

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Ditrói Tamás

Témavezető: Prof. Dr. Nagy Péter, MTA doktora



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2023

A hidrogén-szulfid jelátviteli molekula detektálása fiziológiai rendszerekben

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Ditrói Tamás okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia doktori programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Nagy Péter, MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Tircsó Gyula, PhD
Dr. Sirokmány Gábor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Juhász Béla, PhD
Dr. Ósz Katalin, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület
tanterme

2023. November 24. 15:00 óra

I. Bevezetés és célkitűzések

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. Részt vesz például gyulladásos folyamatokban, érrendszeri szabályzásban, daganatos betegségekben és védi a kardiovaszkuláris rendszert. Ezen hatásait molekuláris szinten jelátvivő és oxidatív stressz ellen védő funkcióival fejti ki. Mindezek miatt mára már terápiás alkalmazása is előkerült. Pozitívumai mellett azonban még mindig egy erősen mérgező gárról beszélünk, ami a szén-monoxidhoz hasonlóan citokróm c oxidáz hem régiójához kötve jelentősen csökkenti az enzim aktivitását. Ezzel sérül az elektrontranszport lánc és a sejtlégzés, ami végső soron sejthalálhoz vezethet.

A kén-hidrogén endogén termelésére több enzim is képes, azonban máig vita van e téren fontosságukról. Ez részben arra vezethető vissza, hogy egyes szervezetben ezen enzimek aránya jelentősen változik. A legfőbb szulfidtermelő enzimek kanonikusan a cisztationin- β -szintáz (CBS), a cisztationin- γ -liáz (CSE) és a 3-merkaptopiruvát szulfurtranszferáz (3-MST).

Bár rengeteg funkciója lévén fontos biológiai molekuláról beszélünk, diagnosztikai jelentőséggel a mai napig nem bír, aminek nagyon jelentős oka az, hogy mérése kifejezetten nehéz. Egy részről azért, mert vérben és szövetben nagy része kötött formában van jelen, ami ráadásul 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.

Legegyszerűbb módon, kolorimetriás vizsgálatnál már 150 éve is határoztak meg hidrogén-szulfid koncentrációt vizes mintákból N,N-dimetil-p-feniléndiamin alkalmazásával. A keletkező kék színű metilénkék könnyen mérhető volt, így kellő módosítás után nagyon sok közlemény született, amelyben az említett módszerrel vizsgáltak biológiai mintákat. Itt azonban idővel több probléma is felmerült, például irreálisan magas mért értékek, a festék di- és trimerizációja miatti bonyolult kiértékelés, az alkalmazott erősen savas közeg, amely felszabadítja a kötött szulfid-tartalékokat és mátrix okozta zavaró tényezők. Bár az utóbbi problémákra az idő és a technológia meghozta a megoldást, mégis sokan új, jobb módszerek után kutattak. Az elektrokémia adott egy lehetőséget a pontosabb meghatározásra, amely ráadásul nem is zavarta meg a rendszert a szabad H_2S és a kötött szulfid közötti dinamikus egyensúly felborításával. A szulfid-szelektív

elektródok azonban sokáig a biológiai mátrixban jelen lévő tiolok és egyéb kénvegyületek zavaró hatásától szenvedtek, valamint érzékenységük is elmaradt a kívánt szinttől.

A fluoreszcens szondák megjelenése jelenthet egy kiutat a mérési problémákból, azonban a technológia még nem forrott ki. Egy jól használható szondával szemben támasztott követelményeket nehezen teljesítik hiánytalanul a most elérhető termékek, azonban ezen gátak leküzdése után a folyamatos, érzékeny, szelektív monitorozás lehetőségével nagyot lendíthetnek a kutatási területen.

A kromatográfiás módszerek szintén már régóta alkalmazott megoldások bonyolult mátrixok feldolgozásában; az egyik jelenlegi olyan módszer, amely csak minimálisan szól bele a kötött és szabad szulfid közötti egyensúlyba, a gázkromatográfia. Amennyiben nem származékképzőt alkalmazunk, úgy a minta feletti gőztérből injektálva specifikus fluoreszcens detektálással már nmol/l alatti koncentrációk is megbízhatóan detektálhatóak. Hátrányaként a mintaelőkészítés és a mérés időigényét és a technika bonyolultságát lehet felhozni.

