

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Az OGG1 enzim szerepének vizsgálata az akut hasnyálmirigy-gyulladásban

Hajnády Zoltán

Témavezető: Prof. Dr. Virág László



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

Tartalomjegyzék

I. Rövidítésjegyzék.....	3
II. Előszó.....	6
III. Bevezetés.....	8
IV. Irodalmi áttekintés.....	9
IV.1 A pankreasz felépítése és működése	9
IV.2 Az AP klasszifikációja és etiológiája.....	10
IV.3 Az alkohol és az epeútbetegségek jelentősége az AP patomechanizmusában....	11
IV.4 Az AP diagnosztikája és kezelése	13
IV.5 Az AP molekuláris patomechanizmusai.....	14
IV.5.1 A proenzimek korai aktiválódása	14
IV.5.2 A Ca^{2+} szerepe az AP-ben	15
IV.5.3 A kolecisztokinin hatása az acinus sejtekre	17
IV.5.4 A protein kináz C (PKC) útvonala	18
IV.5.5 A heveny hasnyálmirigy-gyulladásban kulcsszerepet játszó citokinek	19
IV.5.6 A kemokinek szerepe az AP-ben.....	21
IV.5.7 Az oxidatív stressz szerepe az AP-ben	22
IV.6 A poli-ADP-ribóz polimeráz szerepe az AP-ben	25
IV.7 A 8-oxoguanin DNS glikoziláz-1 bemutatása.....	27
IV.7.1 Az OGG1 szabályozása és szerepe a hibajavításban	27
IV.7.2 Az OGG1 szerepe a transzkripcióban.....	28
IV.7.3 Az OGG1 „kiütésének”/gátlásának vizsgálata különböző oxidatív stressz és gyulladásos modellekben.....	31
V. Célkitűzések	33
VI. Anyagok és módszerek	34
VI.1 Akut pankreatitisz állatmodellje	36
VI.2 Szérum α -amiláz és lipáz mérés	36
VI.3 Mieloperoxidáz (MPO) mérés	37
VI.4 Hisztológiai vizsgálatok	37
VI.5 Immunhisztokémiai vizsgálatok	38
VI.6 Immunfluoreszcens festés	38
VI.7 Citokinek mérése	39
VI.8 RNS izolálás, reverz transzkripció és valós idejű kvantitatív PCR.....	39
VI.9 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)	40
VI.10 Primer acinus sejtek izolálása és kezelése	41

VI.11 Életképesség vizsgálat	42
VI.12 Nekrózis meghatározása LDH esszével	42
VI.13 Nekrózis meghatározása Sytox Green festéssel	42
VI.14 Apoptózis kimutatása kaspáz-aktiváció meghatározásával	43
VI.15 Comet esszé	43
VI.16 PARP-1 enzim szerepének vizsgálata <i>in vivo</i> : egérkísérletek.....	44
VI.17 PARP-1 enzim szerepének vizsgálata <i>in vitro</i> : sejtleletképességi vizsgálatok primer acinus sejteken	44
VI.18 Statisztikai analízis	44
VII. Eredmények	45
VII.1 Az OGG1 szerepének vizsgálata <i>in vivo</i> AP modellben	45
VII.1.1 Az OGG1 gátlásának hatása az acinus sejtek károsodására és a granulociták infiltrációjára.....	45
VII.1.2 Az OGG1 gátlás hatásának tanulmányozása szövettani vizsgálatokban...46	
VII.1.2.1 Általános szövetmorfológia vizsgálata (H&E festés)	46
VII.1.2.2 Oxidatív DNS károsodás vizsgálata 8-oxoG immunfluoreszcens festéssel.....	47
VII.1.2.3 PARP aktiváció kimutatása immunfluoreszcens festéssel	49
VII.1.2.4 Apoptózis vizsgálata az AP-ben.....	50
VII.1.3 A citokinek és kemokinek vizsgálata az AP-ben	51
VII.1.4 A TH5487 hatásmechanizmusának vizsgálata	54
VII.2 Az OGG1 szerepének tanulmányozása az AP <i>in vitro</i> modelljében.....	56
VII.2.1 A TH5487 hatása a ceruleinnel kezelt acinus sejtek életképességére és a sejtpusztulásra	56
VII.2.2 Az OGG1 gátlás hatása a DNS szálak törésére	57
VII.3 A PARP-1 szerepének vizsgálata <i>in vivo</i> és <i>in vitro</i> cerulein modellben	59
VIII. Diskusszió.....	61
IX. Összefoglalás.....	68
X. Summary	69
XI. Irodalomjegyzék.....	70
XII. Tárgyszavak/Key words.....	87
XIII. Köszönetnyilvánítás	88
XIV. Publikációs lista	89
XV. Függelék.....	91

I. Rövidítésjegyzék

Dolgozatomban igyekeztem átvenni a tudományban már meghonosodott magyar nyelvi szakkifejezéseket. Ott, ahol nem sikerült megfelelő fordítást találni, a hagyományos görög-latin szaknyelvet, illetve az angol terminusokat használtam.

8-oxoG: 8-oxo-7,8-dihidroguanin

ACh: acetilkolin

ADP: adenzin-difoszfát

ADPR: ADP-ribóz

AIF: apoptózis indukáló faktor

AP: akut pankreatitisz

APE1: apurinikus/apirimidinikus endonukleáz

ATP: adenzin-trifoszfát

BER: bázis kivágó mechanizmus (*base excision repair*)

cADPR: ciklikus ADP-ribóz

CCK: kolekisztokinin

CCL: kemokin C-C motívum ligand

CCKR: CCK receptor

CFTR: tisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor

DAG: diacilglicerol

DAMP: károsodás-asszociált molekuláris minták (*damage-associated molecular pattern*)

DNA-PKcs: DNS-dependens protein kináz katalitikus alegység (*DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*)

DNS: dezoxiribonukleinsav

EMSA: electrophoretic mobility shift assay

ER: endoplazmás retikulum

ERCP: endoszkópos retrográd cholangiopancreatográfia

FADH₂: flavin-adenin-dinukleotid

FRAP: fluorescence recovery after photobleaching

FBS: főtális szarvasmarha szérum (*fetal bovine serum*)

GFP: zöld fluoreszcens protein (*green fluorescent protein*)

GSH: glutation

GPx: glutation-peroxidáz

H&E: hematoxin-eozin

HCO₃⁻: bikarbonát

HMGB1: high mobility group box 1

ICAM-1: intracelluláris adhézión molekula-1

ICE: IL-1 β -konvertáló enzim

IL: interleukin

IL-1-RA: interleukin-1-receptor antagonista

IL-6R: membrán-kötött IL-6 receptor

IKK: I κ B kináz

IP₃: inozitol-1,4,5-triszfoszfát

IP₃R: inozitol-1,4,5-triszfoszfát receptor

LFA-1: limfocita funkció-asszociált antigén-1

LPS: lipopoliszacharid

KO: knockout

MBP: metil-CpG kötő fehérje

MCP-1: monocita kemoattraktáns fehérje-1

MDA: malondialdehyd

MEF: egér embrió fibroblaszt (*mouse embryonic fibroblast*)

MIP: makrofág gyulladáshos protein

MPO: mieloperoxidáz

MPTP: mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus

NAADP: nikotinsav-adenin-dinukleotid-foszfát

NAD: nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADP: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NF- κ B: nukleáris faktor- κ B

NHEJ: nem homológ végcsatlakozás (*non-homologous end joining*)

OGG1: 8-oxoguanin glikoziláz-1

PARG: poli-(ADP-ribóz) glikohidroláz

PARiláció: poli-ADP-riboziláció

PARP: poli-(ADP-ribóz) polimeráz

PBS: foszfáttal pufferelt sóoldat (*phosphate-buffered saline*)

PI: propídium-jodid

PI3K: foszfatidil-inozitol-3-kináz

PIP₂: foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát

PLC: foszfolipáz C

PMCA: plazmamembrán Ca^{2+} -ATPáz

RIP: receptor interakciós fehérje

RyR: rianodin receptor

ROS: reaktív oxigén gyökök (*reactive oxygen species*)

SERCA: szarkoplazma-/endoplazmaretikulum Ca^{2+} -ATP-áz

sIL-6R: szolubilis IL-6 receptor

SOC: raktárártól függő Ca^{2+} csatornák (*store operated Ca^{2+} channels*)

SOD: szuperoxid-diszmutáz

TBS: Tris-sel pufferelt sóoldat (*Tris-buffered saline*)

TNF: tumor nekrozis faktor

TNFR: tumor nekrozis faktor receptor

TRADD: TNFR1 asszociált halál domén

TRAF2: TNF-receptor asszociált faktor 2

XRCC1: X-ray repair cross-complementing protein 1

II. Előszó

Mérni, ami mérhető, és ami nem az, azt azzá kell tenni.

Galileo Galilei

Egyedül azok a tények léteznek, amelyek mérhetők.

Max Planck



Bohus Zoltán: *Sejt* – szabadtéri üvegplasztika (1978)

Egy PhD hallgató életében meghatározó, hogy hol kezdi a munkáját. 2016-ban 4 hónapos szakmai gyakorlatomat a Bécsi Műszaki Egyetem molekuláris biológiai laboratóriumában töltöttem. 2017-ben második 4 hónapos szakmai gyakorlatomat a Cambridge-i Babraham Institute-ban folytattam. Örömmre szolgál, hogy a Nature Communications folyóiratban közölt tanulmány társszerzői között szerepelhettem. 2018 és 2022 között a Debreceni Orvostudományi Egyetem Vegytani Intézetének nappali tagozatos PhD hallgatója voltam. Kutatómunkám mellett oktatói feladatokat is végeztem: az „Orvosi kémia” c. laborgyakorlatot 4 féléven keresztül tartottam magyar és angol nyelven. Részt vettem két külföldi konferencián, amelyeken az eredményeimet poszter formájában prezentáltam.

Az értekezésem mottójaként választott két idézet közötti kapcsolat jól érzékelteti, hogy a természettudományok kutatási módszerei a több mint 400 év alatt lényegében nem változtak. Galilei előtt a természetkutatás többnyire föltevésekre épült. A modern tudomány tapasztalatból indul ki, kísérleteken alapszik. A tudományos kutatásban két szakaszt különböztethetünk meg: a tények megállapítása (kísérlet) és a következtetések levonása (elmélet).

A tudományos közleményekkel szemben támasztott alapvető követelmény, hogy a bennük szereplő kísérletek újra végrehajtva, ugyanazt az eredményt adják. Ennek érdekében ellenőrző kísérlet nélkül egyetlen eredményt sem értékeltem. Minden esetben dokumentáltam, miként jutottam a kapott eredményhez. A kísérletek adatait és a belőlük levont következtetéseket grafikonokkal és folyamatábrákkal modelláltam.

Miért választottam kutatási témám alapjául az akut hasnyálmirigy-gyulladást? Részint azért, mert a családomban hasnyálmirigy-gyulladással összefüggő haláleset is történt. Másrészt amiatt, hogy lehetőségem nyílt 2018-ban Debreceni Orvostudományi Egyetem Vegytani Intézetének nappali tagozatos PhD hallgatójaként az akut hasnyálmirigy-gyulladás csökkentését célzó farmakológiai ágensek kutatásába bekapcsolódni.

A hasnyálmirigy-gyulladásról és kezeléséről sajnos keveset tudunk. Nagy fordulatot az interdiszciplináris kutatások hozhatnak, amelyek nem elszigetelten vizsgálják a jelenségeket. A tudományterületek közötti átjárhatóság gondolata veszi át fokozatosan az uralmat a fizika, kémia, biológia, mint önálló tudományágak fölött. Mindez reményt ad arra, hogy a közeljövőben a molekuláris biológiai kutatások áttörést fognak elérni ezen a területen is.

III. Bevezetés

Az akut pankreatitisz (AP) az egyik leggyakoribb életet veszélyeztető gasztrointesztinális kórkép. Az AP a hasnyálmirigy heveny gyulladásos megbetegedése, melynek mértéke a fokális ödémától a parenchyma nekrozisáig terjedhet, amelyet diffúz vérzés, kiterjedt szövetpusztulás és többszervi elégtelenség kísér a betegség súlyos formájában. Incidenciája emelkedő tendenciát mutat az elhízás okozta epekövességnek és a növekvő alkoholfogyasztásnak köszönhetően. Jóllehet az utóbbi években növekedett a hasnyálmirigy-gyulladás megelőzésére és kezelésére irányuló kutatások száma, a betegség mögött álló molekuláris mechanizmusok megértésének hiánya nehezíti a megfelelő terápiák kidolgozását [1].

Az AP kialakulásában fontos szerepe van a redox egyensúly felborulásának; a reaktív oxigén gyökök (ROS) felszabadulását már a pankreatitisz korai szakaszában kimutatták. A ROS károsítja az acinus sejtek lipidmembránjait, a fehérjéket és a DNS-t [2]. A ROS által okozott leggyakoribb DNS lézió a 8-oxo-7,8-dihidroguanin (8-oxoG), amit a 8-oxoguanin DNS glikoziláz-1 (OGG1) ismer fel, és hasít ki a bázis kivágó mechanizmus (BER) első lépésében. Az így létrejött abázikus helyen az AP endonukleáz 1 (APE1) hasítja a foszfodiészter gerincet, melynek következtében egy törés keletkezik a DNS szálon [3]. A DNS-ben keletkező hasadások, „nickek” felelősek a poli-(ADP-ribóz) polimeráz-1 (PARP-1) enzim aktivációjáért. A PARP-1 a hibajavításban résztvevő enzimekkel való interakciója révén segíti a DNS törés kijavítását és a sejtek túlélését. Intenzív oxidatív stresszállapotban a két enzim szerepe megváltozik, a PARP-1 hiperaktiválódik és részben a nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD^+) metabolitnak az elfogyasztásán keresztül az ATP deplécióját és a sejt pusztulását okozza [4]. Ezzel szemben az OGG1 elveszíti az enzimaktivitását, viszont inaktivált formája fontos szerepet játszik a proinflammatorikus gének transzkripciójában [3].

Kutatásom során az OGG1 és PARP-1 enzimeknek az AP-ben betöltött szerepét vizsgáltam. A betegség mögött meghúzódó patomechanizmus jobb megismerésével lehetőség nyílik további terápiák kifejlesztésére, amelyek segítségével csökkenthető az elhalálozások aránya.

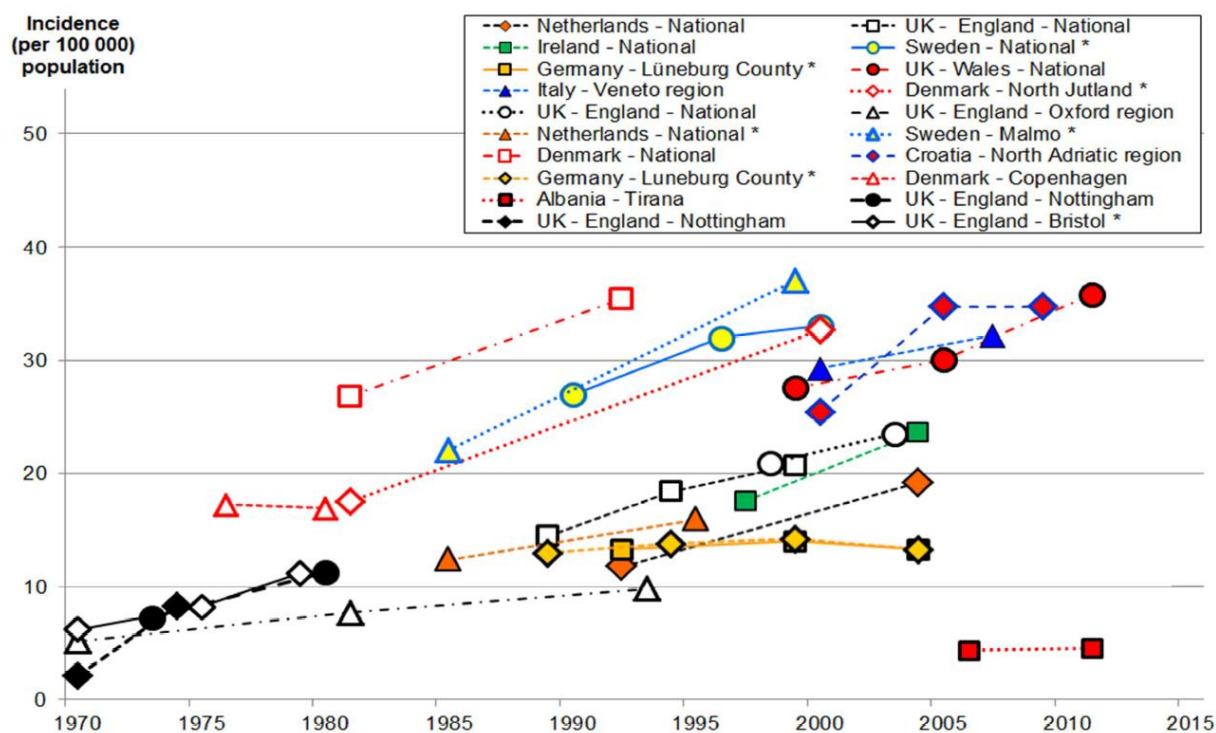
IV. Irodalmi áttekintés

IV.1 A pankreasz felépítése és működése

A pankreasz a görög *pan* (minden, teljes) és a *kreas* (hús) szavakból ered. Három részre tagolható mirigy, amelynek fejrésze a gyomor mögött, a patkóbél C alakú görbületén fekszik, teste keresztezi az emberi test középvonalát, farokrésze a lép hilusáig terjed. A mirigy kettős funkciójáért két strukturálisan különböző komponens felel. Az exokrin mirigyet az emésztéshez nélkülözhetetlen enzimeket szintetizáló acinusok és a szekrétumot a duodenumba szállító ductuszok hálózata képezi [5]. Az emésztőenzimek többsége inaktív proenzim formában szintetizálódik, és membránnal határolt zimogén szemcsékben tárolódik az acinus sejtek apikális régiójában, melyet a szekréción részt vevő aktin filamentumok hálózhatnak be [6]. Az acinus sejtek az apikális pólusaiknál szoros junkciókkal kapcsolódnak egymáshoz egy izolált lument alkotva, amelybe a zimogén granulomok ürülnek exocitózissal. A sejt bazális részén helyezkedik el a sejtmag és a terjedelmes durva felszínű endoplazmatikus retikulum, a basolaterális membránon találhatóak a szekréció kiváltásáért felelős hormonok receptorai. Az exokrin pankreasz szabályozásában a duodenum enteroendokrin sejtjei által termelt hormonok, a kolekisztokinin (CCK) és a szekretin vesznek részt [5] [7]. A CCK egy peptidhormon, ami a proenzimek szekréciónját váltja ki, míg a szekretin a ductusz sejtek által termelt nátriumban és bikarbonátban (HCO_3^-) bőséges folyadék elválasztását serkenti. A magas bikarbonát tartalmú szekréció szerepe a gyomorból érkező savas chymus semlegesítése. A két hormon együttes hatására emésztőenzimeket tartalmazó alkalikus folyadék szekretálódik a fő pankreaszvezetéken keresztül a patkóbélbe. Ezt követően történik az emésztőenzimek aktiválódása. Az enterokinázok proteolitikus hasítása révén a tripszinogén tripszinné alakul, amely ezt követően katalizálja a többi proenzim aktiválódását [8]. Az endokrin komponenst a kb. 1 millió sejtől álló Langerhans-szigetek alkotják, amelyek a hasnyálmirigy kb. 1-2 %-át teszik ki. Ezek a sejtek termelik többek között a vér glükóz szintjének szabályozásához szükséges inzulin- és glükagonhormont, valamint a szomatosztatint, aminek gátló hatása van az előbb említett két hormon szekréciónjára [9].

IV.2 Az AP klasszifikációja és etiológiája

Az AP az egyik leggyakoribb emésztőszervi kórkép, melynek gyakorisága világviszonylatban növekvő tendenciát mutat. Egy 2016-os tanulmány szerint az AP incidenciája globálisan évente 33,74 eset/100.000 fő, a halálozási ráta pedig 1,6 haláloset/100.000 fő [10]. Magyarországon évente kb. 20-50 esetet regisztrálnak 100.000 lakosra vonatkoztatva [11].



1. ábra: Az AP előfordulási gyakoriságának változása számos európai országban 1970 és 2015 között (Forrás: Stephen E. Roberts és mtsai., 2017).

Az 1992-es Atlantai klasszifikáció alapján a betegség enyhe és súlyos formáját különítették el, melyet 2012-ben újradefiniáltak. A módosított Atlantai klasszifikáció alapján már az AP három súlyossági fokozatát különböztetjük meg. Az esetek túlnyomó része enyhe lefolyású, nincs szervi elégtelenség és nem igényel hosszú távú kezelést, a tünetek 3-7 nap alatt megszűnnek. A közepesen súlyos pankreatitisz jellemzője az átmeneti (< 48 óra) egy- vagy többszervi elégtelenség és a helyi vagy szisztémás szövődmények kialakulása. Az akut gyulladással együttjáró leggyakoribb helyi szövődmény az intersticiális ödémás pankreatitisz és a nekrotizáló pankreatitisz. Előbbi a folyadék felgyülemelését, utóbbi a sejtek nekrozisát jelenti a pankreasban és a peripankreatikus szövetekben. Súlyos lefolyású hasnyálmirigy-gyulladás esetén a beteg életét veszélyeztető nekrotizáló pankreatitisz alakulhat ki, melyet

pankreatikus és peripankreatikus felülfertőződés és tartós (> 48 óra) többszervi elégtelenség kíséri, a mortalitás aránya eléri a 30%-ot [12] [13].

Súlyosság foka	Atlantai klasszifikáció (1992)	Módosított Atlantai klasszifikáció (2012)
Enyhe	Nincs szervi elégtelenség és lokális szövődmény	Nincs szervi elégtelenség, lokális vagy szisztémás szövődmény
Középsúlyos	-	Tranziens szervi elégtelenség (48 órán belül megszűnik) és/vagy lokális vagy szisztémás szövődmény perzisztáló szervi elégtelenség nélkül
Súlyos	Lokális szövődmény és/vagy szervi elégtelenség: szisztolés vérnyomás ≤ 60 Hgmm, vagy légzési elégtelenség ($\text{PaO}_2 \leq 60\%$), vagy szérum kreatinin $\geq 156,2$ $\mu\text{mol/l}$, vagy gasztrointesztinális vérzés (> 500 mL/24 óra)	Perzisztáló egyszervi vagy többszervi elégtelenség (48 órán túl perzisztál)

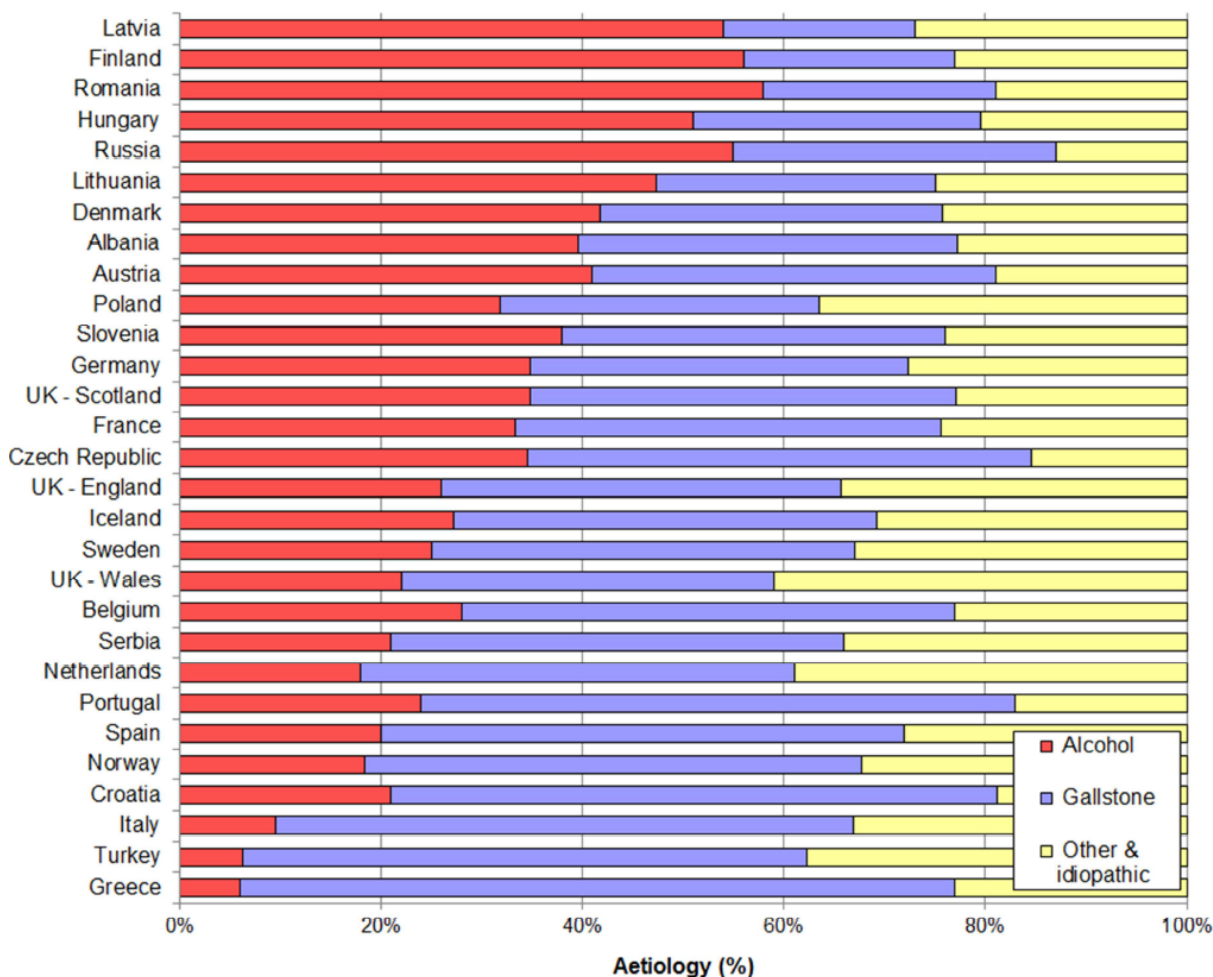
1. táblázat: Az 1992-es és a módosított Atlantai klasszifikáció összehasonlítása (Forrás: Paul G. Lankisch és mtsai., 2015).

