is elegendő volt ahhoz, hogy hatékonyan oxidálja a PTEN enzimet, azaz a fehérje-tiolokat a megfelelő perszulfidszármazékká alakítsa.¹⁷ A cisztin – szulfid rendszer a két extrém példának tekinthető PTEN és DTNB rendszerek között helyezkedik el, ahol az oxidációs ekvivalens a Cys-perszulfid és a szervesetlen poliszulfid között oszlik

meg a dialkil-tri(poli)szulfidok és a hidropoliszulfid-származékok képződése mellett.^{45,61}

Az eredményeink alátámasztják, hogy a diszulfidszármazékok szulfid által történő redukciói diszulfid specifikusak. E reakciók biológiai szerepe kinetikai és termodinamikai sajátágaik alapján értelmezhető. Termodinamikai megfontolások alapján elfogadható az a megközelítés, hogy a redukáló citoszolbeli környezetben a glutation rendszer szabályozza a redoxi homeosztázist,⁵⁹ ugyanakkor feltételezésünk szerint egy oxidatívabb környezetben (mint az endoplazmatikus retikulum, a mitokondrium vagy a mitokondriális intermembrán tér) a reaktív diszulfidok potenciálisan meghatározó reakciópartnerei a szulfidok. Jó példa erre, hogy a szulfid mitokondriális katabolikus útvonalában az első javasolt reakciólépés az SQR enzim intramolekuláris Cys160–Cys356 diszulfid kötésének redukciója szulfiddal, mely reakció során közttermékként perszulfidszármazékok képződnek.^{36,42} Emellett a sejtenszervekben (beleértve a citoszolt is) a szabad szulfid, valamint a perszulfidszármazékok jelentős *steady-state* koncentrációjáról számoltak be korábban. A leírt termodinamikai specificitások így valószínűleg szerepet játszanak a szulfán-kének eloszlásában a fehérje és a fehérje-Cys-származékok között.

Feltételezésünk szerint a diszulfid szulfid általi redukciója – ami egy többlépcsős egyensúlyi folyamatban közttermékként perszulfidot, termékként pedig szervesetlen poliszulfidokat eredményez – biológiai szempontból kiemelkedő jelentőségű. Meggyőződésünk, hogy a diszulfidcsoportok kémiai természetének fontos szerepe van a szulfid általi redukciójuk kinetikai megvalósíthatóságában biológiai körülmények között, és a diszulfidok, perszulfidok, szervesetlen poliszulfidok termodinamikai stabilitása meghatározza a szulfán-kének speciációját.

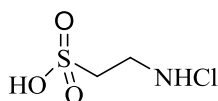
5.3 A kénhidrogén és a klóraminok közötti reakciók kinetikája és mechanizmusa

A neutrofil granulociták az oxidálószeres széles spektrumát állítják elő, többek között klóraminokat, a mikroorganizmusok elpusztításának érdekében. Ezek az oxidálószeres (pl.: klóraminok, HOCl, H₂O₂, OONO⁻) a sejten kívüli térbe is kijuthatnak, ahol számos más molekulával léphetnek reakcióba.

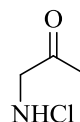
Egy korábbi tanulmány már beszámolt az említett oxidálószeresek közül, a HOCl és a hipobromóssav (HOBr) szulfiddal való reakcióiról.²¹ Igazolták, hogy a szulfid és a HOCl reakcióban legalább 80%-ban poliszulfidok és nem szulfoxidszármazékok képződnek.

Kutatócsoportunk munkájából kiindulva vizsgáltuk a szulfid TauCl-nal (23. a) ábra) vagy GlyCl-nel (23. b) ábra) lejátszódó reakcióit.

a)

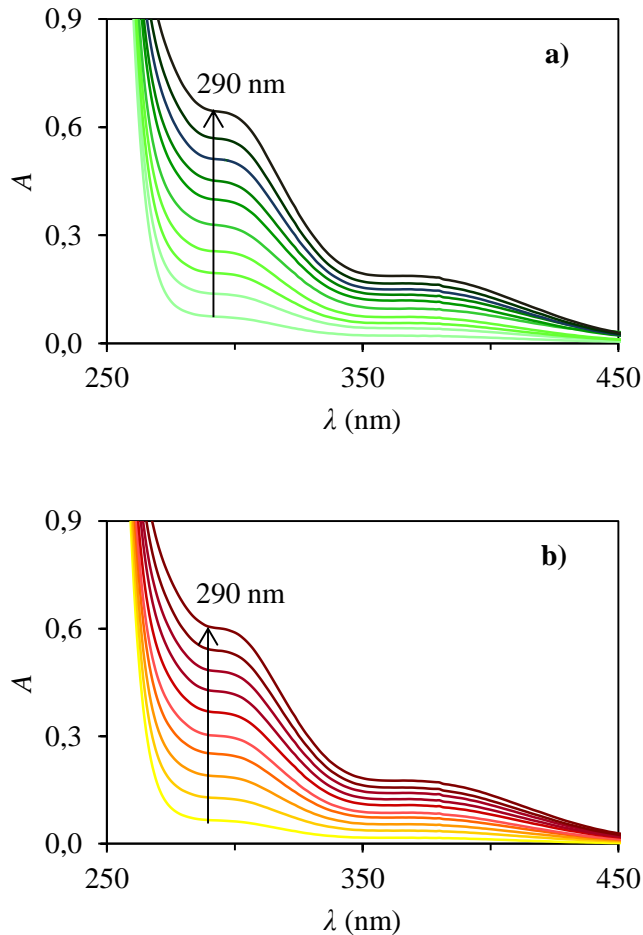


b)



23. ábra. Szerkezeti képlete **a)** az TauCl-nak és **b)** az GlyCl-nek.

Kezdetben spektrofotometriás analízist végeztünk az UV-tartományban a reakció termékeként szulfidfelesleg mellett képződő poliszulfidok detektálására. Az UV spektrumban 290 nm-nél figyeltük meg a reakcióelegyből képződő poliszulfid termék karakterisztikus elnyelését (24. a) és 24. b) ábra). A szulfid klóraminokkal való titrálásakor a spektrumban bekövetkezett változás alapján megállapítottuk, hogy az alkalmazott klóraminok legalább 90%-a poliszulfidok képződésére fordítódik.



24. ábra. A szulfid titrálása **a)** TauCl-nal és **b)** GlyCl-nel. $[\text{TauCl}]$ és $[\text{GlyCl}] = 5,0 \cdot 10^{-5}$, $1,0 \cdot 10^{-4}$, $1,5 \cdot 10^{-4}$, $2,0 \cdot 10^{-4}$, $2,5 \cdot 10^{-4}$, $3,0 \cdot 10^{-4}$, $3,5 \cdot 10^{-4}$, $4,0 \cdot 10^{-4}$, $4,5 \cdot 10^{-4}$, $5,0 \cdot 10^{-4}$ M, $[\text{szulfid}]_{\text{tot}} = 5,0 \cdot 10^{-3}$ M, 0,10 M foszfátpuffer, pH = 7,40, $I = 1,00$ M, $T = 25$ °C.

Annak érdekében, hogy megértsük a klóraminok és a szulfid között végbemenő reakciók mechanizmusát tanulmányoztuk a szulfid – TauCl, valamint a szulfid – GlyCl reakciók kinetikáját. Pseudo-elsőrendű körülményeket alkalmazva, legalább tízszeres szulfidfelesleg mellett *stopped-flow* módszerrel követtük a reakciókat 290 nm-en. Megállapítottuk, hogy *stopped-flow* időskálán minden esetben két jól definiált szakasza van a kinetikai görbéknek mind a TauCl-nal, mind a GlyCl-nel megvalósuló reakcióban (25. ábra). Ezek a kísérleti tapasztalatok arra utalnak, hogy mindkét rendszer

esetében többlépéses reakciók mennek végbe. Először feltételeztük, hogy a reakció két irreverzibilis elsőrendű lépésben játszódik le a következő modell szerint:

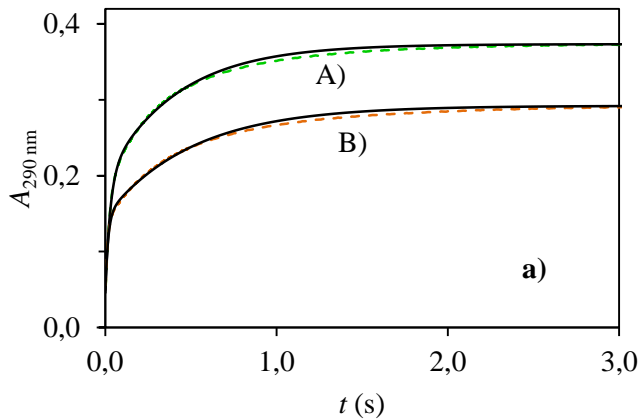


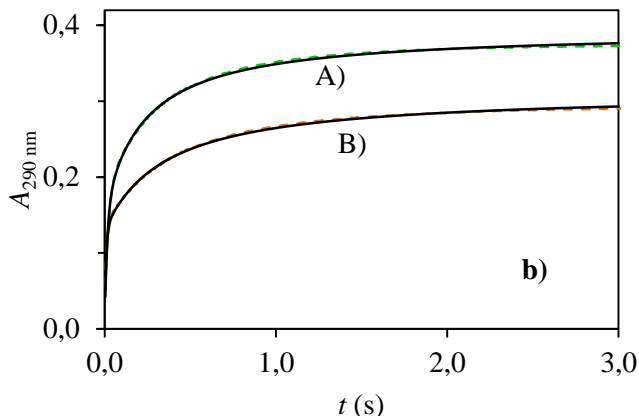
$$\frac{d[B]}{dt} = k_1[A] - k_2[B] \quad (\text{R37})$$

Összességében a 37. egyenlet nem alkalmas a kinetikai görbék pontos leírására (25. a) ábra). A továbbiakban – később ismertetett megfontolások alapján – feltételeztük, hogy az első lépés pszeudo-elsőrendű, míg a második lépés másodrendű a köztitermékre (B) nézve:

$$\frac{d[B]}{dt} = k_1[A] - k_2[B]^2 \quad (\text{R38})$$

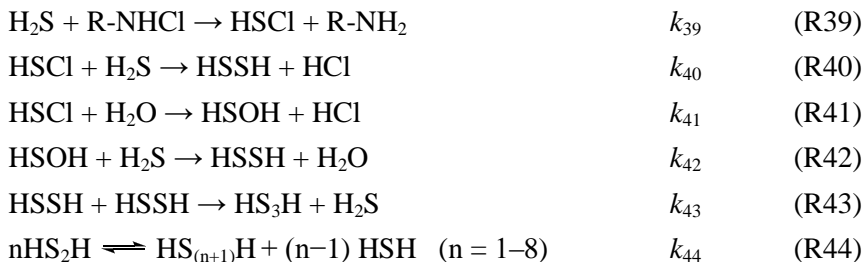
Amint azt a 25. b) ábra szemlélteti, az utóbbi megközelítéssel a kísérleti görbékre a 38. egyenlettel az illeszkedés megfelelő volt.



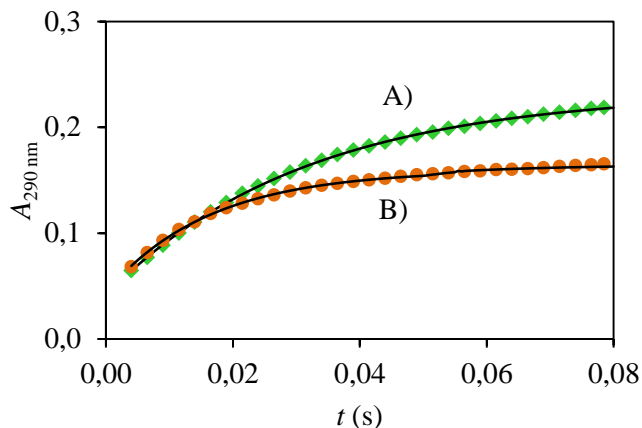


25. ábra. Tipikus *stopped-flow* kinetikai görbék A) a TauCl és B) a GlyCl szulfiddal lejátszódó reakcióiban. **a)**: A görbék illesztése a 37. egyenlet alapján történt; ---: kísérleti görbék, —: illesztett görbék. **b)**: A görbék illesztése a 38. egyenlet alapján történt; ---: kísérleti görbék, —: illesztett görbék. [TauCl] és [GlyCl] = $3,0 \cdot 10^{-4}$ M, [szulfid]_{tot} = $1,0 \cdot 10^{-2}$ M, 0,10 M foszfátpuffer, pH = 7,40, I = 1,00 M, T = 25 °C, λ = 290 nm.

