

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Ditrói Tamás

**A hidrogén-szulfid jelátviteli molekula detektálása
fiziológias rendszerekben**

DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A hidrogén-szulfid jelátviteli molekula detektálása
fiziológias rendszerekben**

Ditrói Tamás

Témavezető: Dr. Nagy Péter



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés.....	4
2.	Irodalmi áttekintés.....	10
2.1.	Mérési módszerek H_2S koncentráció meghatározására.....	10
2.2.	H_2S mérése vérből monobromobimános módszerrel	15
2.3.	Célkitűzés	19
3.	Metodikák.....	20
3.1.	Felhasznált anyagok	20
3.2.	Vérminták	20
3.3.	Alkalmazott műszerek	21
3.4.	Kalibrációs és kinetikai mérések Na_2S standard oldatokkal	21
3.5.	Vérminták feldolgozása („B” módszer)	23
3.6.	Paraméter-függések vizsgálata	23
3.7.	“A” módszer homocisztinuriás és PAD betegek vizsgálatánál	23
3.8.	HPLC mérések.....	24
3.9.	HPLC-MS/MS mérések.....	26
3.10.	ATB-346 Fázis 2 vizsgálata	26
3.11.	Homocisztinuriás betegek véreinek vizsgálata.....	27
3.12.	PAD betegekből H_2S szintek és CBS aktivitás mérése	27
3.13.	Adatok kiértékelése	27
4.	Eredmények.....	29
4.1.	Hidrogén-szulfid és monobromobimán közötti reakció kinetikai jellemzése	29
4.2.	Az alkilálási reakció kinetikai jellemzése vérben.....	37
4.3.	Az alkilálási reakció kinetikáját befolyásoló tényezők vizsgálata vérben.....	39
4.4.	Alkilálási idő.....	39
4.5.	MBB koncentráció.....	41
4.6.	pH	43
4.7.	Hőmérséklet.....	44
4.8.	Mintavétel és mintaelőkészítés során fellépő fizikai, kémiai és biológiai befolyásoló tényezők vizsgálata.....	45
4.9.	Fény zavaró hatása.....	46
4.10.	Reakció leállításának módja	48
4.11.	Pufferhatás vizsgálata	50
4.12.	Mintavevő cső hatása a mért szulfid szintre	53
4.13.	Négy különböző előkészítési módszer összehasonlítása	58
5.	A módszer validálása és alkalmazása betegmintákon.....	61
5.1.	A módszer hosszú távú reprodukálhatósága.....	61
5.2.	Módszer validálása etilmalonsav enkefalopátiás betegek vérével.....	63
5.3.	ATB-346 gyulladás- és fájdalomcsillapító szer fázis 2 vizsgálata	66
5.4.	Homocisztinuriás betegek véreinek vizsgálata	69
6.	Megbeszélés	75
7.	Összefoglalás.....	78

8.	Summary	80
9.	Irodalomjegyzék.....	82
9.1.	Hivatkozott közlemények	82
9.2.	Megjelent publikációk jegyzéke	89
10.	Tárgyszavak	94
11.	Köszönetnyilvánítás	95
12.	Függelék	96

Az értekezésben előforduló rövidítések magyarázata:

ACN	acetonitril
3-MST	<i>3-merkaptopiruvát-szulfurtranszferáz</i>
CARS	<i>ciszteinil-tRNS szintáz</i>
CBS	<i>cisztationin-béta-szintetáz enzim</i>
CBSD	CBS enzimhiány
CID	ütközés indukált disszociáció
COX	<i>ciklooxigenáz</i>
CSAD	<i>cisztein szulfinát dekarboxiláz</i>
CSE	<i>cisztationin-gamma-liáz</i>
DTNB	5,5'-ditiobisz-(2-nitrobenzoesav)
DTPA	dietilén-triamin-pentaecetsav
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EE	etilmalonsav enkefalopátia
EtAc	etil-acetát
ETHE1	<i>etilmalonsav enkefalopátia 1 protein</i>
FA	hangyasav
GSH	glutation
GSSH	glutation-perszulfid
HEPES	4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav
MADD	multiplex acil-CoA dehidrogenáz hiány
MBB	monobromobimán
MeOH	metanol
MTHFR	<i>metilén-tetrahidrofolát-reduktáz</i>
MTR	<i>metionin szintáz</i>
NMDA	N-metil-d-aszparaginsav
NSAID	nem-szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszer
PAD	periférás artériás betegség
PKU	fenilketonuria
PLP	piridoxál-foszfát, B6 vitamin
RMD	remetilációs defektus
SAH	S-adenozil-homocisztein
SAHH	<i>S-adenozil-homocisztein hidroláz</i>
SAM	S-adenozil-metionin
SCADD	rövid szénláncú acil-CoA dehidrogenáz hiány
SDB	szulfid-dibimán
SMB	szulfid-monobimán
SRM	single reaction monitoring
SQR	<i>szulfid-kinon-oxidoreduktáz</i>
TCA	triklórecetsav
TFA	trifluorecetsav
THF	tetrahidrofolát
TRIS	trisz-(hidroximetil)-aminometán
TRX	<i>tioeredoxin</i>
UV-Vis	UV-látható spektrofotometria

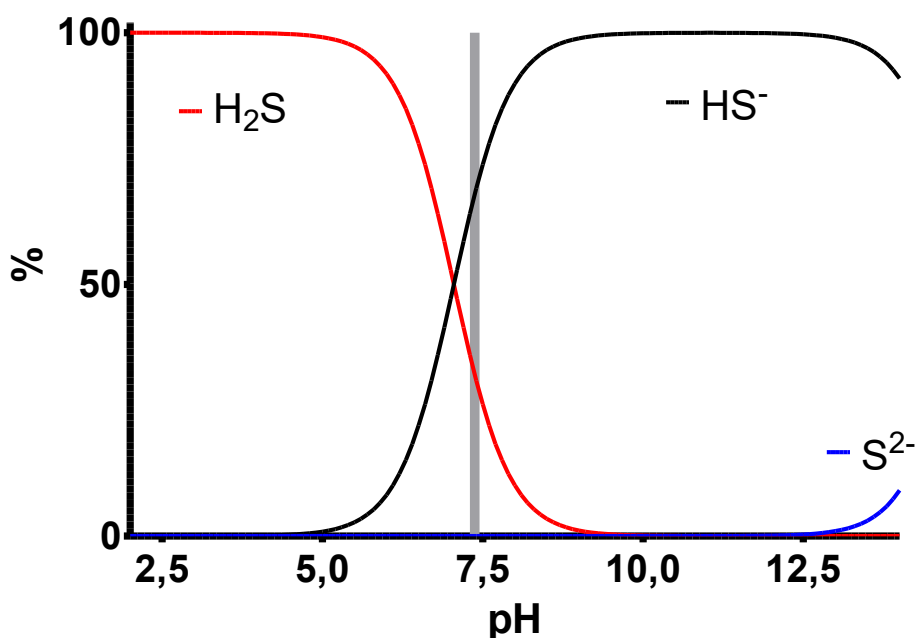
1. Bevezetés

A kén-hidrogén (H_2S), mint biológiailag fontos kis jelátviteli molekula az utóbbi pár évtizedben hódított teret magának, miután felismerték, hogy igen fontos szerepet tölt be biológiai rendszerekben (Szabo 2018). Részt vesz például gyulladásos folyamatokban, érrendszeri szabályzásban és daganatos betegségekben. Kedvező fiziológias hatásait molekuláris szinten jelátvivő és oxidatív stressz ellen védő funkcióival fejt ki (Wang 2012). Mindezek miatt mára már terápiás alkalmazása is előtérbe került (Wallace and Wang 2015). Pozitívumai mellett azonban még mindig egy erősen mérgező gázzal beszélünk, ami a szén-monoxidhoz hasonlóan a *citokróm-c-oxidáz* vas és réz centrumaihoz kötve jelentősen csökkenti az enzim aktivitását (Nicholls and Kim 1982). Ezzel sérül az elektrontranszportlánc és a sejtlégzés, ami végső soron sejthalálhoz vezethet.

Kémiaailag a kén-hidrogén egy színtelen, jellegzetes záptojásszagú gáz. Mérgező, korrozív és éghető, emiatt alkalmazása fokozott körültekintést igényel. A természetben két fontos jelentős forrást találhatunk, egyfelől vulkáni kénes kőzetekből szabadítható fel hidrolízis útján. Ekkor a felszabaduló gáz a kőzetből vízben oldódva kerülhet a felszínre kénes forrásként, földgázzal vagy kőolajjal keveredve. Másik természetes forrása a szerves anyagok anaerob lebontása, mely során oxigén hiányában szulfát-redukáló mikroorganizmusok által keletkezik a kén-hidrogén, amely jellemzően természetes vizekben, mocsarakban fordul elő. Ugyanezen folyamat mesterséges környezetben is fellelhető, hiszen szennyvíztisztító telepek is jól mérhető és érezhető szulfid-emisszióval rendelkeznek. Sajnos jelentős mennyiségben az ipar is felelős a légköri H_2S mennyiségének egy részéért, hiszen kőolaj-finomítás során, kohászati műveleteknél és a könnyűipar több ágában is jelentős kén-hidrogén emisszióval lehet számolni. Eltávolítása vízből egyébiránt katalitikus úton a Claus-eljárással megoldott, amely során elemi kén keletkezik, amelyet az ipar ilyen formában hasznosítani is tud. A mikroorganizmusok a kén-hidrogén poláros tulajdonsága miatt vízben oldható, ahol protonjai disszociációjával gyenge savként viselkedik a következő egyenletek szerint:



Fiziológias körülmények között vérben a fentebbi gyors, dinamikus egyensúlynak megfelelően kb. 70%-ban HS^- és 30%-ban H_2S formában van jelen az 1. ábrán jelöltek szerint, míg S^{2-} forma gyakorlatilag nem fordul elő.

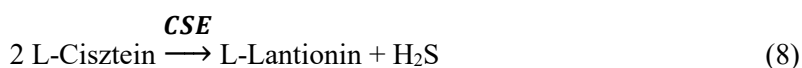
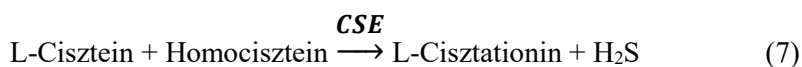
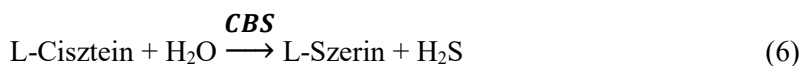
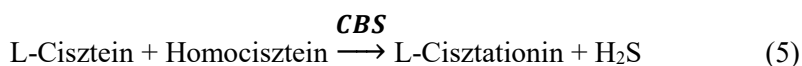
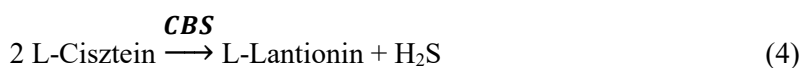
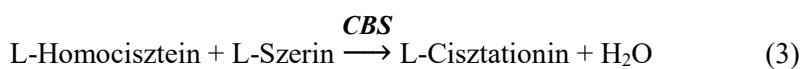


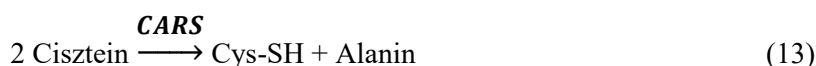
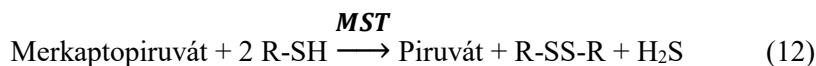
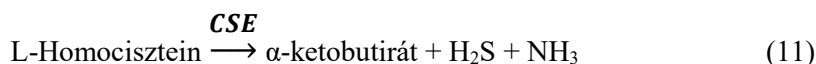
1. ábra – Hidrogén-szulfid protonálódási egyensúlyi eloszlása a pH függvényében

A kén-hidrogén vizes oldata nem stabil, lassú oxidációra hajlamos, eközben többek között tioszulfáttá, szulfittá, szulfáttá, vízben oldhatatlan elemi kénné alakul (Zhang and Millero 1993). Ezt a reakciót fémionok az oldatban katalizálják, ezért fontos a kén-hidrogénnel történő munkánál a nitrogén-oxidokhoz hasonlóan fémion-kelátorok alkalmazása, hiszen csak így biztosíthatjuk oldataink stabilitását (Nagy, Palinkas et al. 2014). Több fémionnal azonban hajlamos nehezen oldható, színes csapadékokat, szulfid sókat képezni, amit kvalitatív analitikai módszerek során előszeretettel alkalmaznak, ilyen például a kadmium, az ólom vagy az ezüst. Fiziológias rendszerben tehát a kén-hidrogén szabad állapotában H_2S és HS^- formában van jelen, emellett azonban jelentős mennyiségben kötötten is megtalálható. Ez a kötött forma kémiai vagy fizikai kötöttséget is takarhat, ezek a kötött kén-hidrogén tartalékok pedig kötésük természetének megfelelően különböző külső behatásokra mobilizálódhatnak, azaz hidrogén-szulfidot szabadítanak fel (Ubuka 2002, Kolluru, Shen et al. 2013, Nagy, Palinkas et al. 2014). A lehetséges tartalékok közül többet is pontosan azonosítottak már. Ezekre példa a hem-funkciós csoporthoz koordinált hidrogén-szulfid, amely dinamikus egyensúlyának megfelelően a fiziológias közegből, annak H_2S koncentrációjának függvényében elnyelésre vagy a kötött

ligandum felszabadításra is képes. Az irodalom ismer azonban olyan tartalékokat is (sulfide-pool), amelyek megfelelő kémiai hatásra mobilizálódnak, ilyenek például a redukzív vagy savas környezet hatására felszabaduló kén-hidrogének. Az előbbire kiváló példát jelentenek a per- és poliszulfidok (RSS_xH), ahol az S^0 oxidációs állapotú kénatomok redukció hatására -2-es oxidációs állapotú kénné, tehát szulfiddá alakulnak. Per- és poliszulfidok azonban számtalan formában léteznek, kezdve a szervesetlen poliszulfid sóktól a tiol csoporttal rendelkező kismolekula perszulfidokon (cisztein, glutation, homociszetin, tiosulfát, stb) keresztül a fehérje per- és poliszulfidokig. Ezek kísérletes bizonyítékok alapján csak kis részét teszik ki a szulfid-tartalékoknak, sokkal dominánsabbak a savas hatásra mobilizálható szulfid-tartalékok. Ilyen tulajdonságúak a vas-kén klasztert tartalmazó molekulák, amelyek savanyítás (vagy a metilénkék-módszernél alkalmazott cink-acetát) hatására szétesnek, miközben hidrogén-szulfid szabadul fel.

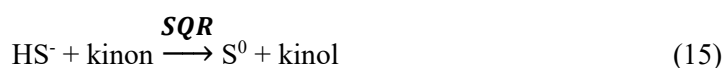
A kén-hidrogén endogén termelésére több enzim is képes, e téren azonban máig vita van az egyes felelős enzimek egymáshoz viszonyított fontosságáról. Ez részben arra vezethető vissza, hogy egyes szövetekben ezen enzimek aránya jelentősen változik. Az irodalom szerint legfőbb szulfidtermelő enzimek a *cisztationin- β -szintáz* (CBS), a *cisztationin- γ -liáz* (CSE) és a *3-merkaptopiruvát-szulfurtranszferáz* (3-MST) (Kabil and Banerjee 2010, Kabil, Vitvitsky et al. 2011, Kabil and Banerjee 2014). Nemrég kutatócsoportunkkal együttműködve Akaike *et al.* azonosított egy lehetséges új útvonalat is szulfid termelésre, amelynek során a CARS2 (*ciszteinil-tRNS szintáz 2*) ciszteinből először cisztein perszulfidot képez, majd a TRX (*tioredoxin*) vagy GSH rendszer ebből a kén-hidrogént lehasítja (Doka, Pader et al. 2016, Akaike, Ida et al. 2017). Ezek az enzimek több útvonalon is képesek megvalósítani a hidrogén-szulfid termelését, amint az a következő egyenletekből látszik:





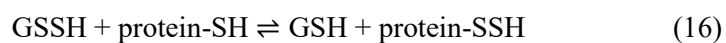
Ezeknek az enzimútvonalaknak a hozzájárulására léteznek becslések (Yadav, Martinov et al. 2016), de ezek validitása erősen vitatott. A területen nincs egyetértés abban, hogy pontosan milyen folyamatok határozzák meg a hidrogén-szulfid fiziológias koncentrációját, azaz melyek azok a kulcsenzimek akár a termelés, akár a lebontás útvonalán, amelyek szabályozzák a hidrogén-szulfid szintjét. Bár sok kutatás foglalkozik ezzel a kérdéssel (Rose, Moore et al. 2017), a fentebb látható reakciókból is látszik, hogy az átfedő reakciók miatt bőven nyílik lehetőség biológiai rendszerekben egyes enzimdefektusok kompenzálására. Emellett fiziológias és patofiziológias körülmények között a különböző enzimatis útvonalak szulfid termeléséhez való hozzájárulása változhat.

Keletkezéséhez hasonlóan a kén-hidrogén eltávolítására is több katabolitikus útvonal áll rendelkezésre. A hidrogén-szulfid lassan, ám enzim segítségével is hajlamos oxidációra oxigén jelenlétében, amelyet fémionok, mint például a vas, katalizálhatnak. Ez biológiai közegben azonban elhanyagolható az enzimatis útvonalakhoz képest, amelyek szintén a kén oxidációján keresztül vezetnek tioszulfát ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) és szulfát (SO_4^{2-}) végtermékekig, amelyek ezt követően kiürülnek a szervezetből. Az oxidációs útvonal első lépése a *szulfid-kinon-oxidoreduktáz* (SQR), amely a hidrogén-szulfidot oxidálva perszulfidot (S^0 , szulfánkén) hoz létre egy kinon segítségével a következő egyenlet szerint:

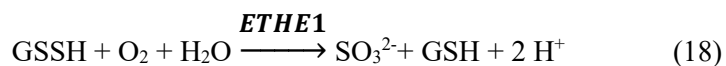


A keletkezett perszulfidot ezt követően az enzim különböző reaktív kénszármazékoknak (szulfít, glutation, dihidroliponsav) képes átadni a megfelelő perszulfidot képezve. A szulfittal képzett reakciójából keletkező tioszulfát már közvetlenül kiürülhet a szervezetből. Ezzel

szemben glutationnal (GSH) történő reakciójában glutation-perszulfid (GSSH) keletkezik, amely több további reakcióban képes átadni a perszulfidját, a következők szerint (Melideo, Jackson et al. 2014):



A keletkezett glutation-perszulfid ezen felül még az *etilmalonsav enkefalopátia 1* proteinen (ETHE1) keresztül is leadhatja extra oxidált kénatomját, a fehérje pedig ebből perszulfid-dioxigenáz funkcióján keresztül az alábbi reakcióban szulfítot generál:



Az itt keletkező szulfít ezt követően akár a fentebbi (17 egyenlet) *tioszulfát-szulfurtranszferáz* (TST vagy *rodanáz*) által katalizált reakcióban is tioszulfáttá alakulhat vagy a *szulfít-oxidáz* hatására szulfát végtermékként távozik a szervezetből.

A hidrogén-szulfid biológiai funkcióinak kutatása jelenleg a felkapott tudományterületek közé tartozik, pedig majdnem 3 évtizede folynak már aktív kutatások ezen funkciók a felderítésére (Xiao, Ying et al. 2018). Az első ilyen publikált funkció az NMDA receptorok közvetítette ingerületek fokozása volt patkányok agyában, amelynek keretében azt is megmutatták, hogy a patkányok agyában a H_2S termeléséért a CBS enzim a felelős (Abe and Kimura 1996). Szintén hatással van azonban az asztrociták Ca^{2+} egyensúlyára is, ezzel egy kalcium-ion alapú jelátvitelt indukálva sejtek között (Nagai, Tsugane et al. 2004). Neurológiai eredetű betegségekhez kötődve mind Parkinson-, mind Alzheimer-kórban kimutatták, hogy a kén-hidrogén szintje lecsökken az egészséges kontrollokhöz viszonyítva. Parkinson-kór esetében megmutatták a hidrogén-szulfid kezelés neurodegeneratív folyamatok elleni védő hatásait, amely mutatja a kén-hidrogén terápiás felhasználásában rejlő potenciált (Eto, Asada et al. 2002, Hu, Lu et al. 2010, Giovinazzo, Bursac et al. 2021). A kén-hidrogén a gyulladásos folyamatokban is fontos szabályzó szerepet kap, azonban ennek természete még nem tisztázott pontosan. Az irodalomban olvashatunk a H_2S gyulladás indukáló hatásáról is ugyanúgy, ahogy ennek védőhatásáról is (Li, Bhatia et al. 2005, Whiteman and Winyard 2011, Wallace, Blackler et al. 2015, Bhatia and Gaddam 2021). Ezzel szemben azonban a cukorbetegséggel kapcsolatban is

számos cikk található kén-hidrogénnel foglalkozó irodalomban, amely szerint a molekula a sejtek inzulinkibocsátását gátolja (Kaneko, Kimura et al. 2006).

A hidrogén-szulfid azonban nem csak önmagában lát el jelátviteli szerepet, hanem például a szintén jelátviteli NO molekulával kölcsönhatásba lépve közösen szabályozhatják az érképződést, az értágulást és egyéb kardiovaszkuláris folyamatokat is (Coletta, Modis et al. 2015, Cortese-Krott, Kuhnle et al. 2015, Kevil, Cortese-Krott et al. 2017). Szabályzószerepet tulajdonítanak a kén-hidrogénnek a simaizmok relaxációjában is szintén kooperációban a nitrogén-oxiddal, amely terápiás alkalmazások felé is terelheti a kutatásokat (Hosoki, Matsuki et al. 1997, d'Emmanuele di Villa Bianca, Sorrentino et al. 2009, Panthi, Chung et al. 2016).

Bár sok ismert funkciója lévén fontos biológiai molekuláról beszélünk, diagnosztikai jelentőséggel a mai napig nem bír, aminek nagyon jelentős oka az, hogy mérése nem triviális, sőt kifejezetten problémás. Egy részről azért, mert vérben nagy része kötött formában van jelen, amely dinamikus egyensúlyban áll a H_2S vagy HS^- formában létező szabad szulfiddal. Másfelől az irodalmat megvizsgálva azt találjuk, hogy a különböző mérési módszerek több nagyságrendnyi eltérést mutatnak tipikus vérbeli koncentrációk között, még azonos elvet követő protokollok esetében is (Furne, Saeed et al. 2008, Wintner, Deckwerth et al. 2010, Nagy, Palinkas et al. 2014). Bár az egyes módszerek közötti eltérésekre megannyi magyarázattal szolgál a szakirodalom, a megegyező módszert alkalmazó kutatások során kapott jelentősen eltérő medián koncentrációk jelenségére csak kevés utalást és még kevesebb igazolt magyarázatot találunk.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Mérési módszerek H_2S koncentráció meghatározására

Klasszikus analitikai módszerek között legegyszerűbbek a szelektív csapadékképzésen alapuló reakciók, amelyek sok korai mérés alapját adták. A módszer egyszerű kivitelezése gravimetriás méréssel párosítva nem összetett rendszerekben mennyiségi meghatározásokra tökéletesen használható volt (Boulegue 1981). Az eljárás során a szulfidot tartalmazó oldatot soft karakterű fémiont tartalmazó oldattal, például Zn^{2+} , Pb^{2+} vagy Cd^{2+} keverve a két ion nagyon rosszul oldható csapadékot képez, amely szűrés és szárítás után tömegméréssel kvantitálható. Ezzel ellentétben a feleslegben alkalmazott ólom-acetát maradékának mennyiségéből is visszaszámolhatunk a hidrogén-szulfid mennyiségére az ólom spektroszkópiás meghatározását követően. A módszer kellően nagy koncentrációjú, zavaró ionokat csak kis mennyiségben tartalmazó oldatok esetén megbízhatóan működik, azonban ezek hiányában kis érzékenysége és korlátozott szelektivitása miatt biológiai mintákon korlátozottan használható. Ennek ellenére még ma is találunk olyan félkvantitatív módszereket, amelyeknél ez a technika jól alkalmazható, például ólom-acetátos szűrőpapír használata sejtek, enzimek vagy szövetek H_2S termelésének vizsgálatára (Yadav, Yamada et al. 2013, Zhang and Weiner 2014).

Pontosabb mennyiségi analízisre ad lehetőséget, ha a termelődő PbS mennyiségét fotometriásan határozzuk meg, így akár fajlagos enzimaktivitást is számolhatunk megfelelő kalibráció birtokában (Chen, Jhee et al. 2004). A Pb(II)-ionokat is tartalmazó reakcióelegyet spektrofotométerben inkubálva és az abszorbanciát 390 nm-en rögzítve jól monitorozható a termelődő H_2S mennyisége, amely azonnal lecsapódik PbS formájában és fényszórása mérhető a megadott hullámhosszon.

Ennek speciálisabb változatában lehetőség nyílik gélelektroforézis során elválasztott H_2S termelő enzimek aktiválásának mérésére gélben (Willhardt and Wiederanders 1975). A módszernél az elválasztott natív poliakrilamid gél szubsztrátokat (homocisztein és szerin), puffert, kofaktort és ólom(II)-ionokat tartalmazó oldatban inkubálják. A bediffundáló szubsztrátokból az enzimek kén-hidrogént állítanak elő, ami a szintén bediffundáló ólommal a már ismert PbS csapadék formájában kiválik, ezt pedig egyszerű denzitometriával számszerűsíteni lehet, akár időfüggést is figyelembe véve.

A rosszul oldódó szulfid-sók lecsapódása azonban lehetőséget ad komplex mintákból az egyéb szennyezők eltávolítására, így kevésbé specifikus analízisekkel, például redox reakciókon alapuló titrálásokkal is meghatározhatjuk a hidrogén-szulfid koncentrációját. Erre példa az analit mangán-szulfid formában történő elválasztása a többi vízoldható komponenstől, majd a

csapadék savas feloldása ismert mennyiségű jodid- és jodát-iont tartalmazó oldatban. A keletkező jód az oldatban felszabaduló H_2S redukálja jodiddá, ezáltal a maradék jód tioszulfátos titrálását követően meghatározható a minta szulfidtartalma (Fonselius, Dyrssen et al. 1999).

Legegyszerűbb módon, kolorimetriás vizsgálattal már 150 éve is határoztak meg hidrogén-szulfid koncentrációt vizes mintákból N,N-dimetil-p-feniléndiamin alkalmazásával (Fischer 1883). A keletkező kék színű metilénkék könnyen mérhető volt, így kellő módosítás után nagyon sok közlemény született, amelyben az említett módszerrel vizsgáltak biológiai mintákat (Fogo and Popowsky 1949). Ennek oka a mérés egyszerű kivitelezhetősége, hiszen csak egy reakciót követő kolorimetriás vagy spektrofotometriás kiértékelést igényel. Itt azonban idővel több probléma is felmerült, például irreálisan magas mért értékek, a festék di- és trimerizációja miatti bonyolult kiértékelés, mátrix okozta zavaró tényezők, valamint az alkalmazott erősen savas közeg, amely egyfelől felszabadítja a savra érzékeny kötött szulfid-tartalékokat, másfelől erősen befolyásolja a metilénkék molekula spektrumát is (Cline 1969, Nagy, Palinkas et al. 2014). Szinte mindegyik probléma kiküszöbölhető vagy enyhíthető megfelelő további lépésekkel. A dimer és trimer képződésének egyensúlyi vizsgálatával és a több hullámhosszon történő méréssel, például ezek a dinamikus egyensúlyi formák elválaszthatóak spektroszkópián és ezáltal a kvantitálás pontosabbá tehető. Ez azonban csak a legkisebb probléma, amely az eredeti módszer linearitását korlátozta jelentősen. Az oldatban jelenlévő, kolorimetriás szempontból zavaró, azaz a metilénkék abszorpciós spektrumával a mérés hullámhosszán átfedő spektrummal rendelkező komponensek eltávolítására egyszerű kromatográfia vagy szerves extrakció is elégséges (Sakurai, Lien et al. 1982, Hoj and Moller 1987). A legnagyobb problémát azonban a reakcióhoz szükséges erősen savas közeg okozza, hiszen a korábban felvázolt savra érzékeny szulfid-tartalékok mobilizálódnak. Így azonban a módszer immár nem a szabad H_2S szintet, hanem a szabad és a savra érzékeny tartalék összegét méri. Ez pedig rögtön megmagyarázza, hogy a metilénkék módszerrel mért eredmények miért jelentősen nagyobbak, mint bármely más módszer eredményei. Ez természetesen csak a tartalékokkal rendelkező rendszereket érinti, így természetes vizek esetén továbbra is közel helytálló eredményeket kaphatunk az adott módszerrel. Biológiai mintából lehetőségünk van head-space gázmintából vizes abszorpciót követően szabad hidrogén-szulfid mérésére, ebben az esetben azonban a mintaelőkészítés körülményes és időigényes, kis koncentrációja miatt speciális, nagy érzékenységű szelektív detektort igényel hagyományos gázkromatográfiás elválasztás esetén. Kevés módosítással azonban a módszer nem csak a szabad és savra érzékeny frakcióját mérheti a hidrogén-szulfidnak, hanem előredukálással lehetőséget nyújt a

redukálható tartalék mérésére is (Sakurai, Lien et al. 1982). Bár a korábbi problémákra az idő és a technológia meghozta a megoldást, mégis sokan új, jobb módszerek után kutattak.

Direkt spektrofotometria is megoldást nyújthat az oldott hidrogén-szulfid koncentrációjának egyszerű meghatározására (Guenther, Johnson et al. 2001). A hidrogén-szulfid anion (HS^-) rendelkezik jól mérhető elnyeléssel 230 nm-en, azonban ezen a hullámhosszon sok más szervetlen ion és szerves molekula is ugyanúgy elnyel, így már egy egyszerűbb összetételű tengervíz mintából is csak dekonvolúcióval tudjuk meghatározni az egyes komponensek hozzájárulását a minta spektrumához (Williams 1983). Biológiai mintában ez a fehérjék elnyelésével csak tovább bonyolódik, így közvetlenül nem tudjuk alkalmazni biológiai mátrixok jelenlétében a direkt spektrofotometriát. Standard oldatok beállításánál azonban továbbra is nagy hasznát vehetjük ennek a módszernek.

Az elektrokémia adott egy lehetőséget a megbízhatóbb meghatározásra, amellyel ráadásul elméletileg nem is zavarja meg a rendszert a szabad H_2S és a kötött szulfid közötti dinamikus egyensúly felborításával (Ubuka 2002, Kolluru, Shen et al. 2013, Cao, Ding et al. 2018). Két megközelítés is adott az elektrokémiai mérésre, az ionszelektív elektródok használata és a polarográfia. A szulfid-szelektív elektródok bár formálisan nem zavarják meg az oldatbeli egyensúlyi viszonyokat, több problémát is felvetnek. Egyik a biológiai mátrixban jelen lévő tiolok és egyéb kénvegyületek zavaró hatása, azaz a nem teljesen specifikus válasz a hidrogén-szulfidra. Ez azonban áthidalható a H_2S szelektív elválasztásával, azaz a mérendő gáz oldatból való eltávolítását követő csapdázásával magas pH-jú oldatban (Chang, Untereiner et al. 2010). Emellett érzékenységük is elmaradt a kívánt szinttől, amelynek az az oka, hogy ezek az elektródok jellemzően a S^{2-} anionra adnak válaszjelet, ami a 1. ábrán jelöltek alapján nagyon kis egyensúlyi koncentrációban van jelen. A pH emelése viszont már megzavarná az egyensúlyt és az elektród elveszítené legnagyobb előnyét. Ez azonban mára megkérdőjelezett feltevés, jelenleg az irodalomban már HS^- -függésük is szerepel leírva, kalibrációs tartományukat pedig rosszul oldódó szulfidsókkal is sikerült kiterjeszteni kisebb koncentrációk felé (Searcy and Peterson 2004).

A fluoreszcens szondák megjelenése jelenthet egy kiutat a mérési problémákból, azonban a technológia még nem forrott ki (Montoya and Pluth 2012, Lin, Chen et al. 2015, Takano, Echizen et al. 2017). Egy jól használható szondával szemben támasztott követelményeket nehezen teljesítik hiánytalanul a most elérhető termékek. Ilyen fontos tulajdonságuk a megfelelő érzékenység vagy a specifikus válasz, ahol a tiolok és egyéb aktív kénszármazékok nem zavarják a meghatározást. Igény lehet még a gyors és reverzibilis válaszidőre is, amennyiben dinamikus változást kívánunk követni időben. Ezen feltételek teljesülése esetén

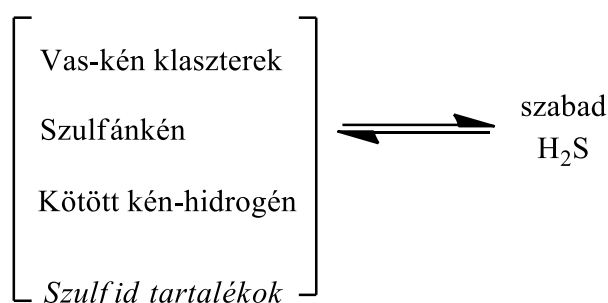
azonban a hidrogén-szulfid szintek folyamatos, érzékeny, szelektív monitorozásának lehetőségével nagyot lendíthetnek a kutatási területen. További fejlesztésekkel, például az emissziós spektrum hosszabb hullámhosszok felé való eltolásával a szondák lehetőséget nyújthatnak a jövőben *in vivo* képalkotásra is.

A kromatográfiás módszerek szintén már régóta alkalmazott megoldások bonyolult mátrixok feldolgozásában; az egyik jelenlegi olyan módszer, amely csak minimálisan zavarja meg a kötött és szabad szulfid közötti egyensúlyt, a gázkromatográfia. Amennyiben nem alkalmazunk származékképzőt, úgy a minta feletti gőztérből injektálva specifikus fluoreszcens detektálással már nmol/l alatti koncentrációk is megbízhatóan detektálhatóak (Vitvitsky, Kabil et al. 2012, Kolluru, Shen et al. 2013). Hátrányaként a mintaelőkészítés időigényét és a technika bonyolultságát lehet felhozni.

A gázkromatográfiával szemben a folyadékkromatográfiás módszerek általában sokkal egyszerűbbek, könnyebben kivitelezhetőek. Ezen származékképzésen alapuló módszerek közül a leggyakoribb a monobromobimánt (MBB) alkalmazó megoldás, ahol a szulfiddal képzett szulfid-dibimán (SDB) terméket fluoreszcens tulajdonságának köszönhetően detektáljuk. Ez az alkilálószer szelektíven reagál ként tartalmazó analitokkal, így hidrogén-szulfid mellett poliszulfidok, oxidált kénszármazékok és tiolok meghatározására is használják. A módszer megfelelő kromatográfiás elválasztással érzékeny és szelektív, nmol/l alatti detektálási határral. Kromatográfiás módszerek között még megemlítenéd az ionkromatográfia és a kapilláris zónaelektroforézis. Az előbbi esetében a problémát a hidrogén-szulfid alacsony disszociációs hajlama és ebből következően alacsony vezetőképessége okozza, azaz a módszer nem rendelkezik megfelelő érzékenységgel. Ez a detektálás módját változtatva azonban kiküszöbölhető probléma, az irodalomban ismertek amperometriás, direkt UV elnyelésen alapuló és elválasztást követő színreakciót használó megoldások is (Miura, Maruyama et al. 1995, Rozan and Luther 2002, Ohira and Toda 2006). A kapilláris zónaelektroforézis technikája is ad lehetőséget egyszerű anionok elválasztására, azonban itt is a detektálás kérdése merül fel legtöbbször. Itt is probléma a konduktometria alacsony érzékenysége, ám ezen könnyen segíthet az ionkromatográfiához hasonlóan amperometriás vagy UV-elnyelésen alapuló detektálás alkalmazása, legyen az direkt vagy indirekt (Font, Gutierrez et al. 1996, Hissner, Mattusch et al. 1999). A módszer nagy előnye kis minta- és anyagigénye, emellett megfelelően érzékeny, nagyon hatékony elválasztásra képes ezzel csökkentve a mátrixkomponensek zavaró hatását, valamint a mérésidő is rövid.