Folyadékkromatográfiás módszerek általában sokkal egyszerűbbek, könnyebben kivitelezhetőek. Ezen származékképzésen alapuló módszerek közül a leggyakoribb a monobromobimánt (MBB) alkalmazó megoldás, ahol szulfiddal képzett szulfid-dibimán terméket fluoreszcens tulajdonságának köszönhetően detektáljuk. Ez az alkilálószér 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. Számtalan kutatásban használták már különböző biológiai minták analízisére, azonban ezek a különböző mérések nem azonos eredményeket hoznak. Ennek oka lehet, hogy a módszer több különböző protokoll formájában is létezik, eltérő kísérleti paraméterekkel.

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 a fejlesztett módszer validálást betegmintákon és annak felderítését, hogy lehetséges-e a módszert klinikai diagnosztikában alkalmazni a jövőben.

II. Kísérleti módszerek és szoftverek

A mintavételeket a módszerfejlesztés során Li-heparin tartalmú, valamint alvadási aktivátort tartalmazó géles csövekbe végeztük, 14 egészséges önkéntes hozzájárulásával. A csövek összehasonlításához ezeken túl K_2EDTA vagy citrát tartalmú (süllyedéshez) mintavevő csöveket használtunk. A nemzetközi együttműködésben kapott, a módszer validálása és alkalmazása során használt minták levétele Li-heparin tartalmú csövekbe történt a partnerek által, amelyek centrifugálás után $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on voltak tárolva és szárazjégen szállítva.

A mintaelőkészítést besötétített szobában, vörös megvilágítás mellett végeztük, a mintákat peltier-elemes termosztátba helyezve, barna mikrocentrifuga csövekben. Az alkilálási időket másodperc pontosan tartottuk. A megfelelő pH-t 200 mM HEPES pufferrel biztosítottuk, a reakciót 50%-os triklórecetsavval állítottuk le.

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 egy $250 \times 4,6$ mm-es $5\text{ }\mu\text{m}$ részecskeméretű Agilent XDB-C18 kolonnán végeztük, majd a módszert egy $200 \times 4,6$ mm-es, $3\text{ }\mu\text{m}$ -es Phenomenex Luna C18(2) kolonnára ültettük át a rutinmérésekhez. Mindkét kolonnán gradiens elválasztást végeztünk, a 0,1% TFA tartalmú vizet és acetonitrilt alkalmazva.

A hemolízis követésére Tecan Spark multimode mikrolemez olvasót használtunk 400-800 nm közötti tartományban, 386 lyukú mikrolemezen, 4x hígításban úthosszkorrekcióval.

A kiértékeléseket Microsoft Excel 2016 és Graphpad Prism 5.03 szoftverekkel végeztük. A szignifikanciák meghatározásakor Student-féle T próbát, Mann-Whitney próbát vagy varianciaanalízist alkalmaztunk Tukey-tesztel.

III. Új tudományos eredmények

III.1. Vérből hidrogén-szulfid megbízható mérésére standardizált módszer fejlesztettünk, ahol megmutattuk az eredmény legjobban befolyásoló mérési paramétereit

III.1.1. Vizsgáltuk a hidrogén-szulfid és monobromobimán közötti reakció kinetikai tulajdonságait

A detektálási módszer beállítását szulfid-tartalmú standard vizes oldatok segítségével kezdtük, mely során az analit és az alkilálószer közötti reakció kinetikáját is vizsgáltuk. Irodalmi várakozásoknak megfelelően exponenciális kinetikával kiválóan közelíthető görbéket kaptunk, melyekből megállapítottuk, hogy a reakció szulfid koncentrációtól függetlenül 7 perc alatt lejátszódik. A termékek analiziséből azt is megállapítottuk, hogy a két lépéses alkilálási reakcióban az irodalomban közöltekkel szemben az első lépés a sebesség-meghatározó, azaz a lassabb lépés.

III.1.2. Bemutattuk, hogy a vérből monobromobimán segítségével meghatározott szulfid-szint nem szabad hidrogén-szulfid koncentrációt jelent, hanem nagy részben a kötött szulfid-tartalékból származik

Az előző tézispontban leírtak alapján standard oldatok után vérmintákon is végeztünk kinetikai méréseket, azonban ekkor azt tapasztaltuk, hogy várt 7 perces reakcióidő helyett, a folyamat még 28 óra után sem fejeződött be.