A kinetikai görbék illesztése alapján megállapítottuk, hogy míg a gyorsabb reakciólépések sebessége TauCl-ra és GlyCl-re nézve különböző volt, a lassabb reakciók azonos sebességgel mentek végbe. Ezzel és a tiolok redoxireakcióinak irodalmával összhangban a következő kinetikai modellt állítottuk fel:

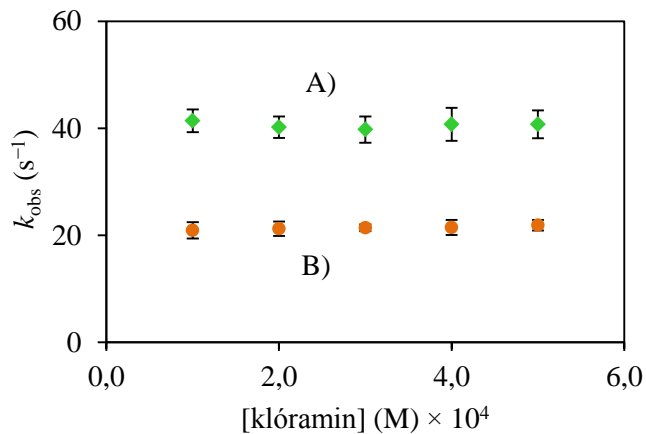


A modell szerint a gyorsabb folyamat a klóraminok és a szulfid között lejátszódó bimolekuláris reakcióhoz rendelhető (39. reakció). A kinetikai görbék első szakasza mindkét rendszer esetén jól illeszthetőek voltak egy exponenciális tagból álló összefüggéssel (26. ábra).



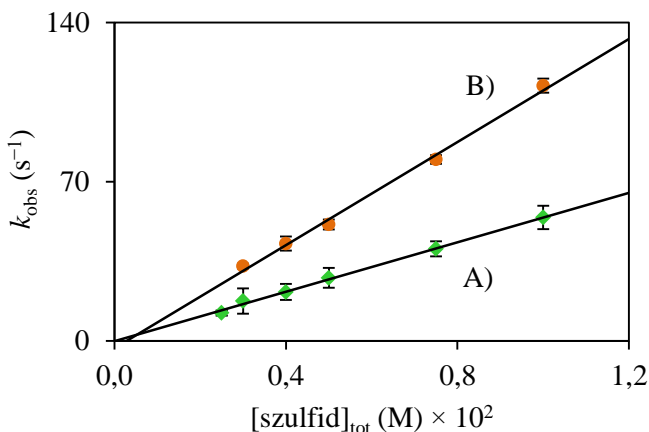
26. ábra. A) a TauCl és B) a GlyCl szulfiddal való reakciójában mért kinetikai görbék első szakaszának illesztése exponenciális összefüggéssel. \blacklozenge és \bullet : kísérleti adatok, —: illesztett görbék. $[\text{TauCl}]$ és $[\text{GlyCl}] = 3,0 \cdot 10^{-4}$ M, $[\text{szulfid}]_{\text{tot}} = 1,0 \cdot 10^{-2}$ M, 0,10 M foszfátpuffer, pH = 7,40, $I = 1,00$ M, $T = 25$ °C, $\lambda = 290$ nm.

Ezeknek a reakcióknak vizsgáltuk a szulfid- és a klóraminkoncentráció-függését és megállapítottuk, hogy a pszeudo-elsőrendű sebességi állandó szulfidfelesleg mellett független a klóraminok koncentrációjától (27. ábra).



27. ábra. Szulfidfelesleg esetében a pszeudo-elsőrendű sebességi állandók függetlenek A) a TauCl- és B) a GlyCl-koncentrációtól. \blacklozenge és \bullet : kísérleti adatok. $[\text{szulfid}]_{\text{tot}} = 5,0 \cdot 10^{-3}$ M, 0,10 M foszfátpuffer, pH = 7,40, $I = 1,00$ M, $T = 25$ °C, $\lambda = 290$ nm. (A mérési pontok hibáját 3 párhuzamos mérés alapján becsültük.)

A pszeudo-elsőrendű sebességi állandó lineárisan függ a szulfidkoncentrációtól mindkét rendszer esetében (28. ábra). Ezen tapasztalatok alapján megállapítható, hogy a reakciók elsőrendűek mind szulfidra, mind pedig klóraminra nézve. A szulfidkoncentrációtól való függés alapján pH 7,40-nál számítottuk a látszólagos másodrendű sebességi állandót (k_{app}), ami a TauCl esetén: $k_{39}^{TauCl} = (5,44 \pm 0,01) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ -nek, míg a GlyCl rendszerénél: $k_{39}^{GlyCl} = (1,13 \pm 0,02) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ -nek adódott.

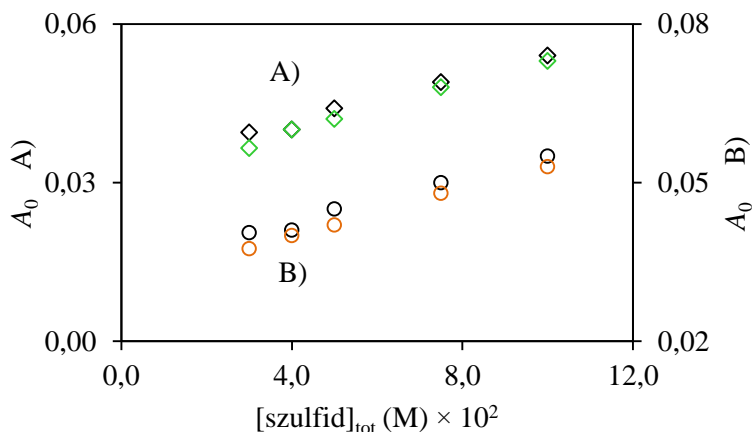


28. ábra. A szulfid – klóramin reakciók első szakaszából számolt pszeudo-elsőrendű sebességi állandó a szulfidkoncentráció függvényében. ♦ és ●: mért sebességi állandók, —: illesztett egyenesek. A): szulfid – TauCl reakció; B): szulfid – GlyCl reakció. [TauCl] és [GlyCl] = $3,0 \cdot 10^{-4}$ M, 0,10 M foszfátpuffer, pH = 7,40, $I = 1,00$ M, $T = 25$ °C, $\lambda = 290$ nm. (Szórás: 6–6 független mérésből.)

A megfelelő látszólagos másodrendű sebességi állandókból jól látszik, hogy fiziológiás pH-n a szulfid kb. kétszer olyan gyorsan reagál GlyCl-nel, mint TauCl-nal.

A kezdeti abszorbanciát is tanulmányoztuk annak érdekében, hogy bizonyítsuk, hogy az első detektált reakció valóban a modell szerinti 39. reakció. A vizsgálatot úgy végeztük, hogy a reakcióelegy kezdeti abszorbanciáját $t = 0$ időpillanatban extrapoláltuk és összehasonlítottuk a reaktánsok abszorbanciájának összegével (29. ábra). Kísérleti hibánál nagyobb eltérést nem tapasztaltunk ezekben az adatokban. Ezek az eredmények azt a feltételezésünket

támasztják alá, hogy a gyorsabb reakciólépés a klóraminok és a szulfid között végbemenő közvetlen bimolekuláris reakció.



29. ábra. A reaktánsok abszorbanciáinak összege – A_0 -értékek keverés előtt a TauCl (\diamond) és a GlyCl (\circ) rendszerben – és a kinetikai görbék $t = 0$ s-ra extrapolált kezdeti abszorbanciái – A_0 -értékek a TauCl (\diamond) és a GlyCl (\circ) rendszerben – szulfidkoncentráció függvényében. A): [TauCl] = $3,0 \cdot 10^{-4}$ M; B): [GlyCl] = $3,0 \cdot 10^{-4}$ M. 0,10 M foszfátpuffer, pH = 7,40, $I = 1,00$ M, $T = 25$ °C, $\lambda = 290$ nm.

A reakciók gyorsabb szakaszára kapott k_{app} -ok pH-függését a TauCl – szulfid reakciónál a 30. a) ábra, míg a GlyCl – szulfid reakciórendszerrel a 30. b) ábra mutatja az $5,8 < \text{pH} < 10,5$ pH-tartományban. Ez a pH-függés a reaktánsok sav-bázis egyensúlyaival értelmezhető.



$$K_a^{\text{H}_2\text{S}} = \frac{[\text{HS}^-][\text{H}^+]}{[\text{H}_2\text{S}]} \quad (\text{R3})$$



$$K_a^{\text{R-NH}_2\text{Cl}^+} = \frac{[\text{R-NHCl}][\text{H}^+]}{[\text{RNH}_2\text{Cl}^+]} \quad (\text{R46})$$

Összességében a reaktánsok protonált és deprotonált formái között négyféle reakció játszódhat le. Azonban lúgos tartományban a k_{app} értéke gyakorlatilag nulla, ami bizonyítja, hogy a deprotonált formák közötti reakció

nem, vagy csak elhanyagolható sebességgel játszódik le. A pH csökkentésével k_{app} nő, ami a hidrogén-szulfid-molekula és a klóraminok, valamint a deprotonált hidrogén-szulfid és a protonált klóraminok közötti reakciókkal egyaránt értelmezhető.



E két reakciót megkülönböztethetetlen, mert a reaktánsok protonálódási egyensúlyai (1. és 45. reakció) rendkívül gyorsan, diffúziókontrollált sebességgel játszódnak le, azaz a sav-bázis reakciók gyors előegyensúlyokként kezelendők a redoxireakciók kinetikájának értelmezése során. A 30. ábrán jól látható módon a k_{app} csökken a pH további csökkentésével, azaz a reaktánsok savi formái közötti reakció lényegesen lassúbb, mint a 39.a és/vagy 39.b reakció. Az 5.2.1.4 fejezetben említett csapadékkiválás miatt a savas pH tartományban a pH-függés részletesen nem tanulmányozható. Ugyanakkor a sebességi állandó jelentős csökkenése egy viszonylag szűk pH tartományban arra utal, hogy ez utóbbi folyamat hatása is elhanyagolható. Mindezek alapján a látszólagos másodrendű sebességi állandó a 47. egyenlettel adható meg:

$$k_{app} = \frac{\kappa[H^+]}{(K_a^{H_2S} + [H^+])(K_a^{R-NH_2Cl^+} + [H^+])} \quad (R47)$$

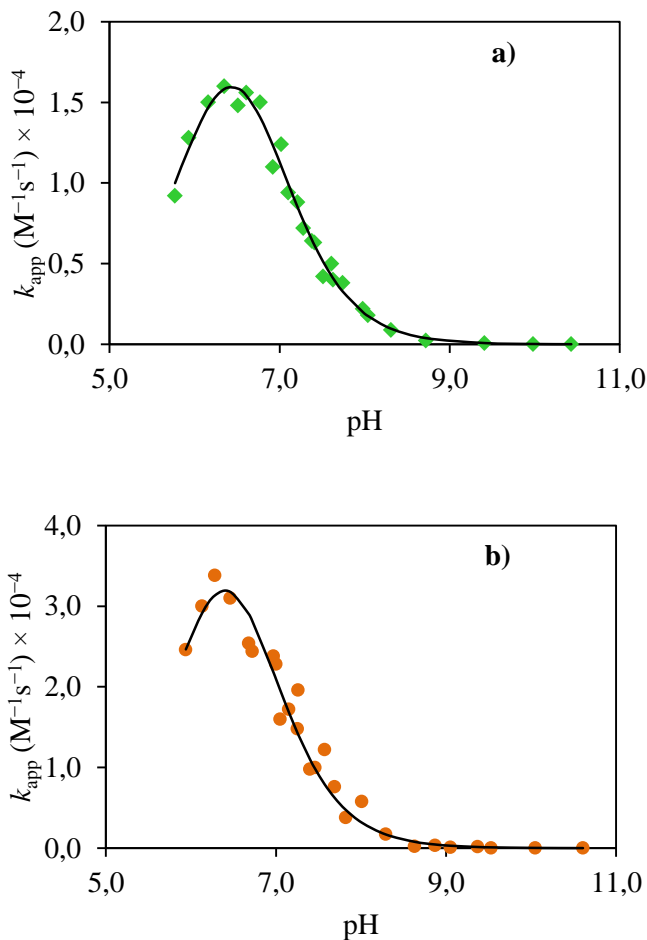
ahol $\kappa = k_{39a} \cdot K_a^{R-NH_2Cl^+} + k_{39b} \cdot K_a^{H_2S}$