A gyulladás az esetek 80%-ában epeútbetegségek vagy alkoholizmus következtében alakul ki, de okozhatja még hipertrigliceridémia, tompa hasi trauma, műtéti sérülés, vírusfertőzés (pl. mumpsz), gyógyszerhatás, utóbbiak előfordulása azonban ritkább [14] [15]. Az AP kialakulásában örökletes genetikai tényezők is közrejátszhatnak, ilyen a tripszinogén kódoló *PRSS1* gén mutációja, mely a tripszinogén hasításához és a tripszin hiperaktivációjához vezet a pankreaszban [16]. Az esetek 10-30%-ában idiopátiás AP-t diagnosztizálnak, mivel nem lehet azonosítani a kiváltó okot [17].

IV.3 Az alkohol és az epeútbetegségek jelentősége az AP patomechanizmusában

A Swansea-i Egyetem 2017-ben készített metaanalízis alapján Magyarországon a betegség leggyakoribb etiológiai tényezője a túlzott mértékű alkoholfogyasztás (2. ábra) [18]. Az alkohol fokozza a pankreasz exokrin működését, melynek hatására az enzimgazdag szekrétrum besűrűsödik, és fehérjedugók keletkeznek, melyek a ductuszok elzáródásához és az emésztőenzimek hasnyálmirigy-állományban történő aktivációjához vezethetnek [19]. Az alkohol nem-oxidatív lebontása során keletkező zsírsav-etil-észterek az inozitol-1,4,5-triszfoszfát receptorhoz (IP_3R) kapcsolódva szabadítanak fel kalciumionokat az endoplazmás retikulumból, ami patológiás Ca^{2+} növekedést okoz a citoszolban [20]. További hatásuk, hogy csökkentik a lizoszómák és zimogén szemcsék membránjának integritását. A zsírsav-etil-észterek hidrolízise során keletkező szabad zsírsavak károsítják a mitokondriumot, mely ATP

deplációhoz és a sejt pusztulásához vezet. Az alkohol oxidatív metabolizmusa során reaktív oxigén gyökök keletkeznek, melyek roncsolják a lipid membránokat, a fehérjéket és a DNS-t [21]. A Rostocki Egyetem kutatói írták le, hogy az alkohol hatással volt az acinus sejtek apikális citoszkeletonjának organizációjára, amely zavart okozott az emésztőenzimek exocitózisában és a zimogének sejten belüli akkumulációjához vezetett [22]. Továbbá az alkohol és a zsírsavak csökkentették a cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR) expresszióját, ami gátolta a fluid és HCO_3^- szekréciót a ductusz sejtekben [23].



2. ábra: Az AP két leggyakoribb és egyéb etiológiai tényezőinek megoszlása az európai országokban. Magyarországon a hasnyálmirigy-gyulladás 50%-ának hátterében az alkoholfogyasztás áll. Európában hazánkat csak Lettország, Finnország, Románia és Oroszország előzi meg (Forrás: Stephen E. Roberts és mtsai., 2017).

A másik leggyakoribb kiváltó tényező a pankreaszvezeték epekő okozta elzáródása, ami az epe ductuszba való visszafolyását eredményezi. Ez intraduktális nyomásnövekedéshez és az enzimgazdag intersticiális folyadék felhalmozódásához vezet a mirigyben. Az aktív formában termelődő lipáz elkezdi a zsírsejteket bontani, ami lokális zsírnekrózis, gyulladás és ödéma

kialakulásához vezet [19]. Az epesavak az IP₃R és rianodin receptoron (RyR) keresztül, dózisfüggő módon növelik az intracelluláris Ca²⁺ koncentrációt az acinus sejtekben. Továbbá gátolják a szarko-/endoplazmatikus retikulum Ca²⁺-ATPáz (SERCA) pumpát, ezáltal akadályozva az ER kalcium raktárának újratöltődését, ami a kalcium homeosztázis felborulását okozza [23] [24] [25].

IV.4 Az AP diagnosztikája és kezelése

Az AP diagnosztikája klinikai tüneteken, laboratóriumi és képalkotói vizsgálatokon alapszik. A gyulladás vezető tünete a heveny epigasztriális fájdalom, további tünetek lehetnek a hányás és hányinger [26]. Korai súlyos pankreatitiszben megjelenhet láz, tachycardia és a szervi elégtelenség következtében kialakuló légzési elégtelenség [27] [28]. Az icterus (sárgaság) megjelenése biliáris okokból kialakuló pankreatitist jelez [29]. A haemorrhagiás nekrosis barnás-zöldes elszíneződést okozhat a has két oldalán lévő lumbalis régióban (Turner-jel) vagy a köldök körül (Cullen-jel). Ezek azonban ritka jelenségek: Waller és mtsai. 2018-ban készült tanulmánya szerint az AP-vel diagnosztizált betegek 0,96%-ában volt észlelhető a Turner-jel, és csupán 0,77%-ukban a Cullen-jel [30] [31].

Az AP laboratóriumi eltérései a nekrotizáló acinus sejtekből a szisztémás keringésbe jutó emésztőenzimokkal hozhatóak összefüggésbe. Ezek közül jellegzetes az amiláz szint emelkedése a szérumban, ami az első 24 órában észlelhető. A szérum lipáz értékének szenzitivitása nagyobb, mennyisége a gyulladást követő 3-6. órában növekszik, csúcscértékét 24 órán belül éri el, és megemelkedett szintje két hétig is jelen lehet a szérumban. Az amiláz és lipáz szintje az AP-ben gyakran meghaladja a normál felső határérték háromszorosát [32] [33].

A hasi UH-vizsgálat alkalmas a biliáris eredetű pankreatitisz kimutatására. A gyulladás súlyosságának megítéléséhez a CT vizsgálatok további segítséget nyújtanak, kontrasztanyag használatával a pankreasz nekrosisának kiterjedése is megállapítható [34] [35].

Az AP kezelés lényege a szupportív terápia, a szerv nyugalomba helyezése a *per os* táplálék és folyadékbevitel leállítása révén. Enyhe pankreatitiszben a szájon keresztüli táplálás általában gyorsan helyreállítható, az intravénás folyadékbevitel és a fájdalomcsillapítás elegendő. Középsúlyos és súlyos pankreatitisz esetén a beteg táplálását enterális (naso-jejunalis, naso-gastricus) vagy parenterális módon kell megoldani [36].

A kutatók a pankreasz exokrin működésének csökkentésére irányuló kezeléseket is végeztek klinikai kísérletekben. Ilyen volt a szomatosztatin vagy elhúzódo hatású analógja, az oktreotid intravénás adagolása, amely csökkentette a mortalitás arányát a súlyos lefolyású pankreatitiszben. A hatásmechanizmus alapja az, hogy a szomatosztatin közvetlenül csökkenti

az emésztőenzimek elválasztását, illetve a szekretin és kolecisztokinin gátlásával közvetett módon is gátolja a szekréciót [37] [38].

Klinikai vizsgálatok igazolták, hogy a proteáz gátlók (gabexát-mezilát, aprotinin) alkalmazása szintén sikeresen csökkentette a moderált és súlyos pankreatitisz mortalitásának az arányát. A proteáz inhibitorok gátolják a tripszinogén intracelluláris aktivációját, és ebből kifolyólag a tripszin kaszkádból kiinduló egyéb proenzimek aktiválódását, valamint limitálják a gyulladásos citokinek felszabadulását, ezáltal csökkentve a gyulladásos sejtek aktivációját és szisztémás gyulladásos válasz kialakulását [38] [39].

Súlyos esetekben a nekrotizáló szövet a bélből származó Gram-negatív baktériumokkal fertőződik, mely szepszishez, majd többszervi elégtelenséghez vezethet [19]. A profilaktikus antibiotikumok hatékonysága az AP-ben a mai napig nem tisztázott [40]. Egy 21 klinikai kísérletet átölelő tanulmány kimutatta, hogy az antibiotikum kezelés hatására a mortalitás mértéke nem változott jelentősen, azonban szignifikánsan csökkent a szepszis és a fertőzések kialakulásának aránya [41].

Biliáris pankreatitisz esetén az endoszkópos retrográd cholangiopancreatográfia (ERCP) módszerét alkalmazzák, melynek során az epeutak és a hasnyálmirigy vezeték kontrasztanyagot feltöltésével láthatóvá teszik azok kóros elváltozásait, majd mikrosebészeti eljárással eltávolítják a követ, ezáltal megszüntetik az obstrukciót [42].

IV.5 Az AP molekuláris patomechanizmusai

IV.5.1 A proenzimek korai aktiválódása

Szervezetünkben az exokrin pankreasz acinus sejteiben folyik a legnagyobb mértékű fehérjeszintézis. Az enzimek a durva felszínű endoplazmás retikulumban szintetizálódnak, majd bizonyos modifikációkon (pl. diszulfidkötések, glikolizáció) esnek át azért, hogy megfelelő formában transzportálódjanak a Golgi-apparátusba, mely további poszttranszlációs modifikációk helyszínéül szolgál. Ezt követően történik a fehérjék szortírozása: az emésztőenzimek zimogén granulumban, a lizoszomális hidrolázok a lizoszomákba szállítódnak. Néhány emésztőenzim (amiláz, lipáz, RNáz, DNáz) kivételével az enzimek inaktív (proenzim) formában tárolódnak és a szekréció után a vékonybélben aktiválódnak [8] [43].

Az AP kialakulásának mechanizmusában számos folyamat vesz részt, melyek közül az egyik legjelentősebb a tripszinogén korai, mirigyben végbemenő aktivációja. A pankreaszt érő toxikus hatások (pl. alkohol, trauma, duktális obstrukció) az acinus sejtekben végbemenő

patológiás eseményekhez vezetnek, úgymint a zimogén exocitózis csökkenése, citoskeletális diszfunkció, megnövekedett lizoszomális- és emésztőenzim szintézis, és a zimogének lizoszomális hidrolázokkal való kolokalizációja [44]. A kolokalizáció során egy lizoszomális cisztein proteáz, a katepszin B aktiválja a tripszinogén-tripszin átalakulást, ami további proenzimek aktivációjának kaszkádját indítja el, az acinus sejt károsodásához és a mirigy önemésztődéséhez vezetve [45] [46]. A szövet sérülése során károsodás-asszociált molekuláris minták (DAMP) szabadulnak fel, amelyek steril gyulladásos választ váltanak ki. A DAMP-okat (pl. HMGB1, DNS, hisztionok, ATP) az immunsejtek felszínén található mintafelismerő receptorok ismerik fel; a kötődés a granulociták és monociták aktivációját, valamint gyulladásos jelátviteli útvonalak indukcióját eredményezi [47]. Az aktiválódott leukociták a sérült szövetbe infiltrálódnak, ami összefüggésben áll az endotél sejtek felszínén megnövekedett intracelluláris adhéziós molekula-1 (ICAM-1) AP-ben megfigyelt expressziójával [48]. Az ICAM-1 egy sejt felszíni glikoprotein, mely a leukocitákban megtalálható limfocita funkció-asszociált antigén-1-hez (LFA-1) kötődve segíti az immunsejtek szövetbe való transzmigrációját [49].

IV.5.2 A Ca^{2+} szerepe az AP-ben

Fiziológias körülmények között, az alapállapotban lévő sejtekben a kalciumionok nagy része a sejt organellumaiban tárolódik, a citoplazma szabad Ca^{2+} koncentrációja $10^{-8} - 10^{-7}$ mol/l között mozog [50]. Az acinus sejtekben az acetilkolin (ACh) és a CCK felelős a citoszolikus kalciumszint növekedéséért. A CCK aolecisztokinin receptorhoz (CCKR) kötődik, ami összeköttetésben áll az ADP-ribozil-ciklázsal. Ez az enzim a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfátból (NADP) nikotinsav-adenin-dinukleotid-foszfátot (NAADP), illetve a NAD^{+} -ből ciklikus ADP-ribózt (cADPR) állít elő. Az ACh a muszkarin ACh receptorhoz kötődve képes aktiválni a foszfolipáz C-t (PLC), ami az inozitol-1,4,5-triszfoszfát (IP_3) képződésért felelős. A keletkezett Ca^{2+} mobilizáló „hírvivők” (cADPR, NAADP, IP_3) különböző receptorokon keresztül indukálják a kalciumion felszabadulást [51] [52] [53].

Az acinus sejtekben kettő, az ER membránban elhelyezkedő csatorna felel a Ca^{2+} felszabadulásáért az organellumból: az IP_3R , mely főként a sejt apikális régiójába eső ER membránban helyezkedik el, és az IP_3 bekötődésével okoz Ca^{2+} felszabadulást; illetve a RyR, ami a sejt bazolaterális régiójában található, és a cADPR aktiválja [51] [54]. A NAADP kétféle módon szabadít fel kalciumionokat a sejtorganellumokból: (1) a kétpórusú csatornákon (TPC) keresztül az endo- és lizoszómákból, ami azután triggerként hat a cADPR/ IP_3 jelátviteli útvonalakra, (2) továbbá a RyR-en keresztül az ER-ből [55] [56] [57] [58].

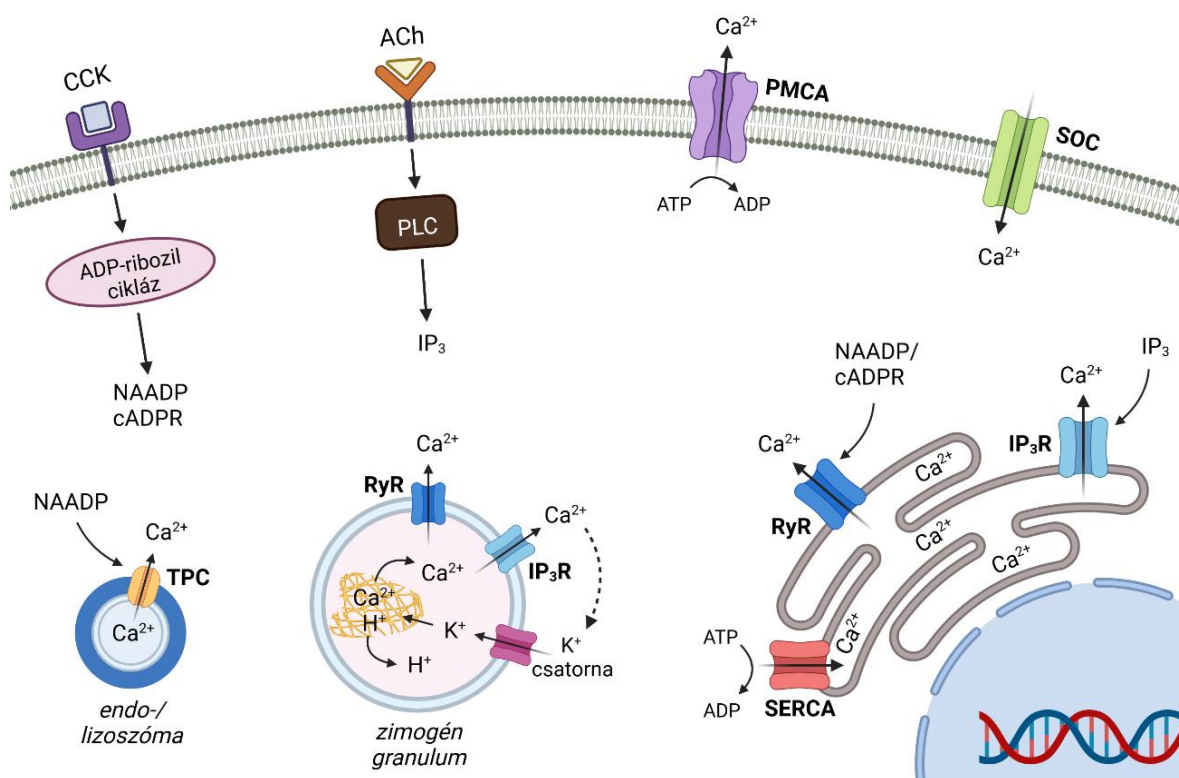
Fiziológiás körülmények között a szekretágók repetitív, tranziens intracelluláris Ca^{2+} szint növekedést indukálnak a sejten, ami a zimogén szemcsék apikális membránon keresztüli exocitóziséhez vezet. A Ca^{2+} sejtorganelumokból való kiáramlásakor kialakuló kalciumjel megszüntetése érdekében a Ca^{2+} egy részét a SERCA veszi vissza az ER belsejébe ATP hasítása közben, másik részét a plazmamembrán Ca^{2+} -ATPáz (PMCA) pumpálja ki a sejtől. Az ER raktárainak újratöltését segítik az extracelluláris térből érkező kalciumionok is, melyek a „store operated” Ca^{2+} csatornák (SOC) kinyílásán keresztül jutnak a sejtbe, majd a SERCA-n keresztül az ER-be [50] [51] [53] [54].

A tartós globális citoszolikus Ca^{2+} szint emelkedése patológiás tényező, intracelluláris enzim aktivációt, vakuolizációt és nekrozist okoz. Raraty és mtsai. igazolták, hogy a szupramaximális koncentrációban (maximális amiláz szekréciót előidéző dózis feletti koncentrációban) alkalmazott CCK aktiválta a PLC-t, ami IP_3 indukált patológiás intracelluláris kalciumion-szint növekedést eredményezett. Ez a tripszinogén aktivációjához vezetett, amit kalciumion kelátor (BAPTA-AM) alkalmazásával sikerült gátolni [59] [60]. Kiderült, hogy a zimogének sejtben belüli aktivációja a RyR-mediált kalciumfelszabaduláshoz is köthető. A RyR gátlásával csökkent a Ca^{2+} szint a basolaterális régióban és ezáltal az emésztőenzimek sejtben belüli aktivációja is gátlódott [61].

Biliáris pankreatitisz esetén az extracelluláris kalciumion-beáramlás is hozzájárul a tartós globális intracelluláris Ca^{2+} jelhez, aminek kialakulásában az intrapankreatikus nyomás hatására aktiválódott SOC csatornának, az ORAI1-nek van szerepe. Az ORAI1 gátlásával csökkent a pankreaszon belüli tripszinogén aktiváció, az ödéma és az acinus sejtek nekrozisa. Számos közlemény foglalkozott azzal, hogy az epesavak és zsírsavak csökkentik a mitokondrium belső membránjának polarizációját, ami redukált ATP képződéshez vezet. Ennek következményeképpen gátlódik a Ca^{2+} ATPázok (PMCA, SERCA) működése, ami csökkenti a Ca^{2+} kiürítését a sejtől és a kalciumionok ER-be való visszapumpálását [23] [62] [63].

Fontos megemlíteni a zimogén granulumokat, melyek membránjában szintén megtalálható az IP_3R és RyR. A granulumok kalciumion tartalma jóval magasabb, mint a sejt citoplazmájában, a kalciumion nagy mennyisége viszont a granuláris mátrixban található meg kötött formában. A Ca^{2+} mobilizáló „hírvivők” hatására Ca^{2+} szabadul fel a zimogén szemcsékből, amelynek következtében növekedik a lokális extragranuláris kalciumion szint. Ennek eredménye a zimogén membránban lokalizálódó kalciumion függő káliumcsatornáknak az aktivációja. A beáramló káliumionok kicserélődnek a mátrix kalcium- és hidrogénionjaival, ami az intragranuláris pH csökkenéséhez és zimogének aktivációjához vezet [51].

Az intracelluláris Ca^{2+} túltelítődés további következménye a mitokondrium károsodása. Az emelkedett citoszolikus Ca^{2+} hatására kalciumionok áramlanak a mitokondriumba, a tartós mitokondriális Ca^{2+} szint hatására kinyílik a mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus (MPTP), ami a mitokondriális membránpotenciál csökkenéséhez, sérült ATP szintézishez és sejthalálhoz vezet [64] [65] [66].



3. ábra: A Ca^{2+} szint szabályozásának folyamatai az acinus sejtekben. A CCK és ACh hatására képződő NAADP, cADPR és IP_3 tranziens intracelluláris Ca^{2+} szint növekedést okoz, ami az enzimek szekrécióját váltja ki. Patológiás körülmények között tartós citoszolikus kalciumjel keletkezik, ami az enzimek sejten belüli aktivációjához vezet. A biliáris eredetű pankreatitiszben az epesavak gátolják a SERCA működését, továbbá az epekő által okozott elzáródás megnövekedett intrapankreatikus nyomást okoz, ami az ORAI1 (SOC) csatorna aktivációjához vezet. (Saját ábra, amely BioRender.com szoftverrel készült.)

IV.5.3 A kolecisztokinin hatása az acinus sejtekre

A CCK hormont elsősorban a vékonybélben található enteroendokrin sejtek termelik, amelyek az emésztési folyamat beindulásával stimulálódnak. A felszabaduló peptidhormon a véráramba jut és az epehólyag kontrakcióját, valamint a pankreasz enzimek szekrécióját váltja ki a CCKR-on keresztül. A bazális CCK-szint alacsony a vérben (0.5-1 pmol/L); stimuláció hatására 5-15 pmol/L-re nő a mennyisége. A CCK-nak számos molekuláris változata létezik,

az emberben a CCK33 a legnagyobb mennyiségben előforduló típus. A CCK szekrécióját a chyme-ben található zsírsavak és fehérjék idézik elő, mennyiségük csökkenésével a CCK szintje visszaáll a kiindulási koncentrációra [67] [68].

Biliáris pankreatitisz esetén magas plazma CCK-szintet diagnosztizáltak a betegekben. A kutatók úgy vélik, hogy az emelkedett hormonkoncentráció tovább súlyosbíthatja a gyulladást és az AP prognózist, mivel stimulálja a sérült pankreaszt [69]. Állatkísérletekben kimutatták, hogy a szupramaximális koncentrációban alkalmazott CCK gátolta az enzimszekréciót, ami a zimogének akkumulációjához és aktivációjához vezetett a sejten belül [70]. Ez a hatásmechanizmus az alapja a kísérleteinkben végzett ceruleinnel indukált AP modellnek. A cerulein egy CCK analóg, ami fiziológias mennyiségben a CCK1R-hoz (magas affinitású CCKR) kötődve váltja ki a zimogének exocitózist. Szupramaximális koncentráció esetén a CCK1 receptorok telítődnek, a cerulein a CCK2R-hoz (alacsony affinitású CCKR) is bekötődik, amelynek szekrécióblokkoló hatása van. A modell előnye, hogy a humán AP-ben leírt jelenségek (hiperamilazémia, gyulladós sejtek infiltrációja, ödéma) jól reprodukálhatók állatkísérletekben [71] [72] [73].

IV.5.4 A protein kináz C (PKC) útvonal

A PKC család 10 izoformáját ismerjük. A klasszikus PKC izoformák: α , β I, β II, γ . Az ún. „novel” PKC izoformák közé a δ , ϵ , η , θ tartoznak, míg az atípusos izoformák közül csupán kettő ismeretes: ζ , λ [74].