Mivel az alkilálás kinetikájára hatással lévő paramétereit állandó értéken tartottuk, ezért a szabad hidrogén-szulfid alkilálása 7 perc alatt lejátszódott volna. Ehelyett egy sokkal lassabb reakciót látunk, amit egy másik, sokkal lassabb folyamat, a szulfid felszabadulása okozhat specifikus szulfid-tartalékokból. Másik kézzelfogható érv emellett, hogy a kén-hidrogén a vérben a mért, 10 μM feletti koncentrációban már igen súlyos mérgező hatást fejtene ki a szervezetre a már említett citokróom c oxidázt gátló hatása miatt.

Az egyszerű magyarázat tehát egy kötött hidrogén-szulfid tartalék megléte, mely kísérletesen is kimutatható, ugyanis jellegétől függően ezek a tartalékok felszabadíthatóak például erős savanyítás vagy redukálószer hozzáadásával, ahogy ez az irodalomban már többször bizonyítást nyert. Ezen tartalékok fontos puffer rendszert képeznek, hiszen a biológiai folyamatokban felhasznált szulfid utánpótlását biztosítják, mintegy lassú endogén szulfid-donor rendszerként.

Fiziológia szempontból azonban nem csak a tartalék felszabadítása fontos, hanem az esetleges többlet megkötése is, hiszen a hirtelen megugró hidrogén-szulfid erősen mérgező gáz, citokróm c oxidáz gátlásán keresztül citotoxikus hatást fejt ki.

III.1.3. Vizsgáltuk a vérben a szulfid és a monobromobimán közötti reakcióra ható legfontosabb befolyásoló tényezőket.

Az előző pontban közölt megállapítás következményeként, miszerint egy még be nem fejezett reakciót állítunk le, a mérendő analit koncentrációja mellett az alkilálás és szulfid tartalékból való mozgósítás sebessége is meghatározó lesz a mért eredmény szempontjából. Elsősorban a reakciókinetikát befolyásoló tényezők esetünkben a reaktánsok koncentrációja, a reakcióközeg pH-ja, a reakcióidő (vagy reakcióhányados), valamint a hőmérséklet.

A legegyszerűbb hatás a reakcióidőhöz köthető, hiszen triviális, hogy hosszabb reakcióidő nagyobb reakcióhányadost jelent, így több termék keletkezik az idővel arányosan. Hogy ez ne jelentsen problémát, mindössze az alkilálási idő pontos betartásáról kell gondoskodni, esetünkben legfeljebb 1-2 másodpercenyi hibát engedtünk meg a 10 perces előkészítés során, amit stopperrel mértünk.

A monobromobimán koncentrációjának a hatását már előzőleg demonstráltuk, azonban vérrel dolgozva az első pár perc után az alkilálás sebessége helyett a szulfid tartalékok felszabadulása veszi át a sebességhatározó szerepet. Az alkilálószer mennyiségének változtatásával egy lineáris összefüggést tapasztaltunk, ami bár függővé teszi az eredményt az alkalmazott oldattól, egy nagyon egyszerű korrekciós lehetőséget is tartalmaz. Mivel a monobromobimán a kifejlesztett HPLC módszerrel pontosan kvantitálható, így lehetőség nyílik minden egyes mérés során az alkilálószer pontos koncentrációjának meghatározására és ezt követően a mért szulfidszintek korrekcióját a már ismert lineáris összefüggés és egy kalibrációs egyenes birtokában könnyen elvégezhetjük.

A pH hatása két megközelítésből is fontos, egyfelől a célmolekula hidrogén-szulfid savi disszociációs karakterisztikája miatt, másfelől a szulfid-tartalékok pH érzékenysége miatt. Nukleofil szubsztitúciós reakció lévén a reakciósebességet a hidrogén-szulfid protonáltsága közvetlenül is befolyásolja, így a pH rendkívül fontos szerepet játszik a reakció során. Ezt pufferrel szabályozva és változtatva egy pH értékkel növekvő mért szulfid szintet tudtunk kimutatni, ami megfelel elméleti és irodalmi várakozásainknak bemutatva a jól kontrollált pH fontosságát.

A hőmérséklet reakciókinetikában ugyanolyan fontos kísérleti paraméter, mint enzimkinetikában. Az irodalomban szinte kizárólag szobahőmérsékleten végzett előkészítés sajnos kevés támpontot ad a tökéletes ismételhetőséghez, ugyanis még a szigorú gyógyszerkönyvek is 15-25°C között bármely hőmérsékletet elfogadnak szobahőmérsékletként. A reakciót termosztálva azonban mi jelentős hőmérséklet-függést tapasztaltuk, ami felhívta a figyelmet ennek az elhanyagolt paraméternek a kiemelt fontosságára.