Korábban Calvo és mtsai arra a következtetésre jutottak,¹¹⁵ hogy az ilyen típusú reakciók minden bizonnyal a hidrogén-szulfid-ion és a protonált klóramincsoportok között zajlanak le. Ennek megfelelően a 47. egyenlet a következő formára egyszerűsíthető:

$$k_{app} = \frac{k_{39b} K_a^{H_2S} [H^+]}{(K_a^{H_2S} + [H^+])(K_a^{R-NH_2Cl^+} + [H^+])} \quad (R48)$$

A 30. ábrán látható adatokat (folytonos vonalak) a 48. egyenlet alapján illesztettük a kísérleti adatokra. A számítások során a hidrogén-szulfid savi disszociációs állandóját rögzített értékkel vettük figyelembe: $pK_a^{H_2S} = 6,61$ ($I = 1$ M-nál).¹⁰⁸ A TauCl – szulfid reakciórendszerre a következő pH független

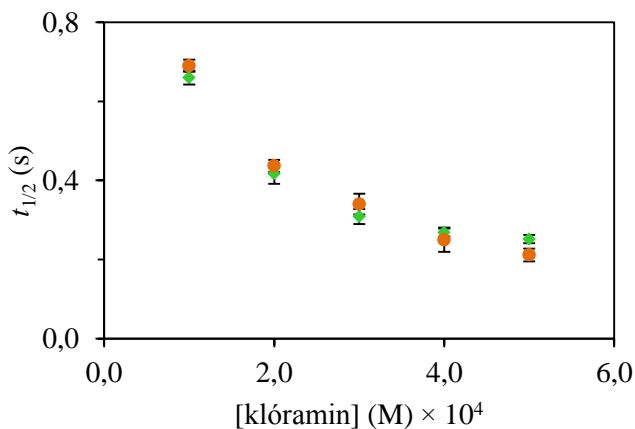
sebességi állandót és savi disszociációs állandót kaptuk: $k_{39b}^{\text{TauCl}} = (9,8 \pm 0,5) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ és $K_a^{\text{TauHCl}^+} = 6,28$; míg a GlyCl – szulfid reakciórendszerre az alábbi becsült értékeket: $k_{39b}^{\text{GlyCl}} = (2,2 \pm 0,2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ és $K_a^{\text{GlyHCl}^+} = 6,20$. A protonált TauCl pK_a -jára kapott adat jó egyezésben van az irodalomban valamelyest eltérő körülményekre közölt értékkel ($pK_a^{\text{TauHCl}^+} = 6,10$).¹¹⁶ (A protonált GlyCl pK_a -jára irodalmi adat nem ismert.)



30. ábra. A látszólagos másodrendű sebességi állandó pH-függése **a)** a TauCl – szulfid és **b)** a GlyCl – szulfid reakciókban. —: illesztett görbék a 48. egyenlet alapján, ahol $K_a^{\text{H}_2\text{S}}$ rögzített, $K_a^{\text{TauHCl}^+}$ és $K_a^{\text{GlyHCl}^+}$ illesztett. 0,10 M foszfátpuffer, $I = 1,00 \text{ M}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda = 290 \text{ nm}$. (Szórás: mindkét rendszernél 3–3 független mérésből.)

A két rendszerben mért k_{app} -ok hasonló pH-függése és hasonló pH független sebességi állandó értékei arra utalnak, hogy mindkét rendszerben ugyanolyan típusú reakciót követünk. A pH csökkentésével a pH > ~7 tartományban mindkét rendszerben nő a sebességi állandó, mert nő a protonált klóramin aránya. Az ábrán a maximumok azzal magyarázhatók, hogy a pH további csökkentésével a pH < 7 tartományban csökken a reaktív HS⁻ koncentrációja. A reakció pH-függését nem tudtuk savas tartományban, pH < 6 tanulmányozni, mert hasonlóan a diszulfid rendszerben tapasztaltakhoz a szulfidoldatban kén csapadék kiválását észleltük (12. reakció).

A kinetikai görbék második szakaszára jellemző másodrendű sebességi állandók függetlenek a szulfid koncentrációjától mindkét klóramin esetében, valamint a reakciók felezési ideje függött a klóraminok kezdeti koncentrációjától (31. ábra). A detektált második reakciók másodrendű kinetikai egyenlettel voltak illeszthetők, melyek alapján meghatároztuk a látszólagos másodrendű sebességi állandókat: $k_{43}^{TauCl} = (6,5 \pm 0,4) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{43}^{GlyCl} = (5,3 \pm 0,6) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pH 7,40-nál. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a lassabb reakciók a GlyCl és a TauCl rendszerek esetében is azonos köztitermékhez rendelhetők. Feltételezésünk szerint a lejátszódó folyamat a HSSH diszproporcionálódása, ami polyszulfidok és H₂S képződéséhez vezet (43. reakció).



31. ábra. A felezési idő függése a TauCl- (◆) és GlyCl-koncentrációtól (●) a detektált második reakciónál. [szulfid]_{tot} = 5,0 · 10⁻³ M, 0,10 M foszfátpuffer, pH = 7,40, I = 1,00 M, T = 25 °C, λ = 290 nm. (Szórás: 3–3 független mérésből.)

A klóraminok szulfiddal való reakcióinak mechanizmusára javasolt modell szerint az első detektált reakció a protonált klóramin és a HS^- között végbemenő bimolekuláris reakció. Az ezt követő lépések, amelyek a diszulfid képződéséhez vezetnek (40.–42. reakciók) gyorsak, ahogy azt az irodalmi adatok is alátámasztják (pl.: a Cys esetén tapasztalt analóg reakciókra)¹⁷. A kinetikai görbék második, lassabban lejátszódó szakasza valószínűleg a 43. reakcióhoz rendelhető. Ez a folyamat a HSSH másodrendű diszproporcionálódása. Azaz a 39. és 43. reakció a sebességmeghatározó a klóraminok és szulfid között végbemenő reakciókban, melyek összességében poliszulfidok képződéséhez vezetnek.

Biológiai körülmények között a szulfid klóraminokkal való reakciója a megadott modell szerint bizonyos körülmények között megvalósulhat. Például, a gyulladást csökkentő terápiás célzattal adagolt, relatíve nagy mennyiségű szulfid reagálhat a gyulladás helyszínén neutrofilok által generált klóraminokkal poliszulfidok képződése közben, melyeknek számos további élettani hatása lehet.¹⁷

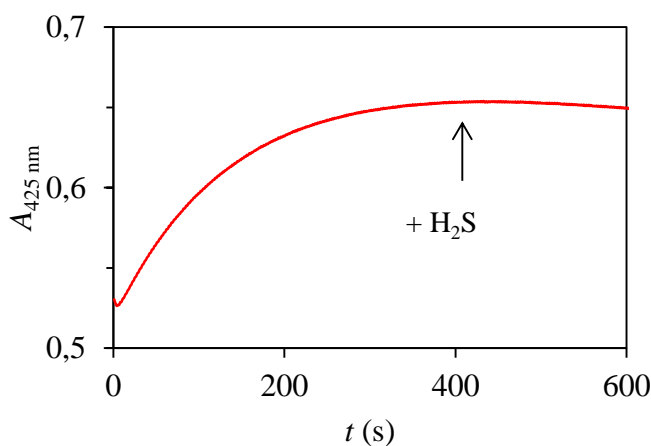
5.4 A ferril-Hb-származék és a hidrogén-szulfid között lejátszódó reakciók

Az érlelmeszesedés (atheroszklerózis) okozta megbetegedések és halálozások száma szoros összefüggésben van az érfalon kialakuló atheroszklerotikus plakkok (vagy más néven atheroszklerotikus léziók) és a komplikált plakkok megjelenésével.¹¹⁸ Gyakran előfordul, hogy a vörösvérsejtek beszivárognak ezekbe a léziókba, és ennek következményeként plakkon belüli vézést okoznak.¹¹⁸ A beszivárgott vörösvérsejt-liázok és hemoglobinek reagálnak a környező plakk lipid-peroxidokkal,¹¹⁹ ezen túlmenően további lipid-peroxidációs termékek a lipid-hidroperoxidok vagy a karbonilek keletkeznek.¹²⁰ Balla és mtsai igazolták, hogy ezen termékeknek a plakkokban oxidatív stresszt okozó hatásuk van.¹²¹

A képződő ferril-Hb-származékoknak sem a szerkezete, sem a kémiai tulajdonságai nem tisztázottak, de azt tudjuk, hogy a metHb- és az oxiHb-származékok peroxid-származékokkal való reakcióiban a képződő ferril-Hb-származék nem stabilis, globingyököket tartalmaz.¹²² A párosítatlan elektron helyzete egyelőre még nem ismert, de általánosan elfogadott, hogy a hemperoxidázokkal ellentétben nem a porfirinyűrűn helyezkedik el. A globingyökök egyelektronos reakcióiban kovalensen kötött Hb-multimerek képződhetnek, melyek jelen vannak a humán atheroszklerotikus léziókban.¹¹⁹ Ezek az oxidált Hb-származékok gyulladásserkentő hatásúak. A ferril-Hb-származékokról a közelmúltban kimutatták, hogy megbontják az endotél sejtek integritását és megkönnyítik a monociták megtapadását az endotélhez.

A hidrogén-szulfidról kimutatták, hogy antiaterogén (érlelmeszesedést gátló) hatással rendelkezik,¹²³ emellett hatékonyan redukálhatja a gyulladásserkentő hatással rendelkező hemfehérjék oxidáló köztitermékeit.²⁰ Az apolipoprotein-E (ApoE -/-) kiűtött egereken végzett kísérletekkel igazolták, hogy a NaHS gátolja az atheroszklerotikus léziók kialakulását, és a CSE enzim gátlása ebben az egér modellben gyorsabb plakkképződést eredményezett.¹²⁴ Mani és mtsai igazolták, hogy az endogén szulfidtermelés csökkenése az érlelmeszesedés folyamatának felgyorsulásával párosult azon egereknél, amelyeknél eltávolították a CSE enzimet.¹²⁵

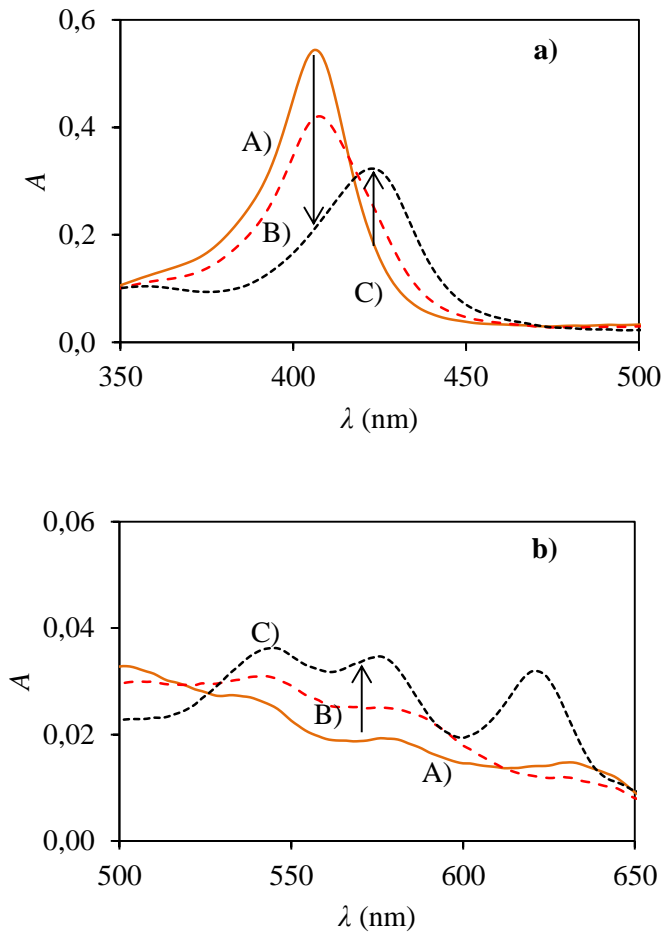
Ezen megfigyelések alapján kívántuk megvizsgálni, hogy a Hb hemcsoportjának különböző peroxid-származékokkal való reakcióiban a nagyon reaktív Fe^{4+} centrumokat tartalmazó ferril-Hb-származékok szulfid általi redukciója milyen módon járul a szulfid oxidatív stresszt közömbösítő hatásaihoz. Kezdetben ferril-Hb-származékot *in situ* készítettünk metHb és 2–5 mól ekvivalens H_2O_2 reakciójával, amit egy szekvenciális *stopped-flow* készülékkel végzett kísérlet első fázisában állítottunk elő. Az alkalmazott kísérleti körülmények mellett a ferril-Hb-származék képződése ~400 s-nál volt teljes (32. ábra).