Számtalan kutatásban használták már a fentebb felsorolt módszereket különböző biológiai minták analízisére, ezek azonban akár nagyságrendileg is eltérő eredményeket hoznak. E

jelenségért több esetben is igazoltan a szulfid-tartalékok felelősek. Míg az összes mérési módszer érdemileg a szabad hidrogén-szulfid (vagy vannak valamely deprotonált formájának) koncentrációjával arányos válaszjelet ad, addig nagyon fontos, hogy a mérés, származékképzés ideje alatt a H_2S és a tartalékok közti egyensúly eltolódhat. Erre kiváló példa a metilkék-módszer, amelyet savas körülmények közt végeznek, hiszen ez szükséges a reakcióhoz. Mindemellett azonban az alacsony pH a bevezetésben említett savra érzékeny tartalékokat mobilizálja, így az előkészítés során folyamatosan szabadítjuk fel a kén-hidrogént, ami aztán további metilénkék keletkezéséhez vezet. Ez mára egy jól ismert jelenség, ami egyfelől megmagyarázza, hogy más módszerekhez képest miért mért jelentősen nagyobb H_2S koncentrációkat a metilénkék-módszer. A problémát azonban tovább árnyalja, hogy olyan mérések között is jelentős az eltérés, ahol hiányoznak a protokollokból a klasszikus tartalékmozgósító hatások, mint a redukálás vagy a savanyítás. Így például két nagyságrendi különbséget is mérhetünk azonos mintából gázkromatográfiát és monobromobimános módszert összehasonlítva. Az ilyen különbségek mögött a szulfid tartalékok (S_{Pool}) és a szabad H_2S közötti dinamikus egyensúly áll, azaz kémiai/fizikai behatás hiányában, valamely egyensúlyi partner koncentrációjának változására a rendszer igyekszik az egyensúlyt helyreállítani a szabad H_2S szintjének növelésével vagy csökkentésével az alábbi ábra szerint:



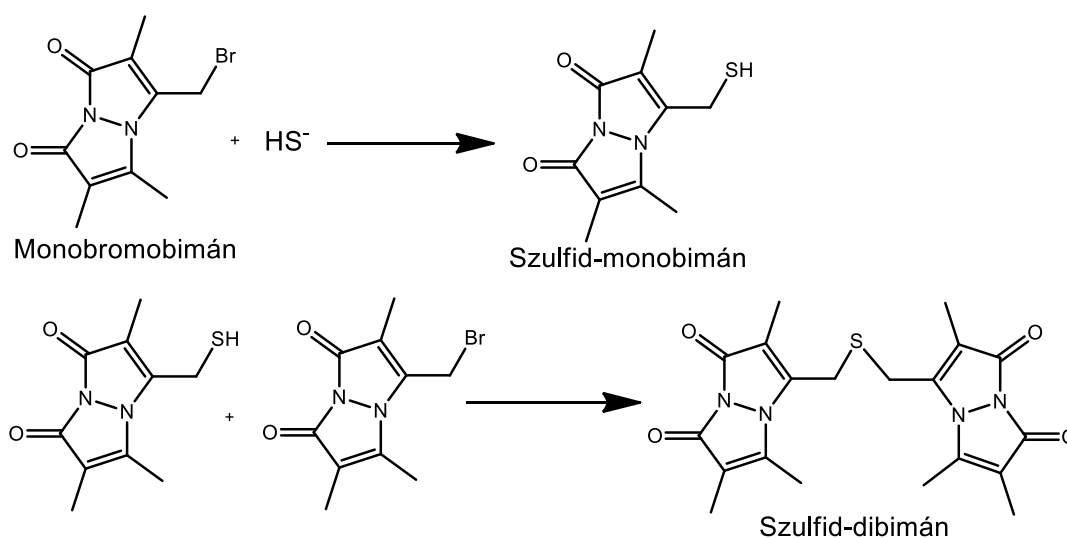
2. ábra – Szabad kén-hidrogén és a szulfid tartalékok közötti dinamikus egyensúly

Így belátható, hogy ha egy adott hatás csökkenti a rendszerben a kén-hidrogén mennyiségét, akkor azt a kémiai egyensúly a tartalékokból H_2S felszabadításával igyekszik pótolni. Ebből adódik, hogy egy irreverzibilis származékképzést követően a csökkenő H_2S szintet a rendszer a tartalékokból ellensúlyozza, ezért az alkilálás folyamán a tartalékokból folyamatosan szabadul fel kén-hidrogén. Mivel ez a jelenség minden fiziológias rendszerben történő, alkilálást alkalmazó módszert érint és ezek az irodalmi szulfid mérések jelentős hányadát képezik, nem elhanyagolhatóak, erre pedig már több közlemény is felhívta a figyelmet (Wintner, Deckwerth et al. 2010, Nagy, Palinkas et al. 2014).

2.2. H₂S mérése vérből monobromobimános módszerrel

A metilénkéken alapuló módszer mellett a leggyakrabban alkalmazott hidrogén-szulfidot mérő eljárás a monobromobimánnal (MBB) történő alkilálást követő kromatográfiás meghatározás biológiai mintákban. A módszer előnye, hogy könnyen kivitelezhető, enyhe reakciókörülményeket igényel (enyhén lúgos pH, szobahőmérséklet), folyadékkromatográfiás elválasztás miatt specifikus, érzékeny, megfelelő protokollokat alkalmazva az egyes diszkrét szulfid-tartalmak mennyisége is mérhető.

A monobromobimán első 1980-as leírását (Kosower and Pazhenchevsky 1980) követően már a következő évben meg is jelent az első két cikk, amelyben tiolok és hidrogén-szulfid nagyon érzékeny (pM) mérésére mutattak példát a szerzők kromatográfia segítségével (Fahey, Newton et al. 1981, Newton, Dorian et al. 1981). A monobromobimán tiolokkal szelektíven reagál nukleofil szubsztitúciós reakcióban. Kén-hidrogén esetén, amelynek kénjén két disszociálható hidrogén is található, a teljes alkilálási reakció két lépésben játszódik le az alábbi ábrának megfelelően:



3. ábra – Monobromobimán kétlépéses reakciója hidrogén szulfiddal

Az első lépés során a nukleofil HS⁻ támad a brómhoz képest α helyzetű szénatomra S_N2 mechanizmus szerint, majd a bromid távozásával kialakul a stabil köztitermék, a szulfid-monobimán. A reakció második lépésében a továbbra is nukleofil kénatomon keresztül újabb S_N2 reakcióval alkilálódik a köztitermék egy újabb monobromobimánnal, a kialakuló végtermék pedig a hidrofób szulfid-dibimán (SDB) lesz. Természetesen az MBB tiolokkal is reakcióba lép, ekkor csak a fent jelölt első reakciólépés játszódik le, a termék pedig a megfelelő tiol bimánnal jelölt adduktja lesz. Az MBB tiolokkal történő reakciója azonban nem jelent

problémát, hiszen a hidrofób alkilálószer miatt fordított fázison (vagy ioncserélő kolonnán (Newton, Dorian et al. 1981)) elválaszthatóak egymástól a keletkezett termékek, így egyetlen előkészítésből meghatározható számos tiol mennyisége. Kezdetben a monobromobimán legfontosabb alkalmazási területe a tiolok fluoreszcens kromatográfiás kvantitálása volt, H_2S meghatározására inkább a metilénkék módszert alkalmazták.

Elsőként 1992-ben jelent meg a vér hidrogén-szulfid szintjéről monobromobimán származékképzéses módszerrel mért eredmény. (Togawa, Ogawa et al. 1992). A szérumból 1 órás alkilálást követően mérték „kötött” H_2S koncentrációt HPLC elválasztást követően, amely értéket 1-2 μM közöttinek találták. Nagyon fontos megfigyelésük volt, hogy a mintához szulfidot adva annak koncentrációját nem tudták visszamérni, még DTT-vel történő redukzív kezelést követően sem. Ez az észlelés is azt mutatta, hogy a vérben nem csak szabad, de kémiai vagy fizikailag kötött formában is jelen van az analit, ráadásul olyan formákban, amelyek nem minden esetben redukálhatóak. Ilyen tartalékokat ezt követően több esetben is leírtak és bemutattak, ezek felszabadulását pedig különböző behatásokhoz, például redukáló közeghez vagy savasodáshoz köthették.

A szulfid-tartalékok pontosabb megismerésével került előtérbe az igény a szabad hidrogén-szulfid koncentrációjának mérésére. Erre kívántak megoldást kidolgozni Wintner és munkatársai monobromobimános alkilálást alkalmazva (Wintner, Deckwerth et al. 2010). Figyelembe véve a szulfid-tartalékok jelenlétét a vérben, gyors és körülményeit tekintve kíméletes eljárást dolgoztak ki a szabad H_2S fluoreszcens alkilálószerrel történő jelölésére, tisztítására és detektálására. A kromatográfiás eljárás beállítását és a zavaró analitok kizárását követően, illetve az alkilálás reakciókinetikájának jellemzését követően állították be a mintaelőkészítés kísérleti paramétereit és próbálták ki módszerüket *in vivo* mintákon is. Sikeresen követték intravénás és belélegzett H_2S időbeni változását, amperometriás méréssel kiegészítve pedig azt is megmutatták, hogy milyen hatékonysággal képes megkötni az intravénásan bejuttatott szulfidot a vér. A kötött H_2S ezt követően amperometriás módszerrel nem, monobromobimánnal azonban érzékenyen kimutatható volt. Ebben egy szerves extrakciós lépés is szerepet játszott, amely során a zavaró ionok, proteinek eltávolíthatóvá váltak, a szerves fázis bepárlásával pedig az analit MBB-származéka koncentrálnaként vált.

Helyesen rámutattak arra is, hogy az irodalomban fennálló nagyságrendi különbségek valószínűleg a módszertani különbségekből fakadnak és nem valós „szabad” szulfid szintet mérnek. Bevezették a „biológiailag hozzáférhető szulfid” fogalmát hivatkozva az általuk mért, közepesen erős elektrofil ágenssel jelölhető frakcióra.

Kevil és munkatársai hasonló módon fejlesztették saját módszerüket is, ők azonban nagyobb hangsúlyt fektettek a mérési paraméterek optimalizálására (Shen, Pattillo et al. 2011). Vizsgálták az oldott oxigén, kelátor (DTPA), pH, N-etilmaleimid, előkészítéshez használt cső anyagának hatását, a termék és a mérendő analit stabilitását, fehérjetartalom hatását, valamint összehasonlították az eredményeket a metilénkék módszer eredményeivel. Ezt egy következő publikációban továbbfejlesztett formájában a különböző szulfid-tartalékok kvantitatív meghatározására is alkalmassá tették (Shen, Peter et al. 2012). Itt a szabad hidrogén-szulfidon túl definiáltak egy savra érzékeny és egy redukcióra érzékeny tartalékot is, amelyek nevüknek megfelelően savanyítással és redukcióval szabadíthatók fel. Ilyen formában a levett vérmintát 3 részletben mérve, egyhez savat, egyhez pedig savat és redukálószerrel adva meghatározták ezeket az említett tartalékokat. A különböző zavaró analitok és hozzáadott reaktánsok eltávolításához a savanyítás hatására gáztérbe került hidrogén-szulfidot magas pH-jú pufferben nyelték el majd jelölték monobromobimánnal. Méréseik hasonlóan a Wintner csoportéhoz 1 μM alatti szabad szulfid koncentrációt mutattak emberi plazmában szemben a korábbi metilénkéssel mért több μM nagyságrendű eredményekkel. Mérésük arra is rámutatott, hogy a H_2S nagy része a savra érzékeny tartalékokban kerül megkötésre, míg a szabad szulfidhoz hasonló mennyiség található a redukálható tartalékban.

A monobromobimán alkalmazása azért is kézenfekvő megoldás tiolok mérésére, mivel a jó szelektivitása mellett megfelelő fluoreszcens tulajdonságokkal is rendelkezik, ami érzékeny detektálást biztosít a kis koncentrációban jelenlévő analitok meghatározására. Emellett egy fluoreszcens detektor és egy folyadékkromatográf a könnyen beszerezhető és üzemeltethető analitikai készülékek közé tartozik. A nagyobb műszerek, mint például a tömegspektrométerek egy egészen más detektálási lehetőséget biztosítanak, nagyobb érzékenységgel és nagyobb specificitással rendelkeznek az általuk biztosított információknak köszönhetően. Logikus tehát, hogy a monobromobimán módszer egyik fejlesztési lehetősége is ez volt, azaz a képződő szulfid-dibimán tömegspektrometriás detektálása és kvantitálása (Morikawa, Kajimura et al. 2012). Vérminták esetében ezt először szintén Christopher Kevil és csoportja írta le összehasonlítva a klasszikus fluoreszcens technikával (Shen, Chakraborty et al. 2014). Standard minták vizsgálatával állították be a tömegspektrometriás módszert és vizsgálták a fluoreszcens detektálással szemben, ezzel meghatározva egy szélesebb lineáris mérési tartományt és több nagyságrenddel kisebb detektálási határt. Biológiai mintákon megismételve a méréseket azt is megállapították, hogy a két mérési mód a vártnak megfelelően teljesen azonos eredményeket ad, így bátran használható olyan rendszerekben is, amelyekben a H_2S koncentrációja a vérbeli értéknél jóval alacsonyabb, például sejtlikzámban.

Szintén publikáltak tömegspektrometriás módszert az analit vérből történő mérésére mások is, azonban eltérő eredményekkel. Egy kínai csoport különböző biológia mátrixokban, például emberi és egér vérben, plazmában, szövetben, gombában vizsgálta a H_2S koncentrációját, általuk optimalizált mintaelőkészítést alkalmazva (Tan, Jin et al. 2017). A korábban, monobromobimános módszerrel publikált eredményekhez képest, melyek nmol/l tartományba estek, az általuk mért eredmények már $\mu\text{mol/l}$ tartományban helyezkedtek el plazmaminták esetén. Ez a nagyságrendi eltérés már elég jelentős ahhoz, hogy megkérdőjelezze akár az általuk publikált eredményeket, akár magának a monobromobimános módszernek a megbízhatóságát. A mért magasabb szulfid szinteknek lehetséges magyarázata lehet, hogy EDTA-tartalmú mintavevő csövet használtak, amelyről korábban már igazolták, hogy hemolízisen keresztül mérhetően növeli a H_2S szintjét plazmában, míg az utóbbira egy lehetséges magyarázat lehet az általuk használt, más monobromobimános módszernél sokkal magasabb alkalmazott MBB koncentráció és a sokkal hosszabb inkubálási idő. Bár módszerük 10% alatti szórást mutatott, a detektálás alsó határaként 39 nM koncentrációt határoztak meg, ami szintén jelentősen magasabb érték, mint a korábban publikáltak.

A monobromobimán és a hozzá hasonló dibromobimán azonban képes tiolokból is a hidrogén-szulfiddal képzett termékkel azonos szulfid-dibimán képzésére is, a tiolcsoportból kénatomot lehasítva (Montoya, Shen et al. 2015). Szerencsére az előbbi elektrofil ágens csak nagyon kis sebességgel képes tiolokról leválasztani a ként, a cikkben vizsgált körülmények közt glutationból képzett SDB termék mennyisége a 0,1%-t sem érte el az elméletileg lehetséges maximumnak 30 perc inkubálást követően. Ez alapján esetünkben ennél is kisebb hányadra lehet számítani, ami alapján ennek az effektusnak a hozzájárulása elhanyagolható.

2.3. Célkitűzés

Kutatócsoportunkban központi szerepet játszik a kén-hidrogén, így különböző biológiai rendszerekben való mérése számunkra kulcsfontosságú. A csoportban már korábban is végeztek hidrogén-szulfid meghatározásokat akár metilénkéket, akár monobromobimánt használva. Mivel a módszerek nagy szórást és nehezen reprodukálható adatokat eredményeztek, ezért fontosnak tartottuk az eljárás felülvizsgálatát. Ehhez járult hozzá a mintaelőkészítés jelentős időigénye, ami miatt egy-egy vizsgálat ideje több hetet vett igénybe. Célunk az volt, hogy a monobromobimános módszerben fellelhető eltérésekre választ adjunk a módszer alapos vizsgálatán keresztül és ezzel olyan egyszerű, könnyen kivitelezhető mérési protokollt tudjunk javasolni, amely pontos és megbízható eredményt ad, lehetővé téve különböző mérések összehasonlíthatóságát. Célul tűztük ki továbbá a fejlesztett módszer validálását betegmintákon és annak felderítését, hogy lehetséges-e a módszert klinikai diagnosztikában alkalmazni a jövőben.

3. Metodikák

3.1. Felhasznált anyagok

A munka során használt reagensek közül a monobromobimán (MBB), trifluorecetsav (TFA), triklórecetsav (TCA), hangyasav (FA), szulfoszalicilsav, dietilén-triamin-pentaecetsav (DTPA), etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-etánszulfonsav (HEPES), tris(hidroximetil)-aminometán (TRIS) és 5,5'-Ditiobisz-(2-nitrobenzoesav) (DTNB) vegyszereket a Sigma-Aldrich-tól szereztük be és legalább 97%-os tisztasággal rendelkeztek.

Vízmentes Na₂S az Alfa Aesar-tól került beszerzésre, tisztasága 95% volt. A kromatográfiás mérésekhez és oldószerként használt gradiens HPLC minőségű acetonitrilt (ACN) és metanolt (MeOH), valamint a HPLC minőségű etil-acetátot (EtAc) a Merck gyártotta. Mind eluensként, mind oldatkészítési célból a HPLC minőségű vizet egy Adrona B30 HPLC víztisztító rendszerből nyertük.

3.2. Vérminták

A vérvételeket az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága által kiadott etikai engedélyben (BPR-021/00084-2/2014) jóváhagyott betegtájékoztató és beteg beleegyező nyilatkozat kitöltése után végeztük el.

A mintavételeket a módszerfejlesztés során Li-heparin tartalmú (Vacutainer Lithium Heparin, 4 ml), valamint alvadási aktivátort tartalmazó géles (Vacutainer BD SST™ II, 10 ml) csövekbe végeztük, 12 (2 férfi, 10 nő) egészséges önkéntes hozzájárulásával, az Országos Onkológiai Intézet Klinikai Központi Laboratóriumának segítségével. A véradók 22 és 45 év közötti (medián 29 év) egészséges munkatársak közül kerültek ki. A csövek összehasonlításához ezeken túl K₂EDTA (Vacutainer K2E, 10 ml) vagy citrát tartalmú (Vacutainer Citrate, 4,5 ml) mintavevő csöveket használtunk. A szövegben a cső típusának megjelölése nélkül *plazmaként* hivatkozott minták minden esetben Li-Heparin tartalmú csőbe levett vérre vonatkoznak. A szobahőmérsékleten tárolt friss véreket mintavételt követően plazma esetében legfeljebb 20 percen belül, szérum esetében 30 percen belül centrifugáltuk szobahőmérsékleten, 10 percig, 3000g-t alkalmazva. A szérum vagy plazma minták kisebb térfogatokra szétosztva 1 hónapon túl történő tárolás esetén -80 °C-os fagyasztóba kerültek, míg az ennél korábban felhasznált minták -20 °C-on voltak tárolva.

A nemzetközi együttműködésben kapott, a módszer validálása és alkalmazása során használt minták levétele Li-heparin vagy EDTA tartalmú csövekbe történt az együttműködésben

résztevő partner által, amelyeket centrifugálás után -80 °C-on tároltak és szárazjégen szállítottak. Mind az etilmalonsav enkefalopátiás (EE), homocisztinuriás, fenilketonuriás (PKU), mind a hozzájuk tartozó egészséges kontroll véreket Prof. Viktor Kozich, a prágai General University Hospital Örökletes Metabolikus Rendellenességek Intézetének vezetője biztosította. A vérek levétele a betegségek ritkasága miatt nem csak Prágában, hanem német, olasz és cseh kórházakban is történtek, majd a levett vérek a prágai elosztást követően kerültek hozzánk.

3.3. Alkalmazott műszerek

A kromatográfiás mérésekhez Thermo Scientific UltiMate 3000 HPLC rendszert használtunk. A biner pumpás rendszerhez egy termosztálható mintatartó, változtatható hullámhosszú UV detektor és egy fluoreszcens detektor csatlakozott. LC-MS mérésekhez a fluoreszcens detektor helyére csatlakozott egy Thermo Scientific LTQ-XL ioncsapdás tömegspektrométer, mellyel a kromatogramok csúcsainak azonosítását végeztük el. A termékek elválasztását a módszerfejlesztés fázisában és a homocisztinuriás betegek vizsgálatánál egy 250x4,6 mm-es, 5 µm részecskeméretű, előtétkolonnával ellátott Agilent XDB-C18 kolonnán végeztük, majd a módszert egy 200x4,6 mm-es, 3 µm-es Phenomenex Luna C18(2) kolonnára ültettük át a rutinmérésekhez. A hemolízis követésére Tecan Spark multimode mikrolemez olvasót használtunk, 400-800 nm közötti tartományban mérve a minta abszorbanciáját, 384 lyukú mikrolemezzel, úthosszkorrekciót alkalmazva.

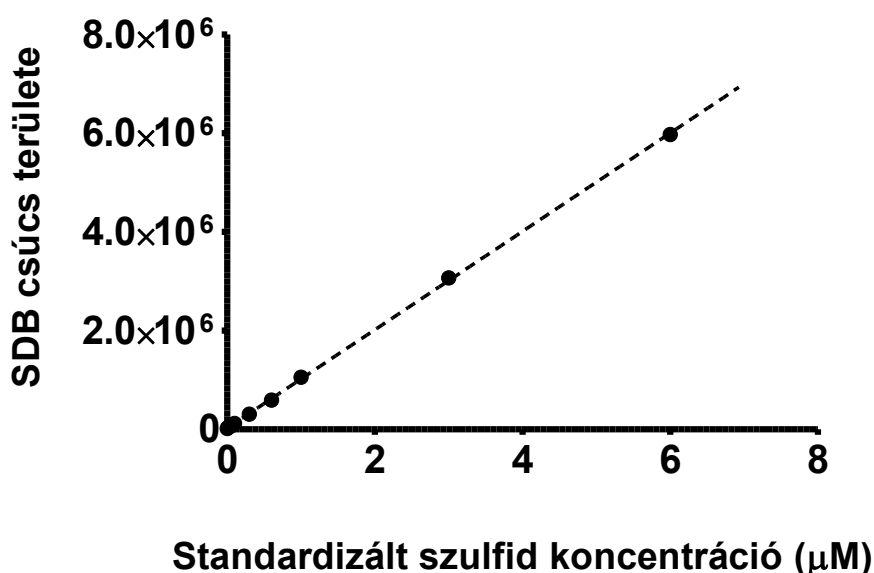
Az előkészítések pontos termosztálásához Peltier-elemes fűthető-hűthető blokk termosztátot használtunk, a vérek centrifugálását kilendülő-fejes centrifugán, míg az előkészítések során a leválasztott fehérjék szeparálását fix rotoros centrifugán végeztük.

3.4. Kalibrációs és kinetikai mérések Na₂S standard oldatokkal

Szulfid standard oldatokat vízmentes Na₂S előzetesen nitrogén gázzal átbuborékolgatott vízben való oldásával készítettük, majd a törzsoldatok pontos koncentrációinak meghatározását direkt fotometriával és DTNB-vel való reakciója alapján határoztuk meg egy korábbi közleményben leírtak szerint (Nagy, Palinkas et al. 2014).

A mintaelőkészítéseket besötétített szobában, vörös megvilágítás mellett végeztük, a mintákat és a reagenseket a reakció elindítása előtt legalább 10 perccel Peltier-elemes termosztátba helyezve, barna mikrocentrifuga csövekben.

A kalibrációhoz 250 μl 50 μM koncentrációjú Na_2S oldatot kevertünk 650 μl 200 mM koncentrációjú pH 8,2 HEPES pufferrel, majd a reakciót 20,0 °C-on termosztálva 10 μl 100 mM koncentrációjú acetonitrilben oldott MBB hozzáadásával és az oldat alapos és gyors keverésével indítottuk. Pontosan 10 perc elteltével az alkilálást 50 μl 50% TCA hozzáadásával állítottuk le, így nyertünk egy 50 μM mintabeli H_2S koncentrációnak megfelelő SDB törzsoldatot. Ugyanezt megismételtük Na_2S standard oldat helyett vizet használva, ezt a vak mintát pedig a kalibrációs sor kihígítására használtuk, hogy a különböző koncentrációjú SDB kalibrációs oldatokat elkészíthessük az előzőleg elkészített SDB törzsoldatunkból. A hígított oldatok ezt követően szeptummal lezárt HPLC üvegekbe kerültek, amelyek a 4 °C-ra hűtött mintatárolóban álltak mérésig. Az így felvett kalibrációs görbe a 4. ábrán látható.



4. ábra – Kalibrációs görbe szulfid-dibimán koncentrációjának kromatográfiás meghatározásához

A kinetikai mérésekhez az előzőnek megfelelő módon és azonos térfogatok keverésével indítottuk el a reakciót, azonban megadott időközönként 71 μl reakcióelegyet kivettünk és összekevertünk 3,9 μl 50% TCA-val, leállítva ezzel a reakciót pontosan a meghatározott időpontban. Így 10-12 időpontban tudtunk mintát venni a reakcióelegyből a kinetika követéséhez. Ezeket a mintákat is közvetlenül ampullákba helyezés után mértük és 4 °C-on tartottuk.

3.5. Vérminták feldolgozása („B” módszer)

A már szeparált plazma és szérum minták 25 µl-es részleteit kevertük 66 µl bimános pufferrel, amelyet 650 µl 200 mM koncentrációjú pH 8,2 HEPES puffer és 10 µl 100 µl koncentrációjú acetonitrilben oldott MBB előzetes keverésével készítettünk. A reakciót 20,0 °C-on termosztálva az előtermosztált keverék vérhez adásával és az oldat alapos és gyors keverésével indítottuk. Pontosan 10 perc elteltével az alkilálást 5 µl 50% TCA hozzáadásával állítottuk le és a reakcióelegyet pár másodpercig erőteljesen kevertettük. A kicsapódott fehérjéket 5 perces szobahőmérsékletű centrifugálással távolítottuk el 3000g-n. A tiszta felülúszók ezután az előzőekhez hasonló módon közvetlenül HPLC üvegekbe kerültek a 4 °C hőmérsékletű mintatárolóba. Amennyiben centrifugálás után az oldat zavaros volt, úgy a feldolgozott mintát elvetettük és ismételten előkészítettük.

A kinetikai méréseket vérben a 3.4 fejezet kinetikai méréseivel megegyezően végeztük Na₂S oldat helyett plazmát vagy szérumot használva. Az egyes időpontokhoz tartozó savanyított mintákat 5 percen keresztül 3000g-n centrifugáltuk, a tiszta felülúszót pedig HPLC üvegekben a 4 °C hőmérsékletű mintatárolóba helyeztük a mérésig.

3.6. Paraméter-függések vizsgálata

Az egyes mérési paraméterek hatásának vizsgálatánál a 0 fejezet szerint jártunk el, ahol mindig csak egy paramétert változtattunk meg a vérek előkészítése során. Minden mintából 3 párhuzamos előkészítést végeztünk, szigorúan kontrollálva a vizsgált kísérleti paramétereket. A méréseket a „B” kromatográfiás módszerrel (3.8. fejezet) végeztük.

3.7. „A” módszer homocisztinuriás és PAD betegek vizsgálatánál

A homocisztinuriás betegeket vizsgáló kísérlet során két módszerrel is előkészítettük és mértük a véreket. A megjelent cikkben (Kozich, Ditroi et al. 2018) „B” módszerként jelölt előkészítés pontosan a 0 fejezetben leírtak szerint történt, a mérést pedig az ehhez tartozó „B” kromatográfiás eljárással végeztük, amely a 3.8 fejezetben olvasható. Az „A” módszer ezzel szemben egy irodalomban közölt két módszerre alapozva a következő módon alakult (Wintner, Deckwerth et al. 2010, Shen, Pattillo et al. 2011): teljesen besötétített laborban 10 µl plazmát kevertünk 10 µl 50 mM pH 8 HEPES pufferrel és 10 µl of 10 mM acetonitrilben oldott MBB oldattal. A reakciókeverék 10 percre rázóasztalra került, majd 100 µl etil-acetát hozzáadásával az elegyből extraháltuk a terméket (SDB) és a reagenst (MBB). A teljes extrakcióhoz a csövek 10 percre forgató rázógépbe kerültek, majd 7 percre centrifugába 1300g-n. A szerves

felülúszóból 50 µl ezt követően vákuum koncentrátorba került bepárlásig, amit 10 µl acetonitril hozzáadása után megismételtünk, hogy eltávolítsuk az etil-acetát nyomnyi maradékát. A bepárolt mintákat ezután -20 °C-on tároltuk és közvetlenül mérés előtt 250 µl acetonitrilben oldottuk. A méréseket az „A” kromatográfiás módszerrel végeztük (3.8. fejezetben kifejtve). Ugyanezen módszer került alkalmazásra PAD betegek és hozzájuk tartozó egészséges kontrollminták vizsgálatakor is.

3.8. HPLC mérések

Minden kromatográfiás mérést a 3.3. pontban említett Thermo készüléken végeztünk. Két különböző kolonnát és 3 különböző eljárást alkalmaztunk, minden esetben fordított fázison történt az elválasztás gradiens elúcióval, ahol a két eluens 0,1% TFA tartalmú víz (A) és 0,1% TFA tartalmú acetonitril volt. Az előkészített mintából 10 µl térfogatot injektáltunk, az elválasztást szobahőmérsékleten végeztük. A detektálást fluoreszcensen végeztük a gerjesztési hullámhosszat 390 nm-re, az emissziós hullámhosszat 475 nm-re állítva. Hogy a viszonylag kis termékcsúcsot érzékenyen detektálhassuk, az elektronikai erősítést a termékcsúcs elúciója előtt 16x értékűre növeltük, majd a reagenscsúcs elúcióját követően visszaállítottuk alapértékre.

A homocisztinuriás betegek első vizsgálatakor („A” módszer) 250x4,6 mm-es 5 µm részecskeméretű, előtétkolonnával ellátott Agilent XDB-C18 kolonnán végeztük állandó, 0,6 ml/perc áramlási sebességgel az elválasztást egy 33 perc hosszú gradiens elúcióval, amely az 1. táblázatban szerepel.

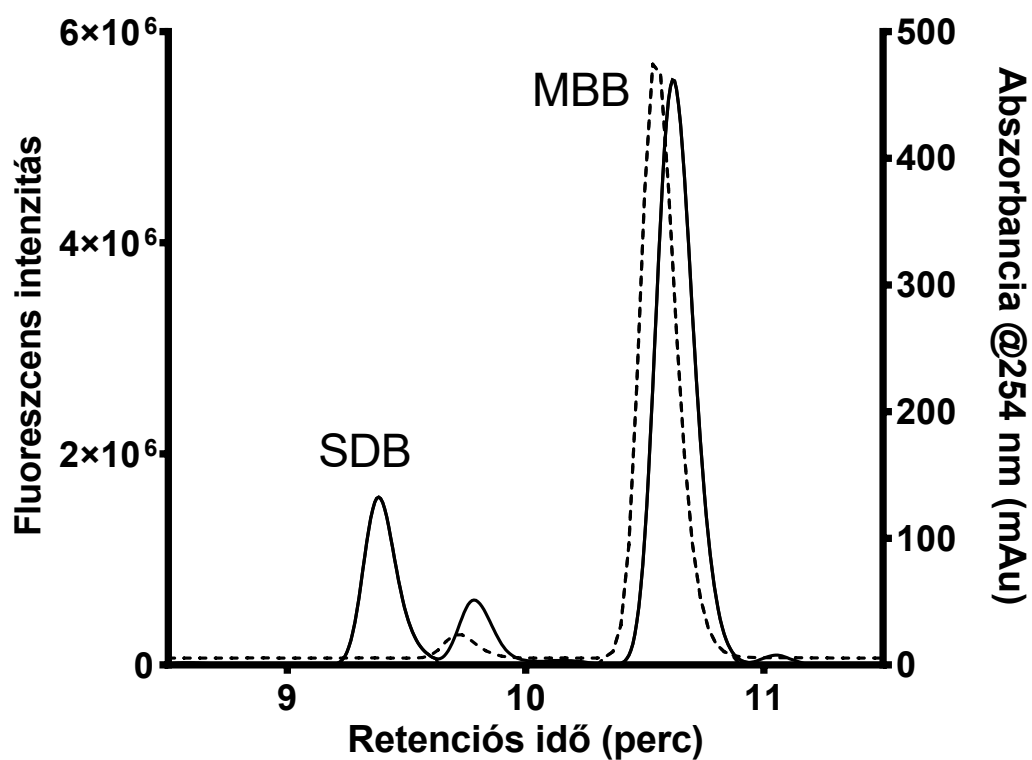
A módszerfejlesztési méréseket, valamint a homocisztinuriás betegek vizsgálatának második részét („B” módszer) az „A” módszernél használt kolonnán végeztük, azonban a gradienst egy 22 perc hosszú elúcióra módosítottuk az áramlási sebesség, 1 ml/perc-re növelésével, a gradiens lefolyása az 1. táblázatban szerepel.

A rutinméréseket a gyógyszervizsgálatnál és a módszer validálásánál már egy jobb teljesítményű kolonnán, egy rövidebb gradiens elúcióval végeztük. Ehhez egy Phenomenex Luna C18(2) 200x4,6 mm-es 3 µm részecskeméretű kolonnát használtunk előtétkolonnával, az elúciót pedig 15 percesre csökkentettük 1 ml/perc áramlási sebesség mellett.

1. Táblázat – Gradiens elúciós profilok az egyes mérési módszerekhez.

A eluens: H₂O/0,1% TFA, B eluens: ACN/0,1% TFA

„A” módszer	Idő (perc)	0	5	15	18	23	26	28	35
	B %	15	30	30	22	70	90	15	15
„B” módszer	Idő (perc)	0	3	9	10,8	13,8	15,6	16,8	22
	B %	15	30	30	22	70	90	15	15
Rutin módszer	Idő (perc)	0	3	9	11	12	13	15	
	B %	15	15	35	35	90	90	15	



5. ábra– UV-Vis (szaggatott vonal) és fluoreszcens (folytonos vonal) kromatogramok egy plazma mintából. A jelölt két csúcs a végtermékhez (SDB) és az alkilálószerhez (MBB) tartozik

3.9. HPLC-MS/MS mérések

A kromatográfiai csúcsok biztos azonosításához HPLC-MS/MS méréseket is végeztünk. A kromatográf fluoreszcens detektora helyére az MS készülék ESI fejének kapillárisát kötöttük és az eluensokban TFA helyett azonos koncentrációjú hangyasavat (FA) használtuk. Előzetesen ezzel az eluenssel is végeztünk futtatást fluoreszcens és UV detektálással az 5. ábrán látható eredménnyel, hogy meggyőződjünk arról, hogy a retenciós idők nem változtak. 50-800 m/z érték között teljes detektálást állítottunk be, valamint szelektív CID fragmentálásra beállítottuk a reagens és a várt termékek prediktált tömeg/töltés értékeit. Ezeket kiválasztva és fragmentálva határoztuk meg később a követendő SRM átmeneteket, amelyek az alábbiak szerint alakultak:

SDB:	415 m/z	→	193 m/z
SMB:	225 m/z	→	192 m/z
MBB:	271 m/z	→	192 m/z

3.10. ATB-346 Fázis 2 vizsgálata

A vizsgálatot Kanadában végezték 4 klinikán 244 fő önkéntes bevonásával, ebből 126 fő kapott naproxent és 118 fő kapott egy naproxen alapvázszal rendelkező szulfid-donor tulajdonságú gyógyszerjelölt molekulát, az ATB-346-ot. A kontrollcsoport naproxent 2x550 mg/nap egyszeri adagban, a kezelt csoport ATB-346-ot 250 mg/nap dózisban kapott. Az önkéntesek átlagéletkora 41,7 év volt, a férfiak aránya a vizsgálatban pedig 54,7%. A vizsgálat 3 részből állt, a páciensek először teljes egészségügyi ellenőrzésen estek át és minden esetben ellenőrizték, hogy nincs-e kezdetben is bármilyen elváltozás az emésztőrendszerükben. A gyógyszereket jelöletlen kapszulákban kapták 14 napon keresztül, amelyről a kezelőorvos sem tudta, mit tartalmaznak. A gyomor és patkóbél endoszkópiás vizsgálatát a 7. valamint a 14. napon végezték, ennek során feljegyezték a 3 mm-nél és 5 mm-nél nagyobb fekélyes sebek számát. Ezen kívül vérvétel is történt hematokrit vizsgálat elvégzéséhez a 14 napos kezelés előtt és után. A H₂S szint vizsgálatához a kezelés 7. napján vett heparinos plazmákból kaptunk 10 db random mintát a naproxen csoportból és a teljes ATB-346 kezelt csoport mintáit. A véreket levétel és szeparálás után fagyasztva, szárazjégen tárolva küldte el részünkre együttműködő partnerünk, Prof. John L. Wallace (Antibe Therapeutics Inc., Toronto, Canada).