A CCK számos molekuláris útvonalon hat az acinus sejtekre. Az egyik ilyen útvonal a már említett PLC aktiválásán keresztül valósul meg, ami a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát (PIP₂) hasításával állít elő IP₃-at és diacilglicerolt (DAG). A DAG és az IP₃ által felszabadított kalcium különböző módon járulnak hozzá a PKC izoformák működéséhez. Mindkettő szükséges a klasszikus PKC izoformák aktivációjához; a „novel” PKC izoformák aktivációjához csak a DAG-ra; az atípusos PKC izoformák működéséhez pedig egyikre sincs szükség [75].

A PKC-nek 4 izoformáját (α , δ , ϵ , ζ) azonosították a rágsálók acinus sejtjeiben, melyek a szupramaximális koncentrációjú CCK hatására aktiválódtak. A PKC α a zimogén granulumok bazolaterális membránon keresztüli exocitózisában játszik szerepet. Foszforilálja a Munc18c fehérjét, ami disszociál a syntaxin4-ről, mely folyamat a SNARE komplex aktiválódásához vezet a bazolaterális régióban. A SNARE komplex fehérjei vesznek részt granulumok és a sejtmembrán közötti fúzióban, amely által az aktivált enzimek az intersticiális térbe kerülnek és a szövet önmérsztődését okozzák [43] [75] [76]. A PKC δ és ϵ izoformájának az NF- κ B

aktiválásban van szerepe, foszforilálja az NF- κ B inhibitor fehérjét (I κ B α), ami leválik a transzkripció faktorról, majd degradálódik. Emiatt az NF- κ B nukleáris lokalizációs szignálja a felszínre kerül, és a transzkripció faktor a sejtmagba transzlokálódik, majd számos, az AP-ben szerepet játszó gyulladásos gén expresszióját indukálja [65] [71] [77].

Az NF- κ B a transzkripció faktorok Rel családjába tartozik, amelybe a p50/p105 (NF- κ B1), p52/p100 (NF- κ B2), c-Rel, p65 (RelA) és RelB alegység tartozik bele az emlősökben [78]. Az AP-ben az egyik legszélesebb körben tanulmányozott formája az NF- κ B-nek a p50/p65 egységből álló heterodimer. Gukovsky és mtsai. írták le a transzkripció faktor kétfázisú aktivációját patkányokban [79]. Az I κ B α szintje 30 perccel a cerulein kezelés után csökkent a pankreaszban, amit a p50/p65 magba való transzlokációja kísért. Az indukciót követő 90. percben az NF- κ B szintje a magban visszaállt a kezdetihez közeli szintre. A második fázisban az NF- κ B aktivációja a 3. órában kezdődött és a 6. óráig tartott, ami az I κ B β degradációjával járt együtt [79].

Virlos és mtsai. vizsgálták a kalpain I inhibitor hatását az AP-ben [80]. A kalpain I egy cisztein proteáz, ami az I κ B α degradálásában játszik szerepet. Az inhibitor alkalmazásával az NF- κ B nukleuszba való transzlokációja gátlódott, így jelentősen csökkent a leukocita infiltráció, a nekrosis mértéke, az ICAM-1 expresszió és a lipid peroxidáció a pankreaszban [80]. Hasonló eredményeket kaptak az NF- κ B/p105 knockout (KO) egerekkel folytatott kísérletben is, melynek során csökkent az egerekben az NF- κ B aktiváció, TNF- α expresszió és leukocita infiltráció [81]. A kísérleti eredmények igazolják, hogy az NF- κ B aktivációjának központi szerepe van az AP mechanizmusában.

IV.5.5 A heveny hasnyálmirigy-gyulladásban kulcsszerepet játszó citokinek

A citokinek szintén fontos kulcsszereplői a gyulladásos folyamatoknak. Az acinus sejtek károsodása helyi gyulladásos válaszhoz vezet, amit az immunsejtek infiltrációja kísér. A szövetsérülés helyére áramló immunsejtek citokineket termelnek, ami a gyulladás progressziójához vezet. A citokinek kis molekulású fehérjék, melynek forrásai nemcsak az aktiválódott leukociták lehetnek, hanem az acinus sejtek is. A ceruleinnel kezelt acinus sejtek TNF- α és IL-6 citokineket termeltek [82] [83]. Az állatok hasnyálmirigyében számos további citokin (pl. IL-1 β , MIP-2, ICAM-1, iNOS) expressziója emelkedett a gyulladás hatására [84]. A fejezet további részében az AP-ben legszélesebb körben tanulmányozott három citokin szerepét taglalom.

A tumor nekrosis faktor- α (TNF- α) volt az egyik első citokin, melynek az AP-ben emelkedett szintjét 1995-ben figyelték meg a Dél-Floridai Egyetem kutatói, Norman és mtsai.

[85]. A TNF- α főként aktivált makrofágok által termelődik, és a tumor nekrozis faktor receptorhoz (TNFR) kötődve fejt ki a hatását. A TNFR2 túlnyomó részben az immunsejtek és endotélsejtek felszínén fejeződik ki és a gyulladás kialakulásának előidézésében van szerepe, míg a TNFR1 majdnem minden sejt membránjában expresszálódik, és a programozott sejthalált indukálja [86]. Az acinus sejtek maguk is képesek a TNF- α expressziójára, és mindkét TNFR megtalálható a sejtfelszínükön. Gukovskaya és mtsai. kimutatták, hogy a TNF- α stimulálja az NF- κ B transzlokációját a magba az acinus sejtekben [87]. A citokin a TNFR-hez kapcsolódva indítja el a TNFR1 asszociált halál domén (TRADD), a receptor interakciós fehérje (RIP), és a TNF-receptor asszociált faktor 2 (TRAF2) toborzását a membránreceptorhoz, ami triggerként hat az I κ B kináz (IKK) komplex (IKK α , IKK β , IKK γ) összeszerelésére és aktivációjára. A komplex foszforilálja az I κ B α -t a Ser32 és Ser36 oldalláncokon, ami az I κ B α ubiquitinálódásához és proteasomális lebontásához vezet; ezután a p50/p65 heterodimer egység a magba transzlokálódik [77] [88]. A kutatók a TNF- α pankreatitiszben betöltött szerepét állatkísérletekben is megerősítették. TNFR1^{-/-} egérben csökkent a szérum amiláz, lipáz, IL-6 szint és a hisztológiai elváltozások mértéke [89]. A TNFR fúziós fehérjével (etanercepttel) kezelt egerekben csökkent a szöveti károsodás mértéke [90].

Az interleukin-1 β (IL-1 β) szintén egy potens proinflammatorikus citokin, amit elsődlegesen monociták és makrofágok termelnek, de a fibroblasztok és endotél sejtek is lehetnek a forrásai [91]. Az IL-1 β proenzim formájában termelődik, és az IL-1 konvertáló enzim (ICE) hasítása után nyeri el biológiailag aktív formáját. Az IL-1 β aktiválja a neutrofileket és indukálja az adhézións molekulák fokozott kifejeződését. Az interleukin-1-receptor antagonist (IL-1Ra) egy természetes formában előforduló IL-1 inhibitor [92]. Norman és kutatócsoportja rávilágított arra, hogy a három fehérje (IL1- β , ICE, IL-1Ra) alacsony szinten expresszálódik az egerek hasnyálmirigyében, de gyors növekedést mutat cerulein stimulus hatására. Meglepő módon a szövetben és szérumban mért IL-1Ra koncentrációja magasabb volt, mint az IL-1 β fehérjéé, aminek az lehet a magyarázata, hogy az IL-1 β termelését kiváltó jelátviteli útvonal közvetlen hatással van az IL-1Ra képződésére, amely negatív visszacsatolásként hat az inflammatorikus folyamatokra [93]. Az IL-1Ra és IL-1 citokinek szintje korrelál az AP súlyosságával [94].

A gyulladásos kaszkádban fontos szerepet játszik az interleukin-6 (IL-6) is. Habár IL-6-ot számos sejt képes termelni, csak néhány sejt (hepatociták, neutrofilek, makrofágok) expresszál membrán-kötött IL-6 receptort (IL-6R) [95]. A citokin működésének komplexitását növeli az IL-6 receptor szolubilis formája (sIL-6R), ami által az IL-6 az IL-6R nélküli sejtekhez is be tud kötödni (transz-szignál útvonal) [96]. Az sIL-6R az IL-6R izoformája, ami membrán-

kötő domén nélküli formában expresszálódik, vagy a horgonyzó receptor proteolitikus lehasításával keletkezik [97]. A klasszikus IL-6 jelátvitel az IL-6R-hoz köthető és anti-inflammatorikus hatást fejt ki az akut fázis folyamatok szabályozásán keresztül, amíg a sIL-6R-hoz kapcsolódó jelátvitel a STAT3 aktivációjához és ezáltal a CXCL1 upregulációjához vezet [98]. A CXCL1 a CXCR2 receptorhoz kötődve váltja ki a granulociták infiltrációját. Az endotél sejtek nem expresszálnak IL-6R-t, de jelenlegi ismereteink alapján feltételezhető, hogy az infiltráló neutrofilek apoptózisuk során „levedlik” a membránhoz kötött IL-6 receptorukat. A keletkező sIL-6R az IL-6-tal komplexet alkotva a glikoprotein 130 transzmembrán fehérjén (gp130) keresztül stimulálja a monocita kemoattraktáns fehérje-1 (MCP-1) termelését az endotél sejtekben, ami további mononukleáris sejtek bevándorlását okozza a gyulladás helyére [99] [100]. Az IL-6-ot az acinus sejtek is képesek termelni, de az AP-ben a citokin fő forrásai a mieloid sejtek. Az IL-6-ot semlegesítő antitestek használatával sikeresen csökkent a szérumban IL-6 és amiláz szint, illetve a pankreasz károsodása a ceruleinnel kiváltott gyulladásban [82] [101].

IV.5.6 A kemokinek szerepe az AP-ben

A kemokinek a citokinek családjába tartoznak, szerkezetüket tekintve konzervált N-terminális cisztein véggel rendelkező, pozitív töltésű polipeptidek. Kemotaktikus és aktiváló hatással vannak a leukocitákra, melynek hatására az immunsejtek a sérülés helyére vándorolnak [82]. Közülük az MCP-1, másnéven kemokin C-C motívum ligand-2 (CCL2) szerepét vizsgálták Bhatia és mtsai., akik emelkedett CCL2 szintet detektáltak a ceruleinnel kezelt primer acinus sejtek felülúszójában [102]. Hasonló eredményeket kaptak a ceruleinnel kezelt egerekben, amelyekben 140-szeresére nőtt az CCL2 mRNS szintje. A CCL2 a kemokin C-C motívum ligand (CCL) család tagja, mivel az N-terminuson lévő ciszteinek szomszédosak. Ezt a kemokint az immunsejteken kívül még egyéb sejtek (pl. endotél sejt, fibroblaszt) is szekretálják. A CCL2 a monociták felszínén található receptorokon (CCR-2 és CCR-4) keresztül fejt ki hatását [103] [104].

A kemokinek további nagy csoportja a C-X-C motívum ligand (CXCL) család, amelyben az első két konzervált cisztein között található egy másik aminosav. Ennek a családnak tagja a makrofág gyulladásos fehérje-2 (MIP-2/CXCL2), ami kemoattraktánsként hat a neutrofilekre, és indukálja a szövetkárosításhoz vezető neutrofil degranulációt [105]. Jia Sun, a Singapore-i Egyetem munkatársa a fejezetben taglalt kemokineken kívül a makrofágok és monociták által termelt makrofág gyulladásos fehérje-1 α (MIP-1 α /CCL3), és a T sejtek által szekretált RANTES/CCL5 szerepét is vizsgálta az AP-ben. A szekretagóggal indukált gyulladásban

szignifikánsan nőtt a CCL2, CCL3, CCL5 és CXCL2 mRNS és fehérje expressziója a pankreaszban, valamint a CCL3 kivételével szignifikáns növekedés volt megfigyelhető a kemokinek plazmakoncentrációjában is [106].

A kemokineknek az AP-ben betöltött szerepük miatt, a gátlásukra irányuló kísérletek kerültek a figyelem középpontjába. Az egyik ilyen szer a bindarit volt, ami a CCL2 képződését blokkolja a makrofágokban. Alkalmazásával csökkent a szérum amiláz, lipáz és CCL2 szint, valamint a hisztológiai elváltozások mértéke a pankreaszban [107] [108]. Csökkent a gyulladás mértéke a CCL2 KO és CCR-2 KO egerekben is [109].

IV.5.7 Az oxidatív stressz szerepe az AP-ben

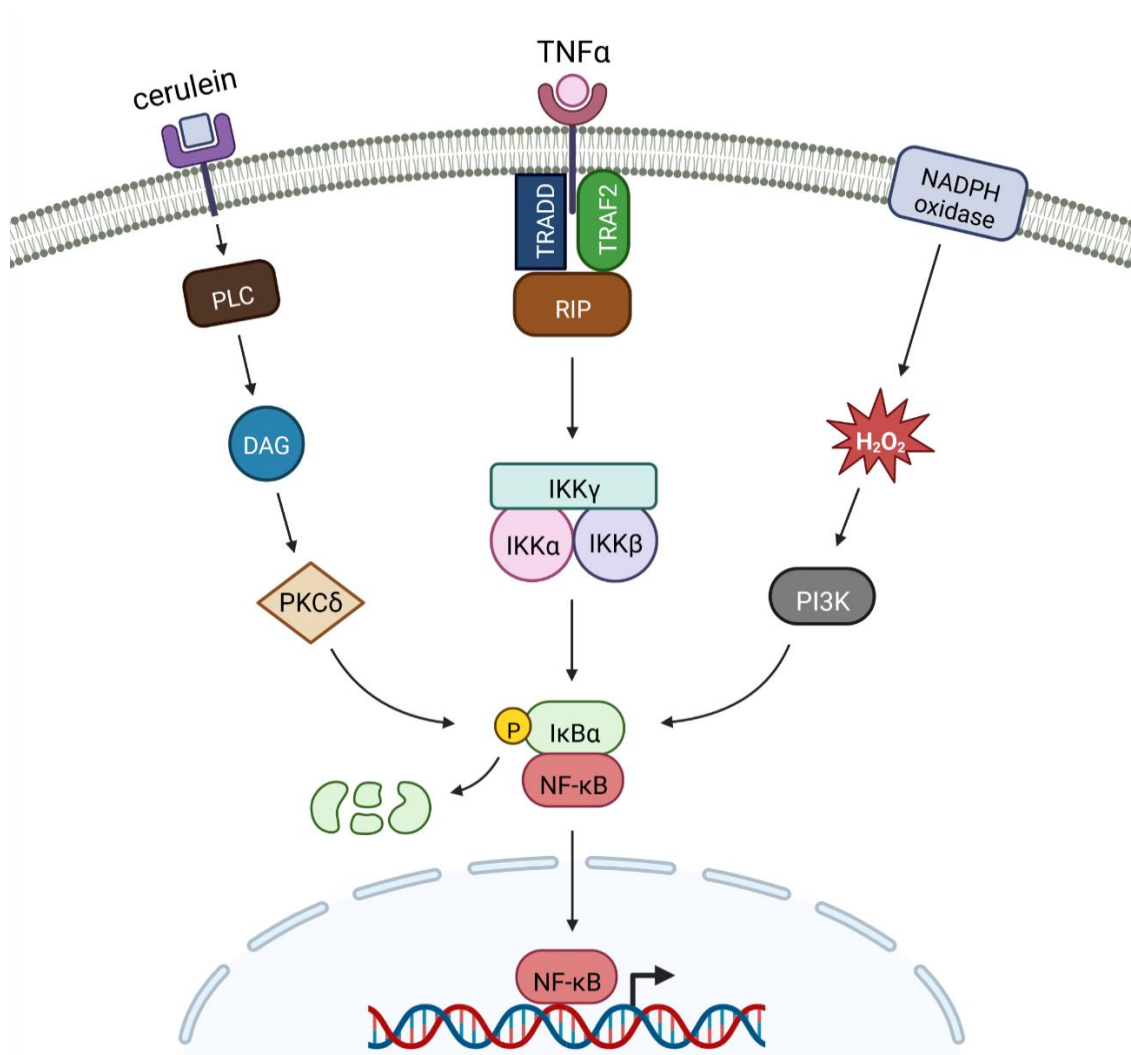
Fiziológiás körülmények között a ROS legnagyobb része a mitokondriumban termelődik az elektrontranszportláncához kötött oxidatív foszforiláció során. Az ATP képződéséhez a NADH és flavin-adenin-dinukleotid (FADH₂) oxidációja szükséges, melyet a mitokondrium belső membránjában található enzimkomplexek (I-IV) katalizálnak. A folyamat során az I. és III. komplexről elektronok szivárognak, melyek az oxigént szuperoxid anionná (O₂⁻) redukálják [110]. A ROS részt vesz a jelátviteli útvonalakban és az immunvédekezésben, túlzott mennyiségben azonban sejt- és szövetkárosodáshoz vezet [111]. Ennek elkerülésére a szabad gyököket az endogén antioxidáns mechanizmusok, pl. szuperoxid-diszmutáz (SOD), kataláz, glutation-peroxidáz (GPx) semlegesítik [112] [113]. Patológias körülmények között a pro- és antioxidáns folyamatok közötti egyensúly felborul, ami oxidatív stresszhez vezet. A ROS túltermelődése károsítja a mitokondriális légzési láncot, az I. és III. komplex defektusa megnövekedett szuperoxid-képződést, mitokondriális DNS károsodást és sejthalált okoz [114].

A ROS emelkedett szintjét az akut pankreatitiszban elsők között Sanfey és mtsai. detektálták 1984-ben, melynek hatására a kutatók figyelme a reaktív szabad gyökök AP-ben betöltött szerepének vizsgálatára irányult a következő évtizedekben [115]. Kimutatták, hogy amíg az oxigéngyökök forrása a pankreatitisz enyhébb formájában az infiltráló leukociták, addig a nekrotizáló AP esetén a xantin oxidáz. Az acinus sejtek destrukciója során kiszabaduló proteolitikus enzimek katalizálják a xantin-dehidrogenáz → xantin-oxidáz konverziót, ami a szuperoxid anion egyik fő forrása [116]. Az oxigéngyökök másik forrása a neutrofilek NADPH oxidáz enzime, amely tartalmaz membránhoz kötött (gp91^{phox}, p22^{phox}) és citoszolikus alegységeket (p67^{phox}, p47^{phox}). Aktiváció során a citoszolikus alegységek a membránhoz transzlokálódnak, szuperoxid és hidrogén-peroxid (H₂O₂) képződése indul el [117]. Jóllehet a ROS képződés fő forrása a granulociták NADPH oxidáza, Yu és mtsai. leírták a NADPH oxidáz expresszióját az acinus sejtekben is. A cerulein stimulálta az enzim aktivációját, ami a p47^{phox}

és p67^{phox} alegység membránhoz való transzlokációjához és ROS képződéséhez vezetett [118] [119]. A NADPH enzim szerepét Gukovskaya és társai vizsgálták olyan egerekben, amelyekben kiütötték a p47^{phox} alegységet. A NADPH deficiens egerekben csökkent a ROS és az aktiválódott tripszinogén mennyisége, a szérum amiláz szint és a granulocita infiltráció mértéke [120].

Az oxidatív gyökök egyik legreaktívabb formája a hidroxil gyök ($\cdot\text{OH}$), amely a sejtmembránt alkotó zsírsavakkal reagálva a membránlipidek peroxidációjához és a sejt dezintegrációjához vezet. A sérülés a kapillárisok és vénák endotél rétegére is kiterjed, ennek következtében növekedik az erek permeabilizációja, ami ödémát okoz. Dabrowsky és mtsai. megmérték a lipidperoxidáció markerének, a malondialdehydnek (MDA) a szintjét pankreasz szövetben. A ceruleinnel indukált pankreatitiszben az MDA koncentrációja 30 perccel az oltás után növekedni kezdett a pankreaszban, melyet a SOD mennyiségének csökkenése kísért. További kísérletekben kimutatták, hogy a glutation (GSH), a GPx és az antioxidáns vitaminok szintje is jelentősen csökkent a pankreaszban az AP során [121] [122] [123].

A proinflammatorikus citokinek és szekretagógok mellett a ROS is szerepet játszhat az NF- κ B aktiválásában. Több transzkripciós faktor (NF- κ B, NRF-2, AP-1) redox szenzitív, ezeknek a jelátviteli útvonalára a ROS számos ponton hatással lehet [124] [125]. A citoplazmában a szabadgyökök az NF- κ B útvonalat gátolhatják az IKK β ciszteinjének oxidációja által, vagy indukálhatják az I κ B α Tyr42 foszforilációjának kiváltásán keresztül [126]. Utóbbi mechanizmus egy IKK független aktivációs útvonal, amelyben a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) játszhat szerepet [127] [128]. A sejtmagban az NF- κ B oxidációja gátolja a transzkripciós faktor DNS-hez való kötődését. Az egyik vizsgált fehérje az NF- κ B p50 alegységének ciszteinje (Cys62) volt, ami oxidált formában van jelen a citoplazmában, de a magba kerülve a tioredoxin1 vagy redox faktor-1 redukálja. Ez a redukciós lépés esszenciális az NF- κ B DNS-kötő doménjének működése szempontjából [129] [130]. A felsorolt mechanizmusok közül Algül és mtsai. kimutatták, hogy a H₂O₂ IKK független útvonalon indukálta az NF- κ B aktivációját a hasnyálmirigy lobulusaiban [131]. Az AP-ben leírt NF- κ B aktivációs útvonalak összefoglalója a 4. ábrán látható.



4. ábra: NF-κB aktiválási útvonalak az AP-ben. A szupramaximális koncentrációban alkalmazott cerulein aktiválja a PKCδ-t, ami a gyulladás során keletkező H₂O₂-dal együtt IKK független útvonalon váltja ki az IκBα foszforilációját. A pankreasz gyulladást a TNF-α emelkedett szintje kíséri, ami az IKK aktivációján keresztül idézi elő az IκBα leválását a transzkripciós faktorról. Ennek következménye az NF-κB magba történő transzlokációja és a gyulladásos gének transzkripciója. (Saját ábra, amely BioRender.com szoftverrel készült.)

Az acinus sejtek kalciumion csatornáit is tartalmazzák redox-szenzitív cisztein oldalláncokat. A RyR oxidációja a csatorna aktiválásához vezet, a ROS pedig növeli az IP₃R szenzitivitását az IP₃-mal szemben. A Ca²⁺-ATPáz pumpák is szenzitívek a redox környezet változásaira. A H₂O₂-vel kezelt acinus sejtekben a PMCA gátlás alá kerül, ami tartós, globálisan magas kalciumionszinthez vezet a sejtben. A SERCA pumpák 6 redox-szenzitív cisztein véget tartalmaznak, melyek közül enyhe oxidatív körülmények között a Cys674 oxidációját és a pumpa upregulációját figyelték meg a Liverpooli Egyetem kutatói, amíg a tartós oxidatív

stressz ugyanennek az oldalláncnak a szulfonilációjához és a SERCA irreverzibilis gátlásához vezetett [132] [133].

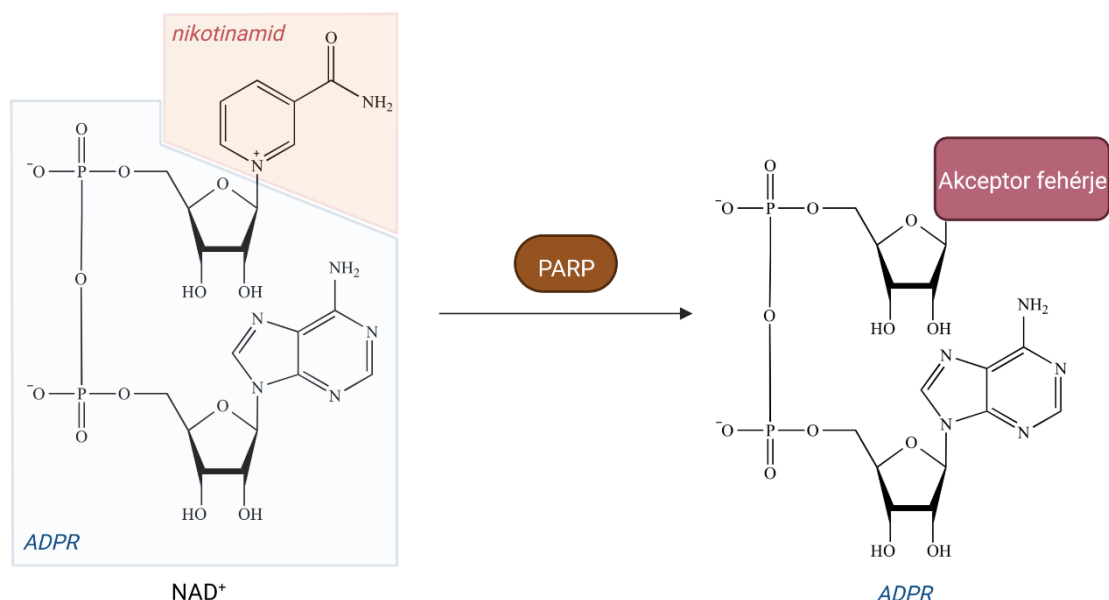
Az antioxidáns enzimek terápiás hatását számos tanulmány igazolta. A SOD-dal és katalázzal való kezelés csökkentette a hasnyálmirigy szöveti károsodásának kiterjedését. Hasonló eredményeket értek el a természetes antioxidánsok használatával, mint például a szőlőben is megtalálható rezveratrollal, ami csökkentette az IL-1 β és TNF- α expressziót, és ezáltal a gyulladás mértékét a pankreasban [134]. Az antioxidánsokkal (pl. C-vitamin, N-acetilcisztein, szelénium) való kezelést humán terápiában is alkalmazzák: enyhíti a szöveti elváltozások mértékét, illetve csökkenti a proinflammatorikus citokinek képződését és a lipid peroxidációt [135] [136].