32. ábra. A ferril-Hb-származék képződésének jellemző kinetikai görbéje. $[\text{metHb}] = 8,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $2,0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ foszfátpuffer, $\text{pH} = 7,40$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda = 425 \text{ nm}$. (A nyíl azt az időt jelzi, amikor a reakcióelegyhez szulfidot adtunk.)

A metHb spektrumának a H_2O_2 hozzáadását követően a ferril-Hb-származék képződésére jellemző spektrális változásokat figyeltünk meg 350–500 és 500–650 nm-es hullámhossztartományban a kiindulási anyagokhoz képest (33. ábra). Az így képződött köztiterméket maximális koncentrációjánál reagáltattuk szulfiddal a szekvenciális *stopped-flow* kísérlet második fázisában (400 s-os késleltetési időnél). A szulfiddal való reakció eredményeként az UV-Vis spektrumban egy gyors változás következett be, ami a szulfid és a ferril-Hb-származék közötti reakcióra utal. A spektrumban a 400 nm-nél mért csúcs jelentős mértékű eltolódása látható a nagyobb hullámhosszak irányába a 33. a) ábrán, míg 530 és 580 nm-nél az abszorbancia növekedése követhető nyomon

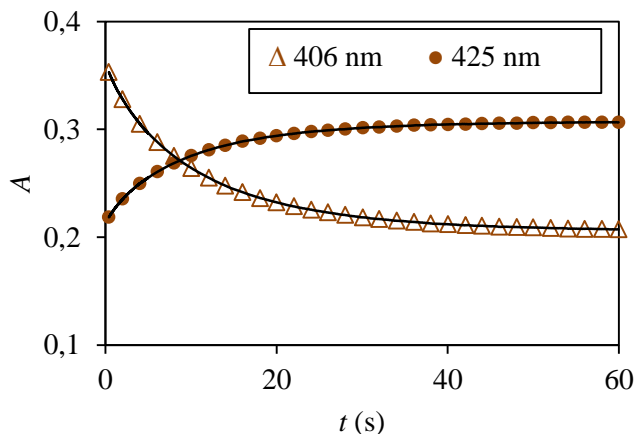
33. b) ábrán. Emellett egy új csúcs jelent meg 620 nm-nél, amely a szulfhemoglobin képződésével van összhangban (33. b) ábra).¹²⁶



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

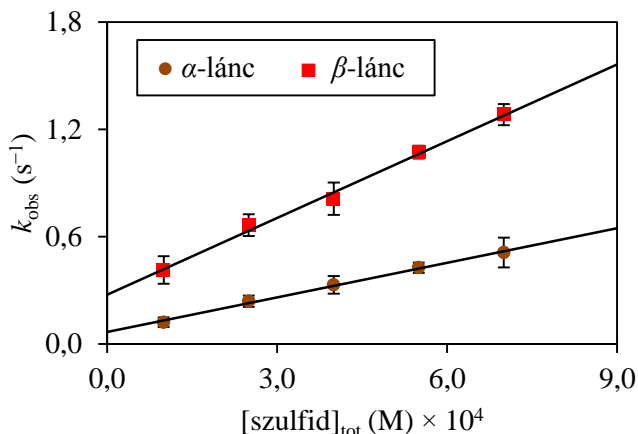
Szekvenciális *stopped-flow* módszer segítségével kinetikai görbékét vettünk fel 406 (34. ábra), 425 (34. ábra) és 570 nm-en legalább tízszeres szulfidfelesleget alkalmazva pH 7,40-nál. A kísérleti görbék összetett abszorbanciaváltozást mutattak mindhárom tanulmányozott hullámhosszon, és

minden esetben egy két exponenciális tagot tartalmazó egyenlettel jól illeszthetők voltak. A különböző hullámhosszokon számolt sebességi állandók hibahatáron belül megegyeztek (34. ábra).



34. ábra. Jellemző kinetikai görbék (●, Δ) két exponenciális tagot tartalmazó egyenlettel való illesztéssel (—) 406 nm-nél (Δ) és 425 nm-nél (●). [metHb] = $4,0 \cdot 10^{-6}$ M, [H₂O₂] = $8,0 \cdot 10^{-6}$ M, [szulfid]_{tot} = $1,0 \cdot 10^{-4}$ M, $2,0 \cdot 10^{-2}$ M foszfátpufferben, pH = 7,40, T = 25 °C, $t_{\text{készletetés}} = 400$ s.

Irodalmi adatok alapján ezek a lassabb és gyorsabb reakciók a Hb eltérő reaktivitású alfa- és béta-láncainak különböző hemcsoportjaihoz rendelhetők.^{127,128} Mindkét reakció pseudo-elsőrendű sebességi állandója lineáris szulfidkoncentráció-függést mutatott, amiből a számolt látszólagos másodrendű sebességi állandók az alfa-láncrea $(1,4 \pm 0,1) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ és a béta-láncrea $(6,5 \pm 0,2) \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ becült értékeknek adódtak (35. ábra).

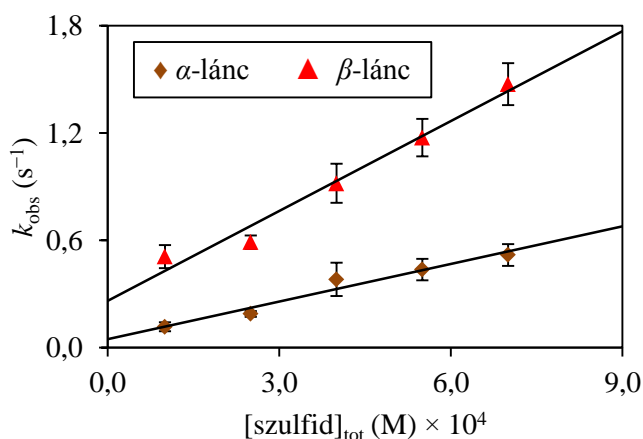


35. ábra. A szulfid – ferril-Hb-származék reakció látszólagos másodrendű sebességi állandóinak meghatározása. ● és ■: mért adatsorok, —: illesztett egyenesek. [metHb] = $4,0 \cdot 10^{-6}$ M, $[H_2O_2] = 8,0 \cdot 10^{-6}$ vagy $2,0 \cdot 10^{-5}$ M, $2,0 \cdot 10^{-2}$ M foszfátpuffer, pH = 7,40, $T = 25$ °C, $\lambda = 425$ nm, $t_{\text{késleltetés}} = 400$ s. α -lánc: $y = 1,4312x + 0,2769$, β -lánc: $y = 0,6448x - 0,0686$. (Szórás: 7 független mérésből.)

A ferril-Hb-származékot az irodalmi adatok alapján nemcsak a metHb – H_2O_2 reakcióban képeztük, hanem az oxiHb H_2O_2 -dal történő oxidációval is előállítottuk (49.–51. reakciók). Az oxiHb-nak ($Fe^{2+}Hb$) H_2O_2 feleslegével, oxidációs állapot szempontjából, egy ferril-hemoglobin ($Fe^{4+}Hb$, *Compound II*) analóg vegyületet kellene eredményeznie, mint Hb-származékot, mert ez a redoxi köztitermék felel meg egy kételektronos bimolekuláris oxidációs reakciónak (oxiHb – H_2O_2 reakció (49. reakció)). Irodalmi adatok alapján azonban a $Fe^{4+}Hb$ -nek (*Compound II*) megfelelő forma gyorsan komproporcionálódik a megmaradó oxiHb-nal, és két mól ekvivalens metHb-t ($Fe^{3+}Hb$) ad (50. reakció). A metHb H_2O_2 -felesleg jelenlétében végül ferril-Hb-származéknak ($Fe^{4+}Hb^{*+}$, *Compound I*) megfelelő forma képződését eredményezi (51. reakció) a következő reakció mechanizmus szerint:



Ezen irodalmi előzmények alapján tanulmányoztuk az oxihb H_2O_2 -dal való oxidációban képződő ferril-Hb-származék reakcióját szulfiddal. A lassabb időskálán képződő ferril-Hb-származék reaktivitását vizsgáltuk szulfiddal 406, 425 és 570 nm-en. Mindhárom hullámhosszon két reakciót rögzítettünk *stopped-flow* módszer segítségével, és a mért kinetikai görbékre két elsőrendű tagból álló egyenletet illesztettünk. A pszeudo-elsőrendű állandók szulfidkoncentráció-függéseiből meghatároztuk mind az alfa-, mind a béta-lánc reaktivására vonatkozó látszólagos másodrendű sebességi állandók értékeit, melyek a gyorsabb reakcióra $(1,7 \pm 0,2) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ és a lassabb reakcióra $(7,0 \pm 0,8) \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ becült értékeknek adódtak (36. ábra).

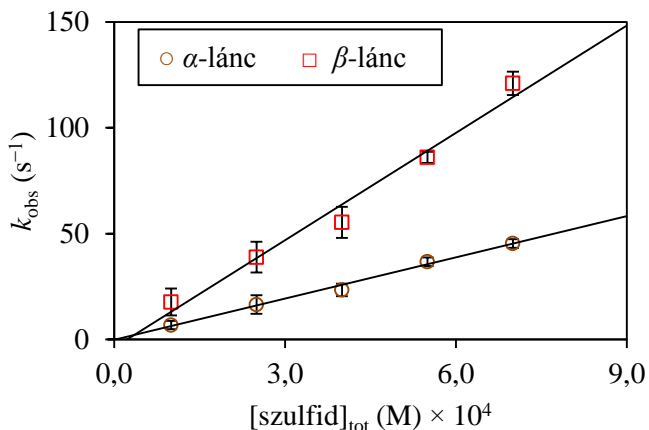


36. ábra. A mért pszeudo-elsőrendű sebességi állandók lineáris szulfidkoncentráció-függése a szulfid – ferril-Hb-származék reakciónál. ▲ és ◆: mért adatsorok, —: illesztett egyenesek. $[\text{oxiHb}] = 4,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $2,0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ foszfátpuffer, $\text{pH} = 7,40$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda = 425 \text{ nm}$, $t_{\text{késleltetés}} = 8,2 \text{ h}$. α -lánc: $y = 1,6751x + 0,2634$, β -lánc: $y = 0,7009x + 0,0483$. (Szórás: 4 független mérésből.)

A metHb – H_2O_2 reakcióval és az oxihb H_2O_2 -dal lejátszódó reakcióval generált ferril-Hb-származék szulfiddal való reakcióiban kapott látszólagos sebességi állandók értékei az alfa- és a béta-lánc reaktivására nézve nagyon hasonló értékeket adtak. Ezen hasonlóságok alapján azt a következtetést vontuk

le, hogy az irodalmi előzményekkel összhangban valóban ugyanazon ferril-Hb-származék képződik a metHb és az oxiHb H_2O_2 -dal való reakcióiban.

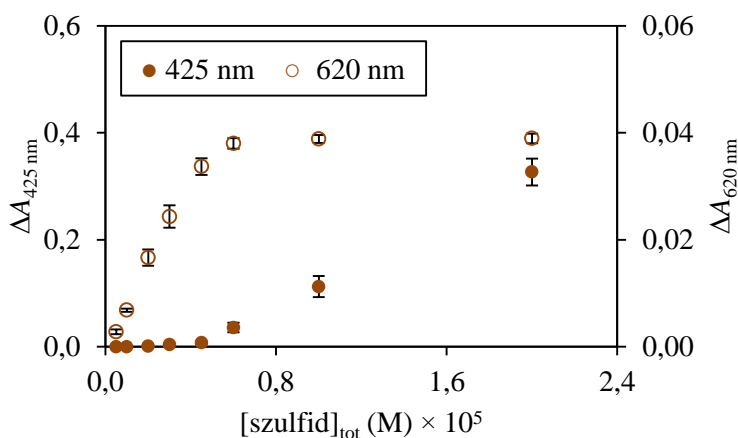
A ferril-Hb-származék szulfiddal való reakció kinetikáját a szulfhemoglobin képződésének hullámhosszánál, 620 nm-nél is követtük. Annak ellenére, hogy ilyen körülmények mellett is kétlépéses volt a folyamat és a kinetikai görbékre két exponenciális tagból álló összefüggés jól illeszthető volt, mégis a 600 nm alatt detektált reakcióknál nagyságrendekkel gyorsabb reakciókat tapasztaltunk. Ez esetben is az alfa- és béta-láncok reaktivitása eltérő volt, valamint a sebességi állandók lineárisan függtek a szulfid koncentrációjától. A látszólagos másodrendű sebességi állandókra a következő becsült értékeket kaptuk: $(1,7 \pm 0,2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ és $(6,5 \pm 0,3) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, mely értékeket a szulfhemoglobin képződéséhez rendeltük (37. ábra).