3.11. Homociszteinuriás betegek véreinek vizsgálata

Ezt a kutatást szintén Prof. Viktor Kozich prágai partnerünk vezette és a véreket is ő biztosította részünkre. Az 51 fő önkéntest három csoportra osztották, 2 kontrollcsoportra és egy betegcsoportra. Az első kontrollcsoport 12 egészséges önkéntesből állt 30-57 éves kor között, ők jelentették a remetilációs betegekkel szembeni kontrollcsoportot. A második 23 fő kontrollcsoport (1-50 évesek) fenilketonuriás betegekből állt, akik alacsony fehérjetartalmú diétát követtek, hasonlóan a klasszikus homociszteinuriás betegekhez. A maradék 16 főt magába foglaló csoportból 10 fő klasszikus homociszteinuriás beteg volt (0,5-33 év között), akik nem reagáltak B6-vitaminos kezelésre és mindemellett magas cisztein- és alacsony metionin- és fehérjetartalmú diétán éltek. 8 fő betaint is szedett, valamint 9 fő B6-vitamint is. A csoport maradék 6 fője (3-24 év) remetilációs defektussal (RMD) rendelkezett, egyikük sem követett diétát, így kontrollcsoportjuk az egészséges csoport volt. 5 fő betaint, hidroxikobalamint és folátot kapott étrendkiegészítésként, míg az utolsó beteg csak hidroxikobalaminnal kezelést kapott. Az összes beteg esetében a diagnózist enzimatis és genetikai vizsgálattal is megerősítették.

A vérek géles Li-Heparin tartalmú csövekbe kerültek levételkor, legfeljebb 30 perc jégen tartás után 5 percig centrifugálták, 2000g-vel választották el a plazmát, amit -85 °C-on tároltak.

3.12. PAD betegekből H₂S szintek és CBS aktivitás mérése

A vérben mérhető H₂S szint és a CBS aktivitás közötti kapcsolat vizsgálatához egy korábbi együttműködésből származó adatsort vettünk igénybe. Az ebben szereplő 115 perifériás artériás beteg (PAD, 68±2 év, 65% férfi) és 20 egészséges önkéntes (69±9 év, 63% férfi) szérum mintáiból mértünk szulfid szintet az „A” módszer segítségével (leírása a 3.7 fejezetben), valamint tömegspektrometriás eljárással meghatároztuk fajlagos CBS aktivitásukat is (Krijt, Kopecka et al. 2011).

3.13. Adatok kiértékelése

A kiértékeléseket Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation), Graphpad Prism 5.03 (Graphpad Software Inc.) és Micromath Scientist 2.0 (Micromath Software) szoftverekkel végeztük. A szignifikanciák meghatározásakor 2 összehasonlítható érték vagy csoport esetén Student-féle t-próbát alkalmaztunk $\alpha = 0.05$ szinten, több csoportot összehasonlító analízisnél pedig variancia-analízist (ANOVA) használtunk Tukey-teszttel. Az 5.3 alfejezetben látható ábra esetén a mért értékek nem normális eloszlása miatt nemparaméteres Mann-Whitney tesztet

alkalmaztunk. Az ábrákon több mintából kiválasztott egy reprezentatív minta eredményeit tüntettem fel, vagy azok legalább 3 mérésből származó átlagát a standard deviancia jelölésével. A csoportok közötti szignifikanciákat az ábrákon a következő módon jelöltük P értékük függvényében: $\geq 0.05 = \text{ns}$, $0.01\text{-től } 0.05\text{-ig} = *$, $0.001\text{-től } 0.01\text{-ig} = **$, $\leq 0.001 = ***$

4. Eredmények

4.1. Hidrogén-szulfid és monobromobimán közötti reakció kinetikai jellemzése

A monobromobimán és hidrogén-szulfid közötti reakciót már viszonylag korán leírták, (Fahey, Newton et al. 1981, Newton, Dorian et al. 1981) a folyamat egy S_N2 szubsztitúció, amely két lépésben játszódik le a 3. ábrán látható séma szerint:

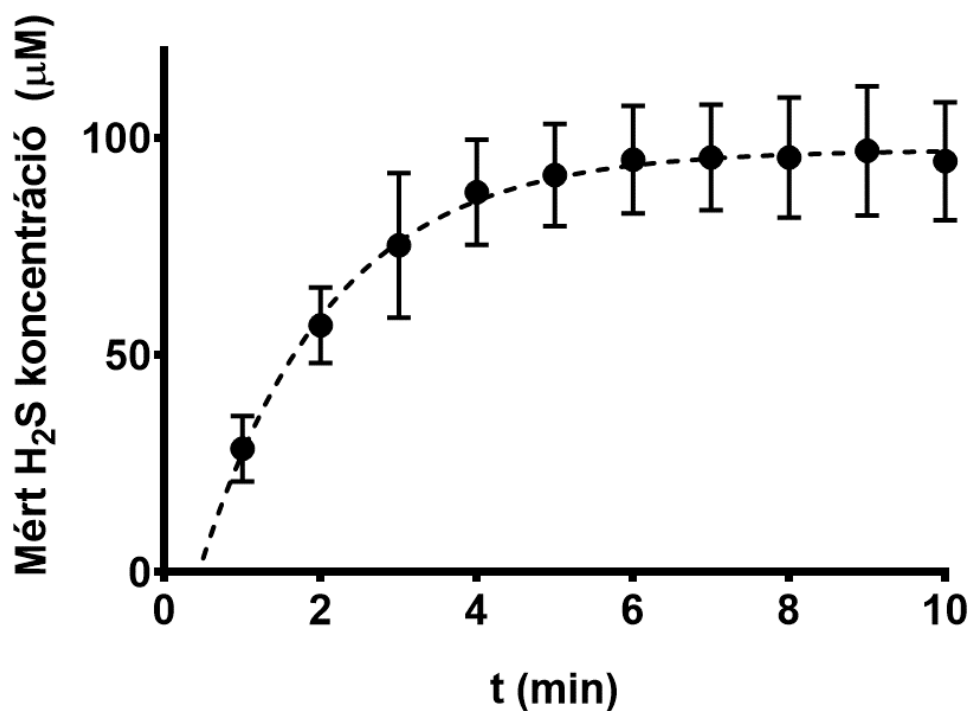


A reakcióséma persze kiegészíthető a hidrogén-szulfid sav-bázis egyensúlyával is (4. oldal, (1) egyenlet), ennek sebessége azonban olyan nagy, hogy elhanyagolható az alkilálás két lépése mellett, azaz gyors előegyensúlynak tekinthető. A két lépés jól karakterizált másodrendű folyamatokat takar, tehát megfelelő koncentráció-körülmények között, azaz az egyik reagens jelentős feleslegben való alkalmazásával várhatóan pszeudo-elsőrendű időfüggést fogunk tapasztalni. Ha emellett feltételezzük, hogy a két lépés sebességi állandója jelentősen különbözik egymástól, úgy egyszerűsödik a leíró egyenlet és immár egyetlen elsőrendű kinetikai függvénnyel jól közelíthető lesz a termék keletkezésének folyamata. Ezen feltételezések már korábban bizonyítást nyertek (Wintner, Deckwerth et al. 2010), így mi is elfogadtuk a feltevéseket a kinetikai vizsgálatok során. Hogy biztosítsuk egy származékképzéses analízis során a pszeudo-elsőrendű körülményeket, ahhoz az irodalomhoz hasonlóan az alkilálószer a hidrogén-szulfidnál jóval nagyobb koncentrációban alkalmaztuk, így annak koncentrációja a reakció során elhanyagolható mértékben változott, azaz állandónak tekinthető. Ekkor a sebességet meghatározó második lépés kinetikáját fogjuk követni, a detektált reakció pedig az alábbi egyenlettel illeszthető:

$$[SDB] = [SDB]_{\infty} (1 - e^{-k_{obs}t}) \quad (21)$$

$[SDB]$ = SDB koncentráció az adott időpontban, $[SDB]_{\infty}$ = SDB végkoncentráció = H_2S kezdeti koncentráció, k_{obs} = pszeudo-elsőrendű sebességi állandó, t = idő

A kinetikai méréseket a 3.4 fejezet alapján végeztük el 100 μM koncentrációjú Na_2S törzsoldatot és 100 mM koncentrációjú MBB törzsoldatot használva. Ezzel a reakcióelegyünkben keverés után biztosítottuk az alkilálószer 25x feleslegét, így teljesítve a pszeudo-elsőrendű kinetika követelményét. Az SDB koncentrációjának időbeli változását követve a 6. ábrán látható görbét kaptuk, amelyre megfelelően illeszkedett az elsőrendű közelítés és jó hasonlóságot mutatott a korábban publikált görbékkel (Wintner, Deckwerth et al. 2010). A pontok jelentős szórása az egymást követően végzett párhuzamos méréseknek tudható be, azaz két görbe között a H_2S párolgása miatt változott a koncentráció. Ezt az egyes párhuzamos görbék külön-külön történő illesztése is igazolta, hiszen azonos kinetikai állandókat kaptunk az egyes egyéni mérésekre.

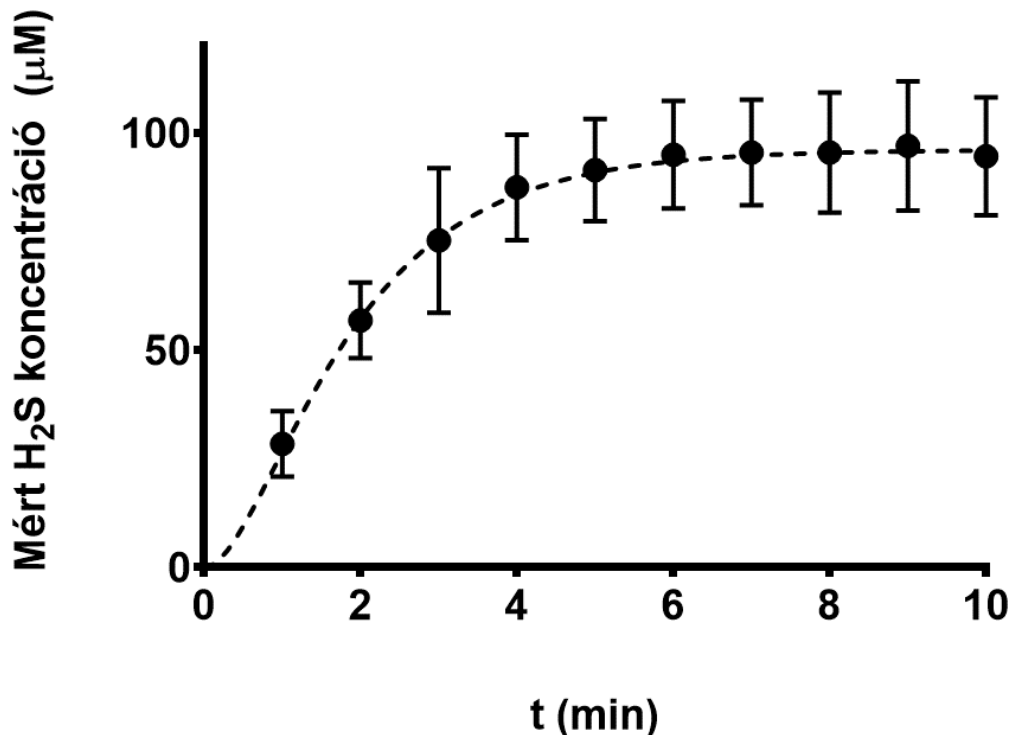


6. ábra – SDB képződés kinetikája H_2S és MBB közötti reakcióban. $[\text{H}_2\text{S}]=27,5 \mu\text{M}$ (100 μM törzsoldat), $[\text{MBB}]=1,1 \text{ mM}$, $\text{pH}=8,2$, $T=20^\circ\text{C}$

Az ábrán azonban észlelhető, hogy az illesztett görbe negatív tengelymetszetet mutat az elméleti $t = 0$ helyett. Ennek a feloldására bevezethetjük az ismert kétlépéses modell alapján a következő egyenletet (konszekutív elsőrendű), amely már a kétlépéses reakció mindkét reakciólépését tartalmazza:

$$[\text{SDB}] = [\text{SDB}]_{\infty} \left(1 + \frac{k_1 e^{-k_2 t} - k_2 e^{-k_1 t}}{k_2 - k_1} \right) \quad (22)$$

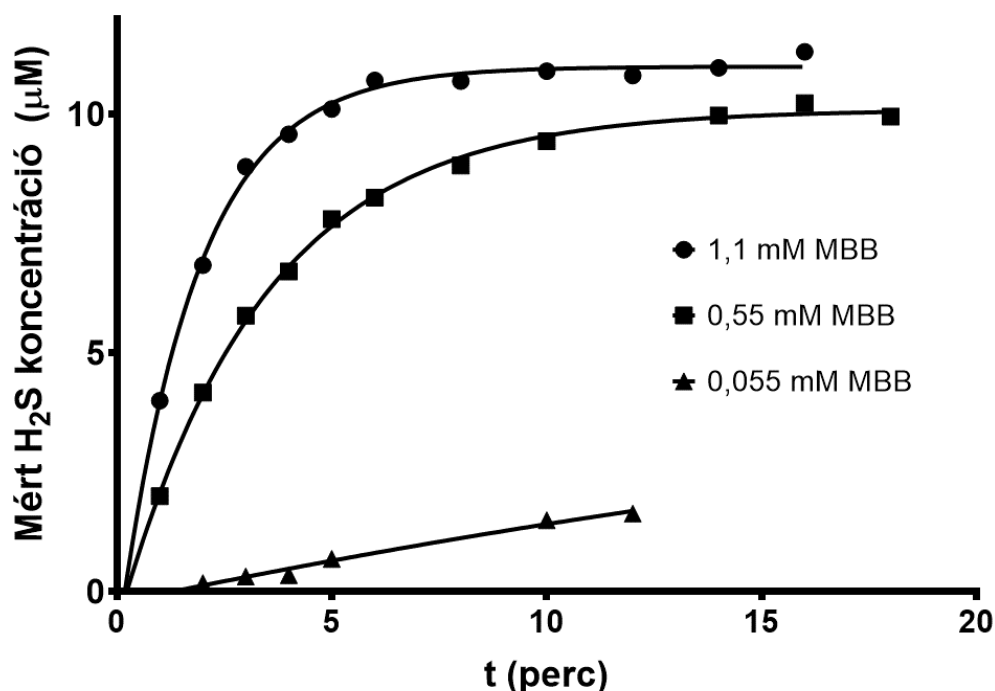
$k_1, k_2 =$ a két reakciólépés pszeudo-elsőrendű sebességi állandói



7. ábra - Az 6. ábra mérési pontjai konszekutív pszeudo-elsőrendű kinetika szerint illesztve

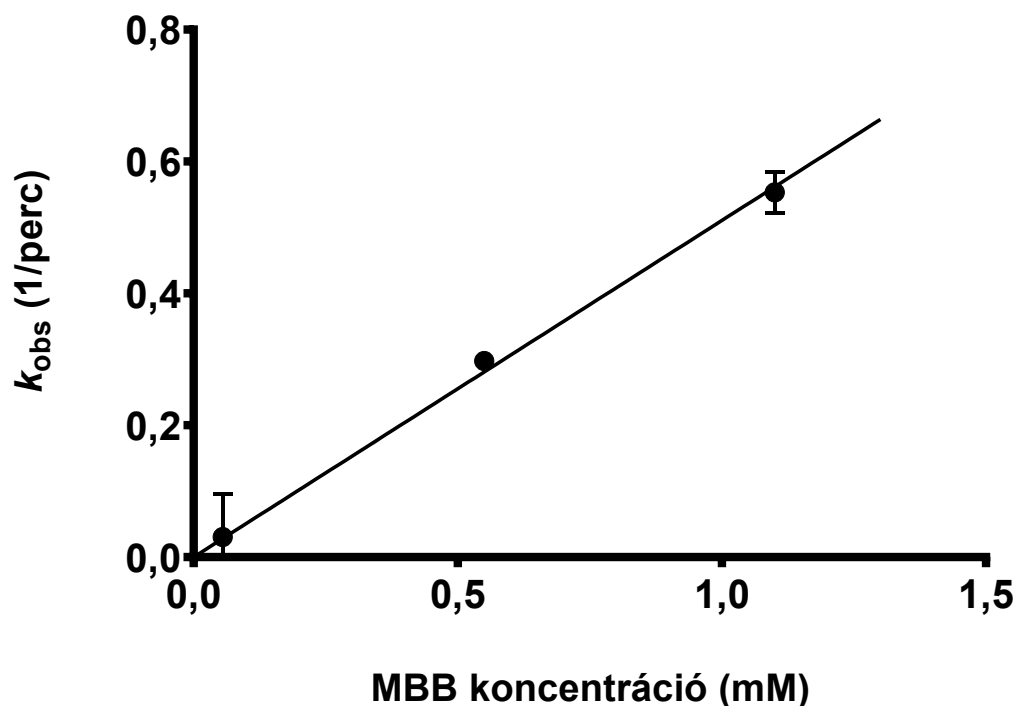
A 7. ábrán ennek megfelelően már jól látszik, hogy az illesztett görbe a várt elméleti feltételezésnek megfelelően alakul.

Az elsőrendű illesztések MBB függését is vizsgáltuk, hogy ezzel is alátámasszuk a felállított modell alkalmazhatóságát. A különböző MBB koncentrációkkal végzett kinetikai mérések a következő időfüggő görbék eredményezték, amelyek esetén a pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat egy exponenciális illesztéssel határoztuk meg.



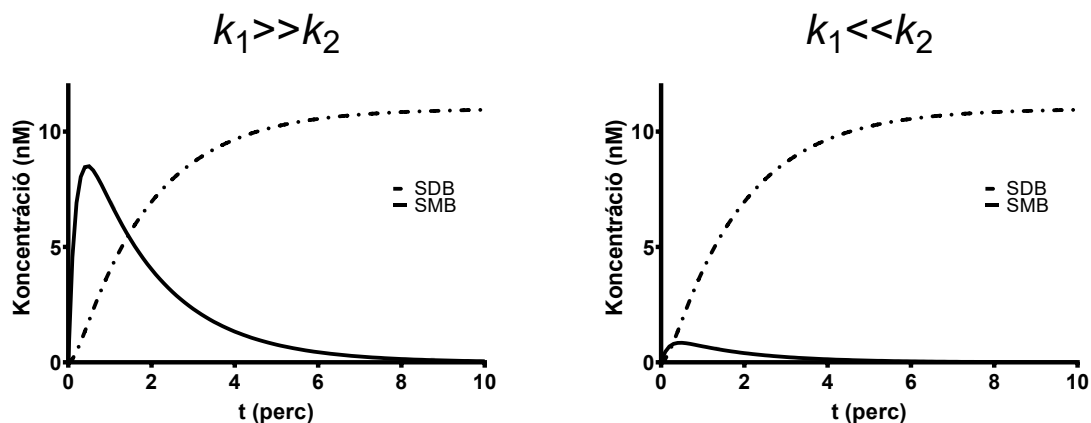
8. ábra – Kinetikai görbék MBB koncentrációjának függvényében. $[H_2S]=2,75 \mu M$ (10 μM törzsoldat), $[MBB]=1,1-0,055 \text{ mM}$, $pH=8,2$, $T=20^\circ C$

A modell alapján az illesztett pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat (k_{obs}) az alkalmazott MBB koncentráció függvényében ábrázolva origóból induló egyenest kell kapnunk. Az ábrázolt egyenes meredeksége a másodrendű sebességi állandóhoz rendelhető. Az ábrázolást és az illesztést elvégezve a 9. ábrát kaptuk, amely nemcsak igazolta a reakció rendűségét, de a másodrendű sebességi állandóra a korábbi irodalmi értékhez közeli eredményt adott. Megjegyzendő, hogy a korábban meghatározott $(3,0 \pm 0,5) \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ sebességi állandó (Wintner, Deckwerth et al. 2010) kissé különböző körülmények között határozták meg, azaz a hőmérséklet nem pontosan ismert (szobahőmérséklet), a pH 8 volt és az oldat 33% acetonitrilt tartalmazott. Ezeket figyelembe véve az általunk meghatározott $(7,7 \pm 0,2) \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bár eltér, de nagyságrendileg megegyező értéket mutat a korábban meghatározott értékkel. Természetesen egyezést nem vártunk, hiszen saját méréseinket kissé eltérő körülmények között végeztük.



9. ábra – Másodrendű sebességi állandó meghatározása a 8. ábra eredményei alapján

A 3. ábra kétlépéses reakciójának a leírásakor nincs egyetértés, hogy melyik reakciólépés határozza meg a sebességet. Egyes cikkek a második lépést említik, mint lassabb, sebességmeghatározó lépést (Montoya, Shen et al. 2015), máshol az első lépést említik sebességmeghatározóként (Wintner, Deckwerth et al. 2010). Ez utóbbi például helytelenül került megállapításra, ugyanis a 7. ábra alapján meghatározott két pszeudo-elsőrendű sebességi állandó, amelyek a két külön reakciólépéshez rendelhetőek, további vizsgálatok hiányában kinetikailag megkülönböztethetetlenek. Ebből fakadóan akár az első, akár a második lépés a lassabb, a kinetikai görbe lefolyása nem változik. A reakciósebességek arányára csak a köztitermék analízisen keresztül juthatunk, ugyanis ennek a mennyisége a reakció során reprezentatív a sebességi állandók viszonyára vonatkozóan. Ezt demonstrálja a 10. ábra is, amelyen a köztitermék mennyiségét szimuláltuk a 8. ábra alapján meghatározott sebességi állandókat felhasználva.

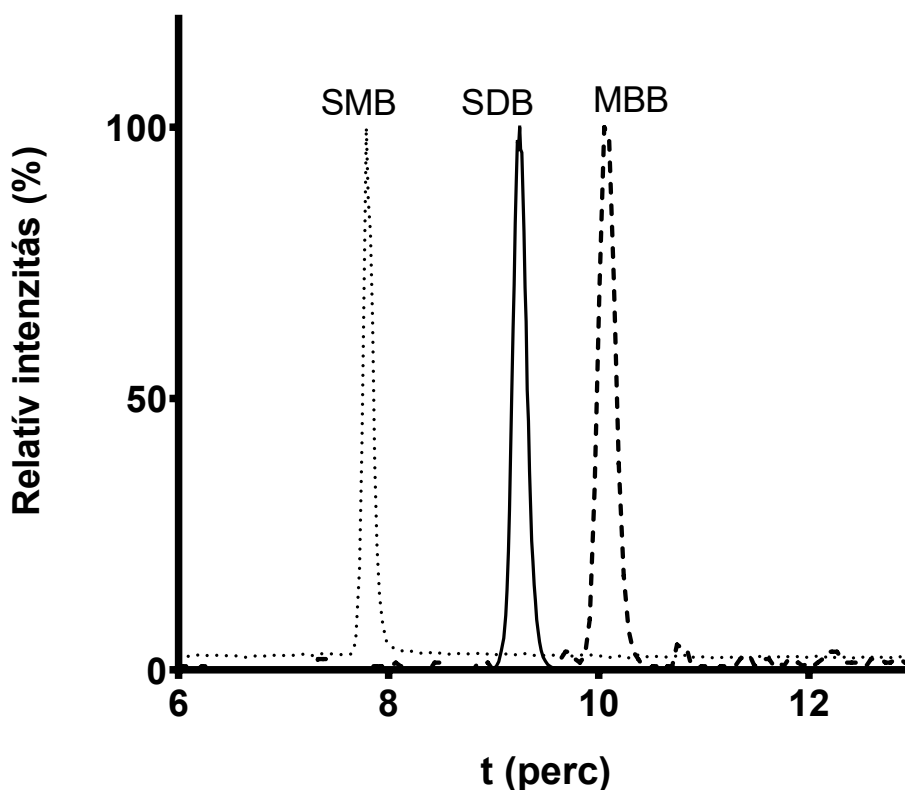


10. ábra – Szimulált kinetikai görbék közti- és végtermék feltüntetésével, a két reakciólépés sebességi állandóinak függvényében. $[H_2S]=2,75 \mu M$ (10 μM törzsoldat), $[MBB]=1,1 mM$

Látszik, hogy amíg $k_1 \gg k_2$, azaz az első lépés a sebességmeghatározó, addig az SMB viszonylag nagyobb mennyiségben is képes felhalmozódni. Ezzel szemben a $k_1 \ll k_2$ esetben, ahol a második lépés a sebességmeghatározó, csak kis SMB koncentráció átmeneti felhalmozódása várható. Ehhez először az szulfid-monobimánhoz tartozó fluoreszcens csúcsot kellett azonosítanunk, amit LC-MS analízissel végeztünk. Na_2S standard oldatot derivatizálva és a reakciót lejátszódása előtt leállítva készítettünk SMB tartalmú mintát, beállítottuk a keresett SMB tömeget és fragmentációja alapján azonosítottuk a keresett csúcsot. A meghatározott retenciós időt felhasználva szeretnénk volna azonosítani a csúcsot a fluoreszcens kromatogramon, azonban a keresett csúcs beleolvadt az alapvonalba kis koncentrációja miatt, amit már a teljes ionáram kromatogram is előre jelzett a csúcs kis intenzitásával. Ez eleve kérdésessé teszi a $k_1 \gg k_2$ lehetőséget, azonban a biztos kizáráshoz sokkal alaposabb bizonyítékra volt szükség.

Ehhez a reakciókörülményeket változtatva a kén-hidrogén feleslegét reagáltattuk monobromobimánnal, így a keletkező SDB mennyiségéből, amelyet pontosan meg tudtunk határozni, következtethettünk a két sebességi állandó viszonyára. Ehhez 5x, 2,5x és 0,5x mennyiségű kén-hidrogént alkalmaztunk a monobromobimánhoz képest, a reakciót pedig a szokásos protokoll szerinti térfogatokkal végeztük, az alkilálást 10 perc után állítottuk le. Rögzítettük a minták fluoreszcens és tömegspektrométerrel detektált kromatogramjait is, ahol a megfelelő SRM átmeneteket állítottuk be MBB, SMB és SDB detektálására a „HPLC-MS/MS mérések” alfejezetben leírtak szerint. A 11. ábrán látható kromatogramokon szerepelnek az egyes molekulák SRM csúcsai, ami alapján meghatároztuk retenciós idejüket. Intenzitásuk (és csúcsterületük) pontos kvantitatív meghatározásra nem alkalmas, emiatt az azonosított

retenciók alapján a csúcsokat visszakerestük a fluoreszcens kromatogramokon. Teljes ionáram kromatogramon mért csúcsterület alapján és korábbi, MBB felesleggel végzett fluoreszcens mérések alapján azonban jól látszott, hogy az MBB és SMB koncentrációja alacsony volt, míg az SDB koncentrációja jelentős volt a mintában.

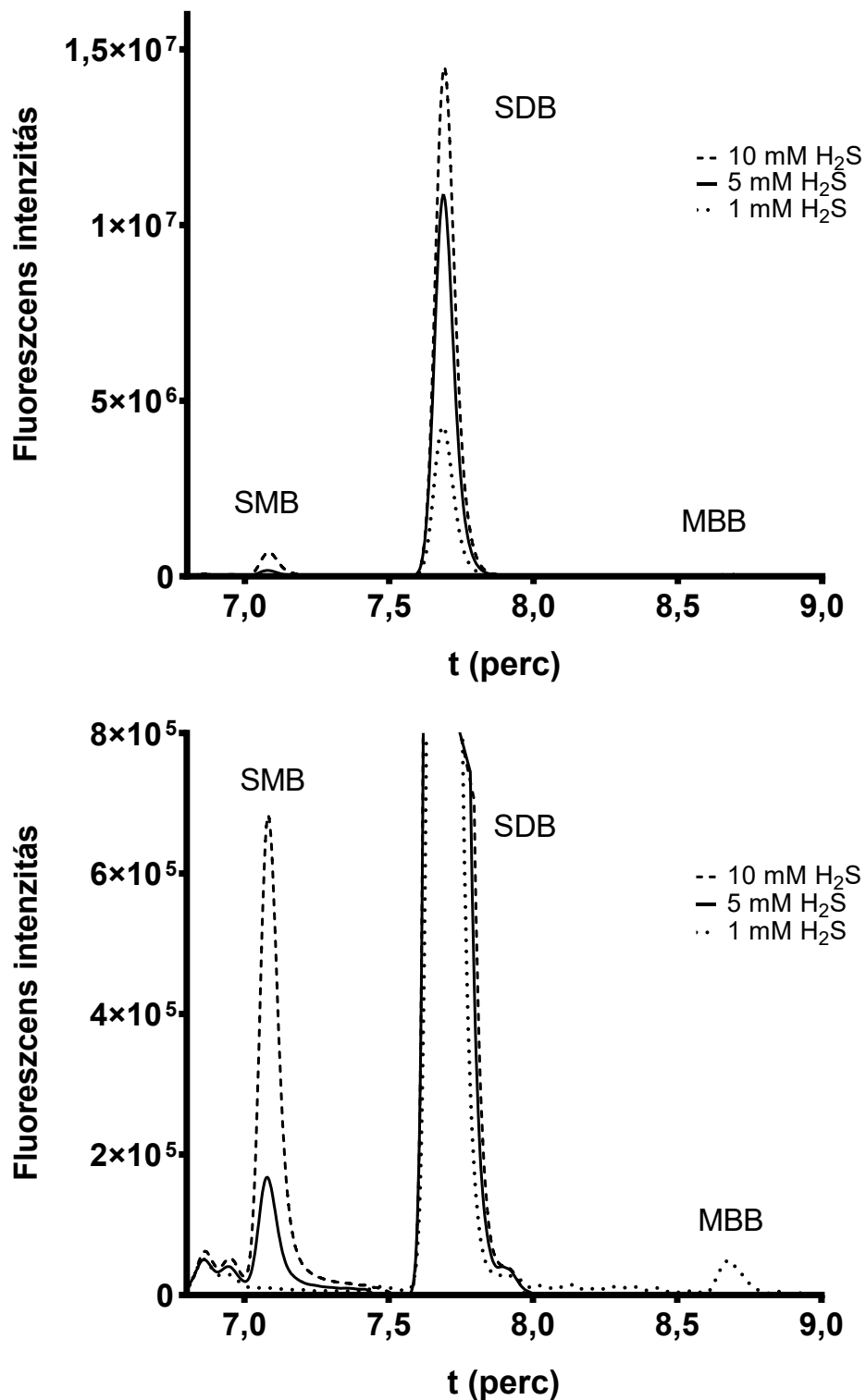


11. ábra – MS/MS kromatogramok a különböző bimán termékek retencióinak meghatározására.

Az intenzitások az egyes monitorozott átmenetek totál ion kromatogramjaira vonatkoznak, azaz mennyiségileg nem összehasonlíthatóak. $[H_2S]=2,75 \mu M$ ($10 \mu M$ törzsoldat), $[MBB]=1,1 \text{ mM}$, $pH=8,2$, $T=20^\circ C$

A fluoreszcens kromatogramokon, amelyek a 12. ábrán kerültek feltüntetésre, egyértelműen látszik, hogy még jelentős H_2S felesleg mellett is a fő termék az SDB, amelynek mennyisége csúcsterület alapján jól követi a kezdeti H_2S mennyiségét. A reakció csaknem 100%-ban lezajszódott, amit az MBB csúcs eltűnése igazol mindkét esetben, amikor a kén-hidrogént alkalmaztuk feleslegben. Az is könnyen leolvasható az ábráról, hogy a szulfid-monobimán mennyisége csak H_2S feleslege mellett mérhető, koncentrációja a felesleggel nő, azonban mennyisége messze elmarad a végtermék SDB csúcsától. Ezek a megfigyelések mind azt az elméletet támogatják, miszerint a második reakciólépés gyorsabb a 15. oldalon felvázolt reakciólépések közül (3. ábra), azaz a bruttó reakció sebességét a lassabb első lépés fogja meghatározni. Ehhez hozzájárul a számításunk is, miszerint az alkalmazott MBB és a detektált

SDB koncentrációja alapján a reakció 90% feletti konverzióval ment végbe szulfid-dibimánra nézve, azaz csak nagyon kis mennyiségű köztitermék keletkezett és a fő termék az SDB volt még jelentős H_2S felesleg mellett is.



12. ábra – Fluoreszcens kromatogramok szulfid-felesleg alkalmazásakor. Az alsó ábrán az első kromatogram nagyított részlete látható. $[\text{H}_2\text{S}]=1\text{-}10\text{ mM}$, $[\text{MBB}]=1,1\text{ mM}$, $\text{pH}=8,2$, $T=20^\circ\text{C}$

Mivel a kinetikai kísérletek alapján a reakció lefolyása jól közelíthető egylépéses elsőrendű illesztéssel, így annak következményei is igazak lesznek. A 29. oldalon található kinetikai egyenlet alapján meghatározható a felezési idő a következő egyenlet szerint:

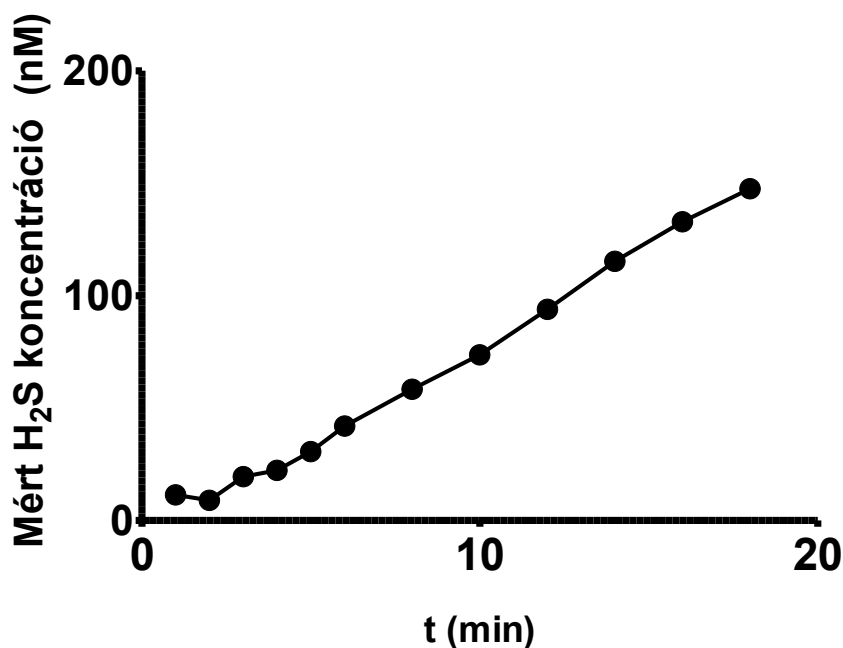
$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{\text{obs}}} = \frac{\ln 2}{k [\text{MBB}]} \quad (23)$$

Az (23) egyenletből jól látszik, hogy a felezési idő, és ebből következően a reakció lejátszódásához szükséges idő hossza egyáltalán nem függ a H_2S koncentrációjától, amíg teljesülnek a kinetikai modell feltételei. Szerencsére ez mostani ismereteink szerint biológiai mintákon még kiugró esetekben sem lesz probléma, azaz nagyon nagy valószínűséggel nem fogunk olyan mintát találni, ahol a H_2S koncentrációja összemérhető lesz az alkilálószer koncentrációjával (pszeudo-elsőrend feltétele).