IV.6 A poli-ADP-ribóz polimeráz szerepe az AP-ben

A poli-ADP-riboziláció (PARiláció) egy poszttranszlációs modifikációja a fehérjéknek, amit a poli-ADP-ribóz polimeráz (PARP) családba tartozó enzimek hajtanak végre. A PARP család 17 tagot foglal magában, melyeknek többsége mono-(ADP-ribóz) egységet kapcsol a célfehérjéhez, csak 6 PARP izoforma (PARP-1, 2, 3, 4, 5A és 5B) rendelkezik a poli-ADP-ribozilációhoz szükséges konzervált glutamát-véggel a katalitikus doménben [137]. A PARiláció számos sejtfolyamat irányításában szerepet játszik, úgymint DNS hibajavítás, kromatinsztruktúra modulációja, sejt differenciáció. A folyamatok szabályozásában a PAR egységek lebontásáért felelős enzimek, az ADP-ribózil protein liáz és poli-ADP-ribóz glikohidroláz (PARG) is fontos szerepet játszanak [137] [138].

A PARP-1 a legjobban karakterizált tagja a családnak, és a celluláris PARiláció nagy része is ehhez az enzimhez köthető. Három fő doménből épül fel: (1) N-terminális DNS-kötő doménből, amely két cinkujj motívumot tartalmaz, (2) az automodifikációs doménből, ami a PARP-1 auto-parilációját végzi és a (3) C-terminálison elhelyezkedő katalitikus doménből. A DNS törése a PARP-1 aktivációját váltja ki, aminek hatására az enzim a két Zn-ujj domén segítségével hozzákötődik a DNS-hez, majd a NAD⁺ hasításával nikotinamidot és ADP-ribózt (ADPR) állít elő. A PARP-1 az utóbbi molekulákat kovalens módon kapcsolja az akceptor proteinek glutamát, aszpartát, lizin, szerin, hisztidin és tirozin oldalláncaira [139] [140]. Az elágazó láncú PAR polimerek szignálmolekulaként szolgálnak a DNS hibajavításában résztvevő enzimek számára. Egyszálú törés esetén a PARP-1 az XRCC1 fehérjével lép kölcsönhatásba, aminek fontos szerepe van a BER mechanizmusában résztvevő enzimek toborzásában. A kettős szálú DNS sérülések javításában betöltött szerepére utal, hogy a PARP-1 stimulálja a DNS-függő protein kináz katalitikus alegységét (DNA-PKcs), amely a nem

homológ végcsatlakozás (NHEJ) hibajavító mechanizmusban vesz részt. A PARG is a DNS károsodás helyére vándorol, és a PARP-1-gyel összhangban vesz részt a PAR-szint szabályozásában, így biztosítva a hibajavításban résztvevő enzimek dinamikus toborzását és szabadon engedését [141] [142].



5. ábra: Az ADP-ribilizáció mechanizmusa. Az akut hasnyálmirigy-gyulladás korai patomechanizmusa a redox egyensúly felborulása, a keletkezett reaktív oxigén gyökök károsítják a DNS-t, ami a PARP aktivációját eredményezi. A PARP a NAD^+ molekulák hasításával ADP-ribóz (ADPR) egységeket állít elő, melyeket ezután az akceptor fehérjék oldalláncaihoz kapcsol. (Saját ábra, amely BioRender.com szoftverrel készült.)

A PARP-1 a kromatinstruktúra regulációján keresztül részt vesz a génexpresszió szabályozásában is. A hisztonok PARilációja a kromatin dekonzenzációjához és a nukleoszóma destabilizációjához vezet. A PAR polimerek hosszúsága néhány egységtől akár 200 egységig terjedhet, ami nagy negatív töltést kölcsönöz a fehérjének. Ennek következtében elektrosztatikus taszítás lép fel a DNS és a hisztonok között, ami könnyíti a transzkripciós faktorok DNS-hez való hozzáférését [143] [144]. A PARP-1 NF- κ B-re kifejtett hatását vizsgálva a Zürichi Egyetem munkatársai kimutatták, hogy az NF- κ B függő gének transzkripciója gátlódott a PARP1^{-/-} sejtekben. Továbbá megerősítették, hogy a PARP-1 enzimaktivitása és DNS-hez való kötődése sem feltétlenül szükséges a transzkripciós faktor aktivációjához [145]. A PARP-1 a p300-zal komplexet alkotva szinergikusan koaktiválja az NF- κ B-t, illetve közvetlenül is képes kötődni a p65 és p50 doménhez, amiből annak a

lehetőségére következtettek, hogy a PARP-1 direkt interakción keresztül is hathat a transzkripció faktorra [146].

Fiziológiás körülmények között a PARP a DNS hibajavításában vesz részt, és ezzel segíti a sejtek túlélését. Intenzív oxidatív stressz során nagy mennyiségű DNS sérülés keletkezik, ami a PARP túlműködését idézi elő. Ennek következtében megnő a sejt NAD^+ felhasználása, ami ATP deplációhoz és nekrotikus sejthalálhoz vezet [147] [148]. A PARP aktivációjához köthető egy másik sejthalálforma is, a parthanatos, melynek során a PAR polimerek a sejtmagból a mitokondriumba jutva váltják ki az apoptózis indukáló faktor (AIF) transzlokációját. Az AIF a mitokondriumot elhagyva a sejtmagba transzlokálódik és egy egyedi szabályozott nekrozist indít el, melyet a kromatin kondenzációja, a DNS fragmentációja és a sejtmembrán integritás elvesztése jellemez [138] [149].

A PARP akut pankreatitiszben betöltött szerepét számos tanulmányban tárgyalták. A pankreasz immunhisztokémiai vizsgálatai során a PAR akkumulációját figyelték meg az AP-ben elhunyt pácienseknél, miközben az egészséges egyéneknél nem volt detektálható PARiláció [150]. A PARP inhibitorok (PJ34, 3-AB, olaparib) alkalmazása csökkentette az amiláz, lipáz és citokinek ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , MCP-1) mennyiségét a szérumban, ezen felül csökkent a lipidperoxidáció és PARiláció mértéke is a pankreaszban [150] [151] [152] [153]. A ceruleinnel kezelt egerekben intenzív ICAM-1 festődés volt detektálható az erek mentén, ami korrelált a szövetben mért magas granulocita infiltrációval. A 3-AB kezelés sikeresen csökkentette az említett két paraméter szintjét a gyulladásban [151].

IV.7 A 8-oxoguanin DNS glikoziláz-1 bemutatása

IV.7.1 Az OGG1 szabályozása és szerepe a hibajavításban

A ROS által okozott egyik leggyakoribb oxidatív DNS károsodás a 8-oxo-7,8-dihidroguanin, ami 2 atomban különbözik a guanintól: a C8, amihez hidrogén helyett oxigén kötődik, és N7, amihez hidrogén kötődik. A DNS struktúrát vizsgáló tanulmányok feltárták, hogy a 8-oxoG lézió kis mértékben vagy egyáltalán nem okoz torzulást a DNS hélixben, így nem blokkolja a DNS replikációt és transzkripciót. Ugyanakkor a DNS-polimeráz működésében szüneteket okozhat és ezáltal csökkentheti a DNS szintézis rátáját. Emellett a 8-oxoG mutációt idézhet elő a genomban, mivel az oxidált guanin adeninnel párosodhat citozin helyett, $\text{G:C} \rightarrow \text{T:A}$ transzverziót kiváltva [154]. Fiziológiás körülmények között körülbelül százezer 8-oxoG keletkezik naponta az eukarióta sejtek DNS-ében, aminek javításáért elsődlegesen a 8-oxoguanin DNS glikoziláz-1 enzim a felelős. A hibajavítás első lépésében az

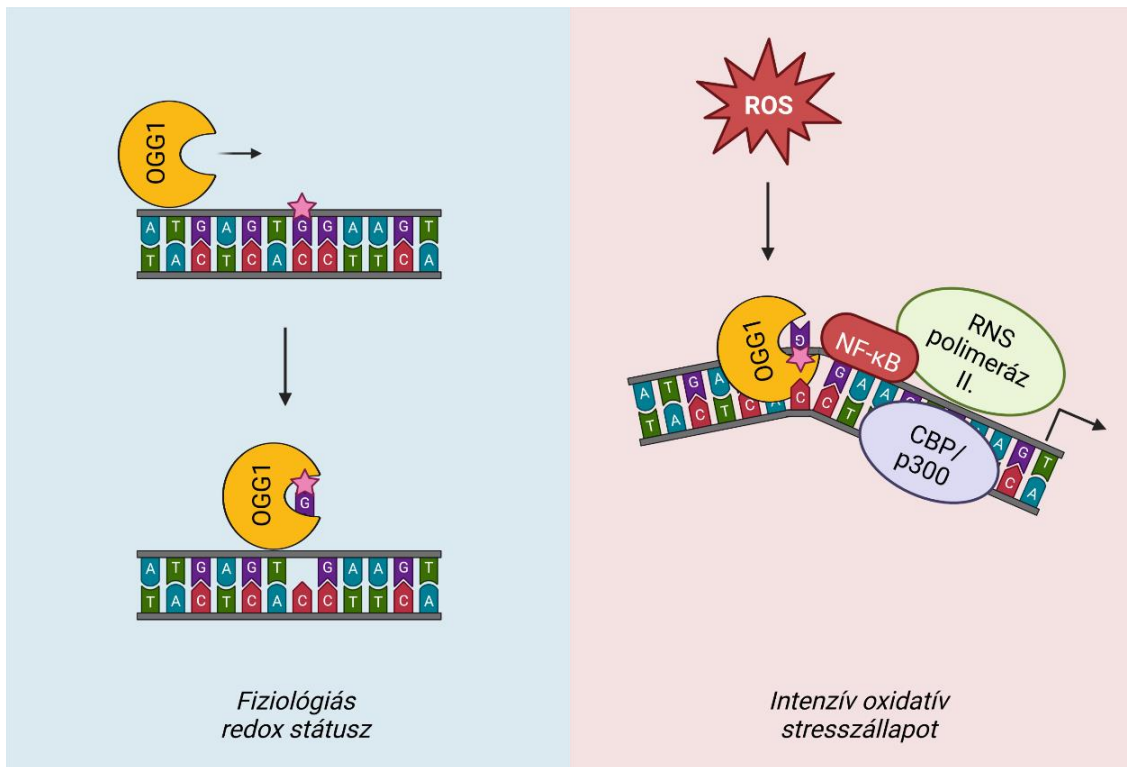
OGG1 felismeri a hibás bázist és kivágja, a keletkező abázikus helynél az APE1 létrehozza az 5'-dezoxiribóz-foszfát és 3'-OH végeket, majd a hiányzó bázist a DNS polimeráz β illeszti be, végül a DNS ligáz összekapcsolja a szálakat [155].

Az OGG1 aktivitását befolyásolják a különböző poszttranszlációs modifikációk. Az enzim Lys338/Lys341-jének a hiszton acetiltranszferáz (CBP/p300) által történő acetilálása vagy a CDK4-mediált foszforilációja növelte az OGG1 enzimaktivitást. Az OGG1 szabályozásában szerepe van az enzimmel interakcióba lépő fehérjéknek is. Ilyen a BER-ben résztvevő XRCC1, mely stimulálta az OGG1 működését, továbbá az APE1, ami növelte az OGG1 liáz aktivitását [3] [156] [157] [158].

Hooten és mtsai. vizsgálták az OGG1 és PARP-1 közötti kapcsolatot. Az OGG1 közvetlenül kötődött a PARP-1-hez; a két enzim kölcsönhatása az oxidatív stressz hatására növekedett. További kísérletekben igazolták, hogy az aktivált PARP-1 gátolta az OGG1 enzimaktivitását. Feltételezhető, hogy a DNS glikoziláz enzimaktivitásának gátlása az OGG1 DNS szálról való leválását szolgálhatja a károsodott bázis kivágása után, lehetővé téve ezáltal a többi javító fehérje DNS repairbe való bekapcsolódását [159].

IV.7.2 Az OGG1 szerepe a transzkripcióban

A patobiokémia területének a 8-oxoG-hez köthető egyik legújabb fejleményét Boldogh István és kutatócsoportja tárta fel. Megfigyelték, hogy az emlősökben a proinflammatorikus gének promóterei magas GC bázis tartalmúak és a gyulladás során keletkező 8-oxoG léziók mennyisége korrelál a transzkripció aktivitással ezekben a génszabályozó régiókban. A folyamatban szerepet játszik az OGG1, amely annak érdekében, hogy hozzáférjen a lézióhoz, a DNS 70°-os hajlását indukálja a 8-oxoG:C bázispár síkjában. Az oxidált bázis eltávolítása után a BER hibajavító fehérjei fejezik be a DNS szál helyreállítását [160] [161] [162]. Intenzív oxidatív stressz hatására azonban az OGG1 cisztein végei oxidálódnak, ami az enzim inaktiválódásához vezet. Habár ebben az esetben az OGG1 nem rendelkezik katalitikus aktivitással, ugyanakkor továbbra is képes az alábbi lépésekre: (1) a károsodott bázis kifordítása a DNS hélixből (flip-out), (2) a 8-oxoG szubsztrát kötése az enzim aktív centrumában, (3) a 8-oxoG-vel párban lévő citozinnal való interakció: a citozin „stacking” kölcsönhatásának megbontása a szomszédos bázisaival (unstacking). Ezek a lépések a DNS hajlását eredményezik, elősegítve az NF- κ B bekötődését és a proinflammatorikus gének átírását mindaddig, amíg a redox-egyensúly helyre nem áll (6. ábra). Ekkor az OGG1 visszanyeri enzimaktivitását, ami a hibás bázis kivágásához és a transzkripció gépezet szétszerelődéséhez vezet [3] [163] [164].

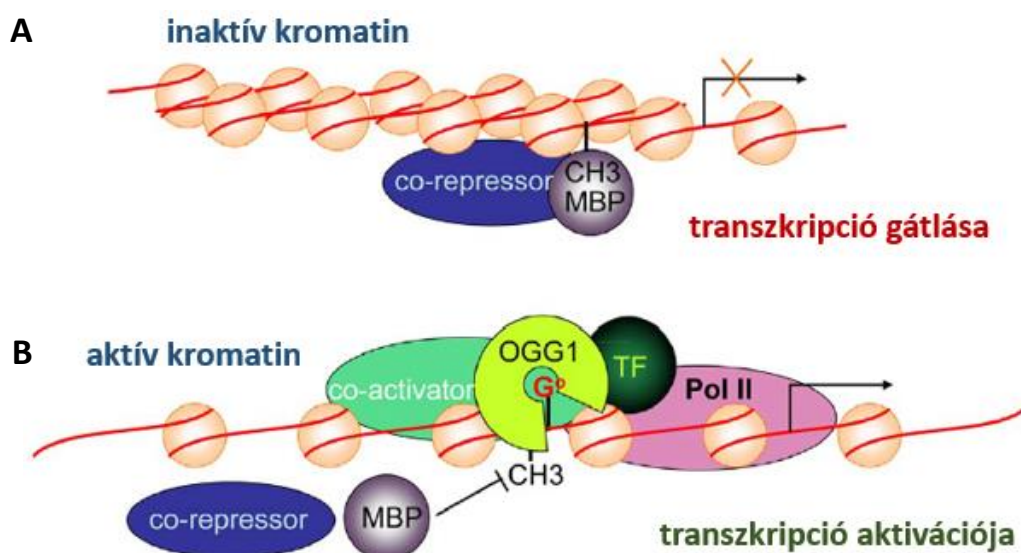


6. ábra: Az oxidatív stressz hatása az OGG1-re. Fiziológias körülmények között az OGG1 felismeri és kivágja a hibás bázist, majd a hibajavítási folyamatot az APE1, DNS polimeráz β és DNS ligáz fejezi be. Intenzív oxidatív stresszállapotban az enzim elveszíti katalitikus aktivitását, ugyanakkor továbbra is képes a 8-oxoG kötésére és kifordítására a DNS hélixből, valamint az oxidált guaninnal párban lévő citozinnal való interakcióra. Ez a redox-egyensúly helyreálltáig tartó hajlását eredményezi a DNS-nek, mely elősegíti az NF- κ B bekötődését és a transzkripció apparátus összeszerelődését. (Saját ábra, amely BioRender.com szoftverrel készült.)

A transzkripció aktivitásban fontos szerepet tölt be a 8-oxoG génszabályozó régió belüli pozíciója. Amennyiben guanin oxidációs módosulása a NF- κ B kötőhelytől 8-11 bázispárnyi távolságra, az upstream régióban helyezkedett el, az OGG1 bekötődése növelte az NF- κ B DNS-kötő aktivitását a 8-oxoG-t nem tartalmazó (natív) szekvenciához képest. Ezzel szemben, ha a guanin lézió az NF- κ B kötőmotívumban vagy ahhoz közeli régióban volt, csökkent a transzkripció faktor kötődési affinitása a natív szekvenciához viszonyítva. Utóbbi jelenség magyarázata az lehet, hogy ezekben az esetekben az OGG1 mintegy „pajzsként” funkcionálva, nem hagy helyet további faktorok bekötődésének [165]. A kutatók az NF- κ B kötőmotívum környező szekvenciáit (10 bázispár távolság az NF- κ B kötőregiótól upstream és downstream irányban) vizsgálva kimutatták, hogy a guanin előfordulásának mértéke az upstream régió -8 és -10 bázispár pozícióiban a legmagasabb. Ez megerősíti azt a feltevést, mely szerint az upstream régió távolabbi pozícióiban gyakoribb az oxidált guaninok

előfordulása is, és hogy ezek az OGG1-gyel együtt fontos szerepet játszhatnak a transzkripció faktorok bekötődésében, valamint a gyulladásos folyamatok progressziójában [3] [163] [166].

Egy másik teória szerint a guanin oxidációja és az OGG1 hozzájárulhat a citozin metilációjához köthető transzkripció represszió feloldásához. A DNS metiláció egy klasszikus epigenetikai marker, ami főként a CpG dinukleotidokban is megtalálható citozint érintő módosulás. A CpG-dinukleotidok általában klaszterek formájában fordulnak elő a gének promóter szakaszában, illetve különböző regulátor régiókban, úgynevezett CpG-szigeteket alkotva. A citozin metilációja a promóter régiókban közvetlenül gátolja a transzkripció faktor bekötődését a génexpresszió gátlásához vezetve [166]. A gátlás történhet közvetett módon is, pl. a metilált CpG szigetekhez kötődő metil-CpG-kötő fehérjén (MBP) keresztül [3]. A metilált citozin MBP általi felismerésében és kötésében fontos szerepet játszik a DNS nagy árkában lévő guanin 6O és 7N atomja [167]. Az enzim további fehérjék (pl. hiszton deacetiláz) bekötődését indukálja a metilált citozin helyére, amely kondenzált kromatinstruktúrához és a gének inaktivitásához vezet [168]. Valinluck és mtsai. leírták, hogy a 8-oxoG lézió a CpG szigetben gátolta az MBP bekötődését, aminek a guanin oxidációja során bekövetkező – a bázis 7N atomját érintő – módosulás lehet az oka. Azt feltételezték, hogy az MBP bekötődésének gátlását fokozza a 8-oxoG-hez kapcsolódott OGG1, ami a DNS allosztérikus módosulását előidézve erősíti a represszió feloldását [169].



7. ábra: Az OGG1-DNS komplex feloldja a transzkripció gátlást, amit a citozin metilációja (CH3) okoz. (A) Az MBP felismeri a metilált-CpG szigeteket és a ko-repressziós molekulák toborzásával a transzkripció gátlását okozza. (B) Az OGG1 a metilált citozinnal párban lévő oxidált guaninhoz kötődik, indukálja a transzkripció gépezet összeszerelődését és ezáltal akadályozza az MBP interakcióját a szubsztrátjával, amely a transzkripció aktivációjához vezet (Forrás: Xueqing Ba és mtsai., 2018).

IV.7.3 Az OGG1 „kiütésének”/gátlásának vizsgálata különböző oxidatív stressz és gyulladásos modellekben

Fiziológias körülmények között az OGG1 gén inaktivációja a 8-oxoG szintjének közel 6-szoros emelkedéséhez vezetett az egerekben, ennek ellenére az állatok élettartama nem csökkent, nem mutattak jelentős patológiai elváltozásokat, és nem volt szignifikáns különbség a mutáció gyakoriságában. Az oxidatív ágenssel (kálium-bromát) kezelt OGG1^{-/-} egerekben viszont 70-szeresére nőtt a 8-oxoG szintje, és 2,9-szer magasabb volt a mutáció gyakorisága a vad típusú egerekhez képest. Az eredmények jelzik, hogy az OGG1 kulcsfontosságú szerepet játszik a 8-oxoG léziók javításában, illetve, hogy az oxidált guaninok akkumulálódása hozzájárulhat egyes betegségek kialakulásához [3] [170].

Mabley és mtsai. az OGG1 szerepét különböző gyulladásos modellekben vizsgálták. Az OGG1^{-/-} egerek ellenállóbbnak bizonyultak a lipopoliszachariddal kiváltott endotoxin sokkal és az oxazonon indukált gyulladással (kontakt hiperszenzitivitás) szemben. A sztreptozotocin beadásával indukált I-es típusú diabétesz modellben az OGG1 knockout egerekben szignifikánsan alacsonyabb volt a vércukor és magasabb az inzulin szint, valamint a diabétesz is kisebb számban alakult ki bennük [171]. Li és mtsai. az OGG1 szerepét légúti gyulladásban vizsgálták, melyet az ovalbumin (OVA) intranazális adásával váltottak ki. Az OGG1^{-/-} egerekben szignifikánsan csökkent a gyulladásos sejtek mennyisége, a STAT6 és NF- κ B a foszforilációjának mértéke és a proinflammatorikus citokinek szintje a tüdőben [172].

Boldogh István magyar biokémikus nevéhez fűződik az OGG1 szelektív inhibitorának, a TH5487-nak a fejlesztése. A TH5487 az OGG1 aktív centrumához kötődik, ezáltal gátolja az enzim 8-oxoG-hez való kötődését és javítását. Az OGG1 inhibitor hatását először *in vitro* kísérletben vizsgálták, melyben kálium-bromáttal (KBrO₃) indukáltak 8-oxoG léziókat T-limfocita sejtekben (Jurkat-3). A TH5487 alkalmazása növelte a 8-oxoG léziók számát, viszont nem volt hatással a sejtek proliferációjára [173]. Annak a hipotézisnek a megerősítésére, miszerint az inhibitor gátolja az OGG1 kötődését a 8-oxoG-hez, a fakítást követő fluoreszcens jelvizsgálat (FRAP) módszerét használták, zöld fluoreszcens proteinnel (GFP) fuzionált OGG1-et expresszáló oszteosarkóma sejtekben (U2OS). A KBrO₃-tal kezelt sejtekben erős OGG1-kromatin kötődést (lassabb fluoreszcencia-visszatérés) detektáltak a kontroll sejtekhez képest. A KBrO₃-tal és TH5487-tel kezelt sejtek nukleuszában a fluoreszcencia-visszatérés gyorsult, amiből az OGG1 nagyobb mértékű mobilitására, és ezáltal az OGG1 DNS-hez való kötődésének gátlására következtettek [174]. Az OGG1 inhibitor hatását TNF- α -val indukált *in vitro* és *in vivo* gyulladásos modellben is megvizsgálták. A TH5487 csökkentette a

proinflammatorikus citokinek expresszióját a tüdő hámsejtekben (MLE-12) és az egerek tüdejében egyaránt [173].