37. ábra. A szulfid – ferril-Hb-származék reakció sebességi állandóinak szulfidkoncentráció-függése. ○ és □: mért adatsorok, —: illesztett egyenesek. $[\text{metHb}] = 4,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $2,0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ foszfátpuffer, $\text{pH} = 7,40$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda = 620 \text{ nm}$, $t_{\text{készletetés}} = 400 \text{ s}$. α -lánc: $y = 169,23x - 3,9267$, β -lánc: $y = 64,951x - 0,2711$. (Szórás: 3 független mérésből.)

A képződő ferril-Hb-származékok szulfiddal való spektrofotometriás titrálása révén, a ferril-Hb-származék- és szulfidkoncentráció arányok változtatásával megállapítottuk, hogy a 600 nm felett és alatt detektált reakciók nem konszekutív, hanem egymással párhuzamos reakciók (38. ábra). Ezeknek a különböző reakcióknak az abszorbanciaváltozásait vizsgálva arra a

következtetésre jutottunk, hogy a H_2O_2 és a Hb 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. Azonban jelenleg nem tudjuk, hogy melyek ezek a ferrilformák, de további vizsgálatokat folytatunk ezek jellemzésére, illetve toxikus tulajdonságainak megállapítására.



38. ábra. A növekvő szulfidkoncentrációval változó ferril-Hb-származék – szulfid reakciók abszorbanciaváltozása 425 nm-nél (●) és 620 nm-nél (○). $[\text{metHb}] = 1,0 \cdot 10^{-5}$ M, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \cdot 10^{-5}$ M, $2,0 \cdot 10^{-2}$ M foszfátpuffer, pH = 7,40, $T = 25$ °C, $t_{\text{késleltetés}} = 400$ s. (Szórás: 3 független mérésből.)

A szulfid és a ferril-Hb-származékok mért sebességi állandói nagyságrendekkel gyorsabb reakciót reprezentálnak, mint a ferril-Hb-származék aszkorbáttal vagy húgysavval való reakciói,¹²⁹ ami azt jelzi, hogy a reakció biológiai rendszerben potenciálisan végbe mehet. Ezen túlmenően, a ferril-Hb-származékok mért stabilitása relatíve nagy, ami arra utal, hogy a hemoglobin-polimerek (Hb-polimerek) képződésének ezeknél a reakcióknál sokkal lassabbnak kell lennie. A Hb-polimerek képződéséről kimutatták, hogy a ferril-Hb-származék képződésén keresztül játszódik le, és képződésük az atheroszklerózis okozta plakkok szétrepedésével összefüggésbe hozható. Ezeket a Hb-polimereket a komplikált léziókban detektálták, ami arra utal, hogy a ferril-Hb-származék viszonylag nagy élettartamú ebben a közegben.

Azt figyeltük meg, hogy az atheroszklerotikus léziókban a Hb jelenléte indukálja a CSE enzim szulfid termelését, míg a komplikált plakkokban a CSE enzim expressziója alacsonyabb volt; vagyis a komplikált léziókban a szulfid hatása nem érvényesülhetett. Kísérleteink alapján úgy gondoljuk, hogy a ferril-Hb-származék okozza a komplikációt és a CSE enzim termelődésének fokozását is. Véleményünk szerint az atheroszklerotikus plakkokban a szulfidnak védő hatása van. Erre utalt azon megfigyelésünk is, hogy a lipid-peroxidok és a ferril-Hb-származék reakciójában képződő lipid oxidációs termékeinek mennyisége *i)* nagyon jó egyezést mutatott a komplikált vagy nem komplikált léziók mennyiségével *ii)* *in vitro* rendszerekben szulfid hatására csökkent. Továbbá a sejtes vagy klinikai mintákban a hemoglobin-polimerizációt is nagymértékben gátolja a szulfid vagy a szulfid donorok jelenléte, ezért a vizsgált szulfid általi ferril-Hb-származék redukció magyarázatként szolgálhat a szulfid védő hatására atheroszklerózis esetén.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori munkámban összegeztem az egyes szulfid-detektálási módszerek előnyeit és hátrányait. A módszerek elemzése lehetővé tette a biológiai rendszerekben detektált szulfidkoncentrációk között észlelt nagy eltérések értelmezését. Ezen eltérések leggyakoribb okának az eltérő kísérleti körülmények alkalmazását és az irreverzibilis származékképzésen, a szulfid elpárologtatásán, illetve a szulfid csapadék formájában való eltávolításán alapuló módszereket találtuk, mivel ezen módszerek a szabad és kötött szulfid egyensúlyát eltolják, ezáltal túlbecsülve a szabad szulfidkoncentrációt.

Tisztáztuk a szulfid reagensként való alkalmazásához szükséges kísérleti körülményeket azáltal, hogy optimalizáltuk a szulfidoldat tárolását, készítését, koncentrációjának ellenőrzését. Kimutattuk, hogy az általunk megvizsgált, a kereskedelemben forgalmazott szulfid tartalmú vegyszerek mindegyike jelentős koncentrációban tartalmaz poliszulfid-szennyeződések. Kidolgoztunk egy eljárást, mely által viszonylag tiszta és stabil vizes szulfidoldatot készíthetünk és tárolhatunk. A $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ kristályok felszínének legalább háromszor háromszorosan ionmentesített vízzel történő lemosását követően ionmentesített vízben argon gáz átbuborékolatásával segített oldódással készítettük a szulfid törzsoldatot. Megállapítottuk, hogy a legjobb módszer a szulfid törzsoldat tárolására, ha sötétben, jégen, argonnal telített háromszorosan ionmentesített vízben tároljuk, és használat előtt DTPA-t tartalmazó pufferrel hígítjuk. Ezek mellett igazoltuk, hogy a DTPA önmagában nem alkalmas az oldatok szulfidtartalmának stabilizálására.

A törzsoldatok szulfid koncentrációjának ellenőrzésére két módszer használatát javasoltuk, mely módszerek együttes alkalmazásával megállapítható

az oldatok szennyezettségének mértéke. Emellett a TRIS-pufferról bebizonyítottuk, hogy jobb puffer a szulfid reakcióinak tanulmányozásához, mint a PBS, mert kisebb mennyiségben tartalmaz fémszennyeződések. Megállapítottuk továbbá, hogy különböző pufferelt oldatok szulfidtartalma gyorsabban csökkent savas pH-tartományban, amiből azt a következtetést vontuk le, hogy a szulfidvesztés elsősorban kipárolgás eredménye.

Értelmeztük a perszulfidképződés molekuláris mechanizmusát a diszulfid kötéseknél a szulfiddal lejátszódó reakciójában, amire egy általános kinetikai modellt állítottunk fel. Ezt a modellt alkalmaztuk a DTNB és a szulfid közötti reakcióra megállapítva, hogy a sebességmeghatározó lépés a DTNB és a szulfid bimolekuláris reakciója, amely 1 mol TNB-perszulfidot és 1 mol TNB-molekulát ad. A második reakciólépésben a TNB-SSH reagál egy másik szulfidmolekulával TNB és HSSH képződése mellett. Ezt követően a HSSH diszproporcionálódik vagy reagál egy TNB-perszulfiddal, mindkét reakció poliszulfidokat eredményez. Megállapítottuk az első reakciólépésről, hogy a reakció a HS^- -molekula nukleofil támadásával indul, ezért a kezdeti reakcióban a HS^- -forma a meghatározó reakciópartner. Meghatároztuk ezen reakció másodrendű sebességi állandóját. A TNB-SSH szulfiddal való reakció látszólagos másodrendű sebességi állandójának lehetséges tartományára kinetikai szimulációk segítségével becslést tettünk.

A cisztin és a GSSG szulfiddal való reakciójáról megállapítottuk, hogy ezek a reakciók lassabbak, mint a DTNB és a szulfid közötti reakció, és igazoltuk, hogy a Cys-SSH-származékok jóval stabilabbak, mint a TNB-perszulfidok. Igazoltuk, hogy a reakciók egy többlépéses egyensúlyi folyamat mentén zajlanak le, ahol poliszulfid hozzáadásával az egyensúly eltolódik a perszulfidképződés irányába, és a Cys és a Cys-SSH képződése mellett további Cys-származékok is keletkeznek.

A diszulfid szulfid általi redukciójáról megállapítottuk, hogy biológiailag feltehetően jelentőséggel bír, és a diszulfidok kémiai tulajdonságaira nézve termodinamikai és kinetikai szempontból specifikusak.

Az emberi szervezetben képződő mikroorganizmusok elpusztításáért felelős klóraminok közül a TauCl és a GlyCl szulfiddal lejátszódó reakcióinak mechanizmusára javaslatot tettünk. Mindkét esetben két reakciót detektáltunk spektrofotometriásan a poliszulfidok elnyelési hullámhosszán. Megállapítottuk a

poliszulfidok UV-Vis spektrális tulajdonságainak ismeretében, hogy a TauCl és a GlyCl, mint modell klóraminok szulfiddal való reakcióiban, szulfidfelesleg mellett, poliszulfidok képződnek. A folyamat két, kinetikailag részben elkülönülő reakciólépéssel írható le. A gyorsabb reakciót a deprotonált HS^- és a protonált klóramincsoportok között lejátszódó reakciónak tulajdonítottuk, ami eltérő sebességgel ment végbe a TauCl-nal, illetve a GlyCl-nel lezajló reakciókban. Meghatároztuk a reakciókat leíró másodrendű sebességi állandók értékeit. A lassabb, másodrendű reakciót a HSSH diszproporcionálódásához rendeltük, ami a két rendszer esetén csaknem azonos sebességgel ment végbe. Eredményink szerint ezek a reakciók lejátszódhatnak fiziológias körülmények között is, ezáltal potenciálisan befolyásolhatják a szulfid biológiai viselkedését.

A metHb hemcsoportját peroxid-származékokkal reagáltatva nagyon reaktív Fe^{4+} centrumokat tartalmazó ferril-Hb-származékok képződnek. Az így előállított ferril-Hb-származék szulfiddal való reakciójának kinetikáját tanulmányozva megállapítottuk, hogy a 600 nm alatt három különböző hullámhosszon detektált biexponenciális jelleget mutató reakciók hullámhossztól függetlenül azonos sebességgel mennek végbe. Ezen reakciókra számolt látszólagos másodrendű sebességi állandók értékeit az irodalmi adatok ismeretében a Hb alfa- és béta-láncainak különböző hemcsoportjaihoz rendeltük.

Ferril-Hb-származékot az oxiHb és H_2O_2 reakciójával is készítettünk, és 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 a metHb – H_2O_2 reakcióval képzett ferril-Hb-származék szulfiddal való reakcióban kapott értékekhez képest. A látszólagos másodrendű sebességi állandók hasonlóságából azt a következtetést vontuk le, hogy ugyanazon ferril-Hb-forma képződik a metHb – H_2O_2 és az oxiHb – H_2O_2 reakcióban.

A ferril-Hb-származék szulfiddal való reakcióját a szulfhemoglobin-képződési hullámhosszán, 620 nm-nél vizsgálva megállapítottuk, hogy az alfa- és béta-láncok eltérő reaktivitása nagyságrendekkel nagyobb, mint a 600 nm alatt detektált reakcióké. A ferril-Hb-származékok szulfiddal való titrálása révén megállapítottuk, hogy a 600 nm felett és alatt detektálható reakciók párhuzamosak, és a H_2O_2 és a Hb-származékok reakcióiban képződő ferril-Hb-

származék két különböző reaktivitású terméket ad, kb. 50–50 % arányban. A reakcióban képződő szulfhemoglobin kizárólag a gyorsabban reagáló ferrilforma reakciójának köszönhető.

7. SUMMARY

In my PhD work I critically reviewed the advantages and disadvantages of the most extensively used sulfide detection methods. Detailed analysis of the methods provided novel insights into the reasons behind the observed large differences in previously detected physiological sulfide concentrations. The most common cause of the discrepancies was associated with the applied different experimental conditions. Methods that contain an irreversible derivatization of sulfide, sulfide precipitation or volatilization of H₂S are likely to overestimate free sulfide levels by shifting the equilibria between biomolecule-bound and free sulfide.

Based on systematic analyses we developed a protocol for reproducible sulfide solution preparation by optimizing storage, preparation and concentration measurement conditions. More specifically we demonstrated that there are polysulfide contaminants at significant concentration levels in all examined, commercially distributed sulfide chemicals. We have developed a method that allows the preparation and storage of relatively pure and stable aqueous sulfide solutions. Most notably in order to avoid significant amounts of polysulfide contaminations in stock solutions we found that it is necessary to rigorously wash the surface area of Na₂S·9H₂O crystals with deionized water before their dissolution to make stock solutions is carried out under argon. Sulfide stock solutions can be stored for a few hours in the dark, on ice in argon saturated threefold deionized water. Working solutions should only be prepared from stock solutions immediately before using them by dilution with DTPA containing buffer. Notably, we proved that DTPA in itself is not suitable for stabilization of sulfide solutions.