Azt tapasztaltuk, 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 tönkretelheti méréseinket, ezért e paraméter szigorú fixálását emeljük ki legfontosabbnak az előzőleg említett, vizsgált kísérleti körülmények közül.

III.1.4. Bemutattuk a mintavétel és mintaelőkészítés során fellépő fizikai, kémiai és biológiai tényezőket, amelyek befolyásolhatják az eredményt és összehasonlítottuk a módszert az irodalomban fellelhető különböző protokollokkal.

A kinetikát befolyásoló tényezők sajnos nem merítik ki az összes, mért szulfidszintre hatással lévő paramétereket. Több egyéb olyan kísérleti paramétert is felderítettünk, amely hátrányosan befolyásolja mérési eredményeinket, azonban nem az alkilálás kinetikájára vannak hatással.

Az alkilálásra használt monobromobimán fényérzékeny vegyületként bomlásra hajlamos, ezért erősen ajánlott a sötét környezetben való munka vele. A fény zavaró hatását több megvilágítás környezetben is vizsgáltuk, ugyanazon mintán elvégeztük az előkészítéseket különböző megvilágítottságú helyzetekben, sötét szobától napfényes laborig. A vizsgálat során mind a végtermék (SDB) mennyiségét, mind a maradék reagens (MBB) koncentrációját mértük. Várakozásunknak megfelelően napsütötte mintákban nagyon jelentősen csökkent mind a reagens, mind a termék koncentrációja, míg fluoreszcens fénycsőves megvilágítás alatt csak a termékben tapasztaltunk szignifikáns csökkenést. Vörös és melegfehér LED világítás alatt a minták nem mutattak mérhető csökkenést egyik analitban sem, így használatuk megfelelő lehet az előkészítésekhez.

Az irodalomban egy kivétellel az alkilálás leállítására és a fehérjék kicsapására valamilyen savanyítást alkalmaznak, akárcsak mi is. Bár több különböző sav is felmerül, például triklórecetsav, hangyasav és szulfoszalicilsav, mechanizmusuk megegyezik. Az alacsony pH-jú

környezetben a reakció sebessége lecsökken, eközben a szabad hidrogén-szulfid protonálódási egyensúlya miatt kipárolog, valamint a fehérjék denaturálódnak és kicsapódnak. Ezzel egy lépésben állítjuk le az alkilálást és centrifugálást követően távolítjuk el a kromatográfiát zavaró fehérjét. Egy másik megoldás etil-acetátos extrakciót javasol, eközben ugyanis a szerves fázisba kerül át mind az alkilálószer, mind a termék, miközben a fehérjefrakció a vizes fázisban marad. A szerves extraktum bepárlásával és visszaoldásával egy tiszta elegyet kapunk, amely azonnal injektálható. Azonos mintából elvégeztük az előkészítést triklórecetsavas és extrakciós leállítással is és azt tapasztaltuk, hogy a két módszer azonos eredményt hozott. Jelentős egyszerűsége és sokkal kisebb hibája miatt így a savanyítást ajánljuk a jövőben is. Az extrakciós módszer előnye, miszerint kevesebb komponens elválasztását teszi szükségessé kromatográfiásan, a mai technológiával már nem jelent kihívást, így elveszik hátrányaihoz képest.

A már vizsgált pH függést egészíti ki a puffer-függés vizsgálata, azaz van-e hatással a puffer minősége a mérésre. Ebben az esetben egy nagyon fontos jelenséggel szembesültünk, azt tapasztaltuk, hogy amíg HEPES, TRIS-HCl és foszfát pufferek nincsenek hatással a mért szulfid szintre, addig DTPA jelenléte szignifikánsan magasabb mért koncentrációt eredményezett, akárcsak a DTPA helyettesítése EDTA-val.