Ennek a kinetikai vizsgálatnak a legfontosabb következtetése, hogy az alkilálás H_2S koncentrációtól független reakcióideje miatt a 6. ábra alapján a reakció minden esetben 7 perc alatt lejátszódik. Korábbi publikációkban is hasonló következtetésre jutottak (Wintner, Deckwerth et al. 2010), így a szükséges reakcióidőt 10 percen határozták meg, amely idő alatt a szabad H_2S 100%-a szulfid-dibimánná alakul.

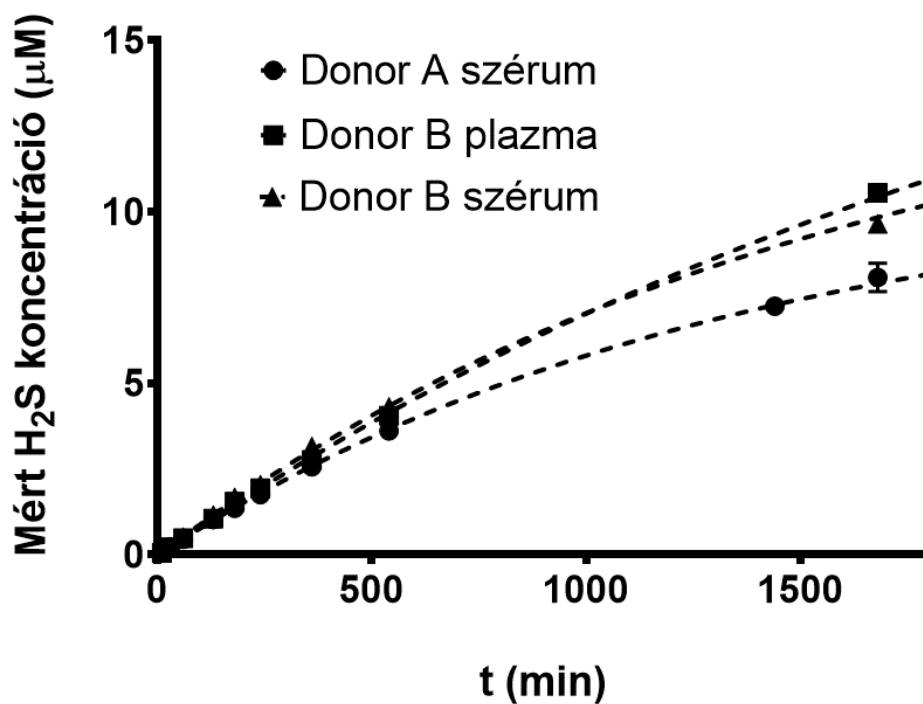
4.2. Az alkilálási reakció kinetikai jellemzése vérben

Az előző tézispontban leírtak alapján tehát kémiai ismereteinkre támaszkodva jogosan várhatjuk, hogy standard oldatok után vérmintákon is hasonló kinetikát tapasztaljunk, amennyiben megtartjuk a mérési körülményeinket. Megismételtük tehát az előző kinetikai méréseinket mindössze annyi változtatással, hogy standard Na_2S oldat helyett egészséges önkéntesek szérumát használtunk. A vártakkal ellentétben azonban jelentős különbséget tapasztaltunk, ugyanis a reakció még 20 perc után sem fejeződött be, azaz nem sikerült az összes hidrogén-szulfidot a várt idő alatt derivatizálnunk, ahogy az a 13. ábrán is látszik.



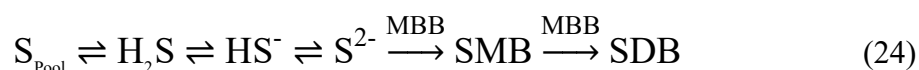
13. ábra – Származékképzés kinetikája egészséges humán szérumban. [MBB]=1,1 mM, pH=8,2, T=20°C

A kísérletet kiterjesztve sokkal hosszabb időskálára és plazma mintákat is használva egészen megdöbbentő eredményre jutottunk, miszerint a reakció a 14. ábra alapján még 28 óra elteltével sem fejeződött be.



14 ábra – Származékképzés kinetikája humán szérum és plazma mérésekor hosszú időskálán. A szaggatott vonal a mérési pontokra illesztett exponenciális görbét jelöli. [MBB]=1,1 mM, pH=8,2, T=20°C

Mivel az alkilálás kinetikájára hatással lévő paramétereket állandó értéken tartottuk, ezért a szabad hidrogén-szulfid alkilálása az előző fejezetben bemutatott, 6. ábrán látható kinetikának megfelelően 7 perc alatt minden bizonnyal lejátszódott. Ehelyett látszólag egy sokkal lassabb reakciót detektálunk, amit semmilyen kinetikai paraméter nem indokol. Az ellentmondás viszont feloldható a 14. oldalon feltüntetett bruttó egyensúlyi reakció bevonásával. Ekkor a teljes reakcióséma a következő szerint módosul:



Ez alapján feltételezve, hogy az első egyensúlyi folyamat a következő lépésekhez képest sokkal lassabb, úgy immár sebességmeghatározó lépés a kén-hidrogén tartalékokból való spontán felszabadulása lesz, aminek kinetikája látható a 14. ábrán. Ez a jelenség egy másik szemszögből is jól indokolható, mivel a kén-hidrogén a vérben a mért, 10 μM feletti koncentrációban már igen súlyos mérgező hatást fejtene ki a szervezetre a már korábban említett *citokróm-c-oxidázt* gátló hatása miatt. Ezt figyelembe véve tehát a mért eredményünk nem reprezentálhatja a szabad hidrogén-szulfidot, hiszen így már toxikus mennyiségben lenne jelen.

4.3. Az alkilálási reakció kinetikáját befolyásoló tényezők vizsgálata vérben

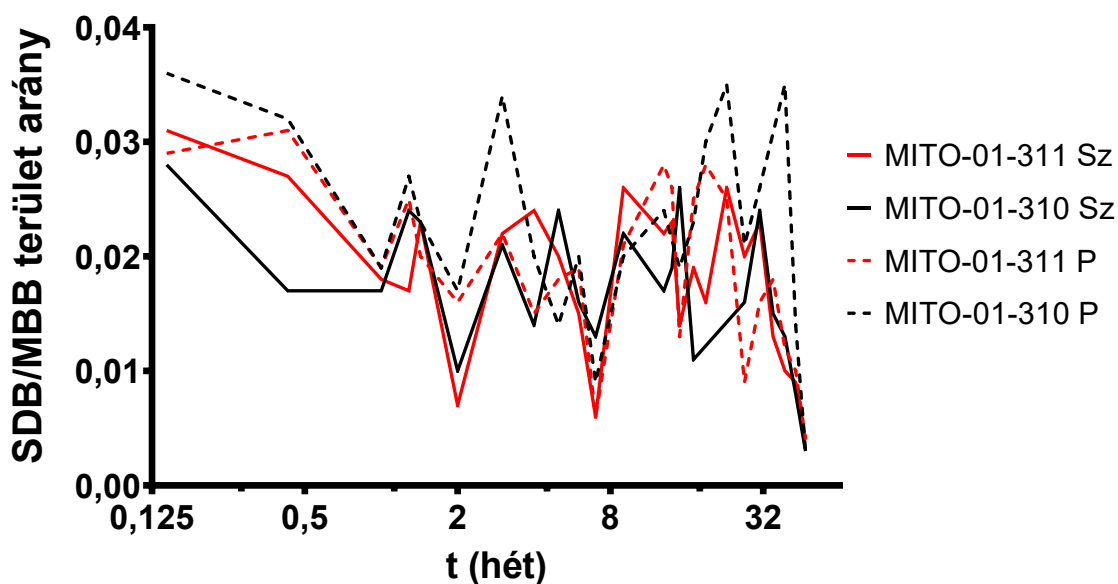
Tekintettel arra, hogy a reakció az előkészítés során csak akkor játszódna le, ha napokra magára hagynánk, minden esetben a mérésnél egy le nem játszódott reakció kellemetlen következményével kell számolnunk: a mért érték jelentősen függeni fog a reakció kinetikájától. Ez egyszerűen fogalmazva annyit jelent, hogy minden olyan külső paraméter, ami befolyásolná a származékképzési reakció sebességét vagy a reakcióhányadost, az a mért szulfid-koncentrációt is befolyásolni fogja. Emiatt szántunk külön figyelmet a kinetikát befolyásoló legfontosabb paraméterek vizsgálatára.

4.4. Alkilálási idő

A legtriviálisabb befolyásoló tényező az idő, hiszen minél tovább halad előre a reakció, annál nagyobb mért szulfid szintet fogunk tapasztalni. A 14. ábra egyértelműen bemutatja, hogy az általunk használt időszámban kifejezetten fontos az alkilálási idő pontos betartása, hiszen még a reakció kezdeti (gyorsan változó) szakaszán vagyunk. A hosszabb alkilálási idő elvileg csökkentheti az alkilálási idő pontatlanságából eredő hibát, azonban ugyanekkor nagyban

csökkentené a mérési kapacitásunkat, hiszen egy-egy előkészítés órákig is eltartana és a mért értékben a szabad szulfid koncentráció hozzájárulása elenyésző lenne. Emiatt a reakcióidő nagyon pontos kontrollálása mellett döntöttünk, amit stopperrel biztosítottunk maximálisan 1-2 másodperc eltérést megengedve a kijelölt alkálalási időtől.

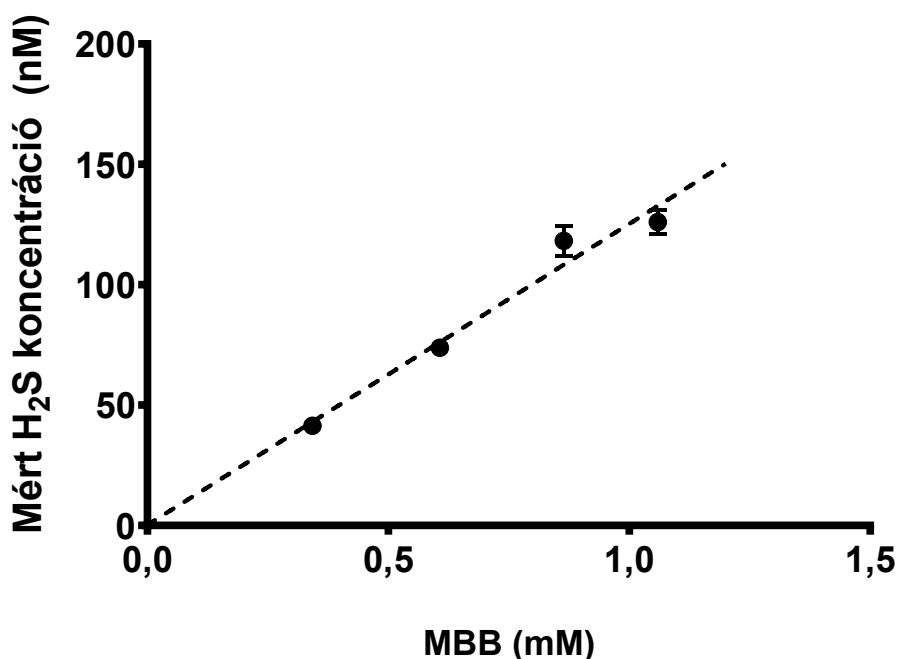
Ez a jelenség részben megmagyarázta a korábban, más módszerrel tapasztalt jelentős szórásokat, mivel az előkészítést végző változó mintaszámú sorozatok esetében változó alkálalási időket alkalmazott a minták számától függően. Az ekkor tapasztalt jelentős párhuzamosok közötti eltérés ezzel a hatással könnyen érthető és megmagyarázható. Ezt a jelentős szórást mutatja be az alábbi 15. ábrán, amelyen ugyanazon szérum minták mért szulfid koncentrációit láthatjuk idő függvényében 47 héten keresztül. Az előkészítések az „A” módszerrel történtek, az Y tengelyen a termék (SDB) és a nagy feleslegben lévő reagens (MBB) hányadosa látható, ez az extrakció hatékonyságának hibáját hivatott csökkenteni, mint belső standard. A nagyon jelentős szórás mögött azonban csak részben áll a pontatlan, akár 50%-os eltérés a kitűzött alkálalási időtől, emellett a pH és a keverési térfogatok kivételével más paraméterek sem voltak szigorúan szabályozva.



15. ábra – „A” módszerrel mért eredmények 4 különböző szérum (Sz) és plazma (P) mintából 47 héten keresztül. Az ábra időtengelye logaritmizált formában került feltüntetésre a mérések gyakoriságához igazodva. [MBB]=3,3 mM, pH=8,0, T=RT

4.5. MBB koncentráció

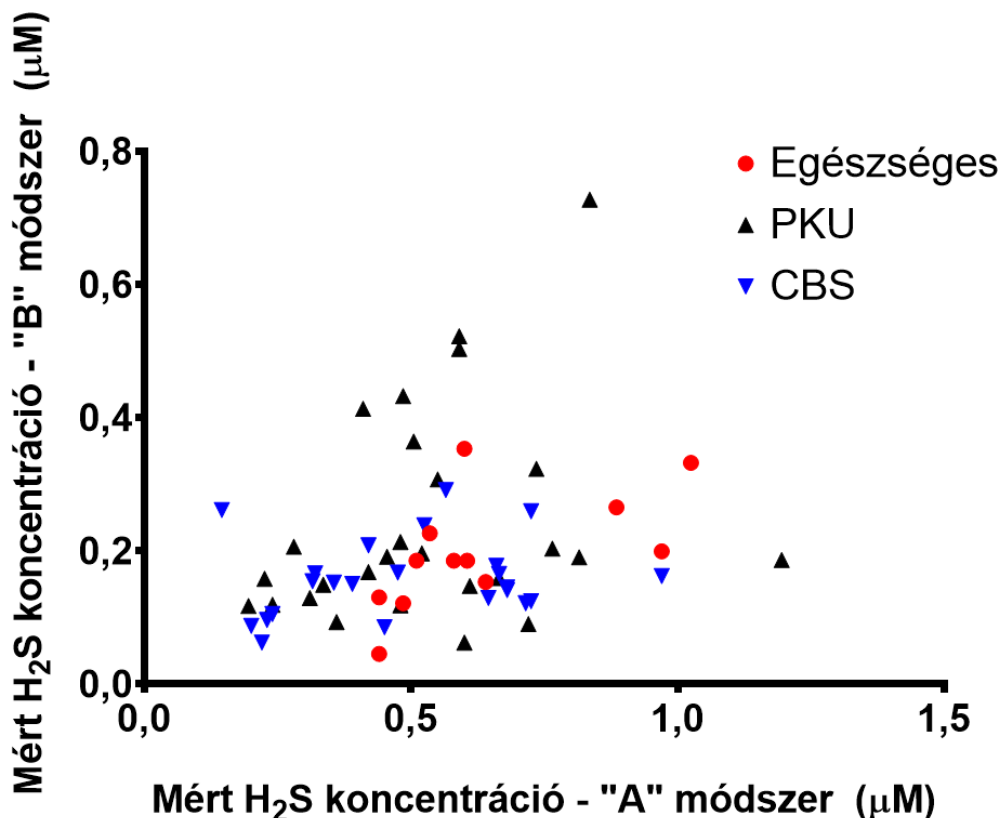
A pszeudo-elsőrendű sebességi állandó a gyakorlatban felbontható a valós, másodrendű sebességi állandó és a feleslegben alkalmazott reagens koncentrációjának szorzatára. Ebből adódóan a feleslegben lévő reagens koncentrációjának változása közvetlenül érvényesül a kinetikában, így magasabb monobromobimán koncentráció magasabb mért szulfid szintet fog eredményezni. Ennek a pontos leírását már bemutattuk a 8. ábrán látható kinetikai vizsgálatnál is standard Na_2S oldatot használva. A vizsgálatot megismételtük vérmintákat használva és azt tapasztaltuk, hogy a standard oldatokhoz hasonlóan lineáris függést láthattunk (16. ábra).



16. ábra – Mért szulfid-koncentrációk szérumban különböző koncentrációjú MBB törzsoldatokkal végzett előkészítések esetén [MBB]=0,33-1,1 mM, pH=8,2, $T=20^\circ\text{C}$

A probléma azonban viszonylag könnyen kiküszöbölhető, hiszen az 5. ábrán látható csúcsból a reakcióban alkalmazott monobromobimán mennyisége könnyen kvantitálható. Ehhez mindössze egy vakminta injektálására van szükség minden egyes előkészítési sorozatban. A vakmintából meghatározott MBB koncentráció ezek után felhasználható a mért adatsor korrigálására eltérő MBB koncentrációk esetén. Bár a monobromobimán acetonitrilben feloldva hetekig tárolható -20°C hőmérsékleten, fontos megjegyezni, hogy idővel bomlik és zavaró csúcsok jelennek meg a kromatogramon. Emellett a szerves oldószer párolgása is közbejátszik, hogy az MBB törzsoldat koncentrációja idővel láthatóan eltérjen a friss oldatétól.

A jelenség gyakorlatban okozott hibáját a 17. ábra mutatja be szemléletesen, amelyen a két tengely két különböző módszer által mért szulfid szinteket mutatja, míg egy pont egy humán plazma mintához tartozik. A két módszer leírása megtalálható a 0 és a 3.7 fejezetekben.



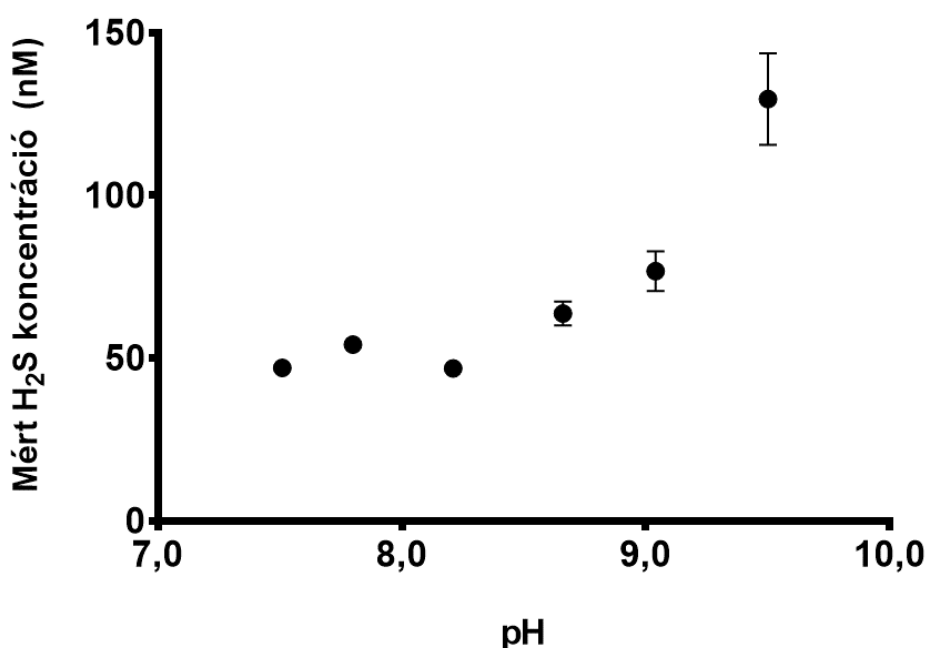
17. ábra – Egészséges, fenilketonuriás (PKU) és CBS hiányos felnőttek vérmintáinak összehasonlítása két különböző módszerrel mérve. „A” módszer: [MBB]=3,3 mM, pH=8,0, T=RT
„B” módszer: [MBB]=1,1 mM, pH=8,2, T=20°C

Amíg az új („B”) módszer által mért értékek egyetlen MBB törzsoldat felhasználásával készültek, addig a háromszöggel (▲▼) és körrel (●) jelölt vérek lemerése két külön MBB oldattal történt az „A” módszert alkalmazva. A két skálán vizsgálva az eredményeket a függőleges skálán ezek egybeesnek a többi mérés medián értékével, azonban a vízszintes tengelyt nézve a piros körök mediánja már a többi ponthoz viszonyítva jelentősen nagyobb. A két mintahalmaz kromatogramjainak utólagos összehasonlítása egyértelműen megmutatta, hogy a körrel jelölt pontokban magasabb MBB szint volt mérhető, ami az ábrán látható módon az értékek a vízszintes tengelyen pozitív irányba tolódását okozta. Ez a tapasztalat kihangsúlyozza, miért fontos egy mintahalmazt ugyanazon MBB törzsoldattal előkészíteni, lehetőleg egyetlen előkészítésen belül. Természetesen ez a probléma egy alternatív megoldással is kiküszöbölhető a 16. ábra eredményét felhasználva: minden előkészítéshez egy MBB

törzsoldatot vagy egy mintaelőkészítésen átesett vak oldatot injektálunk és ellenőrizzük az alkilálószerhez tartozó csúcs területét. Eredményeinket ezt követően súlyozhatjuk az alkalmazott MBB törzsoldat koncentrációjával eltüntetve ezzel a törzsoldatok különbsége okozta varianciát. Megjegyzendő, hogy az MBB meghatározás során érdekesebb UV-Vis detektálást alkalmaznunk, amellyel megbízhatóbban kvantitálhatunk korábban felvett kalibrációs egyenest használva.

4.6. pH

Annak ellenére, hogy valamennyi mérést pufferelt közegben végeztünk, mégis előfordulhatnak eltérések idővel, hiszen vizes pufferoldatok stabilitása sem végtelen. A hatás vizsgálatához az előkészítéshez használt 200 mM koncentrációjú HEPES puffer pH-ját változtattuk 7,4 és 9,5 között, ezek segítségével pedig ugyanazon szérum mintát dolgoztuk fel. Bár az alkalmazott HEPES puffer optimális működési tartománya 6,8 és 8,2 pH érték közé esik, a jelentős pufferkoncentráció ellensúlyozta a 8,2 pH feletti gyenge pufferkapacitásunkat. Ezt a 18. ábrán tapasztalt növekedés is igazolta, hiszen elégtelen pufferkapacitás esetén nem láthattunk volna változást 8.2 feletti pH tartományban. Az irodalomban találhatóhoz hasonló tendenciát tapasztaltunk (Shen, Pattillo et al. 2011), amely a 18. ábrán látható. Azonban míg más források csupán a származékképzés hatásához kötik a tapasztalt tendenciát, a mi esetünkben a lehetséges magyarázatok száma a labilis szulfid-tartalékok léte miatt bővül.



18. ábra – Szérumban mért szulfid koncentrációk a származékképzést során alkalmazott pH függvényében. [MBB]=1,1 mM, pH=7,4-9,5, T=20°C

A jelenség magyarázata tehát több hatás összessége, amelyek a következők lehetnek: 1) A célmolekula, a hidrogén-szulfid savi disszociációs karakterisztikája miatt, ugyanis a vizsgált tartományban H_2S és HS^- formában is jelen van. A két disszociációs forma arányát, tehát a két reagáló nukleofil koncentrációját a pH növelésével az utóbbi irányába toljuk el az (1) egyenlet szerint. Ez pedig az alkilálás reakciósebességét is növeli, hiszen a deprotonált HS^- molekula jobb nukleofilként gyorsabban fog reagálni. 2) A kémiaiilag kötött kénszármazékok, melyek tiol csoporttal rendelkeznek, a magasabb pH okozta deprotonálódás hatására a hidrogén-szulfidhoz hasonlóan jobb nukleofillé válnak. Ennek közvetlen következményeként monobromobimánnal reagálva könnyebben leszakíthatóak, ahogy azt korábban be is mutatták. 3) A szulfid tartalékok közül a per- és polisulfid formában lévő komponensek bázikus hidrolízisre hajlamosak, tehát könnyebben felszabadulnak magasabb pH hatására növelve a szabad szulfid szintet (Hamid, Tanaka et al. 2019).

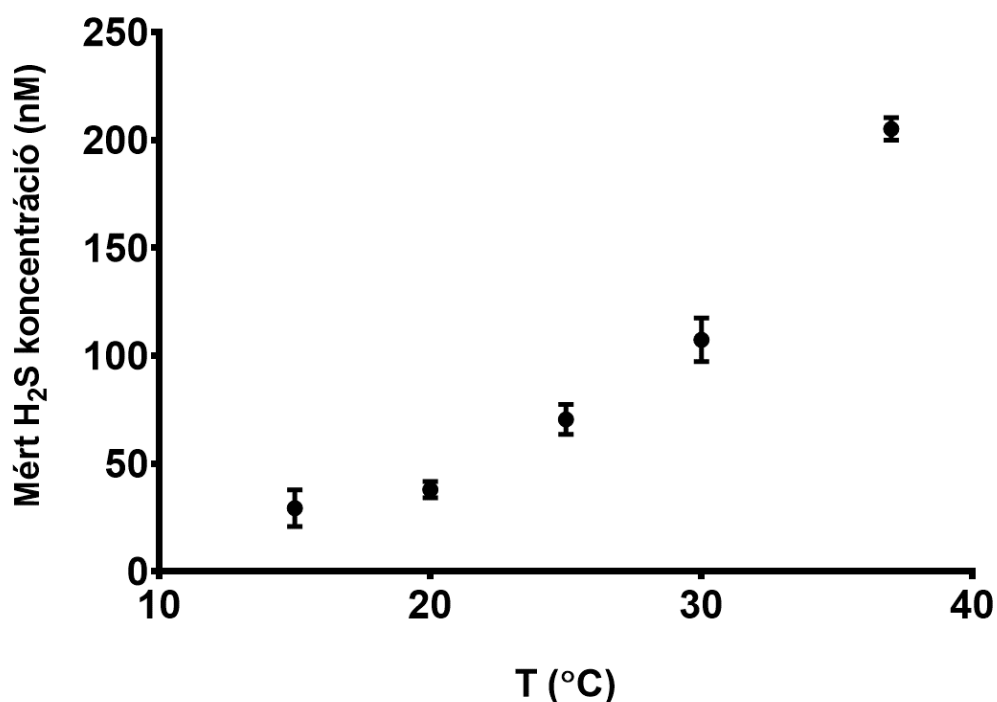
Fontos megjegyezni, hogy ezek a magyarázatok bár külön-külön kísérletileg is bizonyításra kerültek az irodalomban, tényleges hozzájárulásuk a pH okozta változáshoz nem ismert. Az effektusok azonban nagyon könnyen kontrollálhatóvá válnak megfelelő puffer alkalmazásával, hiszen így minden mérésnél garantálhatjuk az adatok összehasonlíthatóságának szempontjából lényeges, pontos pH értéket.

4.7. Hőmérséklet

A hőmérséklet hatása nagyon jól ismert reakció- és enzimkinetikában, így a mi esetünkben is mérhető változást vártunk, amennyiben különböző hőmérsékleteken inkubáltuk a reakcióelegyünket az alkilálás során. Az irodalomban vizsgálva a publikált módszereket azok rendre *szobahőmérsékleten* kivitelezett reakciót írnak le. Ez azonban egy elég tág tartományt takar, a tipikusan szigorú gyógyszerkönyvek is 15-25 °C között rögzítik a szobahőmérséklet fogalmát. Ez gyakorlatban nem egy jelentős probléma, esetünkben azonban, ahol a reakciókinetika közvetlen befolyással van az eredményre, fennáll a veszélye, hogy egy ilyen engedékeny definíció mérhető különbségeket okoz a tartomány két végpontján végzett mérés között.

Ennek kimutatására 15 és 37 °C között végeztünk előkészítéseket ugyanazon plazma mintából 5 különböző hőmérsékleten. Mind a vérmintákat, mind a reaktánsokat és puffereket a reakció indítása előtt legalább 15 perccel hűtő-fűtő termosztátba helyeztük, hogy biztosítsuk a pontos hőmérsékletet. A 19. ábra mutatja a mért szulfid szinteket, amelyek a vártak megfelelően

növekvő tendenciát mutattak a hőmérséklet emelésével, a változás mértéke azonban meglepően nagy volt.



19. ábra - Vérből mért H₂S koncentrációk az alkiláláskor alkalmazott hőmérséklet függvényében. [MBB]=1,1 mM, pH=8,2, T=15-37°C

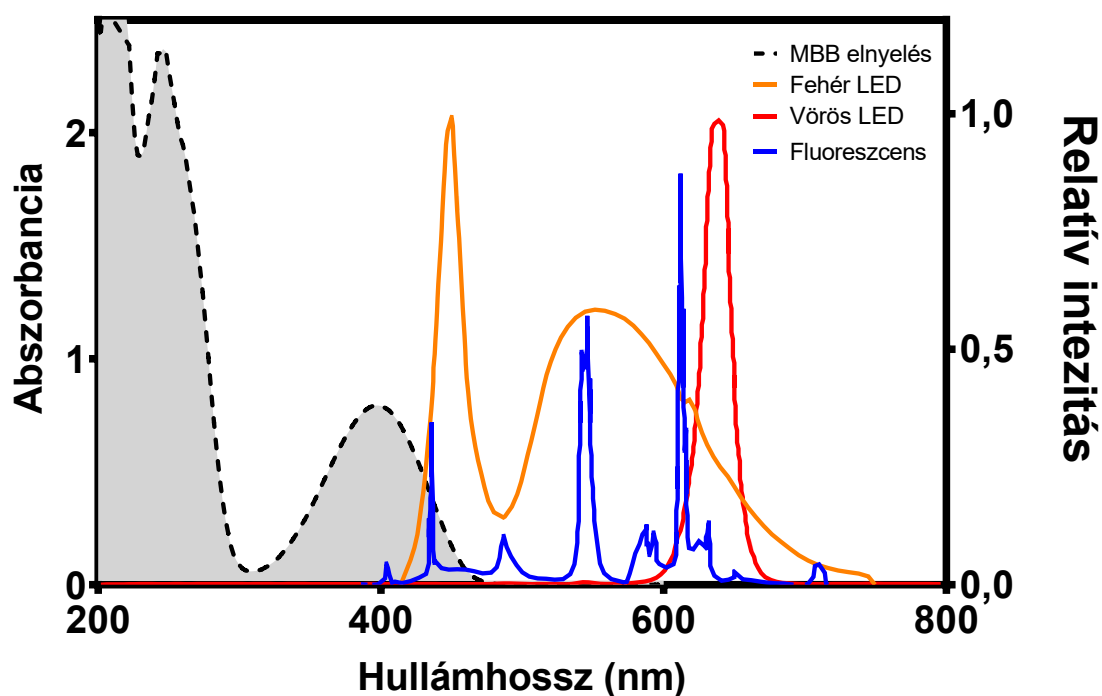
Az ábrából leolvasható, hogy mindössze 5 °C különbség is egy kétszeres szorzót jelent a végeredményünk szempontjából, ami például összehasonlíthatatlanná tesz egy esetleg télen mért értéket egy nyári előkészítéssel. Egy ekkora mértékű, nem helyes termosztálásból eredő hiba teljességgel tönkretetheti méréseinket, ezért e paraméter szigorú fixálása elkerülhetetlen analitikai kritérium.

4.8. Mintavétel és mintaelőkészítés során fellépő fizikai, kémiai és biológiai befolyásoló tényezők vizsgálata

A kinetikát befolyásoló tényezők sajnos nem merítik ki az összes, mért szulfid szintre hatással lévő paramétert. A munka során több egyéb olyan kísérleti paramétert is felderítettünk, amely hátrányosan befolyásolja mérési pontosságunkat, azonban nem az alkilálási reakció sebességének változtatásán keresztül. Ezek a paraméterek az alkalmazott alkilálószerre és a képzett származékokra vannak hatással, az alkilálási reakció leállításának módját változtatják, esetleg a szabad hidrogén-szulfid koncentrációját befolyásolják.

4.9. Fény zavaró hatása

Az alkilálásra használt monobromobimán fényérzékeny vegyületként bomlásra hajlamos, ezért erősen ajánlott sötét környezetben dolgozni vele. Mind az alkilálószer, mind a belőle képződő szulfid-dibimán megvilágítás hatására bomlást szenved, ezek a bomlások pedig a mért szulfid szint csökkenését vonják maguk után. Mivel a fényérzékenység ismert jelenség, ezért az irodalomban rendre hangsúlyozzák a minták sötétben történő feldolgozását. A munka azonban így a korlátozott láthatóság miatt jelentősen nehezebbé válik és külön, besötétített helyiséget igényel. Hogy a megvilágítás hatására bekövetkező bomlás mértékét az előkészítés során is vizsgálhassuk, több megvilágítási környezetben, ugyanazon mintán elvégeztük az előkészítéseket. Mivel az alkilálószer és a termék az ultraibolya és rövid hullámhosszú látható tartományban rendelkezik elnyeléssel, így ezeket szükséges elsősorban kizárnunk. A monobromobimán abszorpciós spektruma az alábbi ábrán látható az egyes fényforrások sugárzási spektrumai mellett:

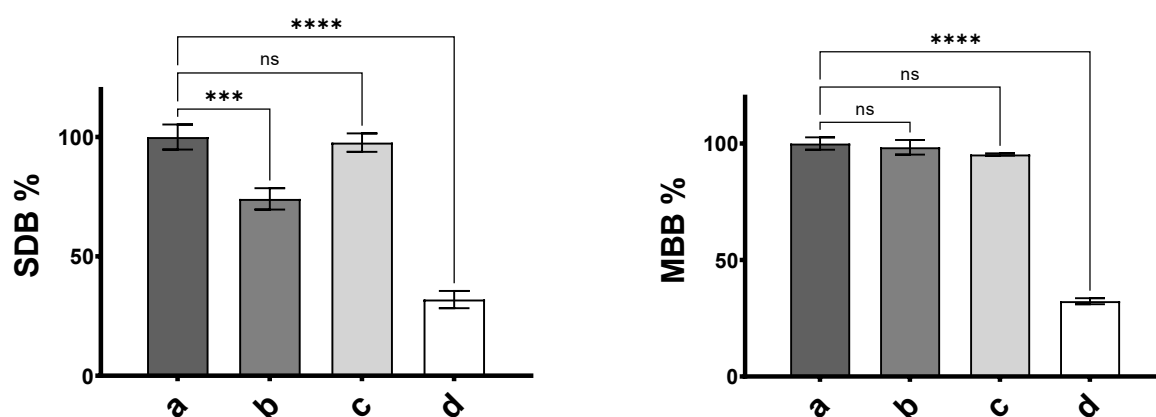


20. ábra – Monobromobimán UV-VIS abszorpciós spektruma és az alkalmazott megvilágítások tipikus sugárzási spektrumai. Az ábrázolt sugárzási intenzitások egymással nem összemérhetők.

A rutin előkészítéseket olyan, teljesen elsötétített szobában végeztük, amelyben kizárólag monokromatikus, vörös, kis intenzitású LED fényforrások biztosítottak láthatóságot. A

kiértékelések során ebben a környezetben végzett kísérletekhez hasonlítottuk a másfajta megvilágításban kapott eredményeket.