The use of TRIS buffer is preferred over PBS, because it contains less transition metal contaminants and therefore results in slower oxygen-mediated sulfide oxidation. We observed that the sulfide content of different buffered solutions decreased more quickly at lower pH values because it is primarily due to evaporation. We proposed two parallel methods for concentration determination of freshly made sulfide stock solutions, which allows for the estimation of contaminants.

We investigated the kinetics and mechanisms of persulfide formation in the reactions of disulfide species with sulfide. By the aid of stopped flow-experiments we demonstrated that in the reactions of the model disulfide, DTNB, with sulfide the rate determining step is the bimolecular reaction between the reactant species producing a TNB-SSH and a TNB molecule. In the second step, TNB-SSH reacts with another sulfide to give TNB and HSSH. Subsequently, HSSH either disproportionates or reacts with another TNB-persulfide, eventually yielding inorganic polysulfide species. We have demonstrated that the first reaction step starts with a nucleophilic attack of HS^- on DTNB, designating HS^- as the dominant reactive sulfide protonation form in this system. We determined the pH independent second-order rate constant for this reaction. Furthermore, using kinetic simulations, we estimated a range for the second-order rate constant of the detected subsequent reaction step, i.e. the reduction of TNB-SSH by sulfide.

We showed that the reaction of cystine or GSSG with sulfide is orders of magnitude slower than the reaction of DTNB with sulfide and that Cys-persulfide derivatives are more stable than TNB-persulfide. We proposed a general model for the reaction of sulfide with disulfide species, which proceeds in a multistep equilibrium processes along the disulfide \rightleftharpoons persulfide \rightleftharpoons polysulfide axis. The true equilibrium nature of the cysteine – sulfide system was corroborated by the fact that changing the concentration ratios of the reagent sulfide or product polysulfide species shifted speciation.

In conclusion, we demonstrated that, determined by the chemical properties of the reagent disulfide species, the kinetic and thermodynamic properties of their reactions with sulfide show large variations, which is a hallmark of biological selectivity.

We also investigated the kinetics and mechanisms of the redox reactions between sulfide and two different chloramine derivatives, TauCl and GlyCl. First, on the basis of UV-Vis spectral properties we confirmed that polysulfides are the major products in the reaction of TauCl and GlyCl when an excess of sulfide was used over the chloramines. Two reactions were detected in both cases by following the formation of polysulfides using stopped-flow spectrophotometry. The faster reaction was shown to be the bimolecular reaction between the deprotonated HS^- and the corresponding protonated chloramine species, and the pH independent second order rate constants were evaluated for both TauCl and GlyCl. The subsequent slower, second-order reaction exhibited similar kinetic properties in both systems and was consistent with the disproportionation reaction of HSSH. Our results shed light on biologically relevant sulfide oxidation processes to produce the bioactive polysulfide species.

Highly reactive ferryl-Hb derivatives are formed in the reactions of hemoglobin heme groups with H_2O_2 . We investigated the kinetics and mechanisms of the reactions of these ferryl-Hb derivatives with sulfide. We observed a bi-exponential character for the detected kinetic traces below 600 nm. Based on literature, these reactions are explained by the different reactivities of the heme groups on the alpha and beta chains of hemoglobin.

Ferryl-Hb derivatives were also generated in the reactions of oxyHb with H_2O_2 . The measured kinetic properties upon mixing these solutions with sulfide were very similar to what we observed when the ferryl-Hb species were generated from metHb. Therefore, we concluded that the same ferryl-Hb derivatives are formed in the reactions of metHb and oxyHb with H_2O_2 .

Interestingly, further investigating the kinetics of the reactions of ferryl-Hb derivatives with sulfide by following the formation of sulfhemoglobin at 620 nm resulted in 2 orders of magnitude larger rate constants. Spectrophotometric titration studies in the UV-visible range suggested that the kinetically separated reactions below and above 600 nm are parallel and not consecutive reactions. Therefore, we proposed that ferryl-Hb formation in the reactions of Hb with H_2O_2 provides two different ferryl-Hb products, which exhibit orders of magnitude different reactivities with sulfide. These ferryl-Hb derivatives are formed at about 50–50 % yield in the reaction of metHb with H_2O_2 . The formation of sulfhemoglobin is exclusively due to the reactions of the more

sulfide reactive ferryl-Hb derivative. Our results provided a novel protecting mechanism for sulfide against Hb-induced oxidative stress, which was underlined by detailed biological studies in human atherosclerosis in Prof. József Balla's laboratory.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Hugo, V.: *A nyomorultak*, **1862**.
- [2] Earnshaw, A.; Greenwood, N. N.: *Chemistry of the Elements*, **1997**.
- [3] Wang, R.: Physiological Implications of Hydrogen Sulfide: A Whiff Exploration That Blossomed. *Physiological Reviews* **2012**, *92*, 791-896.
- [4] Fitch, A. N.; Cockroft, J. K.: A new structure for the lowest-temperature phase of solid hydrogen sulphide. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communication* **1990**, 515-516.
- [5] Beauchamp, R. O.; Bus, J. S.; Popp, J. A.; Boreiko, C. J.; Andjelkovich, D. A.: A Critical-Review of the Literature on Hydrogen-Sulfide Toxicity. *CRC Critical Reviews in Toxicology* **1984**, *13*, 25-97.
- [6] Warenycia, M. W.; Goodwin, L. R.; Benishin, C. G.; Reiffenstein, R. J.; Francom, D. M.; Taylor, J. D.; Dieken, F. P.: Acute Hydrogen-Sulfide Poisoning - Demonstration of Selective Uptake of Sulfide by the Brain-Stem by Measurement of Brain Sulfide Levels. *Biochemical Pharmacology* **1989**, *38*, 973-981.
- [7] Goodwin, L. R.; Francom, D.; Dieken, F. P.; Taylor, J. D.; Warenycia, M. W.; Reiffenstein, R. J.; Dowling, G.: Determination of Sulfide in Brain-Tissue by Gas Dialysis Ion Chromatography - Postmortem Studies and 2 Case-Reports. *Journal of Analytical Toxicology* **1989**, *13*, 105-109.
- [8] Wang, R.: Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB Journal* **2002**, *16*, 1792-1798.
- [9] Abe, K.; Kimura, H.: The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *Journal of Neuroscience* **1996**, *16*, 1066-1071.
- [10] Wallace, J. L.: Physiological and Pathophysiological Roles of Hydrogen Sulfide in the Gastrointestinal Tract. *Antioxidants & Redox Signaling* **2010**, *12*, 1125-1133.
- [11] Kimura, H.: Hydrogen Sulfide: From Brain to Gut. *Antioxidants & Redox Signaling* **2010**, *12*, 1111-1123.
- [12] Lefer, D. J.: A new gaseous signaling molecule emerges: Cardioprotective role of hydrogen sulfide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*, 17907-17908.
- [13] Li, L.; Bhatia, M.; Moore, P. K.: Hydrogen sulphide - a novel mediator of inflammation? *Current Opinion in Pharmacology* **2006**, *6*, 125-129.

- [14] Yang, G.; Wu, L.; Jiang, B.; Yang, W.; Qi, J.; Cao, K.; Meng, Q.; Mustafa, A. K.; Mu, W.; Zhang, S.; Snyder, S. H.; Wang, R.: H₂S as a Physiologic Vasorelaxant: Hypertension in Mice with Deletion of Cystathionine γ -Lyase. *Science* **2008**, *322*, 587-590.
- [15] Fu, M.; Zhang, W. H.; Wu, L. Y.; Yang, G. D.; Li, H. Z.; Wang, R.: Hydrogen sulfide (H₂S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, *109*, 2943-2948.
- [16] Kimura, H.; Shibuya, N.; Kimura, Y.: Hydrogen Sulfide Is a Signaling Molecule and a Cytoprotectant. *Antioxidants & Redox Signaling* **2012**, *17*, 45-57.
- [17] Greiner, R.; Palinkas, Z.; Basell, K.; Becher, D.; Antelmann, H.; Nagy, P.; Dick, T. P.: Polysulfides Link H₂S to Protein Thiol Oxidation. *Antioxidants & Redox Signaling* **2013**, *19*, 1749-1765.
- [18] Palinkas, Z.; Furtmuller, P. G.; Nagy, A.; Jakopitsch, C.; Pirker, K. F.; Magierowski, M.; Jasnos, K.; Wallace, J. L.; Obinger, C.; Nagy, P.: Interactions of hydrogen sulfide with myeloperoxidase. *British Journal of Pharmacology* **2014**, *172*, 1516-1532.
- [19] Cortese-Krott, M. M.; Kuhnle, G. G. C.; Dyson, A.; Fernandez, B. O.; Grman, M.; DuMond, J. F.; Barrow, M. P.; McLeod, G.; Nakagawa, H.; Ondrias, K.; Nagy, P.; King, S. B.; Saavedra, J. E.; Keefer, L. K.; Singer, M.; Kelm, M.; Butler, A. R.; Feelisch, M.: Key bioactive reaction products of the NO/H₂S interaction are S/N-hybrid species, polysulfides, and nitroxyl. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2015**, *112*, E4651-E4660.
- [20] Nagy, P.: Mechanistic Chemical Perspective of Hydrogen Sulfide Signaling. *Methods in Enzymology* **2015**, *554*, 3-29.
- [21] Nagy, P.; Winterbourn, C. C.: Rapid Reaction of Hydrogen Sulfide with the Neutrophil Oxidant Hypochlorous Acid to Generate Polysulfides. *Chemical Research in Toxicology* **2010**, *23*, 1541-1543.
- [22] Mustafa, A. K.; Gadalla, M. M.; Sen, N.; Kim, S.; Mu, W. T.; Gazi, S. K.; Barrow, R. K.; Yang, G. D.; Wang, R.; Snyder, S. H.: H₂S Signals Through Protein S-Sulfhydration. *Science Signaling* **2009**, *2*, ra72.
- [23] Perrin, D. D.: *Ionization Constants of Inorganic Acids and Bases in Aqueous Solution*, **1982**; Vol. second edition.
- [24] Olson, K. R.: Is hydrogen sulfide a circulating "gasotransmitter" in vertebrate blood? *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **2009**, *1787*, 856-863.

- [25] Olson, K. R.: A Practical Look at the Chemistry and Biology of Hydrogen Sulfide. *Antioxidants & Redox Signaling* **2012**, *17*, 32-44.
- [26] Mathai, J. C.; Missner, A.; Kugler, P.; Saparov, S. M.; Zeidel, M. L.; Lee, J. K.; Pohl, P.: No facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106*, 16633-16638.
- [27] Chen, K. Y.; Morris, J. C.: Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by O₂. *Environmental Science & Technology* **1972**, *6*, 529-537.
- [28] Luther, G. W.; Findlay, A. J.; MacDonald, D. J.; Owings, S. M.; Hanson, T. E.; Beinart, R. A.; Girguis, P. R.: Thermodynamics and kinetics of sulfide oxidation by oxygen: a look at inorganically controlled reactions and biologically mediated processes in the environment. *Frontiers in Microbiology* **2011**, *2*, 62.
- [29] Tapley, D. W.; Buettner, G. R.; Shick, J. M.: Free radicals and chemiluminescence as products of the spontaneous oxidation of sulfide in seawater, and their biological implications. *Biological Bulletin* **1999**, *196*, 52-56.
- [30] Kamyshny, A.; Gofman, A.; Gun, J.; Rizkov, D.; Lev, O.: Equilibrium distribution of polysulfide ions in aqueous solutions at 25 degrees C: A new approach for the study of polysulfides equilibria. *Environmental Science & Technology* **2004**, *38*, 6633-6644.
- [31] Carballal, S.; Trujillo, M.; Cuevasanta, E.; Bartesaghi, S.; Moller, M. N.; Folkes, L. K.; Garcia-Bereguain, M. A.; Gutierrez-Merino, C.; Wardman, P.; Denicola, A.; Radi, R.; Alvarez, B.: Reactivity of hydrogen sulfide with peroxynitrite and other oxidants of biological interest. *Free Radical Biology and Medicine* **2011**, *50*, 196-205.
- [32] Hoffmann, M. R.: Kinetics and Mechanism of Oxidation of Hydrogen-Sulfide by Hydrogen-Peroxide in Acidic Solution. *Environmental Science & Technology* **1977**, *11*, 61-66.
- [33] Alvarez-Castelao, B.; Schuman, E. M.: The Regulation of Synaptic Protein Turnover. *The Journal of Biological Chemistry* **2015**, *290*, 28623-29630.
- [34] Vasas, A.; Doka, E.; Fabian, I.; Nagy, P.: Kinetic and thermodynamic studies on the disulfide-bond reducing potential of hydrogen sulfide. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* **2015**, *46*, 93-101.
- [35] Awata, S.; Nakayama, K.; Suzuki, I.; Sugahara, K.; Kodama, H.: Changes in Cystathionine Gamma-Lyase in Various Regions of Rat-Brain during Development. *Biochemistry and Molecular Biology International* **1995**, *35*, 1331-1338.