A DTPA, mint kelátor szerepel hagyományosan egyes monobromobimános protokollokban, ugyanis a kén-hidrogén oxidációra hajlamos, amit fémionok katalizálnak. A fémionok komplexálásával DTPA hivatott ezt a hatást csökkenteni. Bár az elmélet teljesen logikus és helytálló, a gyakorlatban alkalmazott időskálán hidrogén-szulfiddal nem tapasztaltunk különbséget kelátort tartalmazó és nem tartalmazó pufferes előkészítés között, ahogy ez már korábban is közölve lett. Az EDTA okozta különbség ugyanakkor egy aggályos kérdést is felvetett, mit várhatunk egy EDTA-tartalmú csőbe levett vér esetén? Összehasonlítva szérum, Li-heparin plazma és citrátos plazma mintákkal, nagyon jelentős eltéréseket is tapasztaltunk, akár 9x mennyiséget is mértünk a Li-heparinos csőbe vett vérrel szemben.

Az irodalomban már szerepelt az EDTA hemolízist elősegítő hatása, amelyet mi is tapasztaltunk a levett plazma hemoglobin-tartalmának fotometriás monitorozásával, párhuzamosan a megnövekedett mért szulfid szinttel. Mérésünk alapján a csőbe levett vér mennyisége és ezen keresztül az EDTA koncentrációja befolyásolja legjelentősebben a mért szulfid szintet, míg a várakozási idő a plazma elválasztásáig csak kisebb hatással bír.

Fontos még hozzátenni, hogy a tapasztalt hatás csak részben köthető hemolízishez, ugyanis eredetileg Li-heparinos csőbe levett plazmát EDTA tartalmú csőbe pipettázva is jelentős növekedést tapasztalunk a pufferes

kísérlethez hasonlóan, ez az effektus azonban már csak fele-negyede a teljes vérben tapasztalt növekedésnek.

Ezen eredmények alapján egyértelműen elvetjük a vizsgálni kívánt vérek EDTA tartalmú csőbe történő levételét, hiszen ezzel egy nagyon jelentős, térfogattól és időtől függő bizonytalan hibát viszünk be, amely félrevezethet minket. Ezzel szemben támogatjuk Li-heparinos vagy szérum mintavételi csövek használatát, ezek ugyanis nem befolyásolják az eredményt.

Végül demonstrálni szeretnénk volna a már említett disszonanciát a különböző módszerek eredményei között, amihez ugyanazon vérmintát készítettük elő 4 különböző protokollt használva. A 3 irodalmi és egy saját protokoll a vártaknak megfelelően 4 különböző eredményt hozott, ami a munka során feltárt paraméterfüggés következtében immár könnyen értelmezhető. Ezen eredmények is alátámasztják, hogy a területen szükség van standardizált módszer bevezetésére.

III.2. A fejlesztett módszer megbízhatóságát és használhatóságát gyakorlatban is validáltuk egészséges és beteg vérmintákon, valamint vizsgáltuk homocisztinuriás betegek vérében a szulfid-szint változását.

III.2.1. Bemutattuk, hogy a módszer hosszútávon reprodukálható eredményt hoz és a mintatárolás nem okoz mérhető különbséget a szulfid szintben.

Az előző tézispont tapasztalatait figyelembe véve és szigorúan kontrollálva a mérési paramétereket, megmutattuk, hogy ugyanazon mintákból hosszabb távon is képesek vagyunk reprodukálni korábbi mérési eredményeinket. Az elért 5% alatti szórás napi mérések között jelentős javulás a korábbi több mint 50%-os eredményhez képest és fele akkora, mint az irodalomban közölt legújabb tömegspektrometriát is alkalmazó módszeré. A mérés másik fontos eredménye, hogy a minták fagyasztva tárolásáról is biztosít minket, hiszen nem láttunk bomlást egy hónap alatt. Ennek előnye pedig, hogy ritka betegségek is könnyebben vizsgálhatók, a mintagyűjtés ideje ugyanis lehet hosszú, míg a mérés egyetlen alkalommal letudható garantálva a minimális mérési hibát. Másfelől lehetővé teszi olyan együttműködések kivitelezését is, melynél a mintavétel és a mérés helye között fagyasztott szállításra van szükség.

Továbbá fontos kérdés az is, hogy a fagyasztott és frissen levett vérminták között mérhetünk-e különbséget, azaz a fagyasztás befolyásolja-e a mért szulfid szintet. Szerencsénkre ugyanazon szérum és plazma mintákból

A hidrogén-szulfid jelátviteli molekula detektálása fiziológiai rendszerekben

ugyanolyan eredményeket produkáltunk fagyasztás előtt és kiolvasztás után is, ez pedig azért fontos, mert így biztosíthatjuk, hogy minél valósabb képet kapjunk a vér *in vivo* koncentrációviszonyairól.