A referenciaméréssel szemben még 3 különböző megvilágítású környezetben ismételtük meg a mérést, egy esetben sötétített szobában fluoreszcens fénycsövet, egy esetben modern, meleg fehér LED világítást alkalmaztunk, végül egy esetben a teljes előkészítést napfényes ablak elé helyezve végeztük. Minden előkészítés során a helyiséget a kísérlet előtt legalább 2 órával légkondicionáló segítségével 25 °C hőmérsékletűre állítottuk, valamint a reakciókat vékony falú, átlátszó mikrocentrifuga csövekben végeztük. Az átlátszó reakcióedényekre azért volt szükség, hogy a megvilágítás a teljes folyamat során maximális lehessen, míg a teljes labort érintő termosztálásra azért volt szükség, hogy a mintákat ne a sötét, zárt termosztátblokkban kelljen előkészíteni. A kromatográfiás mérés során nem csak a termékhez, hanem az alkilálószerhez tartozó csúcsot is kvantitáltuk, hiszen alapvetően ennek a fényérzékenységet írták le az irodalomban (Kosower and Pazhenchevsky 1980).



21. ábra - Vérből mért SDB és MBB szintek különböző megvilágítási körülmények között az „a” mérésre normalizálva a: vörös LED világítás, b: fluoreszcens fénycső, c: melegfehér LED, d: napfény, [MBB]=1,1 mM, pH=8,2, T=20°C

A 21. ábrán látható módon várakozásunknak megfelelően napsütötött mintákban (d) nagyon jelentősen csökkent mind a reagens, mind a termék koncentrációja, míg fluoreszcens fénycsővel (b) megvilágítás alatt csak a termékben tapasztaltunk szignifikáns csökkenést. Ez a jelenség teljesen érthető, hiszen a leginkább UV-tartományban érzékeny analitokra a legnagyobb UV-sugárzással rendelkező napfény és a működéséből adódóan szintén intenzív UV-vonalakat kisugárzó fénycső volt a legnagyobb hatással. Érdekes azonban, hogy a melegfehér mennyezeti LED világítás már nem tudott szignifikáns bomlást produkálni a

mintákban, hiszen a 20. ábrán látható fehér LED is sugároz a 450 nm környéki hullámhosszakon. A kísérleti eredményekben a fluoreszcens fényszórással ellentétben azonban a LED 400 nm alatt nem sugároz, míg a fluoreszcens kompakt fényszórások működésüknél fogva, ha nem is nagy intenzitással, de ebben a tartományban is sugároznak, ez pedig a fénycső belső rétegének sérülésével, öregedésével nő. Összesítve a rövidebb hullámhosszak erősebb degradáló hatását a kísérleteinknél alkalmazott elrendezésekkel (fehér LED esetén mennyezeti világítást, fluoreszcens fény esetén azonban közeli, intenzívebb megvilágítást alkalmaztunk), a 21. ábra tapasztalatai is megmagyarázhatóak.

A fehér LED megvilágítással kapcsolatos eredményünk nagyon biztató, hiszen ilyen modern fényforrások mellett lehetőségünk van megfelelő látási viszonyok között dolgozni, miközben a mintáinkat sem éri a mérés eredményeit befolyásoló sugárzás.

4.10. Reakció leállításának módja

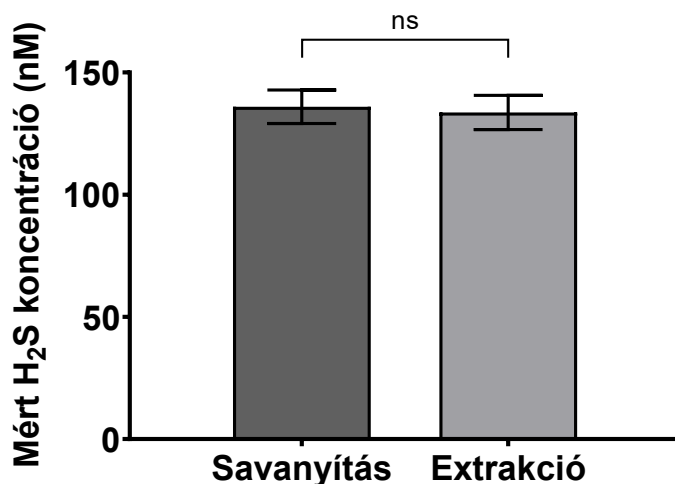
Az irodalomban egy kivétellel az alkilálás leállítására és a fehérjék kicsapására valamilyen savanyítást alkalmaznak, ahogy mi is (Shen, Kolluru et al. 2015, Tan, Jin et al. 2017). Bár több különböző sav is alkalmazható, például triklórecetsav, hangyasav és szulfoszalicilsav, hatásmechanizmusuk megegyezik. Az alacsony pH-jú környezetben a reakció sebessége lecsökken, eközben a szabad hidrogén-szulfid, a protonálódási egyensúly jelentős eltolása miatt (lásd 4. oldalon) kipárolog, valamint a fehérjék denaturálódnak és kicsapódnak. Ezzel egy lépésben állítjuk le az alkilálást és centrifugálást követően távolítjuk el a kromatográfiát zavaró fehérjéket.

Egy másik módszer etil-acetátos extrakciót javasol (Wintner, Deckwerth et al. 2010), eközben ugyanis a szerves fázisba kerül át apoláris tulajdonsága miatt mind az alkilálószer, mind a termék, miközben a fehérjefrakció a vizes fázisban marad. A szerves extraktum bepárlásával és visszaoldásával egy tiszta oldatot kapunk, amely azonnal injektálható. Ennek a megoldásnak több előnye és több hátránya is van, amelyeket lehetőségeink szerint mérlegelni kell. Előnye, hogy a kromatográfiás lépés során egy, a savas leállítással szemben sokkal kevesebb zavaró komponenst tartalmazó oldatot kapunk. Ez kis hatékonyságú elválasztás és kis terhelhetőségű kolonna esetén válhat fontossá. Másik előnye emellett, hogy a bepárlás előtti és a visszaoldási térfogat arányának változtatásával jelentősen kiterjeszthetjük érzékenységünket. Ez kis érzékenységgű detektorok és nagyon kis hidrogén-szulfid tartalmú minták esetén kifejezetten előnyös. Hátrány azonban, hogy a bepárlás folyamata jelentősen növeli az előkészítés idejét, tehát csökken az egységnyi idő alatt feldolgozható minták száma. A módszer másik problémája

az extrakció hatékonyságának kérdése. Ennek a monitorozására megfelelő belső standard alkalmazására lenne szükség, amely elválasztható az analittól, de ahhoz nagyon hasonlóan viselkedik az előkészítés folyamán. Erre kiváló példa lehet Na_2^{34}S -ből előállított SDB hozzáadása, azonban ez már megköveteli tömegspektrometriás detektálás meglétét, amely nem minden esetben adott, költséges és bonyolult is.

A savas leállítással ezzel szemben gyors, egyszerű és kvantitatív eredményt hoz. Hátránya, hogy a különböző szennyezők, mátrixkomponensek továbbra is az oldatban maradnak, ezért körültekintőbb kromatográfiai módszert igényel, ami viszont a mai technika lehetőségeivel már nem jelent akadályt. Elméleti problémát mindössze az jelenthet, hogy a hirtelen savanyítás hatására a savra érzékeny szulfid-tartalékok, amelyek a teljes tartalék jelentős hányadát teszik ki, felszabadulnak. Ekkor felmerül a kérdés, hogy ez a hirtelen koncentráció-növekedés megjelenik-e az eredményben vagy elég hatásos-e a reakció megállítása, hogy ne zavarjon minket?

Ennek eldöntésére azonos plazma mintából elvégeztük az előkészítést triklórecetsavas és extrakciós leállítással is. Az előbbi esetben a „B” módszer szerinti rutin körülményeket alkalmaztuk, míg az extrahálást 3x térfogatú etil-acetát hozzáadásával végeztük, majd a bepárlás után 1/5 térfogatú acetonitrilben oldottuk vissza a szilárd származékot. A 22. ábrán látható módon azt tapasztaltuk, hogy a két módszer azonos eredményt hozott.



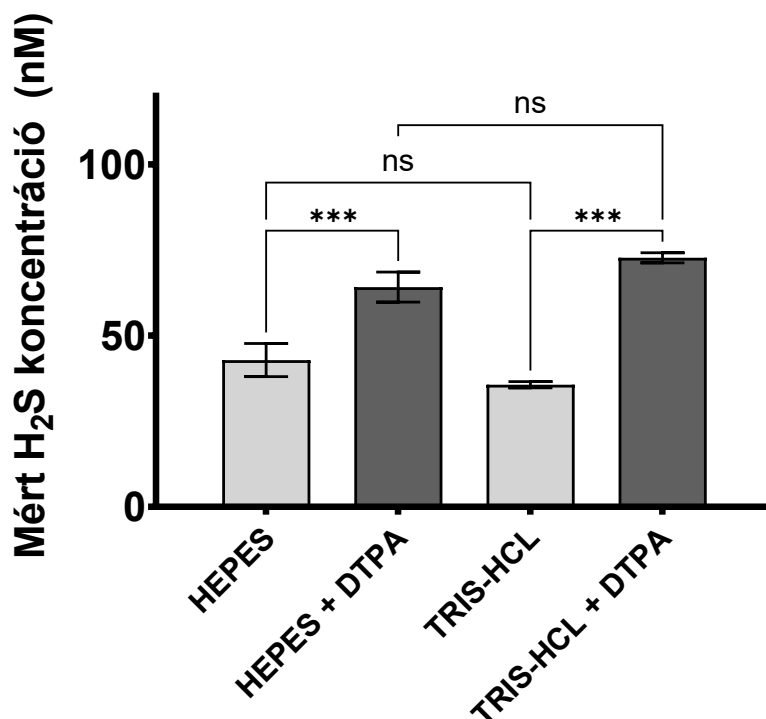
22. ábra – Savas leállítással és szerves extrakció összehasonlítása plazma mintában. $[\text{MBB}] = 1,1$ mM, pH=8,2, $T = 20^\circ\text{C}$

Amellett, hogy csaknem 100%-os kinyerést tapasztaltunk az extrakciós módszernél, a savas leállítással sem növelte meg szignifikánsan a mért szulfid szintet. Bár ez alapján mindkét megoldás

ugyanolyan helyes eredményre vezet, jelentős egyszerűsége és nagy mintaszám esetén a párolgásból adódó kisebb hibája miatt a savanyítást ajánljuk a jövőben is.

4.11. Pufferhatás vizsgálata

A már vizsgált pH függést egészíti ki a puffer-függés vizsgálata, azaz van-e hatással a puffer anyagi minősége a mérésre. A vizsgálat során biokémiai gyakorlatban legtöbbször alkalmazott puffereket (HEPES és TRIS-HCL) választottuk és azonos, 200 mM koncentrációjú és 8,2 pH értékű oldatokat készítettünk belőlük. A kísérlet kiegészítéseként kelátort is adtunk a készített pufferek egy-egy részletéhez, hogy ennek a hatását is vizsgáljuk. Irodalomban jól ismert jelenség, hogy a hidrogén-szulfid oxidációja fémionok hatására katalizálható (Nagy, Palinkas et al. 2014). Az effektus kikerülésére ezért a szabad fémionok eltávolítására van szükség, ennek pedig legegyszerűbb útja a kelátorok alkalmazása. Ezt a monobromobimános irodalom is több cikkben támogatja (Shen, Pattillo et al. 2011, Shen, Peter et al. 2012, Shen, Kolluru et al. 2015) bemutatva, hogy DTPA alkalmazásával jelentősen nagyobb szulfid szint mérésére van lehetőség. Ennek megfelelően mi is 0,1 mM koncentrációjú DTPA-val egészítettük ki puffereinket, hogy a kelátor hatását is láthassuk.

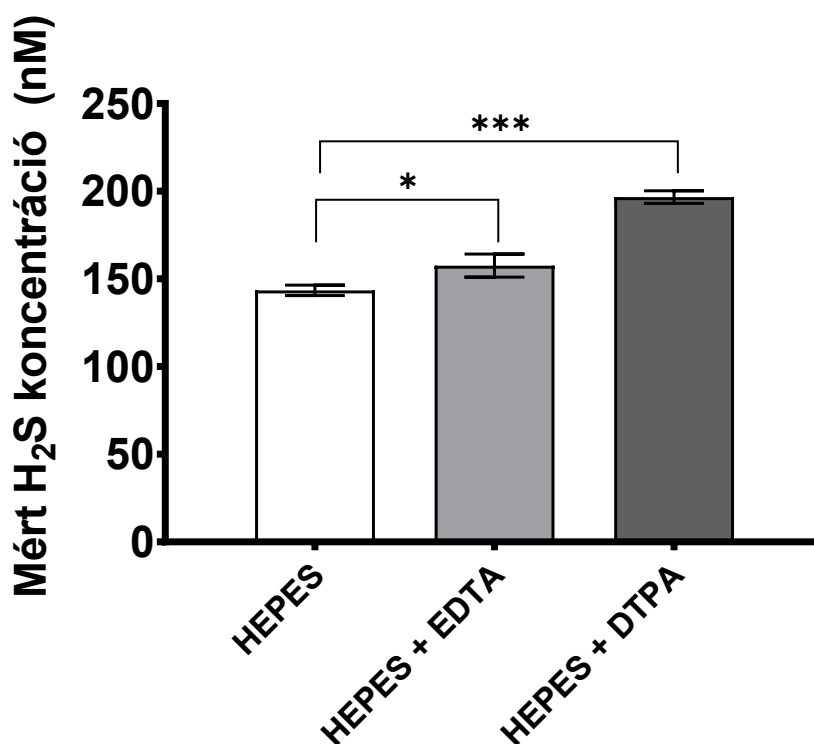


23. ábra – Különböző összetételű pufferek hatása a mért szulfid-koncentrációra plazmában

[MBB]=1,1 mM, pH=8,2, T=20°C, [DTPA]=71,4 µM (0,1 mM pufferben)

Az eredmény előzetes várakozásunknak megfelelően alakult, azaz a 23. ábrán látható módon a különböző puffer-komponensek nem, viszont a kelátor jelenléte jelentősen befolyásolta az eredményünket. Ez az eredmény azonban egy további kérdést is felvetett: Hasonló eredményt kapunk-e más kelátor, pl. EDTA használatakor is?

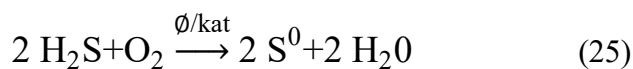
A kérdés relevanciája a mintavételre gyakran használt EDTA-tartalmú csövek miatt fontos, hiszen ekkor már a teljes vérben is jelen van az EDTA, ami viszont hemolízist okozhat, azaz a vörösvérsejtek sejtfala sérül, citoszol tartalma pedig az extracelluláris térbe jut (Peter, Shen et al. 2013). Első lépésben ezért megismételtük az előző kísérletet HEPES pufferrel, amit 0,1 mM EDTA-val egészítettünk ki. A 24. ábrán látható is, hogy az effektus jelen van, ám sokkal kisebb mértékben.



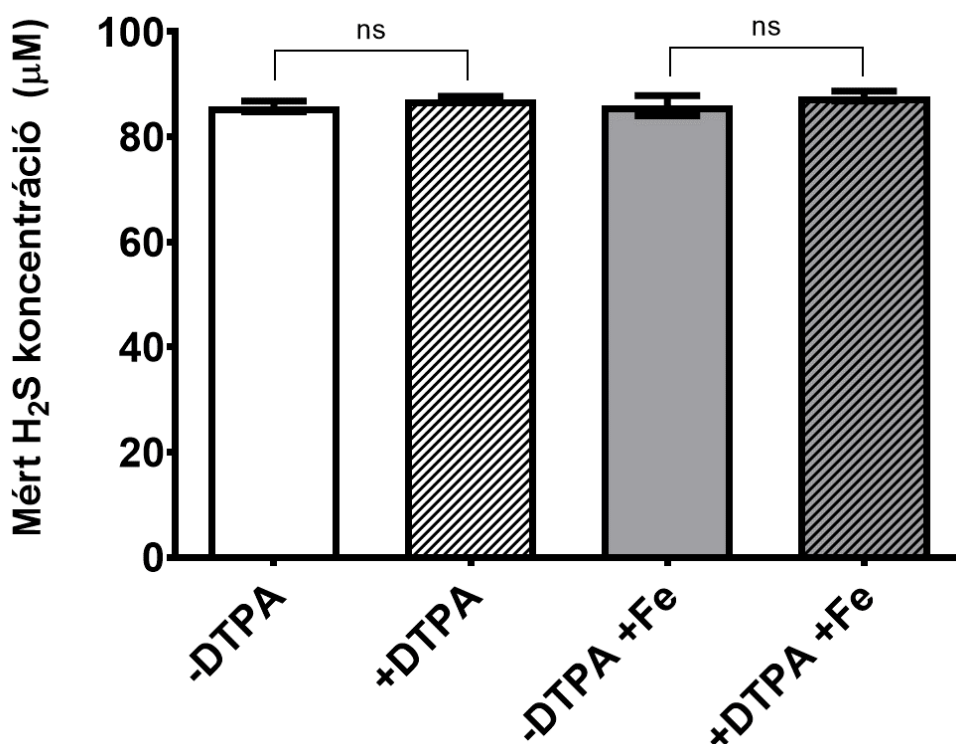
24. ábra – EDTA és DTPA hatása plazmában mért szulfid szintre. [MBB]=1,1 mM, pH=8,2, T=20°C, [DTPA]=71,4 µM (0,1 mM pufferben) [EDTA]=71,4 µM (0,1 mM pufferben)

Ez a tapasztalat azt mutatja, hogy az effektus vélhetőleg a két adalék komplexképző tulajdonságához köthető, ahogy azt korábban is állították. Ennek megfelelően tehát a kelátort is tartalmazó reakcióelegyekben az oldatban jelen lévő szabad vas- és egyéb fémionok

komplexbe kötődnek, ezáltal nem járulnak hozzá a hidrogén-szulfid spontán/katalitikus oxidációjához ezzel csökkentve a mért szulfid szintet az alábbi egyszerűsített egyenlet szerint:



Ennek jelenségnek az igazolása viszonylag könnyen elvégezhető, hiszen csak ki kell mutatni a fenti effektust szulfid standard oldat esetén is, valamint a kelátor védőhatását ugyanezen oldatnál. Ehhez ~100 μM koncentrációjú Na_2S oldatot derivatizáltunk 4 különböző puffert alkalmazva. Egy eredeti HEPES puffert („-DTPA”), egy 100 μM DTPA tartalmú puffert („+DTPA”) egy 1 mg/ml Fe^{3+} tartalmú puffert („-DTPA +Fe”), egy vasat és kelátort is tartalmazó puffert („+DTPA +Fe”).



25. ábra – Kelátor és Fe^{3+} -ionok hatása hidrogén-szulfid oldatokra [MBB]=1,1 mM, pH=8,2, T=20°C, [DTPA]=71,4 μM (0,1 mM pufferben) [Fe^{3+}]=71,4 mg/ml (1 mg/ml pufferben)

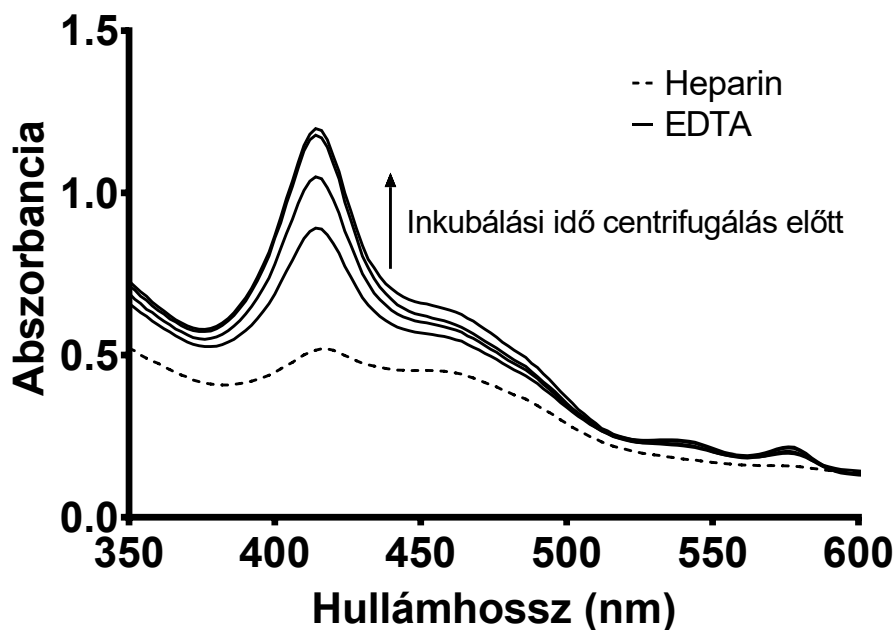
A 25. ábrán látható eredmények alapján nekünk nem sikerült ezt a hatást kimutatni, a mért mennyiségek nem különböztek szignifikánsan. Az alkalmazott pufferből semmilyen módon nem távolítottuk el az oxigént, így elviekben a kén-hidrogén fémion-katalizált oxidációját semmi sem gátolta. Ez a reakció elég jól ismert, mind a szulfiddal, mind a nitrogén-oxidokkal

foglalkozó területen bevett gyakorlat kelátorok használata. Esetünkben azonban az általunk alkalmazott rövid időskálának köszönhetően ez az effektus nem észlelhető, így az óvintézkedésektől is eltekinthetünk, mint az oldatok oxigénmentesítése vagy extra kelátorok hozzáadása a pufferhez. Felmerül viszont a kérdés, hogy miért észlelünk mégis jelentős effektust, ha szérumot vagy plazmát derivatizálunk kelátor jelenlétében.

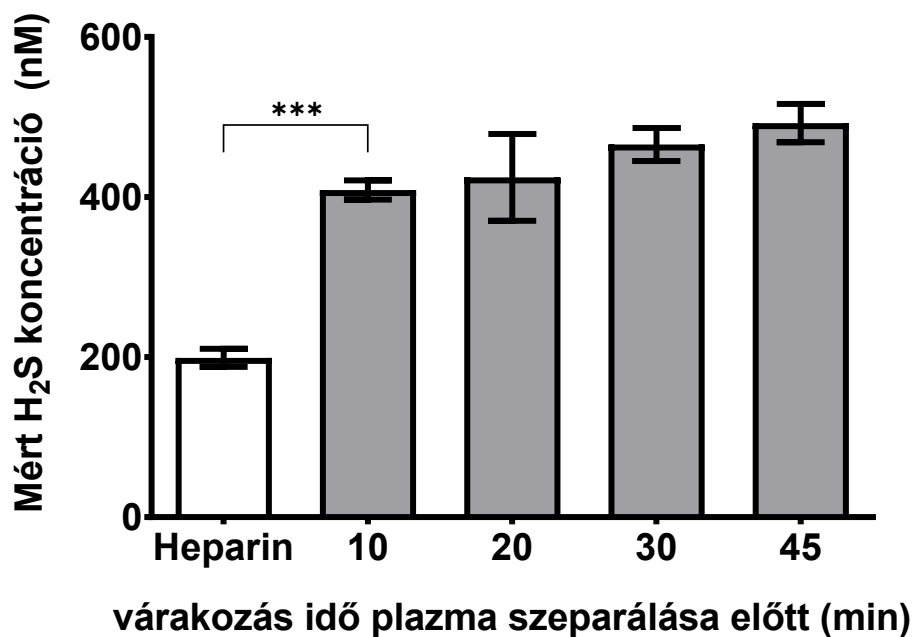
4.12. Mintavevő cső hatása a mért szulfid szintre

Az már ismert, hogy az EDTA hemolízist indukál teljes vérben, ami a mérhető szulfid szint növekedéséhez vezet (Unger, Filippi et al. 2007, Peter, Shen et al. 2013). Ezt mi is így tapasztaltuk, amikor egyazon egészséges donortól egy vérvétel során több EDTA csövet használva vért vettünk. A csövekbe különböző mennyiségű vért vettünk le, valamint egy másik donortól nagyobb térfogatú csőbe is vettünk vért. Az előbbieket azzal a céllal gyűjtöttük, hogy az EDTA koncentrációjának függvényében lássuk a hemolízis és a szulfid-növekedés mértékét. Az azonos térfogatokat tartalmazó csöveket az időbeli effektus vizsgálatára használtuk fel, azaz a mintavétel és a vörösvértestek szeparálása között eltelt idő hatását néztük, amelyet 10 és 45 perc között változtattunk. A levett tele csövet alapos összerázás után kisebb, azonos térfogatú részletekre osztottunk, amelyek egymástól eltérő időpontokban szeparáltunk a vörösvértestektől. Ez a szeparálás centrifugálást jelentett 5 percre 3000g-vel, ami után szétválasztva a frakciókat érdemileg „leállítottuk” a plazmában a további hemolízist. Referenciapontként mindkét vérvételen belül Li-Heparin tartalmú csőbe is levettünk vért, ahol feltételezésünk szerint minimális mértékű hemolízist kell tapasztalnunk.

A mintákat két módszerrel is vizsgáltuk, egy részről hígítás után felvettük UV-látható spektrumukat és követtük a hemolízist, másrészt természetesen megmértük a szulfid-koncentrációkat is. A hemolízis követéséhez a hemoglobin Soret-sávjának intenzitását, azaz 415 nm-nél mérhető abszorbanciáját mértük. A 26. ábrán látható módon azonos levett vértérfogat (és ebből adódóan azonos EDTA koncentráció) esetén az idő növelésével a hemoglobin mennyisége is nő. Ezzel párhuzamosan láthatjuk a 27. ábrán a mérhető szulfid-koncentráció növekedését is. Referenciaként mindkét ábrán szerepel az ugyanezen vér Li-Hep plazmájában rögzített spektrum és a mért szulfid szint.



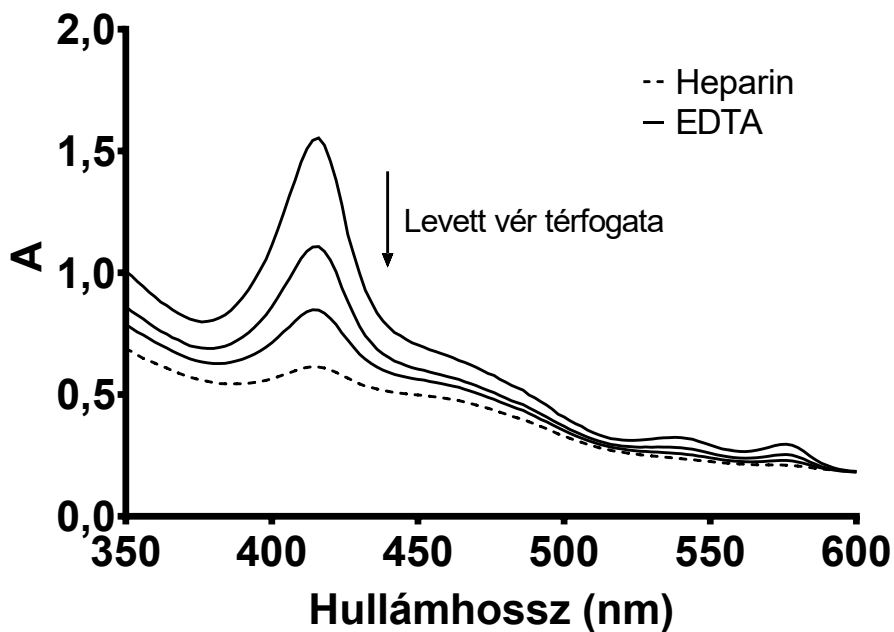
26. ábra – Szeparált plazmák UV-Vis spektruma a vérvétel és centrifugálás között eltelt idő függvényében (10-45 perc)



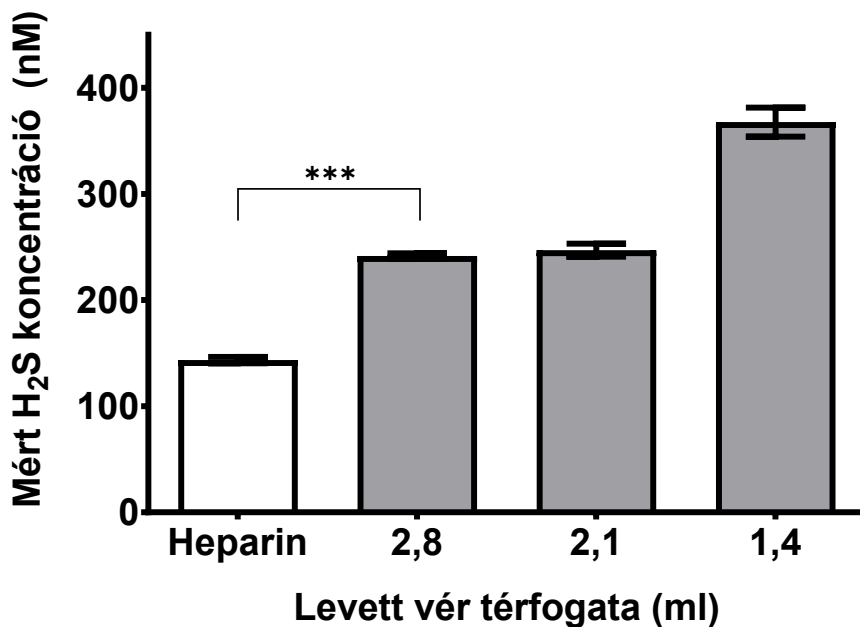
27. ábra – Szeparált plazmákban mért hidrogén-szulfid koncentráció a vérvétel és centrifugálás között eltelt idő függvényében [MBB]=1,1 mM, pH=8,2, T=20°C

Hasonló tendenciájú, de az előzőnél nagyobb mértékű hemolízis jelentkezett, amennyiben a vér EDTA koncentrációját változtattuk a levett vér mennyiségén keresztül, amelyet 2,8 és 1,4 ml között változtattunk. A pontos levett mennyiségeket a csövekben a vérek szintjeinek pontos

megjelölése után egy másik cső jelig történő töltésével határoztuk meg. Egyértelmű a 28. ábra alapján az EDTA hemolízist növelő hatása koncentrációjának függvényében.



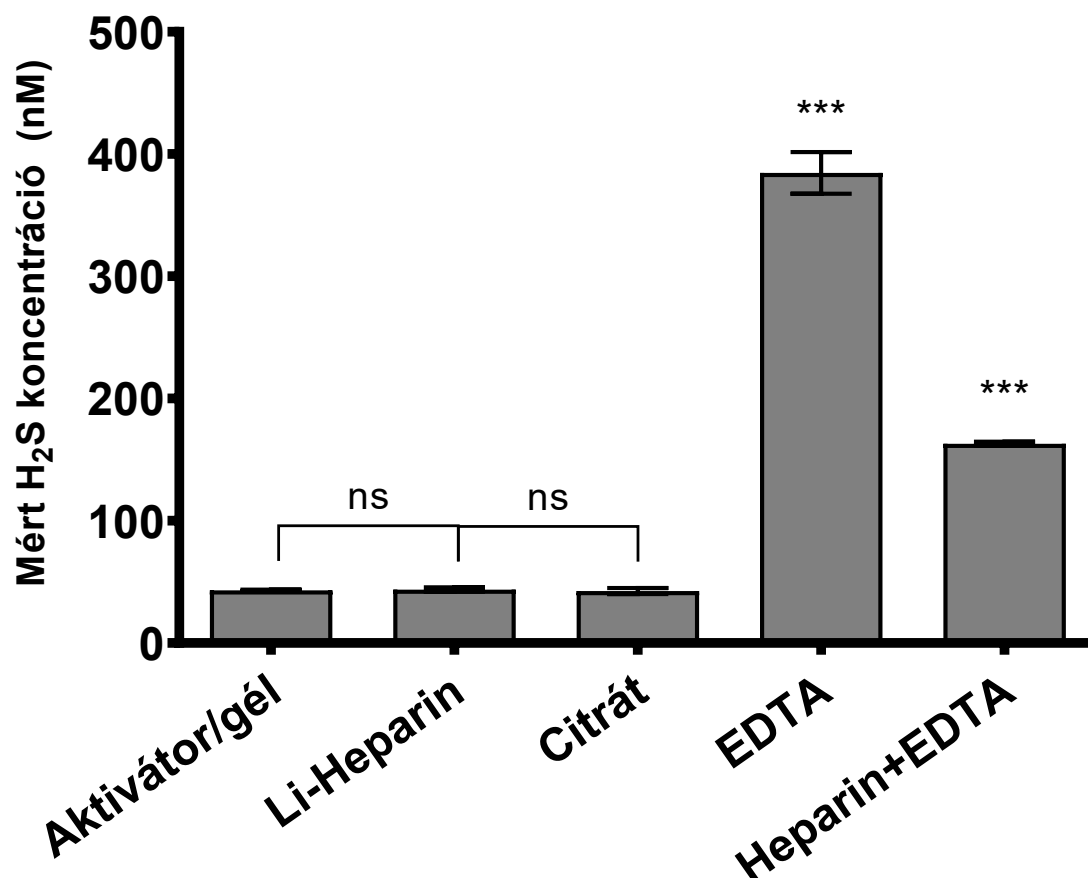
28. ábra - Szeparált plazmák UV-Vis spektruma a levett vér térfogatának függvényében (1,4-2,8 ml 4ml térfogatú mintavevő csőben)



29. ábra - Szeparált plazmákban mért hidrogén-szulfid koncentráció a levett vér térfogatának függvényében. [MBB]=1,1 mM, pH=8,2, T=20°C

Ugyanilyen jól látható trendet követnek a mért szulfid szintek is, azonban függésük jóval jelentősebb az időfüggés során tapasztaltnál. Ez pedig azt jelenti, hogy a vérvétel során a legfontosabb tényező, ami befolyással van a mérésünkre, az a levett vér térfogata. Ennek pontos szabályozása nehézkes, mindenképpen tapasztalatot igényel. A szeparálás előtti inkubálás ideje sokkal könnyebben szabályozható, hatása a szulfid szintre pedig sokkal kevésbé jelentős. Mindezek mellett persze nem lehetetlen egy pontos és reprodukálható mintavétel kivitelezése EDTA tartalmú csövekbe, mégis, egyetértésben az irodalommal mi is ellenezzük ezeknek a csöveknek a használatát (Peter, Shen et al. 2013). Ennek oka nem is a hemolízis jelensége, sokkal inkább a reprodukálhatóság jelentős romlása, aminek az elkerülése az egyik fő célkitűzésünk volt.

A különböző csövek összehasonlítására újra vért vettünk egy donortól 3 eltérő típusú mintavételi csőbe. A Li-Hep és EDTA plazmák mellett citrátot tartalmazó plazmát is vettünk, valamint szérumot alvadást elősegítő faktor géles csőben. Külön kísérletet is végeztünk, amely során a már szeparált Li-Hep plazmát áttöltöttük EDTA tartalmú csőbe („Heparin+EDTA”), hogy ezzel a plazma és EDTA közötti kölcsönhatást megfigyelhessük. Külön figyeltünk arra is, hogy a kevert mintánál az EDTA-s csőbe levett vérrel azonos térfogatú plazmát töltsünk. Citrátos cső esetén a mintavételt pontosan az előírás szerint végeztük és számoltunk a hígulással is, az EDTA csőbe viszont csak kis mennyiségű vért vettünk, hogy kíméljük az önkéntes donort és takarékoskodjunk a Li-Hep plazmával, amiből a kevert mintát is előállítottuk.



30. ábra - Mért szulfid szintek a mintavételhez használt cső típusának függvényében. [MBB]=1,1 mM, pH=8,2, T=20°C

A 30. ábrán látható eredmények több fontos jelenséget is jól prezentálnak. Egyértelmű, hogy a szérums/Li-Hep/Citrát mintákból ugyanazon koncentrációkat mérjük, tehát itt a mintavételnél használt segédanyagok semmit sem befolyásolnak a szabad és kötött H₂S egyensúlyában. Ezekből a mintákból tehát összehasonlítható eredményeket szerezhethetünk, akkor is, ha a véreket nem azonos csövekbe vették le. Ez nagy előny, mivel kiküszöböli a vérvétel módjából adódó különbségeket. Ez olyan esetekben lehet kritikus fontosságú, amikor a véreket már korábban levették, mielőtt felmerült volna az igény H₂S mérésére.