- [36] Kabil, O.; Banerjee, R.: Enzymology of H₂S Biogenesis, Decay and Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling* **2014**, *20*, 770-782.
- [37] Yamanishi, T.; Tuboi, S.: The Mechanism of the L-Cystine Cleavage Reaction Catalyzed by Rat-Liver Gamma-Cystathionase. *Journal of Biochemistry* **1981**, *89*, 1913-1921.
- [38] Ida, T.; Sawa, T.; Ihara, H.; Tsuchiya, Y.; Watanabe, Y.; Kumagai, Y.; Suematsu, M.; Motohashi, H.; Fujii, S.; Matsunaga, T.; Yamamoto, M.; Ono, K.; Devarie-Baez, N. O.; Xian, M.; Fukuto, J. M.; Akaike, T.: Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014**, *111*, 7606-7611.
- [39] Dóka, É.; Pader, I.; Bíró, A.; Johansson, K.; Cheng, Q.; Ballagó, K.; Pastor-Flores; Prigge, J. R.; Dick, T. P.; Schmidt, E. E.; Arnér, E. S. J.; Nagy, P.: Novel persulfide detection method reveals protein persulfide and polysulfide reducing functions of thioredoxin- and glutathione-systems. *Science Advances* **2016**, *2*, No.1 In press.
- [40] Szabo, C.; Ransy, C.; Modis, K.; Andriamihaja, M.; Murgheș, B.; Coletta, C.; Olah, G.; Yanagi, K.; Bouillaud, F.: Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms. *British Journal of Pharmacology* **2014**, *171*, 2099-2122.
- [41] Hildebrandt, T. M.; Grieshaber, M. K.: Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. *Febs Journal* **2008**, *275*, 3352-3361.
- [42] Cherney, M. M.; Zhang, Y. F.; Solomonson, M.; Weiner, J. H.; James, M. N. G.: Crystal Structure of Sulfide:Quinone Oxidoreductase from Acidithiobacillus ferrooxidans: Insights into Sulfidotrophic Respiration and Detoxification. *Journal of Molecular Biology* **2010**, *398*, 292-305.
- [43] Melideo, S. L.; Jackson, M. R.; Jorns, M. S.: Biosynthesis of a Central Intermediate in Hydrogen Sulfide Metabolism by a Novel Human Sulfurtransferase and Its Yeast Ortholog. *Biochemistry* **2014**, *53*, 4739-4753.
- [44] Kimura, H.: Signaling molecules: Hydrogen sulfide and polysulfide. *Antioxidants & Redox Signaling* **2015**, *22*, 362-376.
- [45] Ono, K.; Akaike, T.; Sawa, T.; Kumagai, Y.; Wink, D. A.; Tantillo, D. J.; Hobbs, A. J.; Nagy, P.; Xian, M.; Lin, J.; Fukuto, J. M.: The Redox Chemistry and Chemical Biology of H₂S, Hydropersulfides and Derived Species: Implications to Their Possible Biological Activity and Utility. *Free Radical Biology and Medicine* **2014**, *77*, 82-94.

- [46] Giggenbach, W.: Optical-spectra and equilibrium distribution of polysulfide ions in aqueous-solution at 20 degrees. *Inorganic Chemistry* **1972**, 1201–1207.
- [47] Wedmann, R.; Bertlein, S.; Macinkovic, I.; Boltz, S.; Miljkovic, J. L.; Munoz, L. E.; Herrmann, M.; Filipovic, M. R.: Working with "H₂S": Facts and apparent artifacts. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* **2014**, *41*, 85-96.
- [48] Das, T. N.; Huie, R. E.; Neta, P.; Padmaja, S.: Reduction potential of the sulfhydryl radical: Pulse radiolysis and laser flash photolysis studies of the formation and reactions of center dot SH and HSSH center dot(-) in aqueous solutions. *Journal of Physical Chemistry A* **1999**, *103*, 5221-5226.
- [49] Nagy, P.: Kinetics and Mechanisms of Thiol-Disulfide Exchange Covering Direct Substitution and Thiol Oxidation-Mediated Pathways. *Antioxidants & Redox Signaling* **2013**, *18*, 1623-1641.
- [50] Nagy, P.; Winterbourn, C. C.: *Redox chemistry of biological thiols*, **2010**; Vol. 4.
- [51] Winnewisser, G.; Lewen, F.; Thorwirth, S.; Behnke, M.; Hahn, J.; Gauss, J.; Herbst, E.: Gas-phase detection of HSOH: Synthesis by flash vacuum pyrolysis of di-tert-butyl sulfoxide and rotational-torsional spectrum. *Chemistry-a European Journal* **2003**, *9*, 5501-5510.
- [52] Hampton, M. B.; Kettle, A. J.; Winterbourn, C. C.: Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* **1998**, *92*, 3007-3017.
- [53] Ashby, M. T.: Chapter 8 - Hypothiocyanite. In *Advances in Inorganic Chemistry*; Rudi van, E., Ivana, I.-B., Eds.; Academic Press, **2012**; Vol. 64; 263-303.
- [54] Paul, B. D.; Snyder, S. H.: H₂S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2012**, *13*, 499-507.
- [55] Toohey, J. I.: The conversion of H₂S to sulfane sulfur. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2012**, *13*, 804-804.
- [56] Cavallini, D.; Federici, G.; Barboni, E.: Interaction of Proteins with Sulfide. *European Journal of Biochemistry* **1970**, *14*, 169-174.
- [57] Francoleon, N. E.; Carrington, S. J.; Fukuto, J. M.: The reaction of H₂S with oxidized thiols: Generation of persulfides and implications to H₂S biology. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2011**, *516*, 146-153.
- [58] Nielsen, R. W.; Tachibana, C.; Hansen, N. E.; Winther, J. R.: Trisulfides in Proteins. *Antioxidants & Redox Signaling* **2011**, *15*, 67-75.
- [59] Kabil, O.; Banerjee, R.: Redox Biochemistry of Hydrogen Sulfide. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 21903-21907.

- [60] Paulsen, C. E.; Carroll, K. S.: Cysteine-Mediated Redox Signaling: Chemistry, Biology, and Tools for Discovery. *Chemical Reviews* **2013**, *113*, 4633-4679.
- [61] Toohey, J. I.: Sulfur signaling: Is the agent sulfide or sulfane? *Analytical Biochemistry* **2011**, *413*, 1-7.
- [62] Zhang, D. H.; Macinkovic, I.; Devarie-Baez, N. O.; Pan, J.; Park, C. M.; Carroll, K. S.; Filipovic, M. R.; Xian, M.: Detection of Protein S-Sulfhydration by a Tag-Switch Technique. *Angewandte Chemie-International Edition* **2014**, *53*, 575-581.
- [63] Poole, L. B.; Karplus, P. A.; Claiborne, A.: Protein sulfenic acids in redox signaling. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2004**, *44*, 325-347.
- [64] Ashby, M. T.; Aneetha, H.: Reactive sulfur species: Aqueous chemistry of sulfenyl thiocyanates. *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 10216-10217.
- [65] Nagy, P.; Lemma, K.; Ashby, M. T.: Reactive sulfur species: kinetics and mechanisms of the reaction of cysteine thiosulfinate ester with cysteine to give cysteine sulfenic acid. *Journal of Organic Chemistry* **2007**, *72*, 8838-8846.
- [66] Sen, N.; Paul, Bindu D.; Gadalla, Moataz M.; Mustafa, Asif K.; Sen, T.; Xu, R.; Kim, S.; Snyder, Solomon H.: Hydrogen Sulfide-Linked Sulfhydration of NF- κ B Mediates Its Antiapoptotic Actions. *Molecular Cell* **2012**, *45*, 13-24.
- [67] Zhao, K. X.; Ju, Y. J.; Li, S. S.; Altaany, Z.; Wang, R.; Yang, G. D.: S-sulfhydration of MEK1 leads to PARP-1 activation and DNA damage repair. *Embo Reports* **2014**, *15*, 792-800.
- [68] Mustafa, A. K.; Sikka, G.; Gazi, S. K.; Steppan, J.; Jung, S. M.; Bhunia, A. K.; Barodka, V. M.; Gazi, F. K.; Barrow, R. K.; Wang, R.; Amzel, L. M.; Berkowitz, D. E.; Snyder, S. H.: Hydrogen Sulfide as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Sulfhydrates Potassium Channels. *Circulation Research* **2011**, *109*, 1259-1269.
- [69] Hourihan, J. M.; Kenna, J. G.; Hayes, J. D.: The Gasotransmitter Hydrogen Sulfide Induces Nrf2-Target Genes by Inactivating the Keap1 Ubiquitin Ligase Substrate Adaptor Through Formation of a Disulfide Bond Between Cys-226 and Cys-613. *Antioxidants & Redox Signaling* **2013**, *19*, 465-481.
- [70] Krishnan, N.; Fu, C. X.; Pappin, D. J.; Tonks, N. K.: H₂S-Induced Sulfhydration of the Phosphatase PTP1B and Its Role in the Endoplasmic Reticulum Stress Response. *Science Signaling* **2011**, *4*, ra86.
- [71] Yang, G. D.; Zhao, K. X.; Ju, Y. J.; Mani, S.; Cao, Q. H.; Puukila, S.; Khaper, N.; Wu, L. Y.; Wang, R.: Hydrogen Sulfide Protects Against Cellular Senescence via S-Sulfhydration of Keap1 and Activation of Nrf2. *Antioxidants & Redox Signaling* **2013**, *18*, 1906-1919.

- [72] Jarosz, A. P.; Wei, W.; Gauld, J. W.; Auld, J.; Özcan, F.; Aslan, M.; Mutus, B.: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is inactivated by S-sulfuration in vitro. *Free Radical Biology and Medicine* **2015.**, 89, 512-521.
- [73] Pietri, R.; Roman-Morales, E.; Lopez-Garriga, J.: Hydrogen Sulfide and Heme proteins: Knowledge and Mysteries. *Antioxidants & Redox Signaling* **2011**, 15, 393-404.
- [74] Rios-Gonzalez, B. B.; Roman-Morales, E. M.; Pietri, R.; Lopez-Garriga, J.: Hydrogen sulfide activation in heme proteins: The sulfheme scenario. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2014**, 133, 78-86.
- [75] Powell, M. A.; Somero, G. N.: Hydrogen-Sulfide Oxidation Is Coupled to Oxidative-Phosphorylation in Mitochondria of Solemya-Reidi. *Science* **1986**, 233, 563-566.
- [76] Helmy, N.; Prip-Buus, C.; Vons, C.; Lenoir, V.; Abou-Hamdan, A.; Guedouari-Bounihi, H.; Lombes, A.; Bouillaud, F.: Oxidation of hydrogen sulfide by human liver mitochondria. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* **2014**, 41, 105-112.
- [77] Blackstone, E.; Roth, M. B.: Suspended animation-like state protects mice from lethal hypoxia. *Shock* **2007**, 27, 370-372.
- [78] Park, C. M.; Nagel, R. L.: Sulfhemoglobinemia - Clinical and Molecular Aspects. *New England Journal of Medicine* **1984**, 310, 1579-1584.
- [79] Berzofsky, J. A.; Peisach, J.; Horecker, B. L.: Sulfheme proteins. IV. The stoichiometry of sulfur incorporation and the isolation of sulfhem in the prosthetic group of sulfmyoglobin,. *The Journal of Biological Chemistry* **1972**, 247, 3783-3791.
- [80] Romero, F. J.; Ordonez, I.; Arduini, A.; Cadenas, E.: The Reactivity of Thiols and Disulfides with Different Redox States of Myoglobin - Redox and Addition-Reactions and Formation of Thiyl Radical Intermediates. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, 267, 1680-1688.
- [81] Smith, R. P.; Gosselin, R. E.: The influence of methemoglobinemia on the lethality of some toxic anions. Ii. Sulfide. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1964**, 6, 584-592.
- [82] Nakamura, S.; Nakamura, M.; Yamazaki, I.; Morrison, M.: Reactions of Ferryl Lactoperoxidase (Compound-Ii) with Sulfide and Sulfhydryl Compounds. *Journal of Biological Chemistry* **1984**, 259, 7080-7085.
- [83] Ohtaki, S.; Nakagawa, H.; Nakamura, M.; Yamazaki, I.: Reactions of Purified Hog Thyroid Peroxidase with H₂O₂, Tyrosine, and Methylmercaptoimidazole