Az akut pankreatitisz okának és terápiájának kérdéskörében szerteágazó kutatások folynak. Az elmúlt évtizedekben ígéretes eredmények és tudományos munkák láttak napvilágot. Az irodalmi áttekintésben válogatott tanulmányokon keresztül kívántam bemutatni és rendszerezni az akut pankreatitisz gyulladásának kiváltó okait és csökkentésére irányuló nemzetközi és hazai szakirodalmat. A magyar nyelvű szakirodalomból e tekintetben kiemelkednek Prof. Dr. Boldogh István és Prof. Dr. Hegyi Péter tanulmányai, akiknek az eredményeire nagymértékben támaszkodtam. Továbbá szeretnék köszönetet mondani opponenseimnek, Dr. habil. Röszer Tamásnak és Dr. Ujhelyi Zoltánnak, akik értékes tanácsokkal és lényeglátó kérdésekkel segítették disszertációm végleges formába öntését.

V. Célkitűzések

Az akut hasnyálmirigy-gyulladás incidenciája az elmúlt évtizedekben növekvő tendenciát mutat az életmóddal összefüggésbe hozható rizikófaktorok (helytelen táplálkozás okozta epekő kialakulása, krónikus alkoholfogyasztás) egyre gyakoribbá válása miatt. A betegség halálozási aránya – a gyors orvosi beavatkozás ellenére is – elfogadhatatlanul magas, aminek az az oka, hogy a betegséget kiváltó tényező sok esetben nem felderíthető. Az etiológiai tényezők ismeretének hiányában a terápiás törekvések a gyulladás kezdeti fázisának a megfékezésére irányulnak [1] [14].

Olyan molekulák vizsgálatát tűztük ki célul, amelyek hipotézisünk szerint a pankreasz gyulladásos folyamataiban szerepet játszhatnak. A patomechanizmus feltárásával lehetőség nyílhat további terápiák kifejlesztésére és a mortalitás arányának csökkentésére.

Az elmúlt évtizedekben számos tanulmány számolt be arról, hogy a reaktív oxigéngyökök már az AP korai szakaszában felszabadulnak és fontos szerepet játszanak a betegség kialakulásában [2] [175] [176]. Az oxidatív gyökökkel foglalkozó kutatások egyik legújabb fejleménye, hogy a DNS-ben keletkező 8-oxoG léziók közvetlenül is hozzájárulnak a gyulladásos folyamatokhoz. Ebben szerepe van az oxidált guanin javítását végző enzimnek, az OGG1-nek is, melynek jelentősége az AP patomechanizmusában még feltáratlan területnek számít [3] [163] [165].

A DE ÁOK Orvosi Vegytani Intézet Oxidatív stressz és PARilációs munkacsoportja hosszú idő óta kutatja a reaktív oxigén tartalmú intermedierek által kiváltott DNS-törés – PARP aktivációs útvonal szerepét a sejthalálban és különböző betegségek patomechanizmusában. Mivel a PARP-1 a sejt NAD⁺ szintjének egyik fő meghatározó eleme, így feltevésünk szerint az enzim ígéretes célpont lehet a nekrotizáló pankreatitisz megelőzésében.

Munkám során az alábbi célokat tűztem ki:

- a gyulladásos modell beállítása C57BL/6 egerekben
- a primer acinus sejtek izolálási és kezelési protokolljának optimalizálása
- az OGG1 enzim szerepének vizsgálata az AP-ben az OGG1 szelektív inhibitorának (TH5487) alkalmazásával *in vitro* és *in vivo* kísérletekben
- az OGG1 gátlás PARilációra és PARP-1 enzimre kifejtett hatásának vizsgálata
- a PARP-1 enzim szerepének feltárása az AP-ben PARP-1 knockout egerekben, és a belőlük izolált primer acinus sejtekkel folytatott kísérletekben

VI. Anyagok és módszerek

Anyagok	Cégek
○ cerulein [HY-A0190]	Medchemexpress LLC (Monmouth Junction, NJ, USA)
○ TH5487 [Axon 2934]	Axon Medchem LLC (Reston, VA, USA)
○ α -amiláz kit [47461] ○ lipáz kit [49361]	Diagnosticum Zrt. (Budapest, Magyarország)
○ Collagenase NB 8 Broad Range enzim [S1745602]	Nordmark Pharma GmbH (Uetersen, Németország)
○ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) [D6429] ○ fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF) [P7626] ○ hexadecil-trimetilammónium-bromid (HTAB) [H9151] ○ 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) [T2885] ○ proteáz inhibitor koktél (PIC) [P8340] ○ hidrogén-peroxid (H ₂ O ₂) [31642] ○ Calcein-AM [17783] ○ Triton X-100 [T8787]	Sigma-Aldrich Kft. (Budapest, Magyarország)
○ főtális szarvasmarha szérum (FBS) [FB-1090] ○ penicillin–sztreptomycin [LM-A4118]	Biosera Europe (Nuaillé, Franciaország)
○ 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) [A2231]	AppliChem GmbH (Darmstadt, Németország)
○ dimetil-szulfoxid (DMSO) [02610]	Molar Chemicals Kft. (Halásztelek, Magyarország)
○ PARP-1 antitest [46D11]	Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA)
○ NucleoSpin RNA Plus Kit [740984.50]	Macherey-Nagel (Düren, Németország)

○ High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit [4368813]	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
○ 2X qPCRBIO Sygreen Mix Lo-ROX reagents [LPCR10501L]	PCR Biosystems (London, UK)
○ anti-8-Oxoguanine antitest [ab48508] ○ anti-hasított PARP-1 antitest [ab32064]	Abcam (Cambridge, UK)
○ LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit [20148] ○ Trevigen™ Sample Prep [3950-075-SP] ○ RNaseZap™ [AM9780] ○ 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) [D1306] ○ Hoechst 33342 [62249] ○ CellEvent™ Caspase-3/7 Detection reagents [C10423] ○ SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent reagents [34578] ○ DRAQ5™ Fluorescent Probe Solution [62251] ○ SYTOX™ Green Nucleic Acid Stain [S7020]	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
○ One Step Poly HRP reagents [HK595]	BioGenex (Fremont, CA, USA)
○ Nuclear Fast Red Counterstain [H-3403] ○ Mouse-on-Mouse (MOM) Kit [BMK-2202]	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
○ anti-NF-κB p65 antitest [D14E12]	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)
○ CytoScan™ LDH Cytotoxicity Assay [786-210]	G-Biosciences (St. Louis, MO, USA)
○ monoklonális anti-PAR antitest 10 H hibridóma sejtek felülúszójából telített ammónium-szulfát oldattal történő tisztítással készült a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében	

2. táblázat: A kísérletekhez használt anyagok listája.

VI.1 Akut pankreatitisz állatmodellje

Az állatkísérleteket a DE Élettudományi Épület Kísérleti Állatházában végeztük 6-8 hetes hím C57BL/6 egereken, a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága (DEMÁB) által jóváhagyott és regisztrált engedély (25/2017/DEMÁB) alapján. Az állatokat 1284L Eurostandard Type II ketrecben tároltuk, hozzáférésük a táphoz és az ivóvízhez *ad libitum* történt. Az egerek az előírásoknak megfelelően szabályozott (21-23°C, 30-60% relatív páratartalom, 12 óránként váltakozó fény-sötét periódus) körülmények között voltak tenyésztve és fenntartva. Az előkísérletben az egereket két kezelési csoportra osztottuk: kontroll csoport és TH5487-tel előkezelt csoport. A TH5487 feloldását és adagolását Visnes és mtsai. publikációjában leírtaknak megfelelően végeztük [173]. Az első csoportban az egereket a TH5487 vivőanyagával (5% DMSO-t és 10% TWEEN 80-at tartalmazó fiziológiás sóoldat) oltottuk be intraperitoneálisan (i.p.), míg a második csoportban az egereket 30 mg/kg TH5487-tel kezeltük elő. Ezt követően mindkét esetben az állatokat 8 darab fiziológiás sóoldatot (0,9 % NaCl) tartalmazó oltásban részesítettük óránkénti elosztásban. További kísérleteinkben az egereket három kísérleti csoportra osztottuk: kontroll csoport, ceruleinnel kezelt csoport, ceruleinnel és TH5487-tel kezelt csoport. Utóbbi két csoportban a hasnyálmirigy-gyulladást a cerulein (50 µg/kg) óránkénti i.p. injekciójával, összesen 8 oltást beadva, váltottuk ki. A kontroll egerek fiziológiás sóoldatot kaptak cerulein helyett. A cerulein + TH5487 csoportban, az egerek 1 órával az első cerulein oltás előtt kapták meg a TH5487-et (30 mg/kg) tartalmazó i.p. injekciójukat, miközben a kontroll és cerulein csoportban a TH5487 vivőanyagával oltottuk be az egereket. Az állatokat 10 órával az első cerulein oltás után izoflurán adagolásával túlaltattuk, a szívből vért vettünk, és a hasnyálmirigyet eltávolítottuk. A pankreasz egy részét 10%-os formalin oldatba helyeztük szövettani vizsgálatokhoz, másik részét lefagyasztottuk MPO esszére, maradék részét különböző lízis pufferekbe raktuk RNS izolálás és citokin array végzése céljából.

VI.2 Szérum α -amiláz és lipáz mérés

A vért 3000 RCF-en 15 percig centrifugáltuk, majd a szérumot összegyűjtöttük, és felhasználásig -80 °C-on tároltuk. Az enzimek aktivitását kolorimetriás esszében mértük a Diagnosticum Zrt. kitjével. Az abszorbancia változást az amiláznál 405 nm-en, a lipáz esetében 580 nm-en detektáltuk, melyhez Tecan Spark plate olvasót (Tecan, Männedorf, Svájc) használtunk. A szérum α -amiláz és lipáz szint változását a kontroll csoporthoz viszonyítva fejeztük ki.

VI.3 Mieloperoxidáz (MPO) mérés

Az MPO egy lizoszomális fehérje, amely legnagyobb mértékben a neutrofil granulocitákban expresszálódik és az azurofil granulumokban tárolódik. A neutrofilek aktivációjával a granulumok az extracelluláris térbe szekretálódnak, ebből kifolyólag az MPO aktivitásból a granulocita infiltráció mértékére lehet következtetni [177]. Az MPO mérést Mota és mtsai. cikkében leírt módszer alapján végeztük az alábbi változtatásokkal: a lefagyasztott mintákat 20 mM foszfát pufferben homogenizáltuk golyós homogenizátorral, majd 16 000 RCF-en 15 percig 4°C-on centrifugáltuk [153]. A keletkezett pelletet újraszuszpendáltuk 0,5% HTAB-ot tartalmazó 50 mM foszfát pufferben. Az enzim feltárásnak érdekében a homogenizátumot háromszor fagyasztás-olvasztás ciklusoknak vetettük alá, majd pulzálva szonikáltuk. Ezután a mintákat 16 000 RCF-en 4 °C-on centrifugáltuk és a felülúszóhoz TMB-t (3,2 mM) és H₂O₂-ot (0,4 mM) adtunk, majd az elegyet 37 °C-on inkubáltuk 90 másodpercig. A reakciót 2 M H₂SO₄-val állítottuk le, melyet követően az oldat abszorbanciáját 450 nm-en mértük le Tecan Spark plate readert használva. Az abszorbanciaértékeket a minták fehérjetartalmára normalizáltuk, és az MPO szint változását a kontroll csoporthoz viszonyítva fejeztük ki.

VI.4 Hisztológiai vizsgálatok

A pankreasz hisztopatológiai vizsgálatához a szövetet 10%-os formalinban fixáltuk 48 órán keresztül, majd a dehidrációt követően paraffinba ágyasztuk, és 4 µM-os metszeteket készítettünk. A metszeteken deparaffinálás után hematoxilin-eozin (H&E) festést végeztünk. A hematoxilin egy bázikus festék, a nukleinsavhoz kötődve liláskék színűre festi a sejtmagot, míg az eozin egy savas festék, mely pozitív töltésű fehérjékhez kötődik, rózsaszín színűre festve a citoplazmát. A festés kiértékelését a Debreceni Egyetem Patológia Intézetének munkatársa, Dr. Balázs Lídia végezte, aki az ödéma, leukocita infiltráció és nekrosis mértékét egy 0-tól 3-ig terjedő skálán pontozta (3. táblázat).

Patológiai elváltozások	0	1	2	3
Ödéma	nincs	enyhe	mérsékelt	súlyos
Infiltráció	nincs	alacsony	moderált	magas
Nekrózis	nincs	0-33%	34-66%	67-100%

3. táblázat: A patológiai elváltozások pontozási rendszere.

VI.5 Immunhisztokémiai vizsgálatok

A PARP-1-et és hasított PARP-1-et a pankreaszban immunfestés módszerével vizsgáltuk. Az antigén feltárását PARP-1 esetén citrát pufferben (pH 6,0), hasított PARP-1-nél TRIS/EDTA pufferben (pH 9,0) végeztük. Az endogén peroxidázokat 3%-os H_2O_2 -ot tartalmazó desztillált vízzel gátoltuk 5 percig, majd Tris-sel pufferelt sóoldatban (TBS) mostuk a metszeteket. A blokkoláshoz 5%-os FBS-t és 0,2% Triton X-100-at tartalmazó TBS-t használtunk 30 percig. Ezt követően a lemezeket 1:100 hígításban, intakt vagy hasított PARP-1 ellen termeltetett antitesttel inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on. A következő napon a metszeteket TBS-sel mostuk három alkalommal, majd One-Step Polymer-HRP másodlagos antitesttel inkubáltuk a gyártó utasítása alapján. Ezt követően frissen készített DAB elegyet [0,1g nikkel-szulfát (NiSO_4), 0,08g nátrium-klorid (NaCl) és 0,0047g 3,3'-diaminobenzidine (DAB) 10 ml 0,1 M acetát pufferben (pH 6,0) oldva, amihez 1,25 μL H_2O_2 -ot pipettáztunk] tartalmazó oldatba helyeztük a lemezeket 5 percre. A DAB-ot a peroxidáz oxidálja, amely sötétbarna precipitátum képződéséhez vezet az enzimreakció helyén. A jel erősítésére 0,5%-os CoCl_2 oldatot használtunk 5 percig. A szövetet Nuclear fast red-del festettük, ami a sejtmagot pirosra, a citoplazmát rózsaszínre színezi. A festések kiértékelésére a szín dekonvolúció módszerét használtuk a QuPath szoftverben, ami lehetővé tette a DAB jel digitális elkülönítését a szöveten belül.

VI.6 Immunfluoreszcens festés

A 8-oxoG szint változását immunfluoreszcencia módszerével vizsgáltuk a pankreaszban. Az antigének feltárásához citrát puffert (pH 6,0) használtunk. Ezt követően 4 M HCl-val kezelés következett a DNS denaturálása céljából, majd 50 mM Tris-base oldatban inkubáltuk a metszeteket a sav semlegesítése végett. Ezután a M.O.M kitet használva blokkoltuk és festettük a szövetet a gyártó utasításai alapján. A sejtmagokat DAPI-val festettük, majd foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS) kimostuk a felesleges festéket.

A PAR festéshez az antigén feltárást citrát pufferben (pH 6.0) végeztük. A nem specifikus kötőhelyek blokkolása 2% BSA oldattal (PBS-ben) történt 1 órán keresztül. Az elsődleges antitesttel (10H, 3 $\mu\text{g/mL}$ koncentráció) egy éjszakán át inkubáltuk a metszeteket 4°C-on, majd háromszori mosás következett PBS-sel, a másodlagos antitesttel (Alexa 633, 1:500 hígítás, 1 órán át) való inkubálás előtt. A sejtmagokat itt is DAPI festéssel vizualizáltuk, majd a felesleges festéket kimostuk. A mikroszkópos felvételeket a Leica TCS SP8 konfokális mikroszkóppal (Leica Microsystems, Wetzlar, Németország) készítettük és a CellProfiler

szoftver segítségével értékeltük ki. Az Alexa 633 átlag fluoreszcens intenzitást a sejtmagokban mértük, amelyeket DAPI festés alapján szegmentáltunk.

VI.7 Citokinek mérése

A hasnyálmirigyet magas proteáz tartalma miatt azonnal 4°C fokos lízis pufferben [20 mM TRIS-HCl (pH 7,5), 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% glicerol, 2 mM PMSF, 2% PIC] vettük fel, majd a TissueRuptor II-vel homogenizáltuk és felhasználásig -80°C-on tároltuk. A homogenizátumot 10 000 RCF-en 5 percig centrifugáltuk, majd a felülúszóban mértük a citokineket a Proteome Profiler Mouse Cytokine Array kit segítségével a gyártó utasításai alapján. A citokineket a membránon kemilumineszcenciás módszerrel detektáltuk Bio-Rad ChemiDoc Imager (Bio-RAD, Hercules, California, USA) készülék segítségével. A pixel intenzitást az ImageLab szoftverrel kvantifikáltuk.

VI.8 RNS izolálás, reverz transzkripció és valós idejű kvantitatív PCR

Az RNS izolálást a szövetből Macherey-Nagel NucleoSpin RNA Plus kit-tel végeztük a gyártó leírása alapján. A pankreasz magas RNáz tartalma miatt a szövetmintákat azonnal hűtött lízis pufferbe tettük, és a Quigen TissueRuptor II-vel homogenizáltunk, majd az izolálás megkezdéséig -80°C-on tároltuk, hogy elkerüljük az RNS bomlását. Az izolálás során a munkafelületet és az eszközöket RNaseZap-pal fújtuk le, illetve RNáz-mentes pipettahegyeket használtunk. 2 µg RNS-t használtunk a reverz transzkripcióhoz, amit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-tel végeztünk a gyártó utasításainak megfelelően. A qPCR-hez 2X qPCRBIO Sygreen Mix-et használtunk és a Roche Lightcycler 480II (Roche, Basel, Switzerland) készülékkel végeztük. A felhasznált primerek szekvenciáját a 4. táblázat tartalmazza.

Gén	Forward primer (5→3)	Reverse primer (5→3)
<i>Ccl2</i>	CACTCACCTGCTGCTACTCA	GCTTGGTGACAAAACTACAGC
<i>Ccl4</i>	CCCACCTTCCTGCTGTTTCTCT	GCCTCTTTTGGTCAGGAATACCA
<i>Ccl12</i>	AAGCAGAAGATTCACGTCCG	ATCCAGTATGGTCCTGAAGATCAC
<i>Il23</i>	CCAGCGGGACATATGAATCTAC	TGTCCTTGAGTCCTTGTGGG
<i>Il16</i>	AACTCCTCTACTGACTCCGC	ACCCTGTTCTGTCCCTTTGA
<i>Il10</i>	GCTGTCATCGATTCTCCCT	GACACCTTGGTCTTGGAGCTTAT
<i>Csf1</i>	GCCCTTCTTCGACATGGCT	CCTTCAGGTGTCCATTCCCA
<i>Trem1</i>	TGCCACTTCATACACTGGGT	ATTGTGGAGAAGTCGAGGCA
<i>Il1ra</i>	CATTGCTGGGTACTTACAAGGA	AGTGATGTAACTTCCTCCAGC
<i>Il6</i>	TTCTTGGGACTGATGCTGGT	CCATTGCACAACTCTTTTCTCA
<i>Il1b</i>	TGCCACCTTTTGACAGTGATG	ATGTGCTGCTGCGAGATTTG
<i>Tnfa</i>	GGATGAGAAGTTCCCAAATGGC	TGTCTTTGAGATCCATGCCG
<i>Rps26</i>	CCACAATTCAGACCTGCTG	GGGTAATTTTCCTTCCGTCCT
<i>36b4</i>	GGACCCGAGAAGACCTCCTT	GCACATCACTCAGAATTCAATCC

4. táblázat: A qPCR-hez használt primerek szekvenciái.

VI.9 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

EMSA kísérletben vizsgáltuk az OGG1 inhibitor hatását az NF-κB DNS-kötő aktivitására, amihez a LightShift Chemiluminescent EMSA Kitet használtuk a gyártó utasításainak megfelelően. A módszer elve az, hogy a gélben feszültség hatására a DNS-fehérje komplex lassabban vándorol mint a DNS önmagában, ami egy elmosódott sávot, „shiftet” eredményez. A hasnyálmirigyet 30 perccel az első oltás után távolítottuk el a fiziológiás sóoldattal (Ctr) vagy ceruleinnel (50 µg/kg) oltott (CE) egerből, majd sejtmagot izoláltunk a szövetből. A magextraktumot különböző koncentrációjú (2,5 µM, 5 µM, 10 µM) TH5487-tel inkubáltuk 1 órán keresztül a DNS próba hozzáadása előtt. Ezt követően a magextraktumot módosítatlan (natív) vagy 8-oxoG-vel módosított, biotinnal jelölt, duplaszálú, NF-κB kötőrégiót tartalmazó DNS oligonukleotiddal inkubáltuk. Az oligonukleotid-szekvenciákat az

5. táblázat foglalja össze. A NF- κ B kötődés specificitását kompetíciós kísérletekben teszteltük, amelyben a biotinnal jelölt próba mellé 200-szoros mennyiségű jelöletlen natív oligonukleotidot adtunk a reakcióelegyhez. Ezután az elegyeket 4%-os natív poliakrilamid gélben 100 V-on 25 percig futtattuk, majd pozitív töltésű nylon membránra transzferáltuk. A membránt 1% BSA oldattal (PBS-ben oldva) blokkoltuk 1 órán át, majd sztreptavidin-tormaperoxidáz konjugátummal inkubáltuk 30 percen keresztül. Ezt követően a membránt 0,1% TWEEN 20-at tartalmazó PBS oldattal mostuk. Az oligonukleotidok detektálásához SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent reagenst használtunk. A membránfotók dokumentálása Bio-Rad ChemiDoc Imager készülékkel történt. Az eredményeket ImageLab szoftverrel értékeltük ki. Szupershift esszét végeztünk annak megerősítésére, hogy valóban az NF- κ B található-e a detektált fehérje-DNS komplexben. Ennek érdekében a magextraktumokat anti-NF- κ B p65 antitesttel inkubáltuk 1 órán keresztül a duplaszálú DNS próba hozzáadása előtt.

Módosítás	CCL2 promóter régiójából származó oligonukleotid-szekvenciák
natív próba	sense: 5 – CCCGAAGGGTCTG <u>GGA</u> ACTTCCAATACTGCC – 3 antisense: 5 – GGCAGTATTGGAAGTTCCCAGACCCTTCGGG – 3
8-oxoG módosítást tartalmazó próba	sense: 5 – CCCG* <u>A</u> AGGGTCTG <u>GGA</u> ACTTCCAATACTGCC – 3 antisense: 5 – GGCAGTATTGGAAGTTCCCAGACCCTTCGGG – 3

5. táblázat: Az EMSA-hoz használt próbák szekvenciái, az aláhúzás jelöli az NF- κ B-kötő régiót, a G* pedig a 8-oxoG módosítást.

VI.10 Primer acinus sejtek izolálása és kezelése

A primer acinus sejtekkel folytatott kísérlethez 6-10 hetes hím C57BL/6 egereket használtunk (Debreceni Egyetem Élettudományi Épület Kísérleti Állatház, kísérleti engedélyszáma: 25/2017/DEMÁB). Az állatokból izofluránnal történő túlaltatás után távolítottuk el a hasnyálmirigyet. Az izolálás menete megegyezik Gout és mtsai. publikációjában leírtakkal, az alábbi módosítással: az izolálás utolsó lépésében a sejteket tartalmazó oldatot nagy sűrűségű (8%-os) BSA oldat tetejére rétegeztük, hogy az izolálás során elpusztult sejteket és törmelékét elkülönítsük az életképes klaszterektől, amik a cső aljára ülepednek le [178]. A kollagenázzal történő emésztési időt úgy optimalizáltuk, hogy az izolálás végén több sejtből álló klasztereket kapjunk, ugyanis az elnyújtott emésztés a klaszterek túlzott mértékű disszociációjához, a sejtek polaritásának és szabályozott szekréciójának elvesztéséhez vezet [179]. A sejteket 96 lyukú sejtenyésző plate-be pipettáztuk, és 10% hőinaktivált FBS-

sel, 1% penicillin-sztreptomocinnal kiegészített DMEM High Glucose médiumban tartottuk fenn (37 °C, 5% CO₂). A kísérletek során a primer sejtek károsodását 24 órás cerulein kezeléssel idéztük elő, amit különböző koncentrációjú (1,25 µM, 2,5 µM, 5 µM) TH5487 előkezelés (1 óras) előzött meg az OGG1 inhibitor csoportban. A kontroll sejtek csak tenyésztőmédiumot kaptak. A kezelés lejártaival kalcein esszét, LDH mérést, Sytox Green festést, kaszpáz aktivációs esszét és comet esszét végeztünk.