III.2.2. ETHE1 enzim defektus okozta enkefalopátiás betegek véréből jelentősen emelkedett szulfidszintet mérve validáltuk a módszer klinikai alkalmazhatóságát

A módszer klinikai validálásához etilmalonsav enkefalopátiás betegektől származó vérplazmákat használtunk, amelyeket egy cseh partnernek köszönhetően kaptunk. A betegség hátterében az ETHE1 protein kóros módosulása áll, amin keresztül a kén-hidrogén katabolizmus jelentősen sérül. Ennek következtében többek között a vérben jelentősen nő a szulfid-szint, amelyet sikerült is igazolnunk egészséges kontrollokkal szemben.

III.2.3. ATB-346 gyulladás- és fájdalomcsillapító szer fázis 2 vizsgálatán belül igazoltuk a molekula hidrogén-szulfid donor tulajdonságát

Egy másik együttműködés során lehetőségünk nyílt bekapcsolódni egy nem szteroid gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító gyógyszer fázis 2 vizsgálatába is. Az ATB-346 egy naproxen-származék, melyet elláttak egy szulfid-donor csoporttal, fejlesztését az Antibe Therapeutics Inc. végzi. A gyógyszer hatását már korábban sikeresen igazolták, ezen fázisában pedig naproxennel szemben vizsgálták a mellékhatásokat, amik leggyakrabban gyomor- és bélnyálkahártya fekélyt és vérzést jelentenek. A vizsgálat során megállapították, hogy kisebb dózis mellett az ATB-346 nem csak jobb fájdalomcsillapító hatással bírt, mint a naproxen, hanem a kialakul fekélyek száma és mérete is jelentősen csökkent.

Ezek mellett szulfid-donor tulajdonságát is kívánták vizsgálni, ehhez pedig ATB-346-tal kezelt betegek és a naproxent kapó kontrollcsoport plazmájában határoztuk meg a H₂S koncentrációját a 14 napos mellékhatás vizsgálat 7. napján levett vérekből. Az ATB-346 kezelt csoport véreiből 50%-kal nagyobb mért szulfid-szinttel bizonyítottuk a gyógyszermolekula szulfid-donor tulajdonságát a kontrollcsoportéhoz képest mért szignifikáns különbséggel.

III.2.4. Homocisztinuriás betegek vérért vizsgálva kerestünk összefüggés a hidrogén-szulfid koncentráció és az egyes enzimatikus defektusok között

Külföldi együttműködőtől kapott, transzszulfurizációs folyamatokat érintő ritka betegek plazma mintáiban is vizsgáltuk a hidrogén-szulfid

koncentrációját. A különböző enzimdefektusok miatt homocisztinuriában szenvedő betegek véreit egészséges, valamint fenilketonuriás (PKU), tehát a homocisztinuriához hasonló szigorú diétát követő betegek véreivel hasonlítottuk össze. Homocisztinuriás betegek szervezetében több módon is lehetőség van a homocisztein vérbeli felhalmozódására a különböző metabolikus útvonalak sérülésével, ám klasszikusan ez a cisztationin- β -szintáz (CBS) enzim elégtelen működése miatt lép fel. Ekkor akár az enzim inaktivitása, akár a kofaktorok hiánya miatt a transzszulfurációs útvonal gátolva van, így a homocisztein és ennek következményeként a metionin a vérben felhalmozódhat súlyos idegrendszeri problémákat okozva. Ezzel szemben a remetilációs útvonal sérülése esetén a metionin termelés csökkenése mellett nő meg a homocisztein vérbeli koncentrációja, hiszen így csak a transzszulfurációs útvonalon keresztül tud a homocisztein eltávozni.

Kén-hidrogén termelésére több útvonalon is lehetőség van, azonban ezek jelentős része transzszulfuráción keresztül, a CBS enzim jelentős részvételével zajlik. Ebből következően valószínűsíthető, hogy a fent említett enzimdefektusok hatása megjelenhet a vérbeli szulfid szintben is. Remetilációs probléma esetén a megnövekedett homocisztein szint kedvez a transzszulfurációnak, így nagyobb H_2S koncentrációt várunk. CBS defektus esetén ellenkező hatást várunk, hiszen egy kulcsfontosságú H_2S termelő enzim kieséséről van szó.

A cisztationin- β -szintáz defektussal (CBSD) rendelkező betegek nem mutattak különbséget, azonban a remetilációs defektusban (RMD) szenvedők esetén kismértékű, de szignifikáns csökkenés volt tapasztalható kontrollokhoz képest.