A fentebb említett minták azonossága még egy dologra hívja fel a figyelmet, eszerint ugyanis a szérums képződésekor, tehát a véralvadáskor nem veszítünk el szignifikáns mennyiséget a szulfid-tartalékokból. Ellenkező az esetben ugyanis a szérums mintáknál csökkenést kellett volna tapasztalnunk, hiszen a tartalékok elvesztek volna az alvadat frakcióban.

A másik már látott effektus az EDTA mérhető szulfidot növelő hatása. A 30. ábrán látott csaknem 9x növekedés oka lehet, hogy a mintavételi csövet kevesebb, mint feléig töltöttük csak, így relatíve nagy az EDTA koncentrációja, és ez a 29. ábra alapján könnyen kikövetkeztethető

is. A tapasztalt nagy változás emellett jól mutatja, mennyire fontos a nagyon precíz mintavétel és mekkora hibát tudunk ezzel bevenni a mérésünkbe. Érdekes azonban a Heparin+EDTA mintában látható szintén jelentős növekedés, ami már kizárja a hemolízist, hiszen már eleve szeparált plazma keveredett EDTA-val. A két szomszédos minta (EDTA és Heparin+EDTA) közötti különbség vélhetőleg a hemolízisnek tudható be, hiszen csak annyi a különbség, hogy az EDTA teljes vérben vagy már csak a plazmában volt jelen. Az, hogy még plazmában is 3-4x különbséget tapasztalunk a referencia Li-Hep plazmához képest, valamint a tény, hogy nem láttunk különbségeket a 25. ábrán Fe^{3+} -ionok hozzáadása mellett sem, azt sugallja, hogy egy olyan háttérfolyamattal állunk szemben, amely során az EDTA kén-hidrogént szabadít fel. A vérben megtalálható lehetséges H_2S tartalékok között erre több lehetséges mechanizmust is találhatunk. Egy részről a könnyen hozzáférhető metalloproteinhez koordinált szulfid molekulák kompetitív úton leszoríthatóak a kötő metalloenzimekről, ebben az esetben azonban nem várhatunk nagyon hozzájárulást, hiszen egy aktív centrumhoz történő H_2S koordináció alapja lehet toxicitásának. Sokkal jelentősebbek ezen effektushoz való hozzájárulásuk szempontjából a vas-kén klaszterek, amelyek azon túl, hogy nagy mennyiségben tartalmaznak ként, kelátorok hatására destabilizálhatóak, azaz a kötött H_2S felszabadítható.

4.13. Négy különböző előkészítési módszer összehasonlítása

A fentebb bemutatott tapasztalatok alapján tehát minden különböző előkészítési eljárás következménye eltérő végeredmény lesz a mért szulfidszintben. A különálló tapasztalatokat megpróbáltuk megvizsgálni a gyakorlatban is, ezért néhány irodalmi módszert összeválogatva elvégeztük az ott leírt előkészítéseket azonos vérmintákon.

Három irodalmi és egy saját protokollt választottunk, ezeket pedig lehetőségeinknek megfelelően követtük (2. táblázat). A mintavételből adódó különbségektől eltekintettünk és kizárólag előzetesen levett, fagyasztott Li-heparin plazmát használtunk minden előkészítéshez. Mivel a cikkek rendre szobahőmérsékletű előkészítésre hivatkoztak, így mi önkényesen 20,0 °C-on termosztálva végeztük az összes előkészítést. Bár egy cikk hipoxiás körülményeket követelt volna meg, ettől mi eltekintettünk a 4.11 fejezetben tapasztaltak miatt.

A mérések a vártaknak megfelelően 4 különböző eredményt hoztak a 2. táblázatban látható módon, amely a munka során feltárt paraméterfüggés következtében immár könnyen értelmezhető.

2. táblázat - Azonos plazma mintából származó mért szulfid-koncentrációk 4 különböző protokollt követve

Módszer	Puffer	pH	Alkilálás ideje	MBB konc.	Leállítás	Mért H₂S (nM)
„1” (Shen, Kolluru et al. 2015)	100 mM TRIS + 0,1 mM DTPA	9,5	30 min	3,3 mM	200 mM szulfoszalicilsav	416 ± 13
„2” (Wintner, Deckwerth et al. 2010)	50 mM HEPES	8,0	10 min	3,3 mM	Etil-acetátos extrakció	124 ± 1
„3” (Tan, Jin et al. 2017)	100 mM TRIS + 3,4 mM EDTA	8,5	60 min	11,66 mM	20% FA	460 ± 16
„B”, Saját fejlesztett	200 mM HEPES	8,2	10 min	1,1 mM	50% TCA	43 ± 2

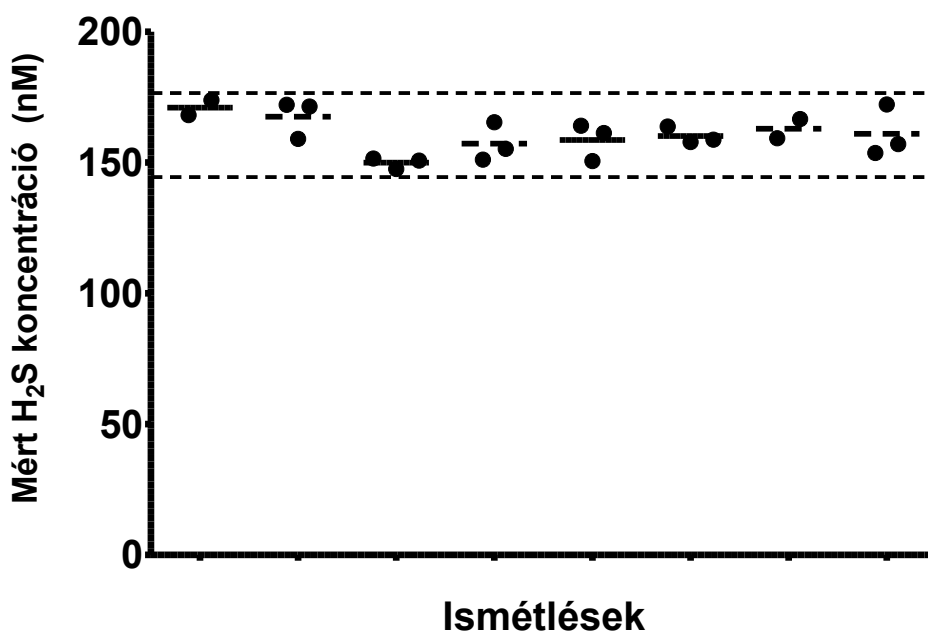
A mért értékek szépen mutatják az általunk is prediktált tendenciákat. A legkisebb MBB koncentrációt használó, legrövidebb alkilálási idejű saját módszer adta a legkisebb mért szulfid szintet, míg ezzel szemben a legnagyobb MBB koncentrációval operáló, leghosszabb alkilálási idejű előkészítés („3”) hozta a legmagasabb eredményt. Fontos emellé azonban hozzátenni, hogy a „3” és „1” módszer közül bár idő, MBB koncentráció szerint is az előbbinek jelentősen magasabb eredményt kellene hozni, mégis megközelítőleg azonos szintet láthatunk. Ennek a hátterében az „1” módszer magasabb pH-ja áll, valamint a reakció heterogén természete, ugyanis az „1” módszer 30%-os ACN tartalmával szemben a „3” módszerben a reakcióelegy ACN tartalma már 58%-os, ennek hatására pedig jelentős fehérjekicsapódást tapasztaltunk, ami lényegesen lassíthatta, korlátozhatta a szulfid-tartalékok felszabadulását, alkilálását. Szintén egyértelműen látszik, hogy az „1” módszer a „2” módszerhez képest jelentősen magasabb eredményt ad, hiszen magasabb a pH, hosszabb alkilálási idő és a kelátor jelenléte mind ebbe az irányba mozdítja a végső eredményünket. Szintén a vártnak megfelelően a „2” módszer is saját protokollunkkal szemben háromszor nagyobb MBB koncentráció miatt produkál háromszor nagyobb mért szulfid szintet, a 16. ábrán látottaknak megfelelően.

Ezen eredmények is alátámasztják, hogy a területen szükség van standardizált módszer bevezetésére, hiszen megannyi paraméter megváltoztatása ugyanennyi különböző végeredményhez vezet. Bár az eredmények korrekciójára lehetőség lenne a pontos paraméterek és a paraméter-függések ismeretében, azonban nagyon fontos kiemelni, hogy az egyik legnagyobb hatást kiváltó tényező, a hőmérséklet, az irodalmi protokollokban rendre nem szerepel pontosan, lehetetlenné téve ezzel a korrekciót. Egy pontosan körülírt, a teljes terület által elfogadott standardizált paraméter-együttes jelentheti a megoldást a problémára.

5. A módszer validálása és alkalmazása betegmintákon

5.1. A módszer hosszú távú reprodukálhatósága

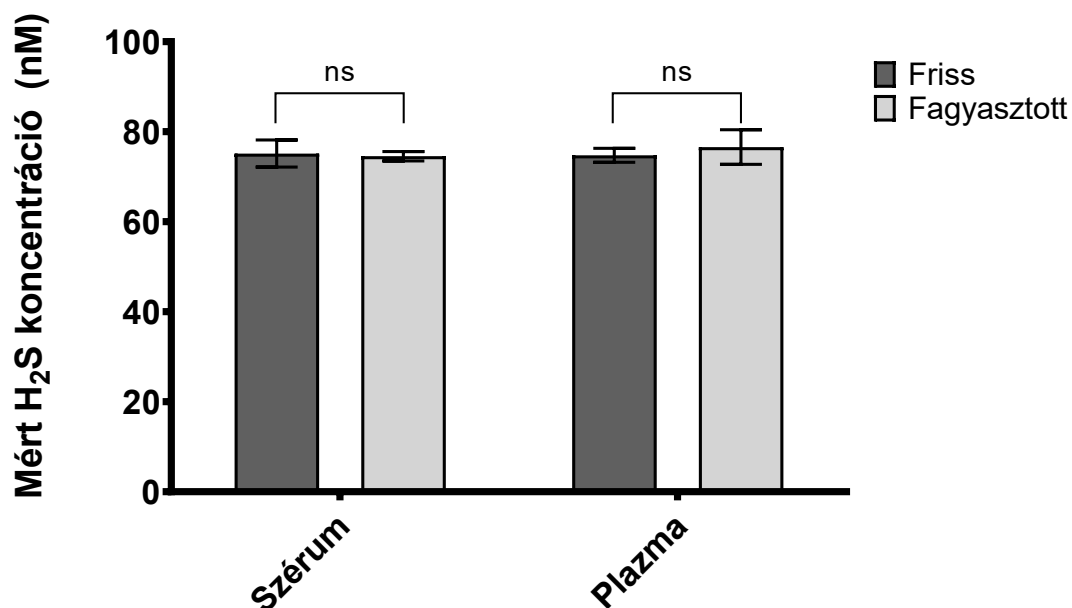
Miután minden befolyásoló mérési paramétert rögzítettünk, a módszer megbízhatóságát is szükséges volt megmutatni, hiszen így igazoljuk, hogy az eredmények reprodukálhatóak. Ehhez ugyanazon plazma mintát osztottuk szét 25 μ l térfogatú részletekre, amelyeket $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten tároltunk felhasználásig. Egy hónapos időtartam alatt 8 különböző napon dolgoztunk fel 3 párhuzamos mintát, amelyhez a monobromobimán tartalmú puffert minden nap frissen kevertük. Az egyes párhuzamos mérések eredményeit a 31. ábra mutatja.



31. ábra - Ugyanazon plazmából mért szulfid szintek egy hónapon keresztül. A vízszintes szaggatott vonalak a teljes átlaghoz képest számolt 10% eltérést jelölik. [MBB]=1,1 mM, pH=8,2, T=20°C

Egy adott napon belüli relatív szórás átlaga 3,6%-nak adódott, míg a napi átlagok közötti relatív szórás értéke 4,0% lett. Ez jelentős javulás a korábbi hosszú távú eltarthatósági vizsgálat 50%-os eredményéhez képest, amelyet az „A” módszer nyújtott. Emellett még sikerült egy újabb, tömegspektrometriát alkalmazó technika szórásához képest is jobban teljesíteni, aminek vélhetően a kísérleti paraméterek nagyon pontos kontrollja az oka (Tan, Jin et al. 2017).

Ezzel párhuzamosan kíváncsiak voltunk, hogy a frissen levett és fagyasztott, majd kiolvasztott vérminták között láthatunk-e mérhető különbséget, azaz a fagyasztás, majd kiolvasztás befolyásolja-e az eredményünket. Ehhez a kísérlethez frissen levett szérum és plazma mintákat dolgoztunk fel közvetlenül vérvétel és szeparálás után, valamint 6 órás fagyasztást követően. A mérések alapján a fagyasztási/olvasztási ciklus nem volt hatással a mért szulfid koncentrációkra, ahogy az a 32. ábrán is látható.



32. ábra – Friss és fagyasztott vérmintákban mért szulfid szintek összehasonlítása [MBB]=1,1 mM, pH=8,2, T=20°C

A mérések nem mutattak szignifikáns eltérést a friss és fagyasztott minták között, ami egy nagyon jelentős következménnyel jár: a mintavétel helye és ideje teljesen elválasztható a mérés helyétől és idejétől. Ennek a jelentős gyakorlati előnye, hogy lehetőség van egyfelől a minták szállítására, tehát nem szükséges a betegek mellett analitikai infrastruktúrát kialakítani, hiszen a mérés intézetek közötti együttműködésben is elvégezhető. Ugyanakkor az idő sem szab gátat nekünk, mivel lehetőségünk van a kis részletekben vagy hosszú idő alatt begyűjtött mintahalmazok egyszeri, egy előkészítéssel történő lemérésére, így jelentősen tudjuk csökkenteni a különböző előkészítésekből adódó hibát. Ez pedig egy újabb lépés afelé, hogy minél kisebb változások érzékeny detektálását tegyük lehetővé. Ennek köszönhető, hogy ritka betegségek mérésére is lehetőségünk van, hiszen ilyen minták beszerzése a betegek kis száma

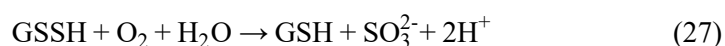
miatt nagyon nehézkes. Emellett érdemes megjegyezni, hogy a 32. ábra alapján joggal feltételezhetjük, hogy a későbbiekben mért eredményünk közel áll a valós fiziológias értékhez.

5.2. Módszer validálása etilmalonsav enkefalopátiás betegek vérével

A módszer klinikai validálásához olyan betegek vérére volt szükségünk, amelyben jól ismert magasabb H_2S szintet mérhetünk. Korábban megjelent tanulmányban a vizsgált állatok vérére Na_2S oldat intravénás bejuttatása után elemezték, ahol ki is mutatták a megnövekedett szulfid szintet validálva módszerüket (Wintner, Deckwerth et al. 2010). Mi ezzel szemben valós betegeken kívántuk megvizsgálni, valóban képesek vagyunk-e endogén fiziológias változásokat detektálni mesterséges beavatkozás helyett.

Ehhez egy prágai, ritka betegségekre szakosodott csoporttal való együttműködésünk nyújtott lehetőséget, így néhány etilmalonsav enkefalopátiás beteg vérmintáját tudtuk elemezni.

Az etilmalonsav enkefalopátia egy örökletes recesszív genetikai elváltozás, amely a metabolizmust érinti (Orpha.net 2020). A betegség velejárója a hidrogén-szulfid katabolizmusának sérülése, ebből adódóan pedig a szervezetben a H_2S toxikus felhalmozódása. Tünetei már születés után nem sokkal jelentkeznek, a neurológiai problémák pedig folyamatosan fejlődnek ki. Leggyakoribb tünet a hasmenés, rohamok és bevérzések (petechiák) jelenléte, ezek egészülnek ki izomgyengeséggel és a fejlődés visszamaradásával. Az etilmalonsav enkefalopátiával érintett betegek várható élettartama 10 év alatt van. Különösen ritka ($<1/1\,000\,000$) betegség, 1990-es leírása óta kevesebb, mint 100 beteget regisztráltak a világon (Hoffmann, Hunneman et al. 1990, Dionisi-Vici, Diodato et al. 2016, Orpha.net 2020). Az elváltozás az *ETHE1* génen történik, amely az *ETHE1* fehérjét (*ethylmalonic encephalopathy 1 protein*) kódolja. Ez a fehérje a mitokondriumban látja el kén-dioxidáz funkcióját, azaz kénből glutation és oxigén segítségével szulfitot termel, amely ezt követően tovább oxidálódva szulfátként ürülhet a szervezetből. A reakció a hidrogén-szulfid oxidációján át először glutation-perszulfid keletkezésével jár (26 egyenlet) amit a *szulfid-kinon-oxidoreduktáz* végezhet), majd ezt követi az enzimatis lépés, melyben oxigén felhasználásával újra képződik a redukált glutation, a kén pedig SO_3^{2-} -á oxidálódik (27) az alábbi két egyenlet szerint (Tiranti, Viscomi et al. 2009):



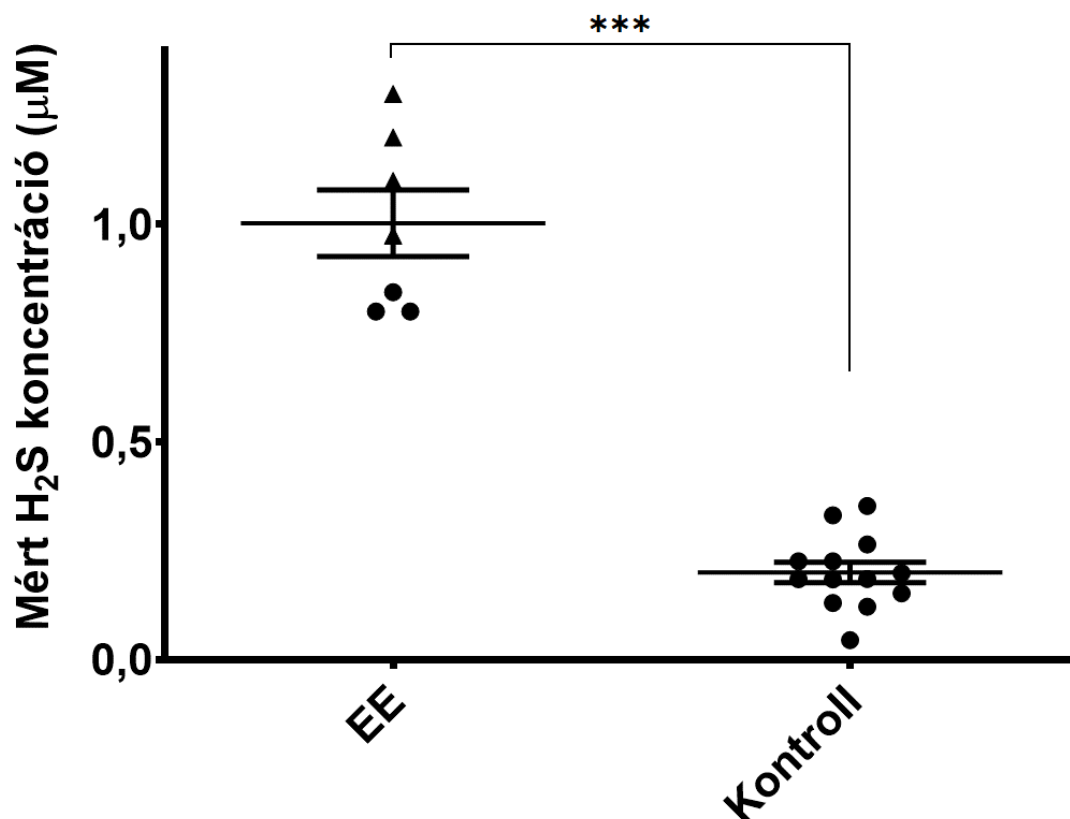
Az *ETHE1* gén defektusa az *ETHE1 protein* kisebb aktivitását és csökkent szubsztrátkötő képességét vonja maga után, tehát a fentebb jelölt reakció sebessége jelentősen lecsökken. Ennek két vonzata is negatívan befolyásolja a szervezetet:

Csökkent mértékű a szulfid-katabolizmus, így lehetősége van a kén-hidrogénnek felhalmozódni. Az egyébként gáz halmazállapotú jelátvivő molekula toxikus tulajdonságú is, például gátolja a *citokróm-c-oxidáz* működését is, tehát a sejtlégzés és energiatermelés is sérül a sejtben (Nicholls és Kim 1982). A *citokróm-c-oxidáz* aktivitás szinte teljes eltűnésének következményeként az izmokban és az agyban a gátolt oxidáció miatt jelentősen megnő a szerves savak (tejsav, etilmalonsav) koncentrációja, ezek pedig a vérbe jutva és ott felhalmozódva okoznak további problémákat.

A metabolizmus ezen köztitermékei a vérből a vizeletbe jutva jelentik az EE diagnózisának első lépését, mivel az etilmalonsav, 2-metilborostyánkősav, izobutirilglicin és izovalerilglutaminsav megnövekedett szintje vizeletből kimutatható. Ezek azonban nem egyértelmű indikátorai az EE-nek, mivel ugyanezt tapasztalhatjuk SCADD (rövid szénláncú acil-CoA dehidrogenáz hiány), MADD (multiplex acil-CoA dehidrogenáz hiány) vagy 2-es típusú glutársav acidúria esetén. A biztos választ genetikai vizsgálatokkal, az *ETHE1* gén ellenőrzésével nyerhetjük. Az alkalmazott kezelés a legtöbb esetben vitaminpótlás, L-karnitin, riboflavin vagy Q10 szedésével a sejtek energiatermelése némiképp javítható. Ezt egészítik ki tüneti kezelésekkel, mint görcsoldó, izomlazító, antiepileptikum szedése, valamint fizioterápiával és rendszeres vizsgálatokkal. Az irodalomban azonban már két esetben is megjelent a májtranszplantációval történő kezelés, amely során a néhány hónapos, EE diagnosztizált betegek ortotopikus májtranszplantáción estek át (Dionisi-Vici, Diodato et al. 2016, Tann, AiDhaheri et al. 2019). Ezt követően mind biokémiai laboreredményeikben, mind neurológiai szempontból nagyon jelentős javulás volt tapasztalható. Ezért a májtranszplantációnak, mint az etilmalonsav encefalopátia kezelésének leghatékonyabb módjának nagy jövője lehet.

Ezek alapján az *ETHE1* deficiens betegek vére kiváló választás a módszer klinikai alkalmazhatóságának vizsgálatára, hiszen jól körülírt problémáról van szó, amelynél egerekben bizonyították, hogy *ETHE1* hiányában a szövetekben szignifikánsan megnő a H_2S koncentrációja. Ez kismolekula révén könnyen a vérbe juthat, így elviekben mérhető is lesz a koncentrációja.

Ritka betegségként csak néhány vérmintához tudtunk hozzájutni Prof. Viktor Kozich segítségével, ezek azonban rendkívül hasznosnak bizonyultak a 33. ábra eredményeinek tekintetében.



33. ábra – Etilmalonsav enkefalopátiás (EE) betegek plazmájában mért szulfid szint egészséges plazma minták mellett. [MBB]=1,1 mM, pH=8,2, T=20°C. A körrel (●) jelölt eredmények Li-Heparin tartalmú csőből származó plazmát jelölnek, míg a háromszöggel (▲) jelölt eredmények EDTA tartalmú csőbe vett plazmából származnak.

Nagyon fontos megjegyezni, hogy az első kontrollmérések (amelynek eredményei a 5.4 fejezetben is szerepelnek) még a hőmérséklet pontos kontrollálása nélkül történtek 20 °C felett, ez okozza a relatíve magas értékeket mindkét csoport esetében. A későbbi, kiegészítő méréseket már 20,0 °C hőmérsékleten végeztük, valamint meghatároztunk egy korrekciós faktort is a korábban mért minták újbóli meghatározásával. A kapott korrekciós faktorból így a 19. ábra alapján meg tudtuk becsülni az eredeti alkilálási hőmérsékletet, amely 28,2 °C-nak adódott. Mivel ezek az eredmények közlésre kerültek, így minden más adatot ennek megfelelően, magasabb hőmérsékletre átszámolva adtunk meg. Több esetben is a Li-Heparin plazma mellett EDTA plazmákat is sikerült beszerezniünk ugyanazon betegtől azonos mintavételnél. A kelátort is tartalmazó plazmák jellemzően 50%-kal produkáltak nagyobb mérhető szulfid szintet, mint LiHep párjaik. Az ábrán jól látszik, hogy az összes mért eredmény bőven az egészséges csoport tartománya felett helyezkedik el, ami jól egyezik az elvárásainkkal.

Arra a kérdésre, miszerint a jelentős növekedés a szabad szulfidként vagy a szulfid-tartalékokban puffereelve létezik, ebből a mérésből nem tudunk válaszolni. Mivel vélhetően a

vér jelentős szulfid-puffer kapacitással bír, ezért feltételezhetjük, hogy a szabad szulfid szint továbbra is nagyon alacsony.

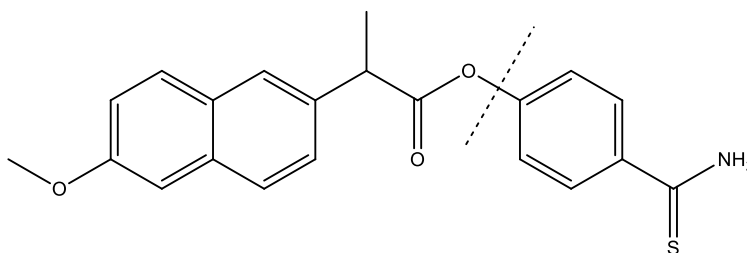
Az eredmények alapján 2 fontos megállapítást tehetünk:

A módszer alkalmas klinikai mintákban a szulfid szint meghatározására és képes különbséget tenni egészséges és a szulfid-metabolizmus módosulásában érintett betegek között.

Etilmalonsav enkefalopátiás betegeknél a vérbeli szulfid mérése jó kiegészítő indikátora lehet a szerves sav diagnosztikának, mivel előzetes eredményeink alapján CSAD (*ciszteinszulfínát-dekarboxiláz*) deficiens beteg vérének vizsgálva szignifikánsan alacsonyabb szulfid szintet mértünk az egészséges kontrollokhoz képest, tehát még genetikai vizsgálat előtt lehet előre jelezni, hogy vajon ez esetben melyik betegség állhat fenn. Ennek az egyértelmű tisztázásához azonban szükség van további mérésekre, mivel a CSAD deficiencia esetén is ritka betegségről (1/50000) van szó, idáig csak egy mintához tudtunk hozzájutni.

5.3. ATB-346 gyulladás- és fájdalomcsillapító szer fázis 2 vizsgálata

Munkám során lehetőségünk nyílt bekapcsolódni egy fejlesztés alatt lévő gyógyszer-hatóanyag vizsgálatába is. Ez a gyógyszer az ATB-346, amelyet az Antibe Therapeutics Inc. (Torontó, Kanada) dolgozott ki gyulladás- és fájdalomcsillapításra. A 34. ábrán bemutatott hatóanyag molekula egy olyan naproxen-származék, mely az alapvázhoz észterformában kötve a szaggyalított vonallal jelölt helyen egy szulfid-donor funkcióscsoporttal rendelkezik.



34. ábra – ATB-346 molekula szerkezete. A szaggyalított vonaltól balra helyezkedik el a naproxen alapváz, jobbra a szulfid-donorként funkcionáló aril-tioamid csoport

A gyógyszer jelenleg fázis 2 klinikai vizsgálati státuszban áll, amely keretein belül kopásos ízületi gyulladás (osteoarthritis) kezelését vizsgálják. A betegséget jelenleg rutinszerűen nem-szteroid gyulladáscsökkentővel (NSAID), például naproxennel kezelik. Ezeknek azonban káros mellékhatásai is ismertek: problémákat okoz az emésztőrendszerben, huzamosabb szedése gyomor- és bélnyálkahártya-fekély kialakulását okozza sok esetben, COX (*ciklooxygenáz*)

gátlóhatáson keresztül. A mellékhatások csökkenthetőek, ha a páciens egyéb gyógyszert is fogyaszt, például Hisztamin H-2 receptor antagonistát vagy proton-pumpa inhibitor, amelyek csökkentik a gyomorsav termelését (Goldstein, Johanson et al. 2007).

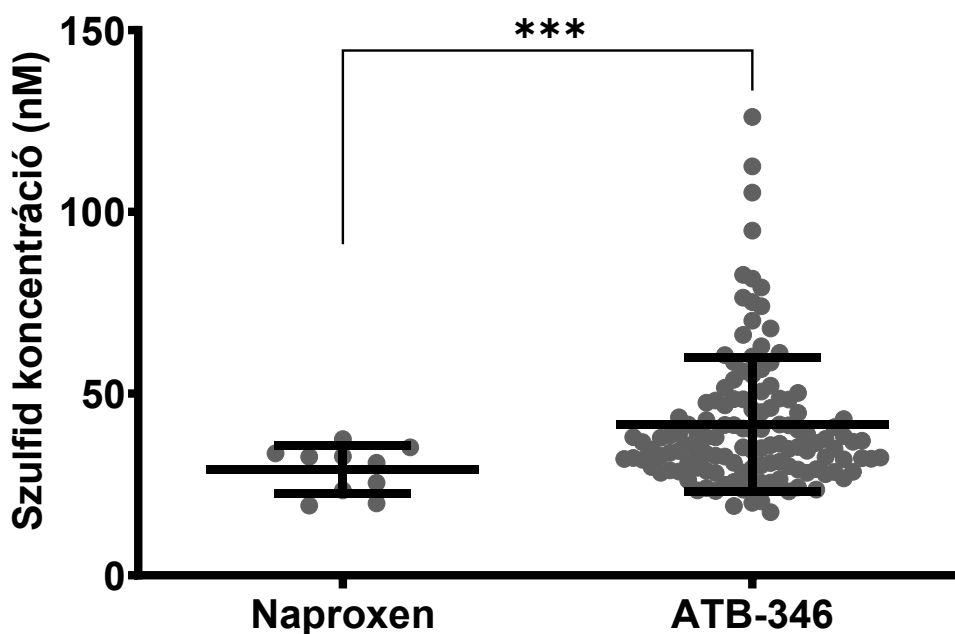
A hidrogén-szulfid esetén több cikkben is kimutatható volt gyulladáscsökkentő és gyógyulást elősegítő hatása (Wallace, Dickey et al. 2007, Blackler, Motta et al. 2015, Motta, Flannigan et al. 2015). Ebből könnyen megérthető, hogy miért hasznos egy NSAID molekula kapcsolása szulfid-donor csoporttal, ahogy azt az ATB-346 esetében is tették. Ezzel a kapcsolással a gyulladáscsökkentő kifejti hatását, míg a felszabaduló kén-hidrogén csökkenti a káros mellékhatásokat. Ezt a védőhatás állatkísérletekben is sikerült kimutatni, patkányok esetében a naproxenhez hasonlóan gátolta a gyógyszer-molekula prosztaglandin E(2) szintézisét, miközben elhanyagolható károsodást okozott az emésztőrendszerben (Wallace, Caliendo et al. 2010). Olyan esetekben is, ahol a patkányok emésztőrendszerének védekezését eleve gyengítették, az ATB-346 kezelés szintén nem okozott jelentős problémákat. Fontos még hozzátenni, hogy az ATB-346 nem volt hatással a vérnyomásra az állatmodellekben.

Fázis 1 klinikai vizsgálata során egészséges önkéntesekben naproxen kontrollhoz képest sokkal jelentősebb, ~6x hatással bírt COX gátlás szempontjából, valamint a hatása is tovább tartott. Ezt követte a Fázis 2 vizsgálat, amelyben már kopásos ízületi gyulladásban szenvedő betegek kapták meg a gyógyszert. 12 beteg 10 napig kapott szokásos naproxen adagjához viszonyítva 1/6 dózisban (250 mg) ATB-346-ot, miközben vizsgálták a vérben a COX aktivitást és követték a betegek fájdalmát is (Wallace, Vaughan et al. 2018). A kísérlet sikeres volt, megerősítette a Fázis 1 eredményeket is, ugyanis a hatóanyag jelentősen csökkentette a fájdalmakat és jól mérhetően csökkent a COX aktivitás is a relatíve alacsony dózis ellenére is.

A Fázis 2 vizsgálat következő lépése az emésztőrendszert érintő mellékhatásokra irányult, ebben a szakaszban vettünk részt együttműködő laborként, a mi feladatunk volt a kezelt betegek vérében a szulfid szint meghatározása kontroll betegekkel szemben. A vizsgálat leírása a 3.10 fejezetben található.

A minták eredményeire tekintve a 35. ábrán statisztikailag szignifikáns szulfid szint növekedést láthatunk az ATB-346-tal kezelt betegek véreiben a naproxent használó csoporttal szemben. Ez pontosan megegyezik várakozásunkkal, hiszen a hatóanyag szulfid-donorként funkcionál, így az eredmény nem meglepő, viszont nagyon fontos két szempontból is. Egy részről sikerült kimutatni a gyógyszer szulfid-donor tulajdonságát vérből, azaz valóban növeli a környezetben (ebben az esetben vérplazmában) a hidrogén-szulfid koncentrációját kis mértékben, ami hozzájárul a mellékhatások csökkentéséhez. Más részről azt is igazoltuk, hogy megfelelő

nagyságú csoport esetén még kis különbségeket is képesek vagyunk detektálni biológiai mintákból.



35. ábra – Naproxennel és ATB-346-tal kezelt betegek plazma mintáiban mért szulfid szintek.

[MBB]=1,1 mM, pH=8,2, T=20°C

A vizsgálat fő célja az emésztőrendszert érintő káros mellékhatások csökkenésének bizonyítása volt, ehhez a gyomorban és patkóbélben endoszkóppal vizsgálták a fekélyek megjelenését, méretét és számát. Az eredmény határozottan pozitív lett, ugyanis naproxen kontrollal összehasonlítva, ahol a páciensek 42%-ánál találtak fekélyt, az ATB-346 csoportban ez a szám mindössze 2,5% volt. Ezen túl a fekélyek mennyisége között is jelentős volt a különbség, míg 53 kontrol betegre esett 210 fekélyes seb, addig a teljes ATB-346 csoportban mindössze négyet regisztráltak 3 főnél. Patkóbélben is hasonló volt a tapasztalat, a kontroll csoportban 7 fekélyt találtak, a kezelt csoportban pedig egyet sem. 5 mm-nél nagyobb fekélyes seb a kontrollcsoport 25%-ánál volt detektálható, az ATB-346 csoportnál viszont nem találtak ilyeneket.