VI.11 Életképesség vizsgálat

A sejtek életképességét kalcein esszével mértük. A Calcein-AM egy sejtp permeábilis festék, amit az intracelluláris észteráz enzimek hidrolizálnak a sejtek belsejében. Az acetoximetil-csoport hidrolízise zölden fluoreszkáló kalcein terméket eredményez, amely arányos az élő sejtek mennyiségével. A kezelési idő letelte után, a sejtekhez Calcein-AM-et adtunk 1 µM végkoncentrációban, majd a plate-et 45 percen keresztül 37 °C-on inkubáltuk. A sejtekből felszabaduló fluorescens jelet a Tecan Spark fotometriás készüléken mértük le 530 nm-en (485 nm-es gerjesztés mellett). Az életképességet a kontroll csoporthoz viszonyított százalékban fejeztük ki.

VI.12 Nekrózis meghatározása LDH esszével

A sejtmembrán sérülése során laktát dehidrogenáz (LDH) szabadul ki a sejtekből. A felülúszóba került LDH mennyiségéből a nekrotikus sejtpusztulás mértékére lehet következtetni, melynek meghatározásához kolometriás mérésen alapuló LDH kitet használtunk. A pozitív kontrollt LDH lízispufferrel lizáltuk, majd a plate-et 800 RCF-en 5 percig centrifugáltuk. A sejtek felülúszójából 50 µl-t leszívunk, és 50 µl LDH puffert adtunk hozzá. Az elegyet 20 percig inkubáltuk sötétben, majd az abszorbanciát 490 nm-en mértük le Tecan Spark plate reader segítségével. Az LDH-felszabadulás mértékét az alábbi képlettel számítottuk ki:

$$\text{relatív LDH-felszabadulás (\%)} = 100 \times (\text{OD}_{\text{kezelt sejtek}} - \text{OD}_{\text{kontroll}}) / (\text{OD}_{\text{pozitív kontroll}} - \text{OD}_{\text{kontroll}})$$

VI.13 Nekrózis meghatározása Sytox Green festéssel

A kezelések által kiváltott sejtpusztulást Sytox Green festéssel is megvizsgáltuk. Ez egy nukleinsav festék, ami nem képes áthatolni az élő sejtek intakt membránján, ezáltal a festődött sejtek mennyisége arányos a nekrózis mértékével. A sejteket 0,5 µM Sytox Green-nel és 2,5 µM DRAQ5-tel festettük meg. A DRAQ5 egy távoli vörös tartományban emittáló vörös festék,

ami intenzíven festi az élő és halott sejtek magját. A festést az Opera Phenix HCS (Perkin Elmer, Ealham, MA, USA) berendezéssel értékeltük ki, és az adatokat Harmony szoftverrel elemeztük. A Sytox Green átlag fluoreszcens intenzitást a sejtmagokban mértük, amelyeket DRAQ5 festés alapján szegmentáltunk.

VI.14 Apoptózis kimutatása kaspáz-aktiváció meghatározásával

Az apoptózis detektálására CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection reagenst használtunk. Ez egy 4 aminosavból álló peptiddel (DEVD) konjugált nukleinsav-kötő festék, amiben a DEVD peptid gátolja a festék DNS-hez való kötődését. Az apoptotikus sejtekben az aktivált kaspáz 3/7 hasítja a DEVD peptidet, lehetővé téve a festék DNS-hez való kötődését, amely fluoreszcens jelet eredményez. A sejtekhez a cerulein kezelésük kezdetén adtunk 7 μ M végkoncentrációban Caspase-3/7 Green Detection reagenst, majd az Opera Phenix HCA készülékkel 24 órán keresztül, 3 óránként mértük a fluoreszcens jel változását (ex/em: 502/530 nm) környezeti kontroll mellett (5% CO₂, 37 °C).

VI.15 Comet esszé

A comet esszé egy sejtszintű elektroforézis, amellyel a DNS károsodás mértéke határozható meg. A törött DNS „üstököst” formáz a gélben. Minél nagyobb a csóvahossz, annál nagyobb mértékű a DNS-károsodás. Kísérletünkben alkalikus comet esszét (pH ~ 12,3) végeztünk, amivel a DNS egyszálú törései mutathatóak ki. Az esszét a Trevigen FLARE™ kit alkalmazásával végeztük Regdon és mtsai. publikációjában leírtaknak megfelelően [180]. A kezelést követően a sejteket Eppendorf csövekbe gyűjtöttük, 4 °C-on centrifugáltuk, és jéghideg PBS-ben vettük fel 5 x 10⁵ sejt/ml koncentrációban. 10 μ l sejtsuszpenzióhoz 100 μ l 0,5%-os alacsony olvadáspontú agarózt adtunk, majd a sejtsuszpenzió-agaróz keverékből 30 μ l-t a kit tárgylemezére pipettáztunk. A tárgylemezt hűtőbe raktuk 30 percig, majd a kit lízis oldatába merítettük egy éjszakán át. Ezt követően a tárgylemezeket 10 percig az elektroforézis pufferben (0,03 M NaOH, 2 mM Na₂EDTA) inkubáltuk, majd 20 V-on, 25 percig, 4 °C-on futtattuk. A tárgylemezt desztillált vízben öblítettük le, és semlegesítettük, majd a sejtmagokat 10 μ g/ml propídium-jodiddal (PI) festettük. A képeket a Leica SP8 konfokális mikroszkóppal készítettük, és OpenComet szoftverrel elemeztük ki.

VI.16 PARP-1 enzim szerepének vizsgálata *in vivo*: egérkísérletek

A PARP-1 enzim szerepét ceruleinnel indukált AP modellben vizsgáltuk 6-8 hetes C57BL/6 hím, vad típusú (WT) és azonos genetikai háttérű PARP-1 KO (KO) egerekben. A kísérlethez az egereket Prof. Dr. Bay Péter szolgáltatta [181]. Négy kezelési csoportot különítettünk el: WT kontroll csoport, WT ceruleinnel kezelt csoport, KO kontroll csoport, és KO ceruleinnel kezelt csoport. A ceruleinnel kezelt egerek kezelési protokollja megegyezett a korábban leírtakkal: 8 db i.p. oltás óránkénti elosztásban, oltásonként 50 µg/kg cerulein. A kontroll egerek fiziológiás sóoldatot kaptak. Az egereket 10 órával az első cerulein oltás után túlaltattuk, majd a szérumból α -amiláz és lipáz szintet mértünk, a szövetből pedig meghatároztuk az MPO szintet.

VI.17 PARP-1 enzim szerepének vizsgálata *in vitro*: sejtéletképességi vizsgálatok primer acinus sejteken

A primer acinus sejteket 100 nM ceruleinnel kezeltük 24 órán keresztül, majd a sejtek életképességét MTT esszével vizsgáltuk. Az élő sejtekben a NAD(P)H-függő oxidoreduktáz enzim redukálja az MTT-t, ami lila formazán kristályok képződéséhez vezet. A sejteket 0,5 mg/ml MTT-oldattal inkubáltuk 30 percig. A médiumot leszívtuk, és a formazán-kristályokat 100 µl DMSO-ban oldottuk fel. Az abszorbanciát 590 nm-en mértük Tecan Spark mikroplate fotométeren. Az életképességet a WT kontroll csoporthoz viszonyított százalékban fejeztük ki.

A nekrozis mértékének megállapításához propídium-jodid festést végeztünk a primer sejteken. A PI a halott sejtekbe tud bejutni, a Hoechst viszont az élő és a halott sejtekbe is bejut, és mindkét festék a magot festi. A sejteket 2,5 µg/ml PI-dal és 5 µg/ml Hoechst-tel festettük 10 percig. A festést az Opera Phenix HCA berendezéssel értékeltük ki, és az adatokat Harmony szoftverrel elemeztük. A nekrotizáló sejtek mennyiségét (PI festés) az összes sejt (Hoechst festés) mennyiségének százalékában fejeztük ki.

VI.18 Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéseket GraphPad Prism 8 programmal végeztük. Az adatok normál eloszlását D'Agostino-Pearson tesztel ellenőriztük. A szignifikancia meghatározására ANOVA analízist és Tukey's post hoc tesztet használtunk. A sejtes eredmények három kísérlet átlagát mutatják. Az állatkísérletekben 6 egér volt az elemszám kezelési csoportonként. Az eredményeket átlag $\pm$ SD formában ábrázoltuk.

VII. Eredmények

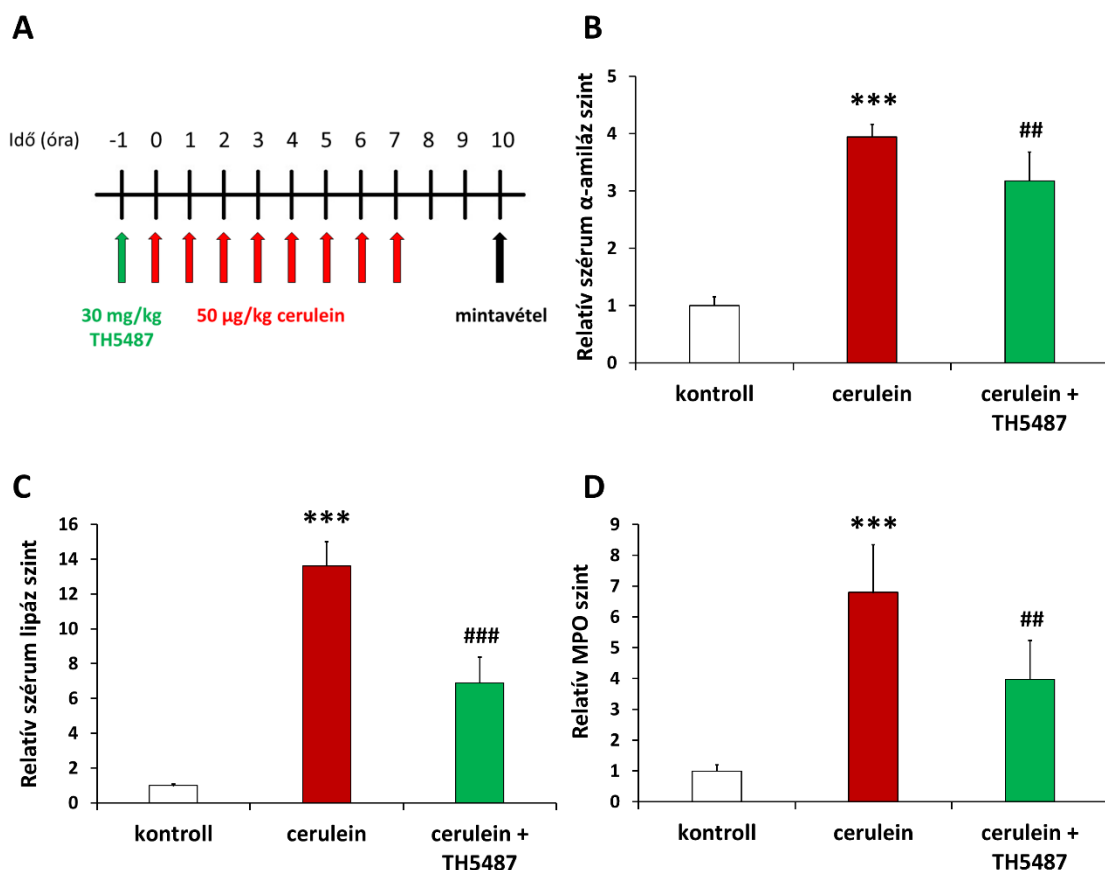
VII.1 Az OGG1 szerepének vizsgálata *in vivo* AP modellben

VII.1.1 Az OGG1 gátlásának hatása az acinus sejtek károsodására és a granulociták infiltrációjára

Az OGG1 enzim szerepét ceruleinnel indukált AP modellben vizsgáltuk. A cerulein modell előnye, hogy az acinus sejtek humán AP-ben megfigyelt strukturális változásai jól modellezhetőek állatkísérletekben. A szupramaximális koncentrációban alkalmazott cerulein gátolja az emésztőenzimek szekrécióját a pankreaszban, ami intrapankreatikus enzimaktivációhoz és a mirigy önemésztődéséhez vezet [72] [73]. Ennek következménye az, hogy a nekrotizáló acinus sejtekből az emésztőenzimek a szisztémás keringésbe kerülnek, mely a szérum amiláz és lipáz növekedését okozza. A szövetsérülés helyére a gyulladás progressziójáért felelős limfociták áramlanak.

Annak a hipotézisnek a megerősítésére, hogy a TH5487 nem toxikus az egerekre, végeztünk egy előkísérletet, amelyben az egereket két csoportra osztottuk: kontroll és kontroll + TH5487. Utóbbi csoportban az állatok előkezelésként 30 mg/kg TH5487-et tartalmazó oltást, míg a kontroll csoportban az OGG1 inhibitor vivőanyagát kapták meg. Ezt követően az egerek mindkét kezelési csoportban 8 alkalommal fiziológiás sóoldatot tartalmazó oltásban részesültek óránkénti elosztásban. A kontroll + TH5487 csoportban mért paraméterek (α -amiláz, lipáz, MPO) nem mutattak patológias eltéréseket a kontroll csoporthoz képest, ezért az előkísérlet eredményei nem kerülnek bemutatásra.

További kísérleteinkben három kezelési csoportot különítettünk el: kontroll, cerulein és cerulein + TH5487. Utóbbi csoportban az egereket 30 mg/kg TH5487-tel, amíg az első két csoportban a TH5487 vivőanyagával kezeltük elő. Ezután a gyulladást 8 db 50 μ g/kg dózisú cerulein i.p. oltással idéztük elő, mialatt a kontroll egerek fiziológiás sóoldatot kaptak. Kísérletünkben a cerulein kezelés 4-szeresére növelte a szérum α -amiláz, és 14-szeresére a szérum lipáz szintjét, továbbá nőtt az MPO szintje a pankreaszban, ami a granulociták infiltrációját jelzi. A TH5487 szignifikánsan csökkentette a vizsgált enzimek szintjét a szérumban, ami arra utal, hogy csökkent az acinus sejtek pusztulásának mértéke, valamint csökkent az infiltráló granulociták száma is (8. ábra).

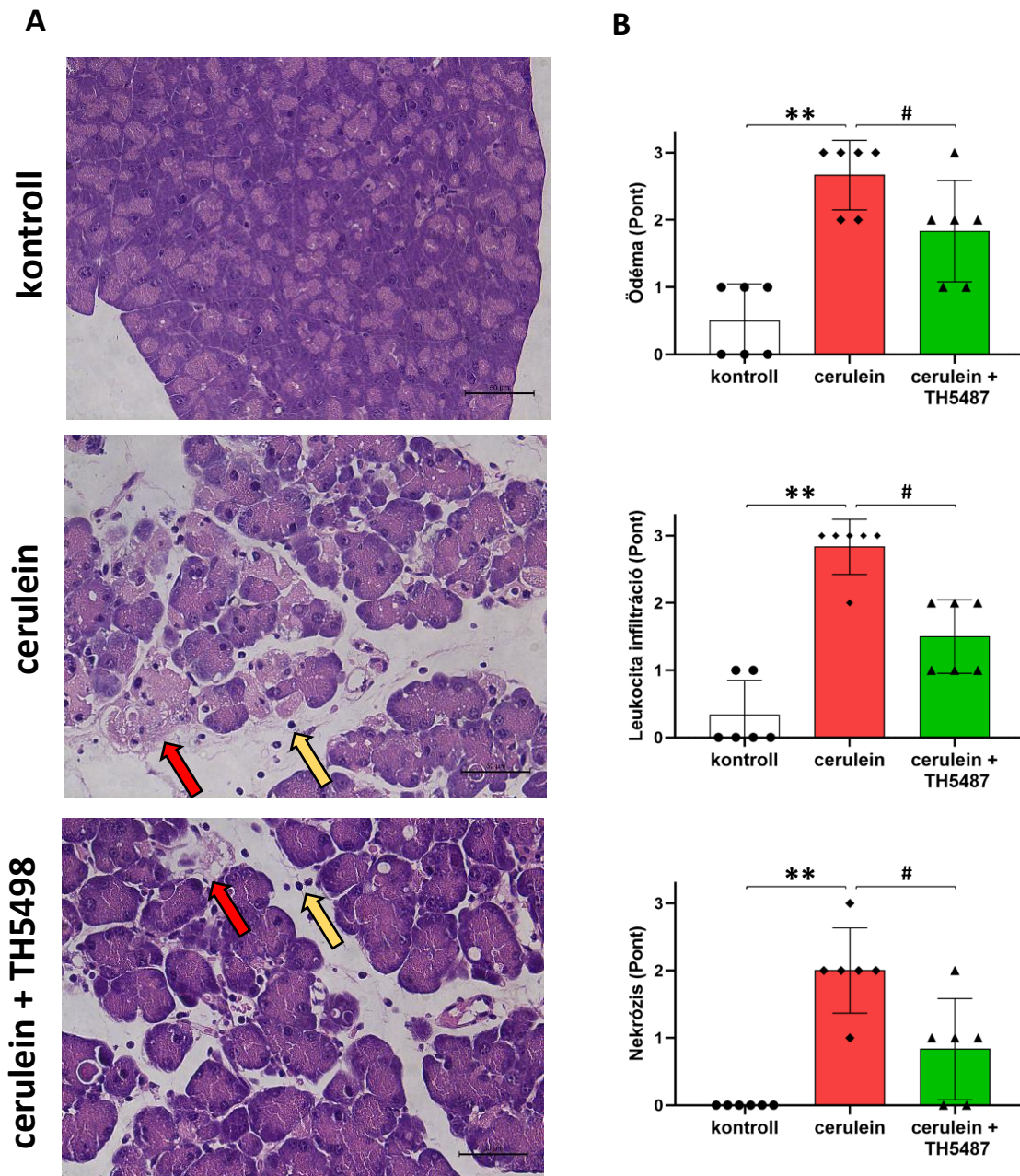


8. ábra: Az OGG1 gátlása csökkenti az acinus sejtek károsodását és az inflammatorikus sejtek extravazációját. Az oltási protokoll az (A) panelen látható. A vér és szövetminták begyűjtése 10 órával az első cerulein oltás után történt. A TH5487 szignifikánsan csökkentette a szérum α-amiláz (B), lipáz (C) szintet és a granulocita infiltráció mértékét (D). *** $p < 0,001$ vs. kontroll; ## $p < 0,01$ vs. cerulein, ### $p < 0,001$ vs. cerulein

VII.1.2 Az OGG1 gátlás hatásának tanulmányozása szövettani vizsgálatokban

VII.1.2.1 Általános szövetszövetmorfológia vizsgálata (H&E festés)

A cerulein ismételt beadása az AP-re jellemző hisztológiai változásokat idézett elő a pankreasban, úgymint intersticiális ödéma, a gyulladásos sejtek infiltrációja és az acinus sejtek pusztulása. Ennek vizsgálatára az egérből eltávolított hasnyálmirigyből paraffinos metszeteket készítettünk, amit hematoxilinnel és eozinnal festettünk meg. A morfológiai változásokat a Debreceni Egyetem Patológiai Intézetének munkatársa, Dr. Balázs Lídia értékelte ki, és 0-tól (nincs patológiai elváltozás) 3-ig (nagy mértékű elváltozás) terjedő skálán pontozta. A festés és kiértékelés eredményei a 9. ábrán láthatóak. Az OGG1 gátlása szignifikánsan csökkentette az intersticiális ödémát, az infiltráló immunsejtek számát és a nekrosis mértékét.

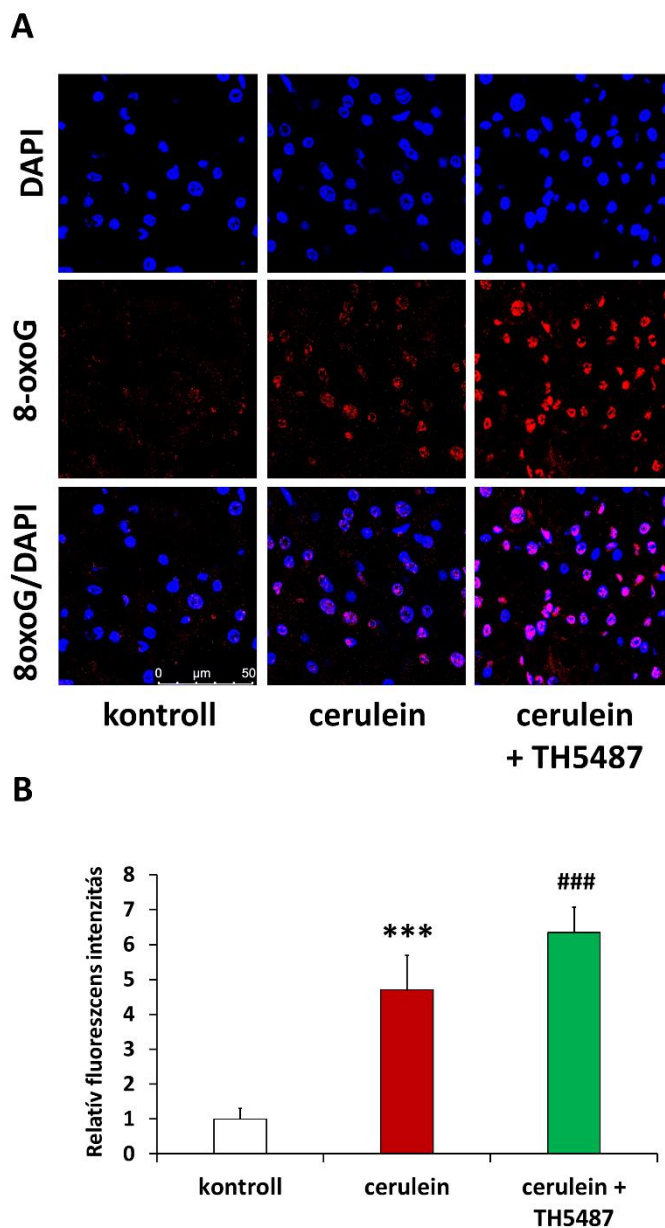


9. ábra: Az *OGG1* gátlása csökkenti a gyulladást és a pankreasz szöveti károsodásának mértékét. A H&E-nal festett pankreasz metszetek mikroszkópos fotója látható az (A) panelen 400x nagyításban (skála: 50 μ M). A piros nyíl mutatja a nekrotizáló szövetrészt, míg a sárga nyíl az infiltráló immunsejteket. A TH5487 szignifikánsan csökkentette az ödéma, az infiltráció és nekrózis mértékét (B). ** $p < 0,01$ vs. kontroll; # $p < 0,05$ vs. cerulein.

VII.1.2.2 Oxidatív DNS károsodás vizsgálata 8-oxoG immunfluoreszcens festéssel

Az akut pankreatitisz kialakulásában jelentős szerepe van a redox egyensúly felborulásának. A reaktív oxigén intermedierek károsítják a sejtek makromolekuláit. A ROS által okozott leggyakoribb DNS károsodás a 8-oxo-7,8-dihidroguanin, melynek javításában az

OGG1 enzim vesz részt [163]. Annak vizsgálatára, hogy a DNS glikoziláz gátlása hogyan befolyásolja a 8-oxoG mennyiségét a pankreaszban, immunfluoreszcens festést végeztünk. A sejtmagi 8-oxoG szint nőtt a ceruleinnel kezelt egerekben, aminek a mennyiségét tovább növelte a TH5487 kezelés (10. ábra).