- (Goitrogen) in Comparison with Bovine Lactoperoxidase. *Journal of Biological Chemistry* **1982**, 257, 761-766.
- [84] Nagy, P.; Palinkas, Z.; Nagy, A.; Budai, B.; Toth, I.; Vasas, A.: Chemical aspects of hydrogen sulfide measurements in physiological samples. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **2014**, 1840, 876-891.
- [85] Tonomura, B.; Nakatani, H.; Ohnishi, M.; Yamaguchiito, J.; Hiromi, K.: Test Reactions for a Stopped-Flow Apparatus - Reduction of 2,6-Dichlorophenolindophenol and Potassium Ferricyanide by L-Ascorbic-Acid. *Analytical Biochemistry* **1978**, 84, 370-383.
- [86] *The Bio Sequential DX-17MV. Sequential Stopped-Flow ASVD Spectrofluorimeter Hardware Manual; Applied Photophysics, 1994.*
- [87] Mylon, S. E.; Benoit, G.: Subnanomolar detection of acid-labile sulfides by the classical methylene blue method coupled to HPLC. *Environmental Science & Technology* **2001**, 35, 4544-4548.
- [88] Sakurai, H.; Lien, S.; Pietro, A. S.: Determination of Acid-Labile Sulfide and Zero-Valence Sulfur in Sub-Chloroplast Particles in the Presence of Sodium Dodecyl-Sulfate. *Analytical Biochemistry* **1982**, 119, 372-377.
- [89] Fogo, J. K.; Popowsky: Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide: methylene blue method. *Anal. Chem.* **1949**, 21, 732-734.
- [90] Hughes, M. N.; Centelles, M. N.; Moore, K. P.: Making and working with hydrogen sulfide The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: A review. *Free Radical Biology and Medicine* **2009**, 47, 1346-1353.
- [91] Cline, J.: Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* **1969**, 454-458.
- [92] Ellman, G. L.: A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1958**, 74, 443-450.
- [93] Nashef, A. S.; Osuga, D. T.; Feeney, R. E.: Determination of Hydrogen-Sulfide with 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid), N-Ethylmaleimide, and Parachloromercuribenzoate. *Analytical Biochemistry* **1977**, 79, 394-405.
- [94] Danehy, J. P.; Elia, V. J.; Lavelle, C. J.: Alkaline decomposition of organic disulfides. IV. Limitation on the use of Ellman's reagent. 2,2'-Dinitro-5,5'-dithiodibenzoic acid. *J. Org. Chem.* **1971**, 36, 1003-1005.
- [95] Shen, X. G.; Pattillo, C. B.; Pardue, S.; Bir, S. C.; Wang, R.; Kevil, C. G.: Measurement of plasma hydrogen sulfide in vivo and in vitro. *Free Radical Biology and Medicine* **2011**, 50, 1021-1031.

- [96] Wintner, E. A.; Deckwerth, T. L.; Langston, W.; Bengtsson, A.; Leviten, D.; Hill, P.; Insko, M. A.; Dumpit, R.; VandenEkart, E.; Toombs, C. F.; Szabo, C.: A monobromobimane-based assay to measure the pharmacokinetic profile of reactive sulphide species in blood. *British Journal of Pharmacology* **2010**, *160*, 941-957.
- [97] Lindell, H.; Jappinen, P.; Savolainen, H.: Determination of Sulfide in Blood with an Ion-Selective Electrode by Pre-Concentration of Trapped Sulfide in Sodium-Hydroxide Solution. *Analyst* **1988**, *113*, 839-840.
- [98] Mcanally, B. H.; Lowry, W. T.; Oliver, R. D.; Garriott, J. C.: Determination of Inorganic Sulfide and Cyanide in Blood Using Specific Ion Electrodes - Application to the Investigation of Hydrogen-Sulfide and Cyanide Poisoning. *Journal of Analytical Toxicology* **1979**, *3*, 111-114.
- [99] Toth, I.; Solymosi, P.; Szabo, Z.: Application of a Sulfide-Selective Electrode in the Absence of a Ph-Buffer. *Talanta* **1988**, *35*, 783-788.
- [100] Searcy, D. G.; Peterson, M. A.: Hydrogen sulfide consumption measured at low steady state concentrations using a sulfidostat. *Analytical Biochemistry* **2004**, *324*, 269-275.
- [101] Doeller, J. E.; Isbell, T. S.; Benavides, G.; Koenitzer, J.; Patel, H.; Patel, R. P.; Lancaster, J. R.; Darley-USmar, V. M.; Kraus, D. W.: Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues. *Analytical Biochemistry* **2005**, *341*, 40-51.
- [102] Funazo, K.; Tanaka, M.; Morita, K.; Kamino, M.; Shono, T.; Wu, H. L.: Pentafluorobenzyl Para-Toluenesulfonate as a New Derivatizing Reagent for Gas-Chromatographic Determination of Anions. *Journal of Chromatography* **1985**, *346*, 215-225.
- [103] Kage, S.; Nagata, T.; Kimura, K.; Kudo, K.: Extractive Alkylation and Gas-Chromatographic Analysis of Sulfide. *Journal of Forensic Sciences* **1988**, *33*, 217-222.
- [104] Hannestad, U.; Margheri, S.; Sorbo, B.: A Sensitive Gas-Chromatographic Method for Determination of Protein-Associated Sulfur. *Analytical Biochemistry* **1989**, *178*, 394-398.
- [105] Shen, X. G.; Peter, E. A.; Bir, S.; Wang, R.; Kevil, C. G.: Analytical measurement of discrete hydrogen sulfide pools in biological specimens. *Free Radical Biology and Medicine* **2012**, *52*, 2276-2283.
- [106] DeLeon, E. R.; Stoy, G. F.; Olson, K. R.: Passive loss of hydrogen sulfide in biological experiments. *Analytical Biochemistry* **2012**, *421*, 203-207.

- [107] Nagy, P.; Jameson, G. N. L.; Winterbourn, C. C.: Kinetics and Mechanisms of the Reaction of Hypothiocyanous Acid with 5-Thio-2-nitrobenzoic Acid and Reduced Glutathione. *Chemical Research in Toxicology* **2009**, *22*, 1833-1840.
- [108] Smith, R. M.; Martell, A. E.: *Critical Stability Constants*; Plenum Press: New York, **1976**; Vol. 4.
- [109] Rao, G. S.; Gorin, G.: Reaction of Cystine with Sodium Sulfide in Sodium Hydroxide Solution. *The Journal of Organic Chemistry* **1959**, *24*, 749-753.
- [110] Liu, D. K.; Chang, S. G.: Kinetic-Study of the Reaction between Cystine and Sulfide in Alkaline-Solutions. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **1987**, *65*, 770-774.
- [111] Moutiez, M.; Aumercier, M.; Teissier, E.; Parmentier, B.; Tartar, A.; Sergheraert, C.: Reduction of a Trisulfide Derivative of Glutathione by Glutathione Reductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1994**, *202*, 1380-1386.
- [112] Parmentier, B.; Moutiez, M.; Tartar, A.; Sergheraert, C.: Preparation of Trisulfide Derivatives of Cystine and Their Formation as by-Products during Peptide-Synthesis. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 3531-3534.
- [113] Kimura, Y.; Mikami, Y.; Osumi, K.; Tsugane, M.; Oka, J.; Kimura, H.: Polysulfides are possible H₂S-derived signaling molecules in rat brain. *FASEB Journal* **2013**, *27*, 2451-2457.
- [114] Koike, S.; Ogasawara, Y.; Shibuya, N.; Kimura, H.; Ishii, K.: Polysulfide exerts a protective effect against cytotoxicity caused by t-butylhydroperoxide through Nrf2 signaling in neuroblastoma cells. *FEBS Letters* **2013**, *587*, 3548-3555.
- [115] Calvo, P.; Crujeiras, J.; Rios, A.; Rios, M. A.: Nucleophilic substitution reactions of N-chloramines: Evidence for a change in mechanism with increasing nucleophile reactivity. *Journal of Organic Chemistry* **2007**, *72*, 3171-3178.
- [116] Ximenes, V. F.; Padovan, C. Z.; Carvalho, D. A.; Fernandes, J. R.: Oxidation of melatonin by taurine chloramine. *Journal of Pineal Research* **2010**, *49*, 115-122.
- [117] Nagy, P.; Ashby, M. T.: Reactive Sulfur Species: Kinetics and Mechanisms of the Oxidation of Cysteine by Hypohalous Acid to Give Cysteine Sulfenic Acid. *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 14082-14091.
- [118] Moreno, P. R.; Purushothaman, M.; Purushothaman, K. R.: Plaque neovascularization: defense mechanisms, betrayal, or a war in progress. *Evolving Challenges in Promoting Cardiovascular Health* **2012**, *1254*, 7-17.

- [119] Jeney, V.; Balla, G.; Balla, J.: Red blood cell, hemoglobin and heme in the progression of atherosclerosis. *Frontiers in Physiology* **2014**, *5*, 379.
- [120] Li, W.; Ostblom, M.; Xu, L. H.; Hellsten, A.; Leanderson, P.; Liedberg, B.; Brunk, U. T.; Eaton, J. W.; Yuan, X. M.: Cytocidal effects of atheromatous plaque components: the death zone revisited. *Faseb Journal* **2006**, *20*, 2281-2290.
- [121] Jeney, V.; Balla, J.; Yachie, A.; Varga, Z.; Vercellotti, G. M.; Eaton, J. W.; Balla, G.: Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood* **2002**, *100*, 879-887.
- [122] Ramirez, D. C.; Chen, Y. R.; Mason, R. P.: Immunochemical detection of hemoglobin-derived radicals formed by reaction with hydrogen peroxide: Involvement of a protein-tyrosyl radical. *Free Radical Biology and Medicine* **2003**, *34*, 830-839.
- [123] Mani, S.; Untereiner, A.; Wu, L.; Wang, R.: Hydrogen Sulfide and the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Antioxidants & Redox Signaling* **2013**, *20*, 805-817.
- [124] Wang, Y. F.; Zhao, X.; Jin, H. F.; Wei, H. L.; Li, W.; Bu, D. F.; Tang, X. Y.; Ren, Y.; Tang, C. S.; Du, J. B.: Role of Hydrogen Sulfide in the Development of Atherosclerotic Lesions in Apolipoprotein E Knockout Mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **2009**, *29*, 173-179.
- [125] Mani, S.; Li, H. Z.; Untereiner, A.; Wu, L. Y.; Yang, G. D.; Austin, R. C.; Dickhout, J. G.; Lhotak, S.; Meng, Q. H.; Wang, R.: Decreased Endogenous Production of Hydrogen Sulfide Accelerates Atherosclerosis. *Circulation* **2013**, *127*, 2523-2534.
- [126] Dijkhuizen, P.; Buurisma, A.; Gerding, A. M.; Zijlstra, W. G.: Sulfhemoglobin - Absorption-Spectrum, Millimolar Extinction Coefficient at Gamma=620 Nm, and Interference with Determination of Hemoglobin and of Hemoglobincyanide. *Clinica Chimica Acta* **1977**, *78*, 479-487.
- [127] Cooper, C. E.; Schaer, D. J.; Buehler, P. W.; Wilson, M. T.; Reeder, B. J.; Silkstone, G.; Svistunenko, D. A.; Bulow, L.; Alayash, A. I.: Haptoglobin Binding Stabilizes Hemoglobin Ferryl Iron and the Globin Radical on Tyrosine beta 145. *Antioxidants & Redox Signaling* **2013**, *18*, 2264-2273.
- [128] Reeder, B. J.: The Redox Activity of Hemoglobins: From Physiologic Functions to Pathologic Mechanisms. *Antioxidants & Redox Signaling* **2010**, *13*, 1087-1123.

- [129] Reeder, B. J.; Grey, M.; Silaghi-Dumitrescu, R. L.; Svistunenko, D. A.; Bulow, L.; Cooper, C. E.; Wilson, M. T.: Tyrosine Residues as Redox Cofactors in Human Hemoglobin IMPLICATIONS FOR ENGINEERING NONTOXIC BLOOD SUBSTITUTES. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, 283, 30780-30787.

9. FÜGGELÉK

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 Jeneý, 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 Pálinkás, 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

Posztterek

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 Fábíán 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 Fábíán 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 Fábíán 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, Fábíán István, Nagy Péter

A diszulfidok H₂S 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, Fábrián István, Nagy Péter

A hidrogén-szulfid klóraminokkal való reakcióinak kinetikája és mechanizmusa

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

Gyöngyöstarján, Magyarország