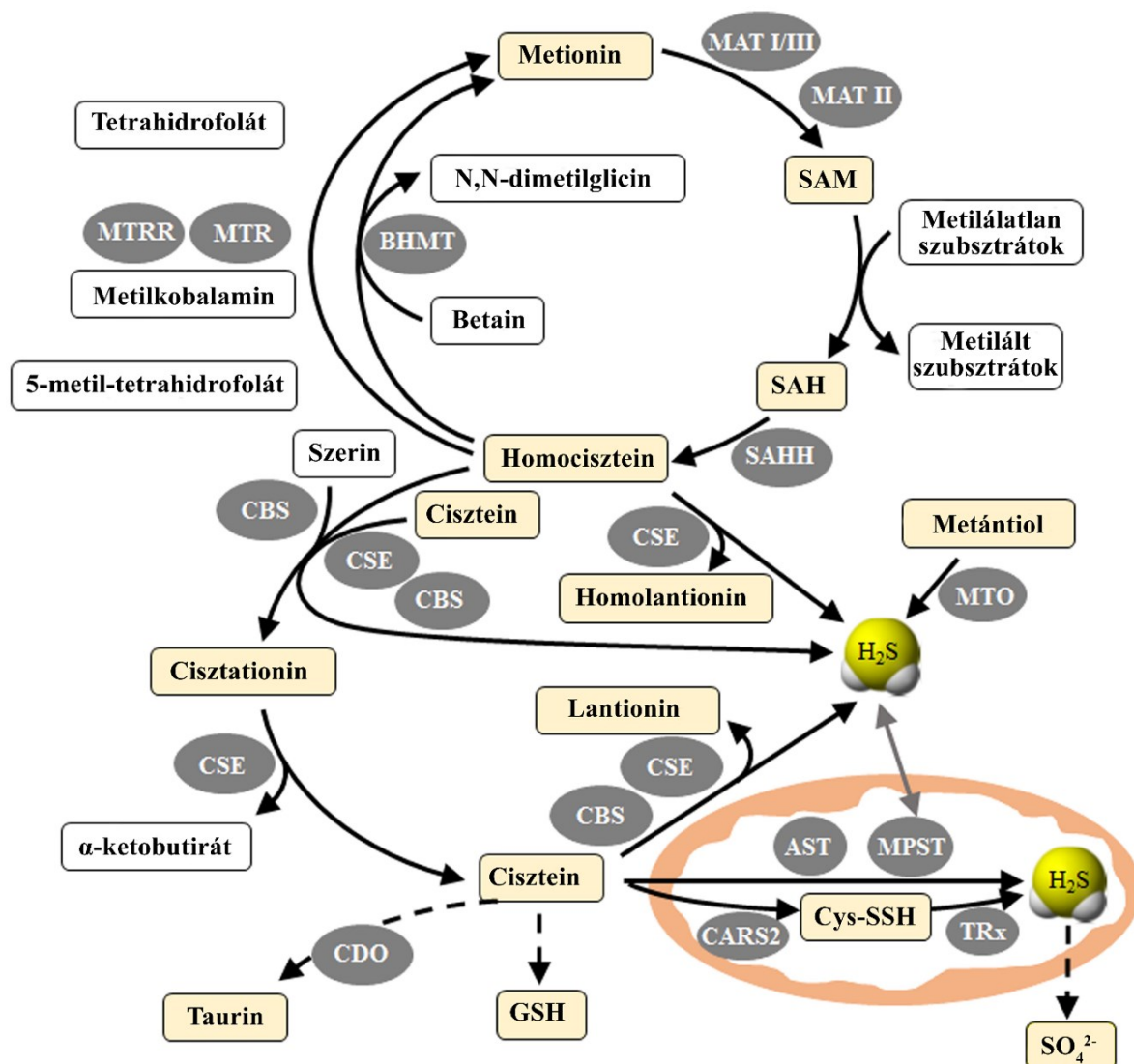
A vizsgálat tehát sikeresen zárult, részünkről a molekula szulfid-donor tulajdonságának igazolásával plazmában, a vizsgálatvezető részéről pedig az emésztőrendszeri káros mellékhatások nagyon jelentős csökkenésének igazolásával. A kutatás következő része jelenleg is folyik, amelyben a szulfid-donor effektus idő- és dózisfüggését vizsgáljuk.

5.4. Homocisztinuriás betegek vérének vizsgálata

Az újonnan fejlesztett módszerrel és a korábban alkalmazott módszerrel egy együttműködés keretein belül kerestünk összefüggést a hidrogén-szulfid koncentráció és az egyes enzimatis defektusok között. Ehhez szintén, Prof. Viktor Kozich biztosította a mérendő mintákat. Prof. Kozich és csoportja a purint, homociszteint és B-vitaminokat érintő útvonalak elváltozásaira és az egyéb mitokondriális zavarokra fókuszál, azok patogenetikáját és molekuláris alapjait kutatják. Közös tudományos tevékenységünk az egyes transzszulfurációt érintő elváltozások alapos metabolomikai vizsgálatát célozta meg, kiemelve a klasszikus homocisztinuriát.

A homocisztinuria egy ritka (1:300000-1:600000), örökletes, autoszomális recesszív betegség, amelynek legfontosabb velejárója a homocisztein szintjének jelentős megemelkedése, ez vizeletben és vérben is kimutatható (Orpha.net 2020). Az elváltozás hátterében nagyon sok esetben a CBS enzim defektusa (CBSD) jelenik meg, de ezen kívül több más okból is manifesztálódhat a probléma.

A 36. ábra alapján két fontos útvonal felelős a homocisztein szintjének kontrollálásáért. A HCys katabolizmus a transzszulfurációs utak mentén, amelyek a homociszteint, mint kénforrást használják különböző kéntartalmú metabolitok és hidrogén-szulfid előállítására. A jelenleg vizsgált betegség szempontjából itt a kulcsfolyamat a CBS enzim által katalizált reakció, amely során homocisztein és szerin kondenzációjával egy tioéter, a cisztationin keletkezik. A cisztationin a CSE enzim segítségével ciszteinné alakítható, ami további kulcsfontosságú molekulák (mint például a glutation vagy kén-hidrogén), illetve fehérjék előállítását teszi lehetővé. Könnyen belátható, hogy ha ez az útvonal a CBS enzim defektusán keresztül sérül, akkor a homocisztein szintjét szabályozó egyik útvonal elvesztésével a metabolit mennyisége megnő. Ez a folyamat a klasszikus homocisztinuria esetét eredményezi, miközben a cisztationin (CTH) szintje lecsökken. A betegség eleinte tünetmentes, később gyerekkorban szemlencse diszlokáció (ectopia lentis), jellemzően rövidlátás, a csontozat meghosszabbodása és gyengülése, korai osteoporosis, tanulási nehézségek és rohamok megjelenése, felnőttkor felé pedig keringési problémák kialakulása jellemzi a betegséget (Kozich V. 2016). A CBS enzim defektusának pontos természete szerint különböző mértékben jelennek meg ezek a tünetek és különböző mértékben kezelhetők is. Amennyiben az enzim aktivitása növelhető egy szükséges kofaktor, a piridoxál-foszfát (PLP, B6-vitamin) hozzáadásával, úgy a tünetek jelentősen csökkenthetők, ha a páciens étrendjét nagy dózisban kiegészítjük ezzel a vitaminnal, esetleg folsavval és B12-vitaminnal együtt. Ez utóbbi két kofaktor hiánybetegsége is hasonló tüneteket produkál, hiszen ez is a CBS enzim aktivitásának csökkenésével jár.



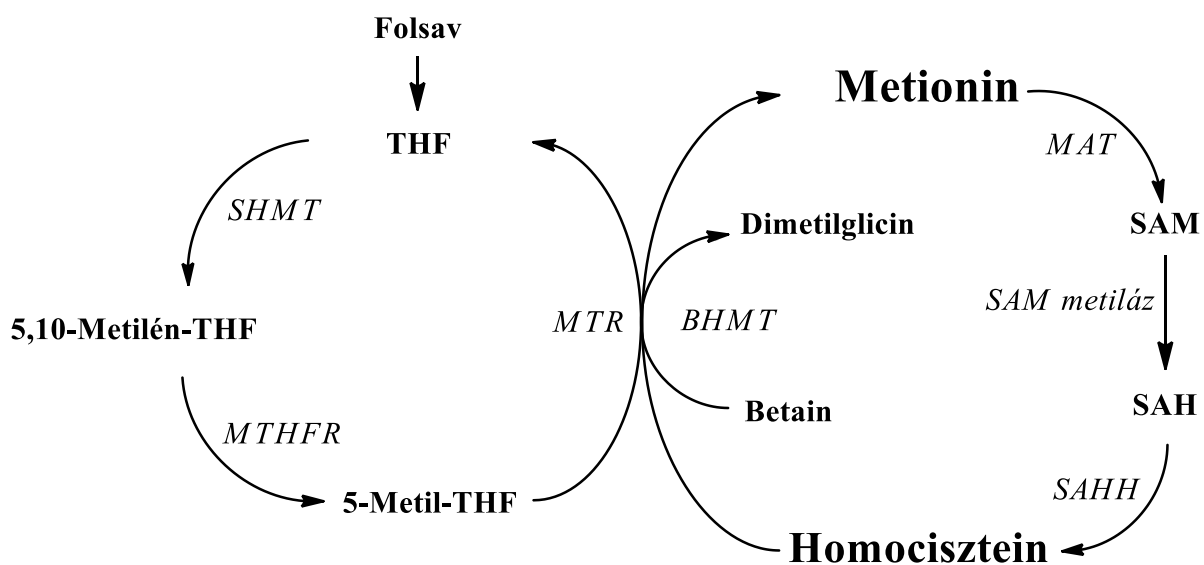
36. ábra – Homociszteint érintő metabolikus útvonalak és az ebből származtatható kénhidrogént termelő folyamatok. (Eredeti ábra: V. Kozich et. al BJP, 2018)

MTRR: metionin-szintáz-reduktáz, MTR: metionin-reduktáz, MAT: metionin-adenoziltranszferáz, BHMT: betain-homocisztein-metiltranszferáz, SAHH: S-adenozilhomocisztein-hidroláz, CBS: cisztationin- β -szintáz, CSE: cisztationin- γ -liáz, AST: aszpártát-aminotranszferáz, MPST: merkaptopiruvát-szulfurtranszferáz, TRx: tioredoxin, CARS2: ciszteinil-t-RNS-szintáz, MTO: metántiol-oxidáz

A veleszületett elváltozás megállapításához a CBS enzim aktivitásának vagy CBS gén mutációjának a vizsgálata szükséges. Olyan esetekben viszont, amikor a terápia nem okozza az enzim aktivitásának növekedését („B6-nonresponsive”), mindenképpen a homocisztein szintjének csökkentésére kell fókuszálni. Egyfelől ezt egy szigorú diétával lehet elérni, amely a fenilketonuria (PKU) kezelésekor alkalmazott étrendhez hasonlóan proteinszegény és minél nagyobb mértékben mellőzi a metionin bevitelét. Emellett lehet kis mértékben serkenteni a HCys metilálását is a 36. ábra felső részén látható remetilációs ciklus támogatásán keresztül.

Betain adagolásával ez a ciklus gyorsítható, tehát a HCys szint csökkenését idézi elő a vérben, ugyanakkor a metionin mennyiségét növeli. Épp ezért inkább kiegészítő kezelésként alkalmazzák vagy olyan esetekben, amikor a szigorú diéta betartása problémákba ütközik.

A homocisztinuria azonban nem csak a működő CBS hiánya miatt alakulhat ki, bár az esetek jelentős részénél ez a kiváltó ok. A 36. ábra HCys felett elhelyezkedő remetilációs ciklusának zavara ugyanúgy felelhet a vér- és vizeletbeli magas homocisztein szintért azonos megfontolások alapján. A két fő típus közötti különbséget a metionin szintje különbözteti meg leglátványosabban, hiszen csökkent CBS aktivitás esetén a metionin vérbeli koncentrációja megnövekedik, míg remetilációs defektus esetén lecsökken az S-adenozil-metioninnal (SAM) együtt. Legtöbb esetben a remetilációs defektus a *metilén-tetrahidrofolát-reduktáz* (MTHFR) hibájából ered, amely 5,10-metilén-tetrahidrofolátból 5-metiltetrahidrofolátot állít elő (Ogier de Baulny, Gerard et al. 1998). Az utóbbi szükséges szubsztátja a *metionin-szintáz* (MTR) enzimnek, amely az 5-metiltetrahidrofolát metilcsoportját homociszteinre transzferálva képi a metionint a szervezetben a 37. ábra szerint.



37. ábra – Remetilációs ciklus útvonalai – az egyes enzimek nevei megtalálhatóak a 36. ábra feliratában

A remetilációs defektus kezelése hasonlóan a CBS működésében érintett betegekhez megfelelő kofaktorok adagolásával kezdődik. Leggyakrabban kobalamint, folsavat kapnak a betegek, ami katalizálja a 37. ábra bal oldalán található ciklust, mivel az MTR enzim B12 függő. Amennyiben a páciensre nincs hatással ez az eljárás, úgy betain segítségével még mindig lehetőség nyílik egy párhuzamos reakcióúton a homocisztein szintjének csökkentésére. Mivel a remetilációs probléma természeténél fogva nem metionin feldúsulást, hanem éppen hiányt

okoz, így a fehérje- és metionin-szegény diétáknak ezeknél a betegeknél nincs értelme. Épp ellenkezőleg, nagyon alacsony metionin-szint esetén az aminosav pótlása válik szükségessé.

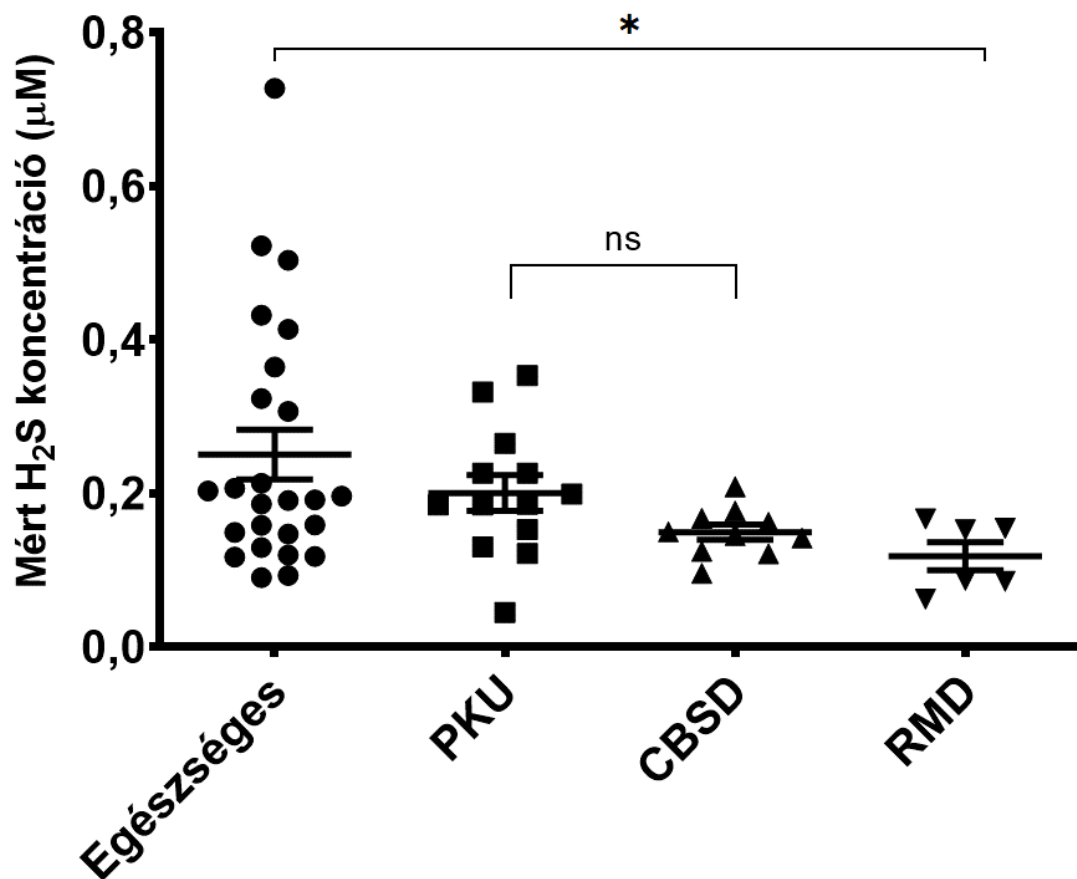
A homocisztinuria diagnosztizálásának első lépése a vér- és vizeletbeli homocisztein szintek monitorozása, amely már újszülötteknél is sok esetben a rutinvizsgálat részét képezi. Ezt egészíthetik ki metionin és tioéter szintek meghatározásával, amely pontosabb képet ad a probléma forrásáról. Ezt követhetik akár vitaminhiányt kizáró vizsgálatok, akár mutációt kereső vizsgálatok, amely utóbbi esetben nagyon pontosan azonosítható a homocisztinuriát kiváltó genetikai hiba.

A kén-hidrogén szintjének vizsgálata a következő alaphipotézisek miatt merült fel:

- Klasszikus homocisztinuria (CBS defektus) esetén a transzszulfurációs útvonal részben vagy egészben történő blokkolása miatt az útvonal végén a hidrogén-szulfid termelése is gátolt, azaz csökkent H_2S szintet várunk vérben.
- Remetilációs defektusnál a transzszulfurációval kompetitív útvonal sérül, így a megnövekedett szubsztrát (HCys) koncentrációja miatt a transzszulfurációs útvonal válik dominánssá, a H_2S szintézise pedig ezzel együtt fokozódik magasabb vérbeli kén-hidrogén koncentrációt eredményezve.

Ennek a hipotézisnek az igazolására végeztünk el heparinos plazma mintákból H_2S koncentráció meghatározást 51 fő bevonásával. A mintákat három csoportba osztályozva kaptuk, egy csoport homocisztinuriás mintákat tartalmazott (CBSD és RMD vegyesen), egy kontrollcsoport fenilketonuriás betegekből állt, mivel ezek az első csoporthoz hasonló diétát követtek, valamint kaptunk egy egészséges kontrollcsoportot is. A csoportok leírása a 3.11 fejezetben található, a méréseket szobahőmérsékleten végeztük, amelyet utólagos kalibrációval az 5.2 fejezetben leírt módon $29,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ -nak határoztunk meg.

A mérések elvégzése után a 38. ábra alapján az induló hipotézisünket sikerült megcáfolni, ugyanis alig találtunk különbséget az egyes csoportok hidrogén-szulfid szintjei között plazmában. Noha az eredmény ellentmond előzetes feltevésünknek, könnyen meg is magyarázható. Mivel a szervezet hidrogén-szulfid szintje nem csak termelésen, hanem lebontáson át is szabályozott, valószínűleg akárcsak a cisztein esetében, a szabad H_2S koncentrációja is katabolitikus útvonalain keresztül szabályozott (Kohl, Mellis et al. 2019). Ezt a korábbi, ETHE1 mérések is alátámasztják, hiszen azokban az esetekben a kén-hidrogén lebontása sérül, ami igencsak szignifikáns növekedéshez vezet. A másik tényező, ami közrejátszhat, az az egyes transzszulfurációban résztvevő enzimek funkcióinak átfedése. Azaz a kén-hidrogén termeléséért felelős egyik enzim funkcióvesztése esetén egy másik átveheti annak helyét, CBS esetében például CSE ahogy az a 3-12 egyenletek között is látható.

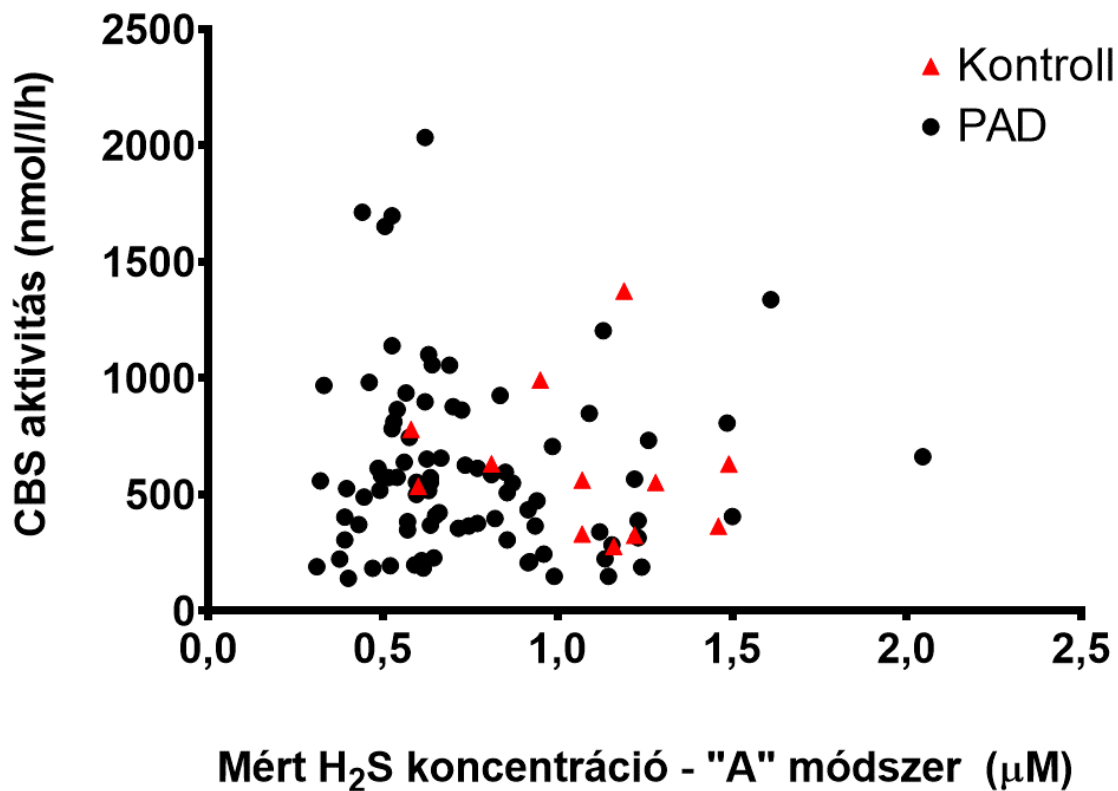


38. ábra– Homocisztinuriás (CBSD és RMD), fenilketonuriás (PKU) betegek és egészséges kontrollok plazma mintáiban mért szulfid szintek. [MBB]=1,1 mM, pH=8,2, T=29.5°C

A CBS enzim és a vérbeli szulfid szint kapcsolatát már korábban sem sikerült kimutatni, azaz az egyes vérmintákból mért H_2S koncentrációk és a hozzájuk tartozó mért CBS aktivitások között nem találtunk szignifikáns korrelációt. Az ehhez tartozó 39. ábra 115 beteg plazmájából mért hidrogén-szulfid szintet és a hozzá kapcsolódó CBS aktivitást mutatja egymás függvényében. A vérmintákat a néhai James R. Mitchell (Harvard T. H. Chan School of Public Health, USA) biztosította számunkra, 3 csoportra osztva. 1 azonos korú és nemű kontrollcsoport, valamint 2 perifériás artériás betegekből (PAD) álló csoport összehasonlításakor azt találtuk, hogy amíg a CBS szintekben nem volt különbség, addig a betegcsoportok csökkent szulfid szintet mutattak.

Érdekes viszont, hogy CSE problémás betegek vérében csökkenést tapasztaltunk, ami felveti a kérdést, hogy vajon a CBS esetében azért nem látunk-e korrelációt, mert a vérbeli H_2S szint jelentős részéért a CSE felel? Ez már egy jól ismert tény, hogy egyes szervekben a kén-hidrogént termelő enzimek aránya jelentősen különbözik, így az egyensúlyi H_2S koncentráció

fenntartásáért eltérő szövetben eltérő enzim felel. Sajnos CSE zavarral rendelkező betegektől mindeddig csak 2 mintát tudott biztosítani cseh partnerünk, így ezt a hipotézist még nem tudjuk nagy biztonsággal elfogadni.



39. ábra – Vérben mért CBS aktivitás és szulfid szintek egymás függvényében.
[MBB]=3,3 mM, pH=8,0, T=RT

6. Megbeszélés

A dolgozatban leírt eredmények leginkább két részre bontva értelmezhetőek és tárgyalhatóak. A dolgozat első fele egy, a szűk területen gyakran alkalmazott analitikai módszer kritikus vizsgálatát öleli fel, amely a szakirodalomban fellelhető disszonanciákat is hivatott feloldani. A dolgozat második fele ezen eredményekre alapozva mutatja be az immár szigorúan kontrollált módszer gyakorlati alkalmazását, mely fontos, új, biológiailag releváns következtetések levonásában járul hozzá a tudományhoz.

A módszerfejlesztés során a kromatográfiás eljárás rövid ellenőrzése mellett a jelentős fókusz a mintaelőkészítés módjára és paramétereire esett. Az irodalomban fellelhető jelentős, nagyságrendi eltérések a vérből mért szabad szulfid szintben, valamint az általunk is tapasztalt nem megfelelő reprodukálhatóság megmagyarázására az egyes előkészítési paraméterek szisztematikus vizsgálatát választottuk. Megállapítottuk, hogy a mintaelőkészítés folyamata, egészen pontosan az alkilálás egy folyamatos, lassú, nem befejezett reakció a szulfid tartalékok felszabadulása miatt, ezért bármely kinetikát befolyásoló paraméter következtetésképpen hatással lesz a reakció leállítása után mért termékkoncentrációra, beleértve a reakcióidőt is. Szisztematikus vizsgálatunk fontos eredménye, hogy a mérést leginkább befolyásoló paraméter, az alkilálás során alkalmazott hőmérséklet a módszer leggyengébb pontja, mivel egyetlen közleményben sem szerepel ennek a pontos értéke, 5-10 °C eltérés azonban 100-200% hibát is okozhat a végeredményben. Ezen kívül a pH, az alkilálószer koncentrációja, az alkilálás időtartama mind olyan paraméterek, melyek közvetlen hatással bírnak a mért szintre, ezért szükség van pontos kontrolljukra. Ezeket a függéseket az egyes irodalomban talált előkészítési módszerek összehasonlításai is alátámasztották, hiszen a módszerek közti különbségek a vártak megfelelően befolyásolták ugyanazon mintából mért szulfid szinteket.

Fontos eredmény még, hogy rámutattunk a kelátorok okozta hibára is, amely nem csak az előkészítés során, de a mintavételnél is egy nagyon fontos szempont. Az irodalomban már korábban is felvetődött EDTA-tartalmú csövekben a megnövekedett hemolízis zavaró hatása, azonban méréseinkben azt is megmutattuk, hogy a korábban védőhatásnak vélt jelenség valójában elhanyagolható és a tapasztalt effektus egy a szulfid-tartalékok felszabadulásához vezető jelenség. Ez pedig mivel még távolabb visz minket meghatározni kívánt eredménytől, ezért ellentétben a korábban elméletben megalapozottan alkalmazott gyakorlattól, mellőzendő a használata.

Az új előkészítési körülmények alkalmazásával több releváns, humán vérmintát is megvizsgáltunk, amelynek célja részben a módszer végső validálása, részben pedig egy ritka

betegség hatásának vizsgálata volt a mérhető vérbeli szulfidszintre. A validálás tekintetében igyekeztünk a vérbeli hidrogén-szulfid szint közvetlen és mesterséges megnövelése helyett olyan mintákat mérni, amelyekben a detektálható különbségek biológiailag releváns szinten vannak. Etilmalonsav enkefalopátia esetén az irodalom H_2S felhalmozódása okozta mérgezésről értekezik, amelyre emberi szervezetben enzimműködés megváltozásának detektálásából, míg egérmodellek esetén hidrogén-szulfid mérési eredményekből következtetnek (Tiranti, Viscomi et al. 2009, Tiranti and Zeviani 2013). A megalapozott gyanút sikerült látványosan igazolni, az együttműködésben kapott *ETHE1* deficiens betegektől származó vérekben szignifikánsan nagyobb szulfid szintet mértünk, mint az egészséges páciensek esetén. Ez alátámasztja a módszer biológiai alkalmazhatóságát, hiszen valós, releváns különbségek vizsgálatával egyértelmű szignifikáns eltérést tapasztaltunk. Fontos azonban észben tartani, hogy egy toxikus koncentrációt eredményező, szélsőséges genetikai elváltozással állunk szemben, nem egy fiziológiásan még tolerálható változást előidéző betegséggel.

Ezt követően nyílt lehetőségünk a módszer kipróbálására egy gyógyszerkísérlet keretében, mely során egy szulfid-donorcsoportot tartalmazó naproxenszármazék hatását vizsgáltuk a vér H_2S szintjére. Mivel már fázis II. vizsgálatról volt szó, így a gyógyszer biztonságossága már igazolt, azaz semmiképpen sem vártunk az etilmalonsav enkefalopátiához hasonló magas koncentrációkat, sokkal valószínűbb volt, hogy a vér jelentős pufferhatása miatt mindössze elenyésző növekedést tudunk mérni. Egy sikeres eredménynek, azaz kontroll és kezelt között mérhető szignifikáns különbségnek egy paraméter, a mérés (és a biológiai csoport) szórása lehet akadálya, azaz vizsgálhatóvá vált, hogy elég pontos-e a metodika kis különbségek kimutatására. A kapott eredmények szerencsére igazolták várakozásainkat, a kezelt csoport vérmintái kimutathatóan magasabb szulfid-koncentrációval rendelkeztek. Bár a biológiai, csoporton belüli szórás igen jelentős volt, az átlagok közötti kicsiny eltérés mégis szignifikáns eltérést eredményezett, ezzel egyrészt igazolva a kis eltérésekhez szükséges nagy pontosságát a módszernek, másfelől a gyógyszerjelölt molekula szulfid-donor hatását is. Amennyiben akármelyik előfeltétel nem teljesült volna, úgy az eredményünk sem lett volna szignifikáns, hiszen a szulfid-donor nélkül nem várunk emelkedett szintet, míg a módszer jelentős szórása, pontatlansága esetén nem lettünk volna képesek szignifikáns különbséget azonosítani a két csoport között.

Két, alapos előfeltételezéssel megtámogatott sikeres mérés után ritka betegségek vizsgálatához fogtunk, amelyek várakozásaink szerint befolyásolhatják a szervezet és a vér hidrogén-szulfid szintjét. A transzszulfurációt érintő több enzim defektusa sem hozta azonban

a várt változásokat, sőt éppen ellenkezőleg alakultak az eredmények. Ez azonban nem a módszer hiányosságát vagy hibáját jelenti, sokkal inkább az enzimhiány okozta metabolomikai változásokkal kapcsolatos hiányos ismereteinket. Kezdeti hipotézisünk egy nagyon egyszerű és közvetlen ok-okozati összefüggést feltételez, azonban a vizsgált enzimrendszer ennél jóval bonyolultabb. Egyrészt az egyes enzimek képesek egymás funkcióit részlegesen átvenni, például mind a CBS, mind a CSE képes a H₂S termelésére, így az egyik defektusa esetén a másik enzim képes részben ellensúlyozni a kialakuló hiányt, ezzel olyan szintre hozva a hidrogén-szulfid koncentrációját, mely nem különbözik a fiziológias szinttől vagy a módszerünkkel attól már megkülönböztethetetlen. Sokkal érdekesebb azonban az a magyarázat, ahol feltételezzük, hogy a H₂S koncentráció katabolizmuson keresztül szabályzott, azaz a lebontás alkalmazkodik a csökkent fluxushoz termelőenzimek hiánya esetén, a katabolikus enzimek defektusa, mint pl. az *ETHE1* enzim viszont jelentős változást idéz elő. Hasonló jelenség áll fenn a cisztein-szint kontrollálásánál is, ahol a legjelentősebb befolyásoló tényező a katabolizmusért felelős *cisztein-dioxigenáz* enzim, amelynek mennyisége igencsak tág határok között képes változni, ezzel biztosítva az állandó cisztein koncentrációt a sejtekben.

Mindezen tapasztalatokat összefoglalva elmondható, hogy sikerült egy minden eddiginél megbízhatóbb mintaelőkészítési és mérési protokollt beállítanunk, amely alkalmas valós, fiziológias hatással bíró változások megbízható és reprodukálható detektálására. A módszerfejlesztés során nyert tapasztalataink alkalmasak voltak arra, hogy az irodalomban fellelhető különbségeket logikusan és méréssel is alátámasztva megmagyarázzuk, vérmintákkal való munkánk során pedig igazoltuk ennek alkalmazhatóságát.

7. Összefoglalás

A munka során hidrogén-szulfid vérben történő detektálására dolgoztunk ki olyan monobromobimánt alkalmazó módszert, amellyel az eddigieknél pontosabban és megbízhatóbban elvégezhető az analízis. Az előkészítés környezeti változóit egyenként vizsgálva meghatároztuk, hogy mely paraméterek milyen mértékben vannak hatással a végeredményre, amiből azt is megállapítottuk, hogy a jelenleg irodalomban megjelent metodikai leírások nem elégségesek a kísérleti eredmények pontos reprodukálásához. Ennek egyik oka, hogy az egyik legjelentősebb, mért végeredményt befolyásoló paraméter, az a hőmérséklet, amely egyetlen protokollban sem szerepel megfelelő pontossággal. Az irodalomban fellelhető módszerek összehasonlításával bemutattuk, hogy ezek az effektusok valóban felelősek lehetnek a publikált adatok közötti jelentős, akár nagyságrendi eltérésekért. Megállapítottuk, hogy ennek a bizonytalanságnak a hátterében a módszer egyik hibás alapfeltételezése áll, miszerint a publikált körülmények között végzett előkészítések a vérben elérhető szabad (H_2S és HS^-) állapotú hidrogén-szulfid meghatározására alkalmasak. Ezzel szemben megmutattuk, hogy a standard szulfiddal végzett reakció 7 perces időtartamával szemben a vérben több, mint 28 órás alkilálást követően is nő a detektált szulfid szint. Ezt a vérben lévő szulfid-tartalékokból való lassú, dinamikus egyensúlyon keresztül történő, alkilálás hatására bekövetkező hidrogén-szulfid felszabadulással magyaráztuk. A kötött szulfid-tartalékok már korábban is ismertek voltak, azonban idáig ezek felszabadulását nem feltételezték az alkilálás során.

A paraméter-függések vizsgálatának eredményeire alapozva ezért egy olyan módszert állítottunk össze és validáltunk, amelyet követve megbízható, reprodukálható eredményeket kaphatunk vérminták analízise során, valamint biztosíthatjuk, hogy a módszer körütekintő alkalmazásával nyert adatok összehasonlíthatóak lesznek. Fontos kitétel, hogy sem a korábbi, sem az új módszerrel meghatározott eredmények nem tekinthetők szabad szulfid koncentrációknak, mivel már az előkészítés közben is jelentős mennyiségben szabadul fel szulfid a tartalékokból, amit kinetikai mérésekkel becsültünk meg.

Az eljárás validálásához megmutattuk, hogy a módszerrel nyert eredmények az eddig publikált módszereknél jobban reprodukálhatóak, valamint igazoltuk, hogy a fagyasztás/olvasztás folyamata nem befolyásolja a mért szulfid szinteket, így fagyasztott vérből is lehetőségünk van hidrogén-szulfid koncentrációkat mérni, amelyek megegyeznek a friss mintából mért koncentrációval.

A klinikai alkalmazhatóság validálásához több betegmintát is rendelkezésünkre bocsátottak együttműködő partnereink. Ezek közül a legfontosabbak az etilmalonsav enkefalopátiás betegek plazmái voltak, ezeknél a mintáknál nagyon jelentős vérbeli szulfid növekedést tudtunk detektálni a vártak szerint. Emellett egy kísérleti fázisban lévő szulfid-donor tulajdonsággal rendelkező gyógyszer esetén is meg tudtuk mutatni, hogy a gyógyszert szedők vérében a mérhető hidrogén-szulfid szint kis mértékben, ám mérhetően és szignifikánsan megnőtt, igazolva módszerünk és egyben a hatóanyag alkalmazhatóságát is.

A klinikai és kémiai szempontból is validált módszert felhasználtuk örökletes, kén-metabolizmust érintő ritka betegségek vizsgálatára is. A kezdetben felállított hipotézisünket megcáfoltuk, miszerint a kén-hidrogén termelésében érintett enzimútvonalak sérülése mérhető változást okoz a plazmában belüli kén-hidrogén koncentrációban. Ennek vélhető és egyre valószínűbb magyarázata a katabolikus útvonalak fokozott jelentősége a szintézissel szemben, amelyet a CBS enzim aktivitásának és a mért H_2S szintek korrelációjának hiányában már korábban is feltételeztünk.

8. Summary

The main objective of the work presented here was to establish a new method for the measurement of hydrogen sulfide in blood samples that is more reliable and reproducible than the ones that are already published. Exact parameters of the sample preparation procedure were extensively and systematically studied to assess their effects on the actual measured H_2S concentration. This study shed light on multiple shortcomings of the previously published methods, like the inaccurate description of the temperature used during the alkylation step, which was shown to have an extreme effect on the results. Comparing published methods, we have shown, that these inaccuracies together with the different parameters used during sample preparation can be behind the observed large discrepancies in measured blood H_2S levels.