Az eredmények megcáfolták a felállított hipotézisünket, azonban korábbi vizsgálatok során sem sikerült összefüggést találnunk vérben a hidrogén-szulfid termelésért részben felelős CBS enzim aktivitása és a vérben mért szulfid-szint között. Ez egy részről magyarázható azzal az állítással, miszerint a H_2S termelő enzimek aránya szervenként jelentősen változhat, így az agyban kiemelt fontosságú CBS vérben nem feltétlenül a legjelentősebb szulfidtermelő enzim, hanem például a CSE. Erre előzetes mérések is utalnak, ugyanis egy CSE deficiens páciens véréből szignifikánsan alacsony szulfid-szintet mértünk, amit a katabolizmus oxidált termékei (tioszulfát, szulfít) is megerősítettek.

IV. Az eredmények lehetséges alkalmazásai

Az itt bemutatott munka elsődleges eredménye egy olyan módszer kifejlesztése, mellyel érzékenyen, pontosan és megbízhatóan tudunk vérmintákból hidrogén-szulfid szintet meghatározni. A jelenlegi irodalomban található különböző módszerek eredményeinek összehasonlítása a bemutatott mérések alapján nem lehetséges, azonban egy jól validált standard módszer bevezetésével ez a probléma idővel feloldható. A módszert ugyanakkor kifejezetten egyszerűen kivitelezhetőre terveztük, így a legtöbb, HPLC készülékkel rendelkező laboratóriumban könnyen elérhetővé válik vérmintákból hidrogén-szulfid szint mérése, nincs szükség hipoxiás kamrára, extrakcióra, tömegspektrometriára. speciális mintavételre és azonnali feldolgozásra.

Az új módszer a megnövelt pontosságnak köszönhetően a kutatásban is lehetőséget nyújt olyan új eredmények feltárására, ahol eddig a nagyobb szórás vagy az összehasonlíthatóság hiánya miatt nem volt lehetőség. A módszer nagyobb pontossága így már kimutathat kicsi, de jelentős változásokat is, amelyek új biológiai funkcióit tárhatják fel a hidrogén-szulfidnak.

Jelenleg sem a módszernek, sem a hidrogén-szulfid vérből mérésének nincs semmilyen klinikai, diagnosztikai alkalmazása, aminek a hátterében a módszer kiforratlansága áll. A jövőben azonban fennáll a lehetőség, hogy a terület fejlődésével egyes rendellenességekhez a szulfid-szint vérbeli megváltozása nyújthat indikációt. Mivel a módszer egyszerű, olcsó és gyorsan kivitelezhető, az esetleg körülményesebb diagnosztikai eljárások mellett vagy előszűrésként kiválóan alkalmazható.

V. 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. 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 az oka vérben lévő kötött szulfid-tartalékokból való lassú, dinamikus egyensúlyon keresztül történő, alkilálás hatására bekövetkező hidrogén-szulfid felszabadulása.

A paraméter-függések vizsgálatának eredményeire alapozva egy olyan módszert állítottunk össze és validáltunk, amellyel megbízható, reprodukálható eredményeket kaphatunk vérminták analízise során, valamint biztosíthatjuk összehasonlíthatóságukat.

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.

A klinikai alkalmazhatóság validálásához több betegmintát is rendelkezésünkre bocsátottak együttműködő partnereink. Ezek közül a legfontosabbak az etilmalonsav enkefalopátiás betegek plazmái voltak, amelyeknél 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 kezelt betegek vérében a mérhető hidrogén-szulfid szint kis mértékben, ám szignifikánsan megnőtt, igazolva módszerünk és egyben a hatóanyag alkalmazását is.

A 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 vérbeli kén-hidrogén koncentrációban. Ennek vélhető 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.

VI. Tudományos publikációk



**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: Ditrói 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., **Ditrói, 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. **Ditrói, 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., **Ditrói, 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





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. Czokora, 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., Honzik, 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., Kubovciak, J., Liška, F., Malinská, 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





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., Czékora, Á., Balog, N., Silwal-Pandit, L., Ida, T., Olasz, J., Hajdu, D., Mátrai, Z., Csuka, O., Uchida, K., Tóvári, J., Engebraten, O., Akaïke, 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.**, Bátaï, 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., Fábíán, 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





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., Györi, 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 π -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., **Ditrői, 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.