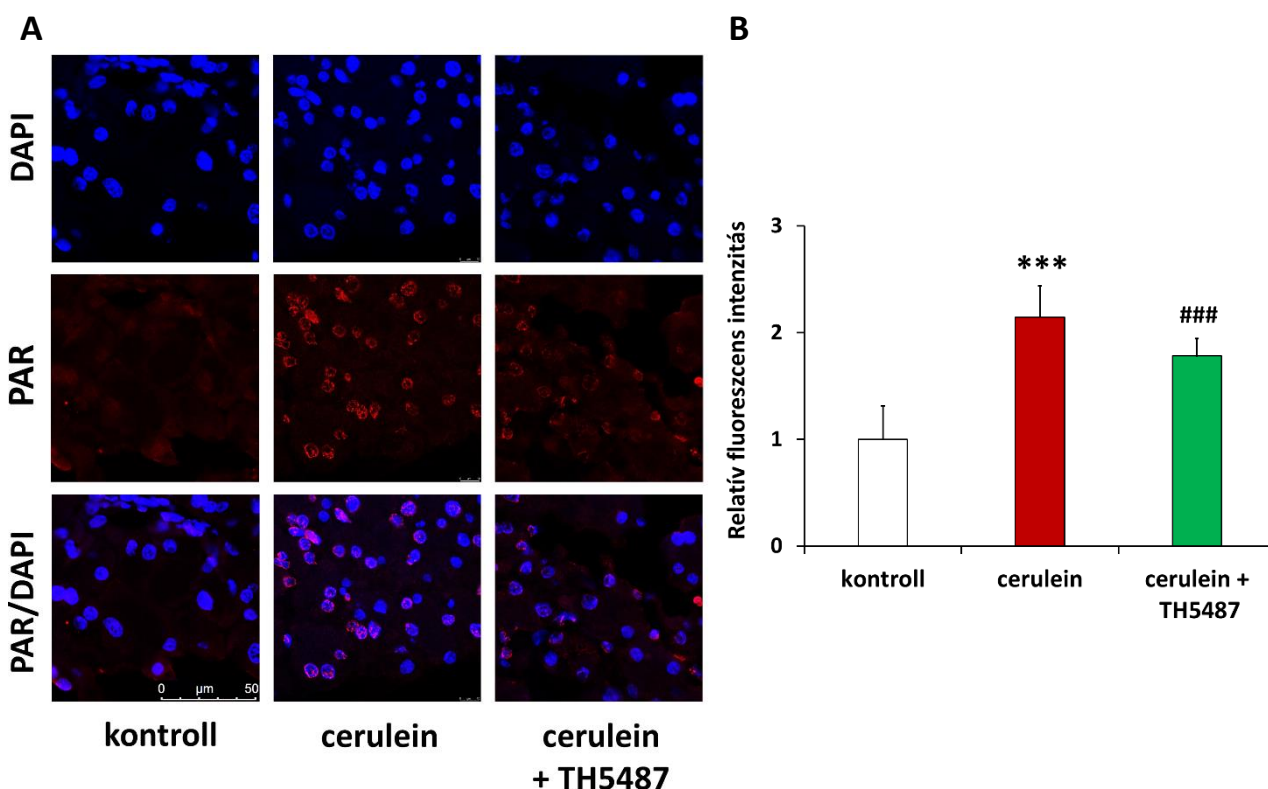


10. ábra: Az *OGG1* gátlása növeli a 8-oxoG sejtmagi akkumulációját. A pankreasz metszetek 8-oxoG immunfluoreszcens festése az (A) panelen látható (skála: 50 μ M). A magokat DAPI festéssel tettük láthatóvá. A sejtmagokban a 8-oxoG intenzitása szignifikánsan nőtt a TH5487-tel kezelt egerekben a cerulein csoporthoz képest (B). *** $p < 0,001$ vs. kontroll; ### $p < 0,001$ vs. cerulein.

Annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy az OGG1 gátlása a fokozott DNS bázissérülés mellett okoz-e törést a DNS szálban, comet esszét végeztünk primer acinus sejtekkel. Ennek az eredményét a VII.2.2 fejezetben taglalom.

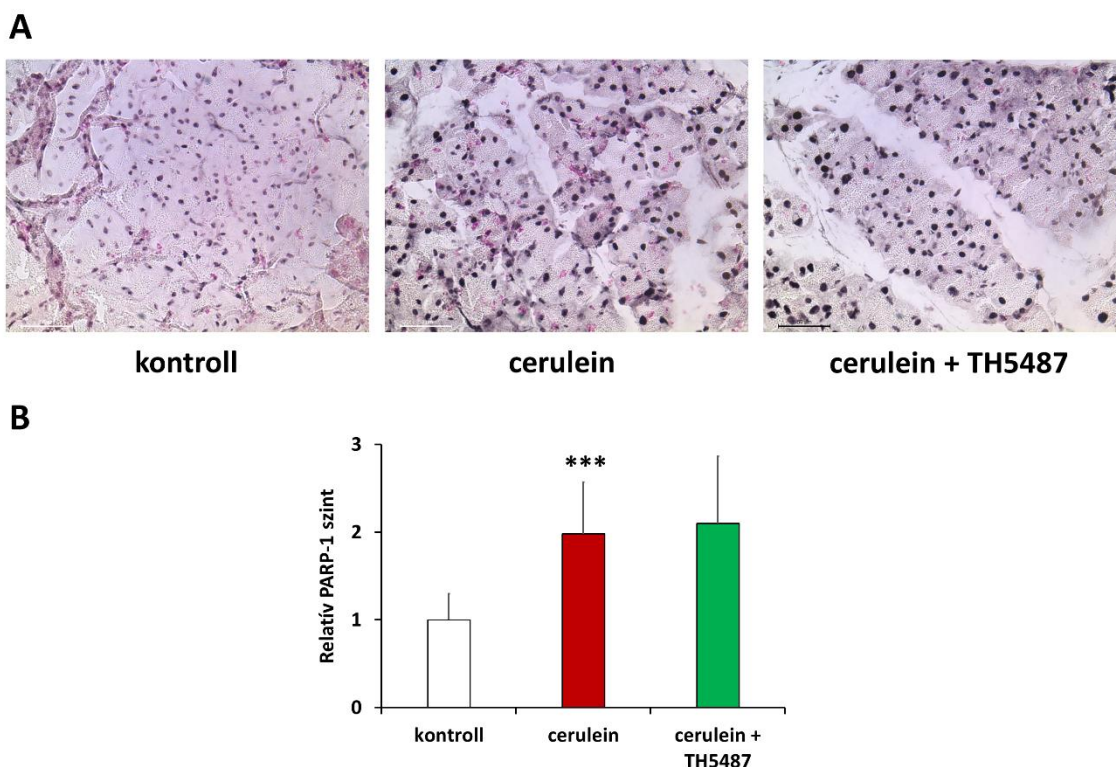
VII.1.2.3 PARP aktiváció kimutatása immunfluoreszcens festéssel

A DNS léziók hibajavításában fontos szerepet játszik a PARP-1 enzim is. Hooten és mtsai. kimutatták, hogy az OGG1 stimulálja a PARP-1-et, ami kölcsönhatásba lépve a DNS javításban résztvevő enzimekkel, növeli a hibajavítási folyamatok hatékonyságát [157]. Ugyanakkor a PARP-1 számos betegség patológiás folyamataiban is szerepet játszik. Ennek oka az intenzív oxidatív stressz esetén keletkező jelentős mennyiségű DNS törés, ami a PARP-1 hiperaktivációt indukálja. Ez a folyamat a sejt NAD^+ készletének felhasználásához vezet, amely ATP depléciót és a sejt nekrotikus halálát okozza [147]. PAR immunfluoreszcens festést végeztünk abból a célból, hogy megvizsgáljuk, az OGG1 gátlása hogyan befolyásolja a PARilációt a pankreasban. A PAR polimerek mennyisége szignifikánsan emelkedett a ceruleinnel kiváltott gyulladásban, amit a TH5487 kezelés csökkentett (11. ábra).



11. ábra Az OGG1 gátlása csökkenti a sejtmagi PARilációt. A PAR immunfestés reprezentatív ábrái az (A) panelen láthatóak (skála: 50 μm). A sejtmagokat DAPI-val festettük. A sejtmagi PAR szint jelentős növekedést mutatott a ceruleinnel kezelt csoportban, amit a TH5487 szignifikánsan csökkentett (B). *** $p < 0,001$ vs. kontroll; ### $p < 0,001$ vs. cerulein.

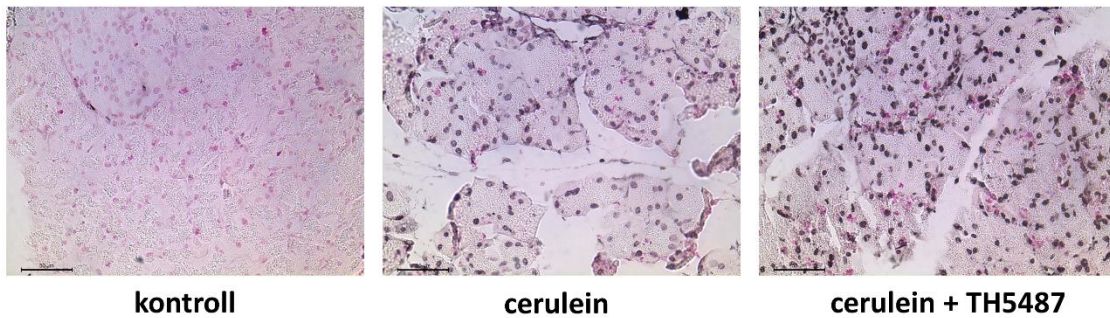
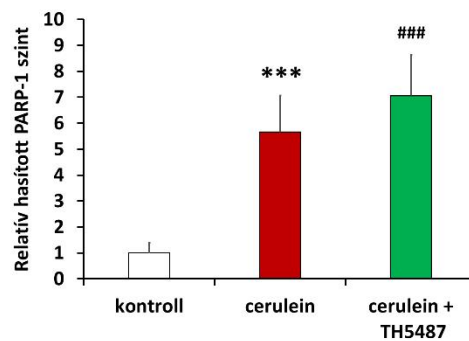
Annak megállapítására, hogy az OGG1 gátlása esetén megfigyelt csökkent PARiláció köthető-e a PARP-1 enzim szintjének változásához a pankreasban, PARP-1 immunfestést végeztünk. A ceruleinnel kezelt egerekben kétszeresére nőtt a PARP-1 enzim mennyisége a kontroll csoporthoz képest, de a TH5487 kezelés nem volt hatással az enzim expressziójára (12. ábra). Ebből arra következtettünk, hogy kísérletünkben az OGG1 gátlása a PARP-1 enzimaktivitását befolyásolta.



12. ábra: A ceruleinnel indukált gyulladásban szignifikánsan nő a PARP-1 enzim szintje. A PARP-1 immunfestés reprezentatív ábrái az (A) panelen láthatóak (skála: 50 μ m). A PARP-1 mennyisége kétszeresére nőtt a cerulein kezelés hatására, de a TH5487 nem volt hatással az enzim expressziójára (B). *** $p < 0,001$ vs. kontroll.

VII.1.2.4 Apoptózis vizsgálata az AP-ben

A heveny hasnyálmirigy-gyulladásban az acinus sejtekre jellemző sejthaláltípusok közül az apoptózist tanulmányozták az egyik legszélesebb körben [182]. Apoptózis során a kaszpáz-3 proteolitikusan hasítja a PARP-1-et, melyet hasított PARP-1-re specifikus immunfestéssel vizsgáltunk [147]. A ceruleinnel kezelt egerekben szignifikánsan nőtt a hasított PARP-1 mennyisége a kontroll csoporthoz viszonyítva. A TH5487-tel kezelt egerekben volt a legmagasabb az apoptózis mértéke (13. ábra).

A**B**

13. ábra: Az OGG1 gátlása növeli az acinus sejtek apoptózist. A hasított PARP-1 immunfestés ábrái az (A) panelen láthatóak (skála: 50 μ m). A cerulein kezelés hatására nőtt a hasított PARP-1 mennyisége a kontroll csoporthoz viszonyítva, az OGG1 gátlása további szignifikáns növekedést okozott az apoptózis mértékében (B). *** $p < 0,001$ vs. kontroll; ### $p < 0,001$ vs. cerulein.

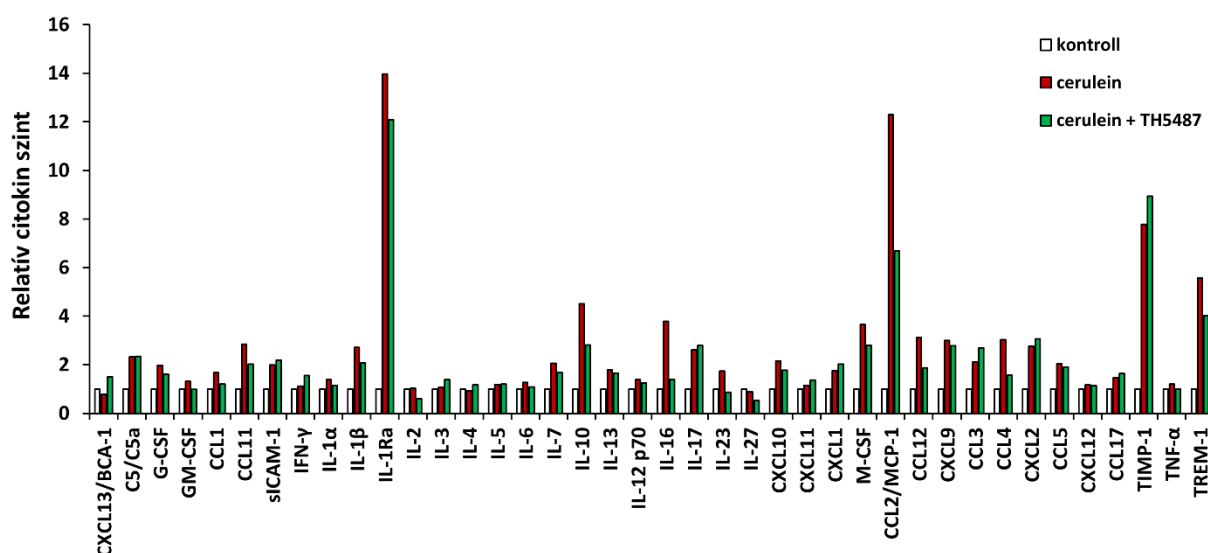
A szövettani vizsgálatok kimutatták, hogy az OGG1 gátlásával csökkent az ödéma, a leukocita infiltráció és a nekrosis a pankreaszban, ugyanakkor növekedett az apoptózis mértéke. Ebből arra következtettünk, hogy a TH5487 szerepet játszik az apoptózis indukálásban, ami csökkenti a helyi szövetsérülés és gyulladás mértékét. Az inhibitor apoptózisban és nekrosisban betöltött szerepét primer acinus sejtes kísérletekben is vizsgáltuk, amit a VII.2.1 fejezetben részletezek.

VII.1.3 A citokinek és kemokinek vizsgálata az AP-ben

Az egyik kulcsfontosságú patológiás folyamat az AP-ben a proteázok sejten belüli aktiválódása, ami az acinus sejtek pusztulásához és a mirigy önmérsztődéséhez vezet. Ennek hatására leukociták vándorolnak a szövetbe, és proinflammatorikus citokineket és kemokineket termelnek, melyek további immunsejtek aktiválódását és a gyulladás progresszióját idézik elő a pankreaszban. A gyulladás során keletkezett citokinek és reaktív oxigén intermedierek

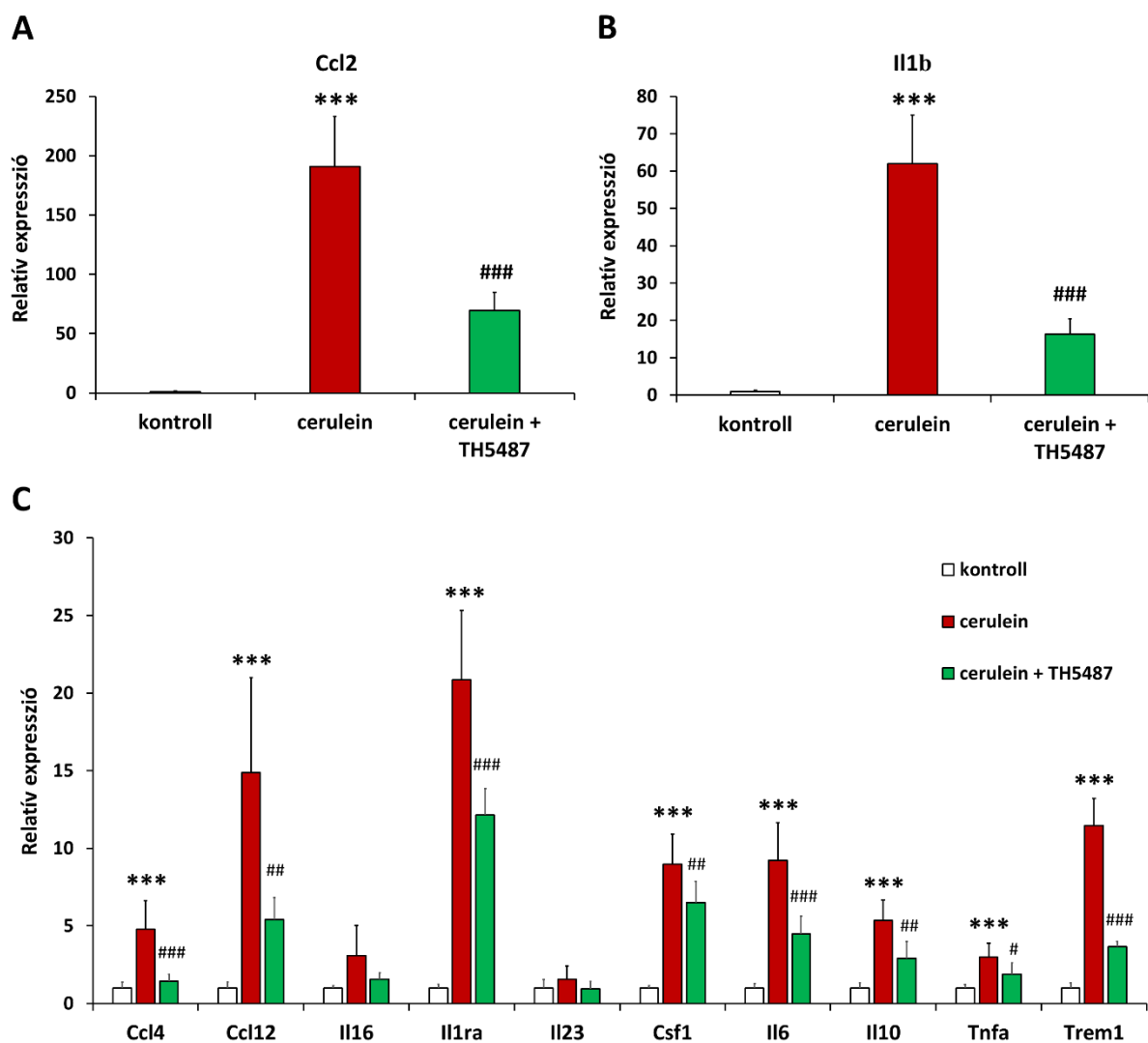
aktiválják az NF- κ B transzkripció faktort, mely a gyulladásos mediátorok átírásáért felel [77] [82].

Az OGG1 gátlásának gyulladásra kifejtett hatását a citokinek szintjének mérésével is vizsgáltuk a pankreaszban. A ceruleinnel kezelt egerekben a 40 vizsgált citokin közül tíznek a szintje több mint háromszorosára növekedett a kontroll csoporthoz képest. A cerulein kezelésben emelkedett proinflammatorikus citokinek közül megemlítendő az IL-1 β és IL-16. Előbbi aktiválja a neutrofileket és indukálja az adhézións molekulák expresszióját, utóbbi a limfociták aktivációjában vesz részt [94] [183]. Az anti-inflammatorikus citokinek közül az IL-1Ra és az IL-10 szintje emelkedett meg, amelyek a pankreaszban kialakult gyulladásra adott szöveti válasz részeként termelődtek. Az IL-10 szintje a gyulladás első 24 órájában növekszik az AP-ben; stimulálja az IL-1Ra képződését és csökkenti a proinflammatorikus citokinek mennyiségét. Az IL-1Ra az IL-1 receptorhoz kötődve gátolja az IL-1 jelátviteli útvonalat [94] [184]. A cerulein növelte a kemokinek szintjét is (CCL2, CCL4, CCL11, CCL12), amelyek kemoattraktánsként hatnak a monocitákra, a természetes ölüsejtekre és a granulocitákra [82] [185]. A granulociták és monociták aktivációjában szerepet játszó, mieloid sejteken expresszálódó triggering receptor-1 (TREM-1) szintje is növekedett. Az OGG1 gátlásával csökkent az említett citokinek és kemokinek mennyisége a pankreaszban (14. ábra).



14. ábra: A TH5487 számos citokin szintjét csökkenti az akut hasnyálmirigy-gyulladásban. A ceruleinnel kezelt egerekben a gyulladásban szerepet játszó citokinek közül 10 mennyisége több mint 3-szorosára növekedett, amit a TH5487 valamennyi esetben csökkentett. A citokinek mennyiségét Image Lab szoftverrel kvantifikáltuk és a relatív citokin szintet ábrázoltuk.

A citokin array-vel kapott eredmények megerősítésére qPCR-rel vizsgáltuk a gyulladásban növekedett fehérjeszintet mutató citokinek expresszióját. A vizsgált 12 génből 11 expressziója szignifikánsan nőtt a ceruleinnel kezelt egerekben a kontroll csoporthoz képest. A legnagyobb növekedést a Ccl-2 (~200x) és az Il1b esetén (~60x) detektáltuk a pankreaszban. A gyulladás kialakulásában és progressziójában szerepet játszó 12 citokin közül 10 expresszióját az OGG1 inhibitor szignifikánsan csökkentette (15. ábra).

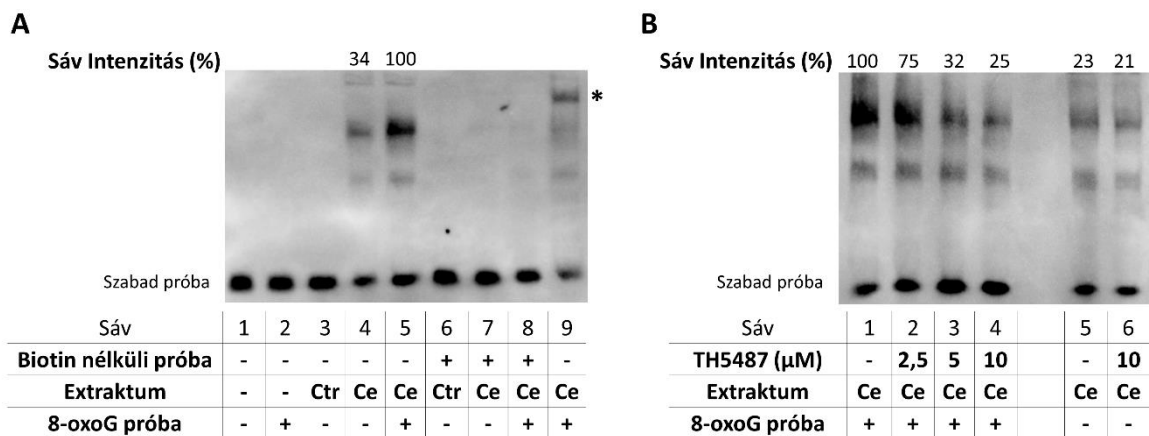


15. ábra: Az OGG1 gátlása csökkenti a gyulladásos markergének expresszióját. A gyulladásban szerepet játszó gének expresszióját qPCR-rel vizsgáltuk. A ceruleinnel kezelt egerekben jelentősen nőtt a Ccl2 (A), Il1b (B) és további proinflammatorikus gének expressziója (C), amit a TH5487 alkalmazása szignifikánsan csökkentett. * $p < 0,05$ vs. kontroll, *** $p < 0,001$ vs. kontroll; # $p < 0,05$ vs. cerulein, ## $p < 0,01$ vs. cerulein, ### $p < 0,001$ vs. cerulein.

VII.1.4 A TH5487 hatásmechanizmusának vizsgálata

Az AP patomechanizmusának egyik korai eseménye az NF- κ B aktivációja. Számos kísérlet alátámasztotta, hogy a szupramaximális koncentrációban alkalmazott cerulein már a gyulladás kezdeti szakaszában indukálja az NF- κ B transzlokációját a sejtmagba [77] [79] [186] [187] [188]. Mivel a gyulladásos citokinek és kemokinek szintje csökkent a TH5487-tel kezelt egerekben, így azt feltételeztük, hogy az OGG1 gátlása az NF- κ B gyulladásos jelátviteli útvonalatát célozza meg. Intenzív oxidatív stressz körülmények között az OGG1 a DNS allosztérikus módosításán keresztül növeli az NF- κ B kötődését a DNS-hez, és ezáltal a gyulladásos gének átírását [3] [163]. Hipotézisünk szerint ezt a folyamatot képes gátolni az OGG1 szelektív inhibitora. Az OGG1 inhibitor NF- κ B DNS-kötődésre kifejtett hatását EMSA kísérletben erősítettük meg.

A kísérlet első részében a fiziológiás sóoldattal (Ctr) vagy ceruleinnel (Ce) kezelt egerek hasnyálmirigyéből készítettünk sejtmagextraktumokat, melyeket natív vagy 8-oxoG-vel módosított, NF- κ B kötőhelyet tartalmazó oligoszekvenciákkal inkubáltunk. A kontroll egerből származó extraktumban nem detektáltunk shiftet, amely a transzkripció faktor sejtmagi transzlokációjának hiányát jelzi. A Ce extraktumban jelen volt az NF- κ B a sejtmagban, és a 8-oxoG módosítás fokozta az NF- κ B DNS-kötő aktivitását a natív próbához képest (16/A ábra). A kísérlet második részében az OGG1 inhibitor NF- κ B DNS-kötődésére kifejtett hatását teszteltük. A TH5487 koncentrációfüggő módon csökkentette az NF- κ B DNS-kötő aktivitását a 8-oxoG próbák esetében, de nem volt hatással a transzkripció faktor kötődésére a natív próbával végzett kísérletben (16/B ábra).