The primary reason identified behind these findings was the fact, that this method, just like any alkylation-based procedure, does not actually measure the so-called free sulfide levels (H_2S and HS^-). Using a chemical kinetic approach, we have shown that while the reaction of hydrogen sulfide with monobromobimane reaches completion in 7 minutes, using the same procedure with blood one can experience a constant increase in the detected sulfide concentration even after 28 hours. This can be attributed to the blood sulfide-pool that is in dynamic equilibrium with free sulfide levels, constantly and slowly releasing it as it is consumed by the alkylation agent monobromobimane.

Based upon our findings, we have chosen a certain parameter set and developed and validated a method for blood H_2S determination that is reliable and reproducible, ensuring that results produced by this tightly controlled procedure will be comparable unlike before. It is however important to state that results produced by either the previously published or the newly developed method will not represent true “free” hydrogen-sulfide levels, rather than a mix of the free and liberated sulfide that we can call “bioavailable” H_2S . We have shown using blood samples that the reproducibility exceeds those of previous methods and that freezing/thawing does not affect the results, therefore we do not need to have fresh samples, sera/plasma can be collected and analyzed later.

To validate its usability in clinical studies, multiple human samples were provided by our collaborators and assayed using the new method. We had a chance to analyze blood samples from patients suffering from ethylmalonic encephalopathy, where the expected high sulfide levels were unambiguously proven by our method. We were also given a chance to receive blood samples from a Phase 2 study of an NSAID that has a sulfide-donor property. Treated patient blood samples showed a slight but significant increased sulfide level versus the control

group proving that the drug has the expected effect and our method is capable of distinguishing such small differences.

The now validated method was also used on samples obtained from patients with rare genetic diseases affecting sulfur metabolism. Our initial hypothesis, that defects in enzymes responsible for H₂S production would translate into changes in bioavailable blood sulfide levels, was however disproved by our measurements. This can be attributed to the more pronounced influence of the catabolic enzymes on H₂S levels as we have seen it in the case of ethylmalonic encephalopathy.

9. Irodalomjegyzék

9.1. Hivatkozott közlemények

- Abe, K. and H. Kimura (1996). "The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator." Journal of Neuroscience **16**(3): 1066-1071.
- Akaike, T., T. Ida, F. Y. Wei, M. Nishida, Y. Kumagai, M. M. Alam, H. Ihara, T. Sawa, T. Matsunaga, S. Kasamatsu, A. Nishimura, M. Morita, K. Tomizawa, A. Nishimura, S. Watanabe, K. Inaba, H. Shima, N. Tanuma, M. Jung, S. Fujii, Y. Watanabe, M. Ohmuraya, P. Nagy, M. Feelisch, J. M. Fukuto and H. Motohashi (2017). "Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics." Nat Commun **8**(1): 1177.
- Bhatia, M. and R. R. Gaddam (2021). "Hydrogen Sulfide in Inflammation: A Novel Mediator and Therapeutic Target." Antioxid Redox Signal **34**(17): 1368-1377.
- Blackler, R. W., J. P. Motta, A. Manko, M. Workentine, P. Bercik, M. G. Surette and J. L. Wallace (2015). "Hydrogen sulphide protects against NSAID-enteropathy through modulation of bile and the microbiota." Br J Pharmacol **172**(4): 992-1004.
- Boulegue, J. (1981). "Simultaneous Determination of Sulfide, Polysulfides and Thiosulfate as an Aid to Ore Exploration." Journal of Geochemical Exploration **15**(1-3): 21-36.
- Cao, X., L. Ding, Z. Z. Xie, Y. Yang, M. Whiteman, P. K. Moore and J. S. Bian (2018). "A Review of Hydrogen Sulfide Synthesis, Metabolism, and Measurement: Is Modulation of Hydrogen Sulfide a Novel Therapeutic for Cancer?" Antioxid Redox Signal.
- Chang, T., A. Untereiner, J. Liu and L. Wu (2010). "Interaction of methylglyoxal and hydrogen sulfide in rat vascular smooth muscle cells." Antioxid Redox Signal **12**(9): 1093-1100.
- Chen, X., K. H. Jhee and W. D. Kruger (2004). "Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine beta-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine." J Biol Chem **279**(50): 52082-52086.
- Cline, J. D. (1969). "Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters." Limnology and Oceanography: 454-458.
- Coletta, C., K. Modis, B. Szczesny, A. Brunyanszki, G. Olah, E. C. Rios, K. Yanagi, A. Ahmad, A. Papapetropoulos and C. Szabo (2015). "Regulation of Vascular Tone, Angiogenesis and Cellular Bioenergetics by the 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase/H₂S Pathway: Functional Impairment by Hyperglycemia and Restoration by DL- α -Lipoic Acid." Mol Med **21**: 1-14.
- Cortese-Krott, M. M., G. G. Kuhnle, A. Dyson, B. O. Fernandez, M. Grman, J. F. DuMond, M. P. Barrow, G. McLeod, H. Nakagawa, K. Ondrias, P. Nagy, S. B. King, J. E. Saavedra, L. K. Keefer, M. Singer, M. Kelm, A. R. Butler and M. Feelisch (2015). "Key bioactive reaction products of the NO/H₂S interaction are S/N-hybrid species, polysulfides, and nitroxyl." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(34): E4651-4660.
- d'Emmanuele di Villa Bianca, R., R. Sorrentino, P. Maffia, V. Mirone, C. Imbimbo, F. Fusco, R. De Palma, L. J. Ignarro and G. Cirino (2009). "Hydrogen sulfide as a mediator of human corpus cavernosum smooth-muscle relaxation." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(11): 4513-4518.
- Dionisi-Vici, C., D. Diodato, G. Torre, S. Picca, R. Pariente, S. Giuseppe Picardo, I. Di Meo, C. Rizzo, V. Tiranti, M. Zeviani and J. De Ville De Goyet (2016). "Liver transplant in

ethylmalonic encephalopathy: a new treatment for an otherwise fatal disease." Brain **139**(Pt 4): 1045-1051.

Dionisi-Vici, C., D. Diodato, G. Torre, S. Picca, R. Pariente, S. G. Picardo, I. Di Meo, C. Rizzo, V. Tiranti, M. Zeviani and J. D. De Goyet (2016). "Liver transplant in ethylmalonic encephalopathy: a new treatment for an otherwise fatal disease." Brain **139**: 1045-1051.

Doka, E., I. Pader, A. Biro, K. Johansson, Q. Cheng, K. Ballago, J. R. Prigge, D. Pastor-Flores, T. P. Dick, E. E. Schmidt, E. S. Arner and P. Nagy (2016). "A novel persulfide detection method reveals protein persulfide- and polysulfide-reducing functions of thioredoxin and glutathione systems." Sci Adv **2**(1): e1500968.

Eto, K., T. Asada, K. Arima, T. Makifuchi and H. Kimura (2002). "Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease." Biochemical and Biophysical Research Communications **293**(5): 1485-1488.

Fahey, R. C., G. L. Newton, R. Dorian and E. M. Kosower (1981). "Analysis of biological thiols: quantitative determination of thiols at the picomole level based upon derivatization with monobromobimanes and separation by cation-exchange chromatography." Anal Biochem **111**(2): 357-365.

Fischer, E. (1883). "Bildung von Methylenblau als Reaktion auf Schwefelwasserstoff." Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **16**(2): 2234-2236.

Fogo, J. K. and M. Popowsky (1949). "Spectrophotometric Determination of Hydrogen Sulfide." Analytical Chemistry **21**(6): 732-734.

Fonselius, S., D. Dyrssen and B. Yhlen (1999). Determination of hydrogen sulphide. Methods of Seawater Analysis: 91-100.

Font, J., J. Gutierrez, J. Lalueza and X. Perez (1996). "Determination of sulfide in the leather industry by capillary electrophoresis." Journal of Chromatography A **740**(1): 125-132.

Furne, J., A. Saeed and M. D. Levitt (2008). "Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **295**(5): R1479-1485.

Giovinazzo, D., B. Bursac, J. I. Sbodio, S. Nalluru, T. Vignane, A. M. Snowman, L. M. Albacarys, T. W. Sedlak, R. Torregrossa, M. Whiteman, M. R. Filipovic, S. H. Snyder and B. D. Paul (2021). "Hydrogen sulfide is neuroprotective in Alzheimer's disease by sulphydrating GSK3beta and inhibiting Tau hyperphosphorylation." Proc Natl Acad Sci U S A **118**(4).

Goldstein, J. L., J. F. Johanson, C. J. Hawkey, L. J. Suchower and K. A. Brown (2007). "Clinical trial: healing of NSAID-associated gastric ulcers in patients continuing NSAID therapy - a randomized study comparing ranitidine with esomeprazole." Aliment Pharmacol Ther **26**(8): 1101-1111.

Guenther, E. A., K. S. Johnson and K. H. Coale (2001). "Direct ultraviolet spectrophotometric determination of total sulfide and iodide in natural waters." Anal Chem **73**(14): 3481-3487.

Hamid, H. A., A. Tanaka, T. Ida, A. Nishimura, T. Matsunaga, S. Fujii, M. Morita, T. Sawa, J. M. Fukuto, P. Nagy, R. Tsutsumi, H. Motohashi, H. Ihara and T. Akaike (2019). "Polysulfide stabilization by tyrosine and hydroxyphenyl-containing derivatives that is important for a reactive sulfur metabolomics analysis." Redox Biol **21**: 101096.

Hissner, F., J. Mattusch and K. Heinig (1999). "Determination of sulfur-containing inorganic anions by dual ion chromatography and capillary electrophoresis - application to the

characterization of bacterial sulfur degradation." Fresenius Journal of Analytical Chemistry **365**(8): 647-653.

Hoffmann, G. F., D. H. Hunneman, C. Jakobs, E. Wilichowski, S. W. Eber, F. Hanefeld, D. Rating and H. Reichmann (1990). "Progressive fatal pancytopenia, psychomotor retardation and muscle carnitine deficiency in a child with ethylmalonic aciduria and ethylmalonic acidaemia." J Inherit Metab Dis **13**(3): 337-340.

Hoj, P. B. and B. L. Moller (1987). "Acid-labile sulfide and zero-valence sulfur in plant extracts containing chlorophyll and ionic detergents." Anal Biochem **164**(2): 307-314.

Hosoki, R., N. Matsuki and H. Kimura (1997). "The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide." Biochem Biophys Res Commun **237**(3): 527-531.

Hu, L. F., M. Lu, C. X. Tiong, G. S. Dawe, G. Hu and J. S. Bian (2010). "Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on Parkinson's disease rat models." Aging Cell **9**(2): 135-146.

Kabil, O. and R. Banerjee (2010). "Redox biochemistry of hydrogen sulfide." J Biol Chem **285**(29): 21903-21907.

Kabil, O. and R. Banerjee (2014). "Enzymology of H₂S Biogenesis, Decay and Signaling." Antioxidants & Redox Signaling **20**(5): 770-782.

Kabil, O., V. Vitvitsky, P. Xie and R. Banerjee (2011). "The Quantitative Significance of the Transsulfuration Enzymes for H₂S Production in Murine Tissues." Antioxidants & Redox Signaling **15**(2): 363-372.

Kaneko, Y., Y. Kimura, H. Kimura and I. Niki (2006). "L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic beta-cell: possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter." Diabetes **55**(5): 1391-1397.

Kevil, C., M. Cortese-Krott, P. Nagy, A. Papapetropoulos, M. Feelisch and C. Szabo (2017). "Cooperative Interactions Between NO and H₂S: Chemistry, Biology, Physiology, Pathophysiology." Nitric Oxide: Biology and Pathobiology: Third Edition: 57-83.

Kohl, J. B., A. T. Mellis and G. Schwarz (2019). "Homeostatic impact of sulfite and hydrogen sulfide on cysteine catabolism." Br J Pharmacol **176**(4): 554-570.

Kolluru, G. K., X. Shen, S. C. Bir and C. G. Kevil (2013). "Hydrogen sulfide chemical biology: pathophysiological roles and detection." Nitric Oxide **35**: 5-20.

Kolluru, G. K., X. G. Shen, S. C. Bir and C. G. Kevil (2013). "Hydrogen sulfide chemical biology: Pathophysiological roles and detection." Nitric Oxide-Biology and Chemistry **35**: 5-20.

Kosower, E. M. and B. Pazhenchevsky (1980). "Bimanes .5. Synthesis and Properties of Syn and Anti-1,5-Diazabicyclo[3.3.0]Octadienediones (9,10-Dioxabimanes)." Journal of the American Chemical Society **102**(15): 4983-4993.

Kozich, V., T. Ditroi, J. Sokolova, M. Krizkova, J. Krijt, P. Jesina and P. Nagy (2018). "Metabolism of sulfur compounds in homocystinurias." Br J Pharmacol.

Kožich V., M. A. A. M., Blom H.J. (2016). Disorders of Sulfur Amino Acid Metabolism. Inborn Metabolic Diseases. J.-M. S. R. B. Walter, Springer Nature: 309-320.

Krijt, J., J. Kopecka, A. Hnizda, S. Moat, L. A. Kluijtmans, P. Mayne and V. Kozich (2011). "Determination of cystathionine beta-synthase activity in human plasma by LC-MS/MS: potential use in diagnosis of CBS deficiency." J Inherit Metab Dis **34**(1): 49-55.

- Li, L., M. Bhatia, Y. Z. Zhu, Y. C. Zhu, R. D. Ramnath, Z. J. Wang, F. B. Anuar, M. Whiteman, M. Salto-Tellez and P. K. Moore (2005). "Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse." *FASEB J* **19**(9): 1196-1198.
- Lin, V. S., W. Chen, M. Xian and C. J. Chang (2015). "Chemical probes for molecular imaging and detection of hydrogen sulfide and reactive sulfur species in biological systems." *Chem Soc Rev* **44**(14): 4596-4618.
- Melideo, S. L., M. R. Jackson and M. S. Jorns (2014). "Biosynthesis of a Central Intermediate in Hydrogen Sulfide Metabolism by a Novel Human Sulfurtransferase and Its Yeast Ortholog." *Biochemistry* **53**(28): 4739-4753.
- Miura, Y., T. Maruyama and T. Koh (1995). "Ion-Chromatographic Determination of L-Ascorbic-Acid, Sulfite, Sulfide and Thiosulfate Using a Cation-Exchanger of Low Cross-Linking." *Analytical Sciences* **11**(4): 617-621.
- Montoya, L. A. and M. D. Pluth (2012). "Selective turn-on fluorescent probes for imaging hydrogen sulfide in living cells." *Chem Commun (Camb)* **48**(39): 4767-4769.
- Montoya, L. A., X. Shen, J. J. McDermott, C. G. Kevil and M. D. Pluth (2015). "Mechanistic investigations reveal that dibromobimane extrudes sulfur from biological sulphydryl sources other than hydrogen sulfide." *Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental details, pH stability data for BTE, NMR spectra. See DOI: 10.1039/c4sc01875c* Click here for additional data file." *Chem Sci* **6**(1): 294-300.
- Morikawa, T., M. Kajimura, T. Nakamura, T. Hishiki, T. Nakanishi, Y. Yukutake, Y. Nagahata, M. Ishikawa, K. Hattori, T. Takenouchi, T. Takahashi, I. Ishii, K. Matsubara, Y. Kabe, S. Uchiyama, E. Nagata, M. M. Gadalla, S. H. Snyder and M. Suematsu (2012). "Hypoxic regulation of the cerebral microcirculation is mediated by a carbon monoxide-sensitive hydrogen sulfide pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(4): 1293-1298.
- Motta, J. P., K. L. Flannigan, T. A. Agbor, J. K. Beatty, R. W. Blackler, M. L. Workentine, G. J. Da Silva, R. Wang, A. G. Buret and J. L. Wallace (2015). "Hydrogen sulfide protects from colitis and restores intestinal microbiota biofilm and mucus production." *Inflamm Bowel Dis* **21**(5): 1006-1017.
- Nagai, Y., M. Tsugane, J. Oka and H. Kimura (2004). "Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes." *FASEB J* **18**(3): 557-559.
- Nagy, P., Z. Palinkas, A. Nagy, B. Budai, I. Toth and A. Vasas (2014). "Chemical aspects of hydrogen sulfide measurements in physiological samples." *Biochim Biophys Acta* **1840**(2): 876-891.
- Newton, G. L., R. Dorian and R. C. Fahey (1981). "Analysis of biological thiols: derivatization with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography." *Anal Biochem* **114**(2): 383-387.
- Nicholls, P. and J. K. Kim (1982). "Sulphide as an inhibitor and electron donor for the cytochrome c oxidase system." *Can J Biochem* **60**(6): 613-623.
- Ogier de Baulny, H., M. Gerard, J. M. Saudubray and J. Zittoun (1998). "Remethylation defects: guidelines for clinical diagnosis and treatment." *Eur J Pediatr* **157 Suppl 2**: S77-83.
- Ohira, S. I. and K. Toda (2006). "Ion chromatographic measurement of sulfide, methanethiolate, sulfite and sulfate in aqueous and air samples." *Journal of Chromatography A* **1121**(2): 280-284.
- Orpha.net. (2020). "Orphanet." 2020, from www.orpha.net.

- Panthi, S., H. J. Chung, J. Jung and N. Y. Jeong (2016). "Physiological Importance of Hydrogen Sulfide: Emerging Potent Neuroprotector and Neuromodulator." Oxid Med Cell Longev **2016**: 9049782.
- Peter, E. A., X. Shen, S. H. Shah, S. Pardue, J. D. Glawe, W. W. Zhang, P. Reddy, N. I. Akkus, J. Varma and C. G. Kevil (2013). "Plasma free H₂S levels are elevated in patients with cardiovascular disease." J Am Heart Assoc **2**(5): e000387.
- Rose, P., P. K. Moore and Y. Z. Zhu (2017). "H₂S biosynthesis and catabolism: new insights from molecular studies." Cellular and Molecular Life Sciences **74**(8): 1391-1412.
- Rozan, T. F. and G. W. Luther (2002). "An anion chromatography/ultraviolet detection method to determine nitrite, nitrate, and sulfide concentrations in saline (pore) waters." Marine Chemistry **77**(1): 1-6.
- Sakurai, H., S. Lien and A. San Pietro (1982). "Determination of acid-labile sulfide and zero-valence sulfur in subchloroplast particles in the presence of sodium dodecyl sulfate." Anal Biochem **119**(2): 372-377.
- Searcy, D. G. and M. A. Peterson (2004). "Hydrogen sulfide consumption measured at low steady state concentrations using a sulfidostat." Anal Biochem **324**(2): 269-275.
- Shen, X., S. Chakraborty, T. R. Dugas and C. G. Kevil (2014). "Hydrogen sulfide measurement using sulfide dibimane: critical evaluation with electrospray ion trap mass spectrometry." Nitric Oxide **41**: 97-104.
- Shen, X., G. K. Kolluru, S. Yuan and C. G. Kevil (2015). "Measurement of H₂S in vivo and in vitro by the monobromobimane method." Methods Enzymol **554**: 31-45.
- Shen, X., C. B. Pattillo, S. Pardue, S. C. Bir, R. Wang and C. G. Kevil (2011). "Measurement of plasma hydrogen sulfide in vivo and in vitro." Free Radic Biol Med **50**(9): 1021-1031.
- Shen, X., E. A. Peter, S. Bir, R. Wang and C. G. Kevil (2012). "Analytical measurement of discrete hydrogen sulfide pools in biological specimens." Free Radic Biol Med **52**(11-12): 2276-2283.
- Szabo, C. (2018). "A timeline of hydrogen sulfide (H₂S) research: From environmental toxin to biological mediator." Biochem Pharmacol **149**: 5-19.
- Takano, Y., H. Echizen and K. Hanaoka (2017). "Fluorescent Probes and Selective Inhibitors for Biological Studies of Hydrogen Sulfide- and Polysulfide-Mediated Signaling." Antioxid Redox Signal **27**(10): 669-683.
- Tan, B., S. Jin, J. Sun, Z. Gu, X. Sun, Y. Zhu, K. Huo, Z. Cao, P. Yang, X. Xin, X. Liu, L. Pan, F. Qiu, J. Jiang, Y. Jia, F. Ye, Y. Xie and Y. Z. Zhu (2017). "New method for quantification of gasotransmitter hydrogen sulfide in biological matrices by LC-MS/MS." Sci Rep **7**: 46278.
- Tann, A., N. S. AiDhaheri, K. Mysore, M. E. Tessier, J. Goss, L. A. Fernandez, A. M. D'Alessandro, J. S. Schwoerer, G. M. Rice, S. H. Elsea and F. Scaglia (2019). "Improved clinical outcome following liver transplant in patients with ethylmalonic encephalopathy." American Journal of Medical Genetics Part A **179**(6): 1015-1019.
- Tiranti, V., C. Viscomi, T. Hildebrandt, I. Di Meo, R. Mineri, C. Tiveron, M. D. Levitt, A. Prelle, G. Fagioliari, M. Rimoldi and M. Zeviani (2009). "Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy." Nat Med **15**(2): 200-205.

- Tiranti, V. and M. Zeviani (2013). "Altered sulfide (H₂S) metabolism in ethylmalonic encephalopathy." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(1): a011437.
- Togawa, T., M. Ogawa, M. Nawata, Y. Ogasawara, K. Kawanabe and S. Tanabe (1992). "High performance liquid chromatographic determination of bound sulfide and sulfite and thiosulfate at their low levels in human serum by pre-column fluorescence derivatization with monobromobimane." Chem Pharm Bull (Tokyo) **40**(11): 3000-3004.
- Ubuka, T. (2002). "Assay methods and biological roles of labile sulfur in animal tissues." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **781**(1-2): 227-249.
- Unger, J., G. Filippi and W. Patsch (2007). "Measurements of free hemoglobin and hemolysis index: EDTA- or lithium-heparinate plasma?" Clin Chem **53**(9): 1717-1718.
- Vitvitsky, V., O. Kabil and R. Banerjee (2012). "High turnover rates for hydrogen sulfide allow for rapid regulation of its tissue concentrations." Antioxid Redox Signal **17**(1): 22-31.
- Wallace, J. L., R. W. Blackler, M. V. Chan, G. J. Da Silva, W. Elsheikh, K. L. Flannigan, I. Gamaniek, A. Manko, L. Wang, J. P. Motta and A. G. Buret (2015). "Anti-inflammatory and cytoprotective actions of hydrogen sulfide: translation to therapeutics." Antioxid Redox Signal **22**(5): 398-410.
- Wallace, J. L., G. Caliendo, V. Santagada and G. Cirino (2010). "Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of naproxen (ATB-346)." Br J Pharmacol **159**(6): 1236-1246.
- Wallace, J. L., M. Dicay, W. McKnight and G. R. Martin (2007). "Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats." FASEB J **21**(14): 4070-4076.
- Wallace, J. L., D. Vaughan, M. Dicay, W. K. MacNaughton and G. de Nucci (2018). "Hydrogen Sulfide-Releasing Therapeutics: Translation to the Clinic." Antioxid Redox Signal **28**(16): 1533-1540.
- Wallace, J. L. and R. Wang (2015). "Hydrogen sulfide-based therapeutics: exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter." Nat Rev Drug Discov **14**(5): 329-345.
- Wang, R. (2012). "Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed." Physiol Rev **92**(2): 791-896.
- Whiteman, M. and P. G. Winyard (2011). "Hydrogen sulfide and inflammation: the good, the bad, the ugly and the promising." Expert Rev Clin Pharmacol **4**(1): 13-32.
- Willhardt, I. and B. Wiederanders (1975). "Activity staining of cystathionine-beta-synthetase and related enzymes." Anal Biochem **63**(1): 263-266.
- Williams, R. J. (1983). "Determination of Inorganic Anions by Ion Chromatography with Ultraviolet Absorbance Detection." Analytical Chemistry **55**(6): 851-854.
- Wintner, E. A., T. L. Deckwerth, W. Langston, A. Bengtsson, D. Leviten, P. Hill, M. A. Insko, R. Dumpit, E. VandenEkart, C. F. Toombs and C. Szabo (2010). "A monobromobimane-based assay to measure the pharmacokinetic profile of reactive sulphide species in blood." Br J Pharmacol **160**(4): 941-957.
- Xiao, Q., J. Ying, L. Xiang and C. Zhang (2018). "The biologic effect of hydrogen sulfide and its function in various diseases." Medicine (Baltimore) **97**(44): e13065.
- Yadav, P. K., M. Martinov, V. Vitvitsky, J. Seravalli, R. Wedmann, M. R. Filipovic and R. Banerjee (2016). "Biosynthesis and Reactivity of Cysteine Persulfides in Signaling." J Am Chem Soc **138**(1): 289-299.

Yadav, P. K., K. Yamada, T. Chiku, M. Koutmos and R. Banerjee (2013). "Structure and kinetic analysis of H₂S production by human mercaptopyruvate sulfurtransferase." J Biol Chem **288**(27): 20002-20013.

Zhang, J. Z. and F. J. Millero (1993). "The Products from the Oxidation of H₂S in Seawater." Geochimica Et Cosmochimica Acta **57**(8): 1705-1718.

Zhang, Y. and J. H. Weiner (2014). "A simple semi-quantitative in vivo method using H₂S detection to monitor sulfide metabolizing enzymes." Biotechniques **57**(4): 208-210.

9.2. Megjelent publikációk jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/202/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Ditrői Tamás
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10040514

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Wallace, J. L., Nagy, P., Feener, T. D., Allain, T., **Ditrői, T.**, Vaughan, D. J., Muscara, M. N., Nucci, G., Buret, A. G.: A proof-of-concept, Phase 2 clinical trial of the gastrointestinal safety of a hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drug.
Br. J. Pharmacol. 177 (4), 769-777, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.14641>
IF: 7.73
2. **Ditrői, T.**, Nagy, A., Martinelli, D., Rosta, A., Kožich, V., Nagy, P.: Comprehensive analysis of how experimental parameters affect H₂S measurements by the monobromobimane method.
Free Radic. Biol. Med. 136, 146-158, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.04.006>
IF: 6.17
3. Kožich, V., **Ditrői, T.**, Sokolová, J., Křížková, M., Krijt, J., Ješina, P., Nagy, P.: Metabolism of sulfur compounds in homocystinurias.
Br. J. Pharmacol. 176 (4), 594-606, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.14523>
IF: 7.73





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400

Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

További közlemények

4. Combi, Z., Potor, L., Nagy, P., Sikura, K. É., **Ditrői, T.**, Jurányi, E. P., Galambos, K., Szerafin, T., Gergely, P., Whiteman, M., Torregrossa, R., Ding, Y., Beke, L., Hendrik, Z., Méhes, G., Balla, G., Balla, J.: Hydrogen sulfide as an anti-calcification stratagem in human aortic valve: altered biogenesis and mitochondrial metabolism of H₂S lead to H₂S deficiency in calcific aortic valve disease.
Redox Biol. 60, 1-19, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2023.102629>
IF: 10.787 (2021)
5. Czinkora, Á., Erdélyi, K., **Ditrői, T.**, Szántó, N., Jurányi, E. P., Szanyi, S., Tóvári, J., Strausz, T., Nagy, P.: Cystathionine beta-synthase overexpression drives metastatic dissemination in pancreatic ductal adenocarcinoma via inducing epithelial-to-mesenchymal transformation of cancer cells.
Redox Biol. 57, 1-14, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2022.102505>
IF: 10.787 (2021)
6. Kožich, V., Schwahn, B. C., Sokolová, J., Křížková, M., **Ditrői, T.**, Krijt, J., Khalil, Y., Křížek, T., Vaculíková-Fantlová, T., Stibůrková, B., Mills, P., Clayton, P., Barvíková, K., Blessing, H., Sykut-Cegielska, J., Dionisi-Vici, C., Gasperini, S., García-Cazorla, Á., Haack, T. B., Honzík, T., Ješina, P., Kuster, A., Laugwitz, L., Martinelli, D., Porta, F., Santer, R., Schwarz, G., Nagy, P.: Human ultrarare genetic disorders of sulfur metabolism demonstrate redundancies in H₂S homeostasis.
Redox Biol. 58, 1-13, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2022.102517>
IF: 10.787 (2021)
7. Dóka, É., Arner, E. S. J., Schmidt, E. E., Dick, T. P., Vliet, A., Yang, J., Szatmári, R., **Ditrői, T.**, Wallace, J. L., Cirino, G., Olson, K. R., Motohashi, H., Fukuto, J. M., Pluth, M. D., Feelisch, M., Akaike, T., Wink, D. A., Ignarro, L. J., Nagy, P.: Comment on "Evidence that the ProPerDP method is inadequate for protein persulfidation detection due to lack of specificity".
Science Advances. 7 (17), 1-5, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.abe7006>
IF: 14.957
8. Krijt, J., Sokolová, J., Šilhavý, J., Mlejnek, P., Kubovčíak, J., Liška, F., Malínská, H., Hüttl, M., Marková, I., Křížková, M., Stipanuk, M. H., Křížek, T., **Ditrői, T.**, Nagy, P., Kožich, V., Pravenec, M.: High Cysteine Diet Reduces Insulin Resistance in SHR-CRP Rats.
Physiol. Res. 70 (5), 687-700, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.33549/physiolres.934736>
IF: 2.139





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

9. Gombos, Z., Koltai, E., Torma, F., Bakonyi, P., Kolonics, A., Aczél, D., **Ditrői, T.**, Nagy, P., Kawamura, T., Radák, Z.: Hypertrophy of Rat Skeletal Muscle Is Associated with Increased SIRT1/Akt/mTOR/S6 and Suppressed Sestrin2/SIRT3/FOXO1 Levels.
Int. J. Mol. Sci. 22 (14), 1-11, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22147588>
IF: 6.208
10. Longchamp, A., MacArthur, M. R., Trocha, K., Ganahl, J., Mann, C. G., Kip, P., King, W. W., Sharma, G., Tao, M., Mitchell, S. J., **Ditrői, T.**, Yang, J., Nagy, P., Ozaki, C. K., Hine, C., Mitchell, J. R.: Plasma Hydrogen Sulfide Is Positively Associated With Post-operative Survival in Patients Undergoing Surgical Revascularization.
Front. Cardiovasc. Med. 8, 1-9, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcvm.2021.750926>
IF: 5.846
11. Erdélyi, K., **Ditrői, T.**, Johansson, H. J., Czikora, Á., Balog, N., Silwal-Pandit, L., Ida, T., Olasz, J., Hajdu, D., Mátrai, Z., Csuka, O., Uchida, K., Tóvári, J., Engebraten, O., Akaike, T., Borresen Dale, A. L., Kásler, M., Lehtiö, J., Nagy, P.: Reprogrammed transsulfuration promotes basal-like breast tumor progression via realigning cellular cysteine persulfidation.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 118 (45), 1-12, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2100050118>
IF: 12.779
12. Mellis, A. T., Misko, A. L., Arjune, S., Liang, Y., Erdélyi, K., **Ditrői, T.**, Kaczmarek, A. T., Nagy, P., Schwarz, G.: The role of glutamate oxaloacetate transaminases in sulfite biosynthesis and H₂S metabolism.
Redox Biol. 38, 1-13, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2020.101800>
IF: 10.787
13. Bogdándi, V., **Ditrői, T.**, Báta, I. Z., Sándor, Z., Minnion, M., Vasas, A., Galambos, K., Buglyó, P., Pintér, E., Feelisch, M., Nagy, P.: Nitrosopersulfide (SSNO) Is a Unique Cysteine Polysulfidating Agent with Reduction-Resistant Bioactivity.
Antioxid. Redox Signal. 33 (18), 1277-1294, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2020.8049>
IF: 8.401
14. Szabó, M., Kalmár, J., **Ditrői, T.**, Bellér, G., Lente, G., Simic, N., Fábán, I.: Equilibria and kinetics of chromium(VI) speciation in aqueous solution ? A comprehensive study from pH 2 to 11.
Inorg. Chim. Acta. 472, 295-301, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2017.05.038>
IF: 2.433





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

15. **Ditrői, T.**, Lente, G.: Minimal Reaction: Diffusion Model of Micromixing during Stopped-Flow Experiments.
J. Phys. Chem. A. 122 (25), 5503-5509, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jpca.8b02879>
IF: 2.641
16. Bogdándi, V., Ida, T., Sutton, T. R., Bianco, C. L., **Ditrői, T.**, Koster, G., Henthorn, H. A., Minnion, M., Toscano, J. P., Vliet, A., Pluth, M. D., Feelisch, M., Fukuto, J. M., Akaike, T., Nagy, P.: Speciation of reactive sulfur species and their reactions with alkylating agents: do we have any clue about what is present inside the cell?
Br. J. Pharmacol. 176 (4), 646-670, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.14394>
IF: 6.583
17. Pino, C. J. Á., **Ditrői, T.**, Lente, G., Fábán, I.: A detailed kinetic study of the direct photooxidation of 2,4,6-trichlorophenol.
J. Photochem. Photobiol. A-Chem. 330, 71-78, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochem.2016.07.025>
IF: 2.625
18. **Ditrői, T.**, Kalmár, J., Pino, C. J. Á., Erdei, Z., Lente, G., Fábán, I.: Construction of a multipurpose photochemical reactor with on-line spectrophotometric detection.
Photochem. Photobiol. Sci. 15 (4), 589-594, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C5PP00407A>
IF: 2.344
19. Lázár, I., Kalmár, J., Anca, P., Szilágyi, A., Győri, E., **Ditrői, T.**, Fábán, I.: Photocatalytic performance of highly amorphous titania-silica aerogels with mesopores: the adverse effect of the in situ adsorption of some organic substrates during photodegradation.
Appl. Surf. Sci. 356, 521-531, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.08.113>
IF: 3.15
20. Nagy, M., Rácz, D., Lázár, L., Purgel, M., **Ditrői, T.**, Zsuga, M., Kéki, S.: Solvatochromic Study of Highly Fluorescent Alkylated Isocyanonaphthalenes, Their Pi-Stacking, Hydrogen-Bonding Complexation, and Quenching with Pyridine.
ChemPhysChem. 15 (16), 3614-3625, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cphc.201402310>
IF: 3.419





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

21. Lente, G., **Ditrói, T.**: Stochastic Kinetic Analysis of the Frank Model. Stochastic Approach to Flow-Through Reactors.
J. Phys. Chem. B. 113 (20), 7237-7242, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jp900276h>
IF: 3.471

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 141,774

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
21,63**

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

Debrecen, 2023.06.02.



10. Tárgyszavak

Hidrogén-szulfid, kromatográfia, analitikai kémia, vér, laboratóriumi diagnosztika, módszerfejlesztés

Hydrogen sulfide, chromatography, analytical chemistry, blood, laboratory diagnostics, method development

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel és hálával tartozom témavezetőmnek, Nagy Péternek, aki megelőlegezte számomra bizalmát és osztályán az élettudományok világába merülhettem számos kitűnő kolléga társaságában. Anyagi és szakmai támogatást biztosított közös munkánk során, segítséget nyújtott tudományos publikációim elkészültéhez és lehetővé tette ennek a dolgozatnak a megszületését.

Hálás vagyok korábbi egyetemi témavezetőmnek és mentoromnak, Lente Gábornak, aki 10 éves közös munkánk során folyamatosan egyengette tudományos pályafutásom és kutatót nevelt belőlem, néha akaratom ellenére is.

A munka kivitelezésében és a minták előkészítésében nagyon sok segítséget kaptam munkatársamtól Nagy Attilától, a fejlesztéshez használt vérek levételében Garai Dorottytól és Molnár Ajnótól, valamint a Molekuláris Immunológia és Toxikológia osztály dolgozóitól, akik szó szerint vérüket adták azért, hogy ez a módszer beállításra kerülhessen.

Köszönet illeti Viktor Kozich-ot, aki immár évek óta tartó közös kutatásunk keretein belül biztosít számunkra értékes, ritka beteganyagot, valamint John L. Wallace-t, aki megtisztelt bizalmával és gyógyszervizsgálataiba bevont minket.

Hálás vagyok feleségemnek és családomnak, akik biztosították számomra a folyamatos nyomást, hogy befejezzem ezt a dolgozatot és megszerezsem a doktori fokozatot.

12. Függelék

- **Az értekezés alapját képző megjelent publikációk és kéziratok gyűjteménye.**