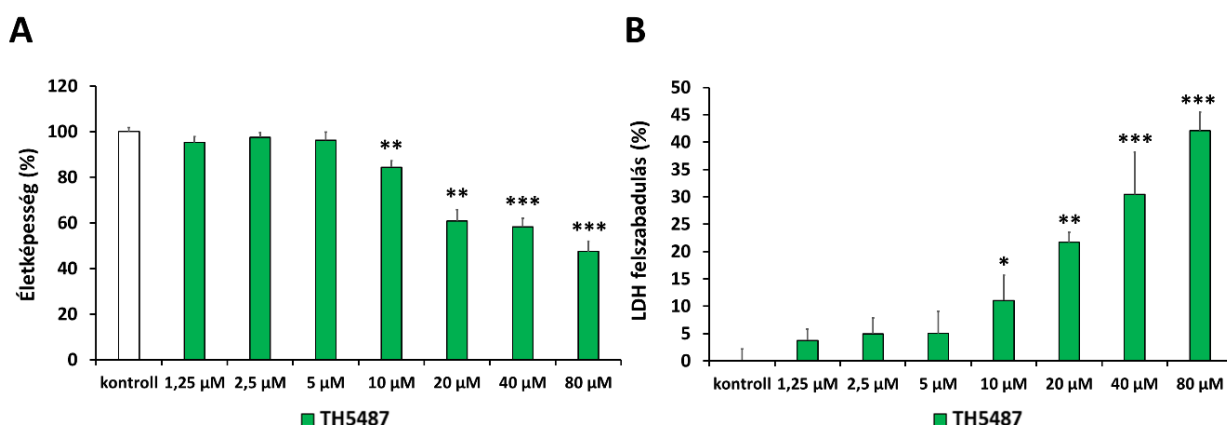


16. ábra: Az OGG1 gátlása csökkenti az NF-κB DNS-kötő aktivitását. A panel: A fiziológiás sóoldattal (Ctr) vagy cerulein (Ce) kezelt egerek hasnyálmirigyéből izolált magextraktummal EMSA kísérletet végeztünk. A Ctr extraktumban nem volt detektálható shift, mivel nem volt jelen az NF-κB (3. sáv). A Ce extraktummal folytatott esszében a 8-oxoG jelenléte közel 3-szoros növekedést okozott a transzkripciós faktor DNS-kötő aktivitásában a natív próbához képest (4. és 5. sáv). A NF-κB kötődés specificitását kompetíciós kísérletben teszteltük, melynek során 200-szoros mennyiségű jelöletlen natív oligonukleotidot adtunk a reakcióelegybe (6-8. sáv). Annak megerősítésére, hogy valóban az NF-κB található-e a detektált DNS-fehérje komplexben, anti-p65 ellenanyaggal supershift kísérletet végeztünk. A komplex mobilitása csökkent, mivel az NF-κB-hez hozzákapcsolódott az ellenanyag (9. sáv, * jelölve). B panel: Különböző koncentrációjú TH5487-tel inkubáltuk a Ce extraktumot a DNS oligok hozzáadása előtt. Az OGG1 inhibitor dóziszfüggő módon csökkentette az NF-κB DNS-kötő aktivitását a 8-oxoG próbák esetén (1-4. sáv), de nem volt hatással a transzkripciós faktor kötődésére 8-oxoG hiányában (5-6. sáv). A shiftet Image Lab szoftver segítségével értékeltük ki. A sáv intenzitásokat a 8-oxoG próbával inkubált Ce extraktum shiftjéhez viszonyítottuk, amit 100%-nak vettünk (5. sáv az A panelen és 1. sáv a B panelen).

VII.2 Az OGG1 szerepének tanulmányozása az AP *in vitro* modelljében

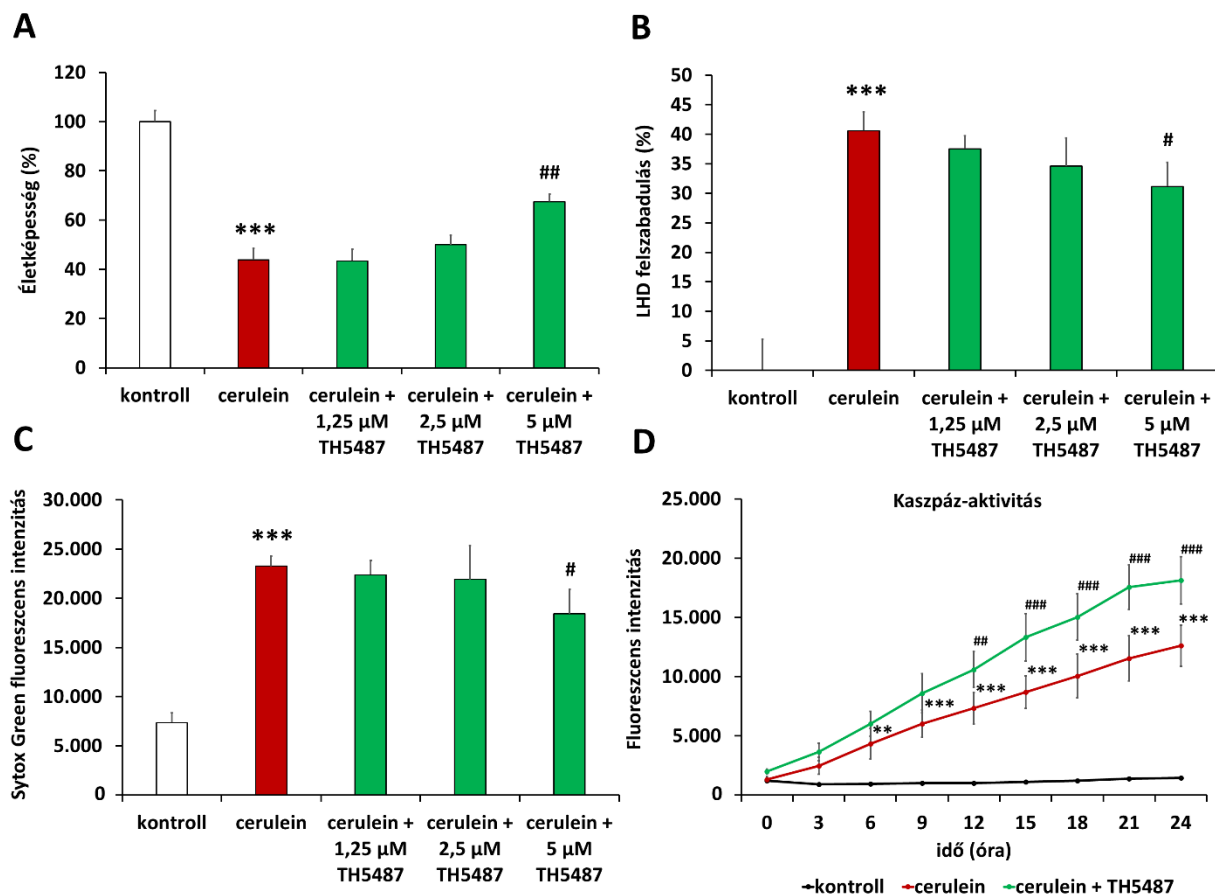
VII.2.1 A TH5487 hatása a ceruleinnel kezelt acinus sejtek életképességére és a sejtpusztulásra

A primer acinus sejtek jó lehetőséget nyújtanak az exokrin pankreasban bekövetkező ceruleinnel indukált sejthalálnak az *in vitro* tanulmányozására. Első körben különböző koncentrációjú TH5487-tel kezeltük a sejteket 24 órán keresztül, majd életképességet és LDH szintet vizsgáltunk, hogy meghatározzuk a primer sejtekre toxikus OGG1 inhibitor koncentrációját (17. ábra).



17. ábra: A TH5487 toxicitás vizsgálata primer acinus sejtekben. A sejteket különböző koncentrációjú TH5487-el kezeltük, majd az életképességet (A) és LDH (B) felszabadulást mértük. A 10 μM és afeletti koncentráció szignifikánsan csökkentette a sejtek életképességét, és növelte az LDH felszabadulást a kontroll csoporthoz képest. * $p < 0,05$ vs kontroll, ** $p < 0,01$ vs kontroll, *** $p < 0,001$ vs kontroll.

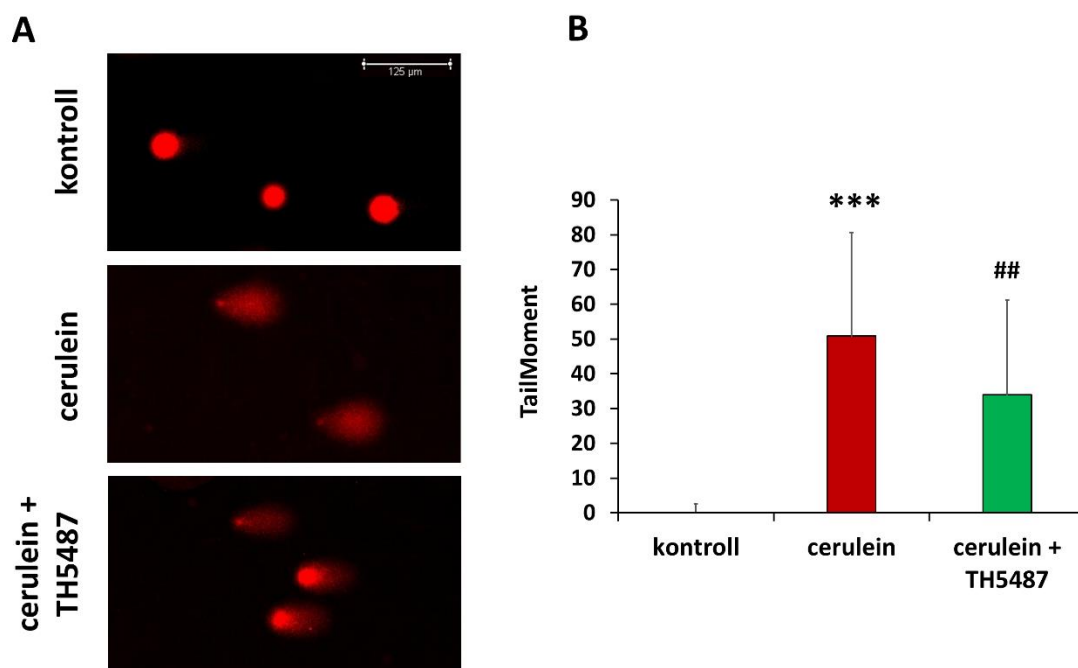
A következő kísérletben a sejteket 1,25 μM, 2,5 μM vagy 5 μM TH5487-tel előkezeltük, majd az OGG1 inhibitor jelenlétében 100 nM-os cerulein kezeléssel váltottuk ki a sejtpusztulást. Azokban az acinusokban, amelyeket csak ceruleinnel kezeltünk, szignifikánsan csökkent a sejtek életképessége (18/A ábra) és növekedett a nekrosis mértéke (18/B,C ábra) a kontroll csoporthoz képest. Az OGG1 gátlása szignifikáns javulást okozott az említett paraméterekben. Ezen kívül kaszpáz aktivációs esszében vizsgáltuk az apoptózis mértékét. A cerulein csoportban a 6. órától szignifikánsan növekedett az apoptózis a kontrollhoz képest, ugyanakkor az 5 μM inhibitorral előkezelt sejtekben detektáltuk a legmagasabb kaszpáz aktivitást, ami a 12. órától szignifikáns növekedést mutatott a cerulein csoporthoz képest (18/D ábra).



18. ábra: A TH5487 kezelés hatására az acinus sejtek pusztulása a nekrosis irányából az apoptózis felé tolódott, miközben szignifikánsan javult a sejtek életképessége. A primer sejtek károsodását 24 órás cerulein kezeléssel idéztük elő, amit különböző koncentrációjú TH5487-es előkezelés előzött meg az OGG1 inhibitor csoportban. Az 5 μM-os TH5487 kezelés szignifikánsan növelte a sejtek életképességét (A), csökkentette az LDH felszabadulást (B) és a Sytox Green pozitív sejtek számát (C), miközben fokozta az apoptózist (D). * $p < 0,05$ vs kontroll, ** $p < 0,01$ vs kontroll, *** $p < 0,001$ vs kontroll; # $p < 0,05$ vs cerulein, ## $p < 0,01$ vs cerulein, ### $p < 0,001$ vs cerulein.

VII.2.2 Az OGG1 gátlás hatása a DNS szálak törésére

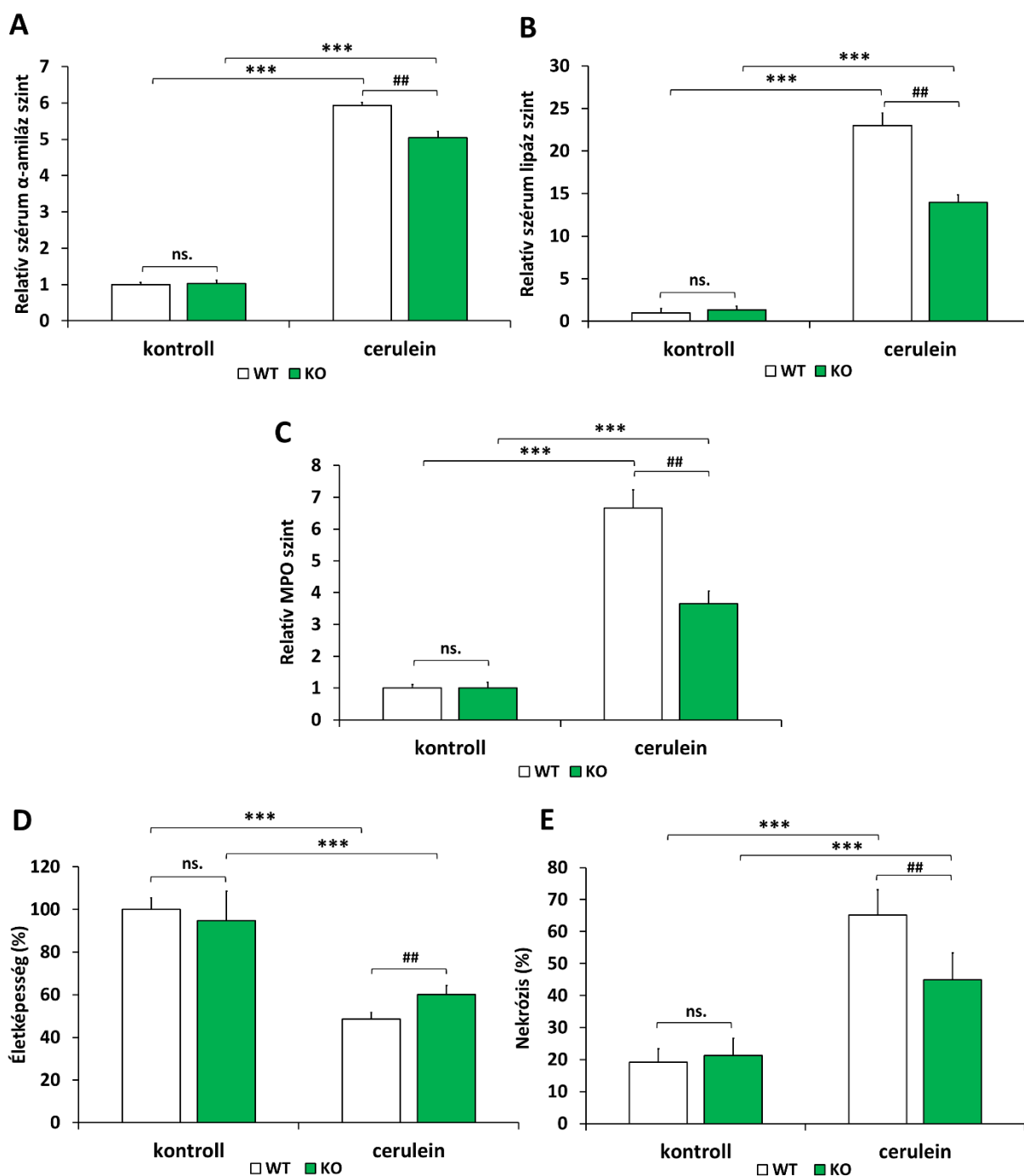
A 8-oxoG immunfestés kimutatta, hogy az OGG1 gátlása növelte a 8-oxoG léziók számát a pankreaszban. Alkalikus comet esszével vizsgáltuk, hogy a DNS bázis károsodása mellett detektálható-e változás az egyszálú DNS törések számában az OGG1 inhibitor alkalmazása esetén. A kontroll sejtekben intakt magok voltak láthatóak. A cerulein kezelés jelentős mértékű DNS törést idézett elő, az üstökös fejrésze csökkent, a csóva mérete a töredezett DNS mennyiségével arányosan nőtt. Az TH5487 kezelés szignifikánsan csökkentette a DNS szálak törését (19. ábra).



19. ábra: A TH5487 csökkenti a ceruleinnel kiváltott DNS törések kialakulását. A primer acinus sejteket 5 μ M TH5487-tel előkezeltük 1 órán keresztül, amit 24 órás cerulein kezelés követett. A kontroll sejtekben a DNS intakt maradt, csak az üstökös fejrésze volt látható. A cerulein kezelés a DNS károsodását, üstökös csóva képződését idézte elő (A). A TH5487 kezelés hatására csökkent a törések mennyisége az acinus sejtekben. A sejtmagokat propidium-jodiddal festettük, és a DNS törés mértékét a TailMoment paraméterével (csóva százalékos DNS tartalma $\times$ csóva hossza) jellemeztük (B). Kondícióként 50 magot értékeltünk ki az OpenComet szoftver segítségével. *** $p < 0,001$ vs kontroll; ## $p < 0,01$ vs cerulein.

VII.3 A PARP-1 szerepének vizsgálata *in vivo* és *in vitro* cerulein modellben

A PARP-1 a pankreasz daganatos és gyulladásos megbetegedéséhez köthető folyamatok patomechanizmusában is részt vesz. Amíg az előbbi esetben a DNS hibajavítás révén segíti a daganatos sejtek túlélését, addig a pankreatitiszben a sejthalál és a transzkripció folyamatok (kromatin struktúra átrendeződés, NF-kB aktiváció) indukálása által járul hozzá a patogenezishez [137]. A disszertációm alapjául szolgáló társszerzős cikkemben a PARP-1 akut pankreatitiszben betöltött szerepét vizsgáltuk. A gyulladást a cerulein ismételt beadásával váltottuk ki vad típusú (WT) és PARP-1 KO (KO) egerekben. A cerulein kezelés jelentősen növelte a szérum α -amiláz és lipáz szintjét a WT egerekben, melyet a PARP-1 enzim „kiütése” szignifikánsan csökkentett a KO egerekben (20/A,B ábra). Az MPO szintje is nőtt a cerulein kezelés hatására, melynek szintje a KO egerekben közel a felére redukálódott (20/C ábra). A kontroll WT és kontroll KO egerek között nem volt különbség a vizsgált paraméterekben. A PARP-1 sejthalálban betöltött szerepét primer acinus sejtekkel folytatott kísérletekben vizsgáltuk. A WT és KO egerekből izolált sejtek életképességét MTT esszével mértük, a nekrosis mértékének megállapítására PI festést végeztünk. A cerulein kezelés hatására 50%-ra csökkent a sejtek életképessége a WT primer acinus sejtekben. A ceruleinnel kezelt KO sejtekben viszont szignifikánsan magasabb volt az élő sejtek száma (20/D ábra). Továbbá a ceruleinnel kezelt sejtek összehasonlításakor láthatjuk, hogy a nekrotizáló sejtek száma szignifikánsan alacsonyabb volt a KO primer sejtekben a WT-hez képest (20/E ábra).



20. ábra: A PARP-1 gén inaktivációja mérsékelte az acinus sejtek pusztulását és a granulocita infiltrációt. Az egerekben a gyulladást a cerulein (50 μ g/kg) óránkénti intraperitoneális injekciójával - összesen 8 oltás beadásával - váltottuk ki. A kontroll egerek fiziológiás sóoldatot kaptak. Az első oltástól számított 10. órában történt a vér és szövetminták begyűjtése. A KO egerekben csökkent a szérum α -amiláz (A) és lipáz (B), valamint a szöveti MPO szintje (C). A primer acinus sejteket 24 órán keresztül kezeltük ceruleinnel, majd MTT esszét és PI festést végeztünk. A KO sejtek életképessége nőtt (D), a nekrózis mértéke pedig csökkent (E) a WT-hez viszonyítva a ceruleinnel kezelt csoportokban. *** $p < 0,001$ vs kontroll; ## $p < 0,01$ vs WT cerulein.

VIII. Diszkusszió

Az akut pankreatitisz az egyik leggyakoribb gasztrointesztinális kórkép, amelynek az incidenciája növekvő tendenciát mutat. A kórlefolyás az esetek 80%-ában enyhe, amely koplalás és folyadékpótlás mellett egy héten belül meggyógyul. Az esetek 20%-ában azonban a gyulladás súlyos formája alakul ki, ami a beteg életét veszélyeztető állapothoz is vezethet [1]. A pankreatitisz kialakulásáért legnagyobb részben az epekövesség és a túlzott mértékű alkoholfogyasztás a felelős, de számos egyéb etiológiai tényező (vírusfertőzés, gyógyszerhatás, hipertrigliceridémia, tumor, trauma) is ismert [14] [15]. A betegség patomechanizmusában fontos szerepet játszik a proinflammatorikus citokinek szintéziséért felelős NF- κ B, a tripszinogén korai aktivációja, a mitokondrium károsodása és az oxidatív stressz. A folyamatok összefüggése és időbeli sorrendje azonban a mai napig nem teljes mértékben tisztázott [189] [190].

Az eddigi kutatási eredmények alapján a reaktív oxigén intermedierek szintje már a gyulladás korai szakaszában megemelkedik, amit az endogén antioxidáns enzimek szintjének csökkenése kísér. A keletkezett szabadgyökök károsítják a sejt makromolekuláit, beleértve a nukleinsavakat. A redox-patobiokémia területének egyik legújabb fejleménye, hogy a guanin oxidációja közvetlenül is szerepet játszik a gyulladásos folyamatokban, amelynek mechanizmusáról elsőként Boldogh István kutatócsoportja számolt be. A proinflammatorikus gének promóterei magas GC tartalmúak, és mivel a guanin rendelkezik a legalacsony redox potenciállal a négy bázis közül, így könnyű célpontot jelent a reaktív oxigén gyökök számára. A keletkezett 8-oxoG léziók javításában az OGG1 vesz részt, azonban intenzív oxidatív stressz esetén a DNS-glikoziláz elveszíti katalitikus aktivitását. Ennek ellenére az enzim továbbra is képes a szubsztrátjához kötődni és a DNS allosztérikus módosulását indukálni, ami segíti az NF- κ B DNS-hez való kötődését és a transzkripció apparátus összeszerelődését [3] [163]. Az OGG1^{-/-} egerek ellenállóbbak voltak az LPS-sel, oxazolonnal vagy ovalbuminnal kiváltott gyulladással szemben [171]. Továbbá az OGG1 csendesített egerekben csökkent a légúti gyulladás mértéke [191].

Munkánk célja az volt, hogy az OGG1 gyulladásban betöltött szerepét megvizsgáljuk akut pankreatitiszben is, amihez az OGG1 szelektív gátlószerét, a TH5487-et használtuk.

Az OGG1 gátlása csökkenti a szövetsérülés és a gyulladás mértékét a ceruleinnel indukált AP-ben.

Jelenlegi ismereteink alapján az akut pankreatitisz egyik kulcsfontosságú korai eseménye a Ca^{2+} szint tartós emelkedése a citoszolban, ami a tripszinogén és a többi proenzim acinus sejten belüli aktivációjához és a pankreasz önemésztődéséhez vezet. Ennek következtében a mirigyből kiszabaduló emésztőenzimek a szisztémás keringésbe kerülnek. Annak érdekében, hogy megállapítsuk az OGG1 inhibitor hatásosságát az AP modellünkben, elsőként az α -amiláz és lipáz szintjét mértük meg a szérumban. Az említett emésztőenzimek szérumszintjének meghatározását a humán diagnosztikában is alkalmazzák [30]. Kísérletünkben a TH5487 kezelés csökkentette a szérum α -amiláz és lipáz szintet, amiből a szövetsérülés mértékének csökkenésére következtettünk.

Az acinus sejtek halálának útvonala meghatározó a betegség kimenetelében. A gyulladás enyhébb formájában a sejtek apoptózisa figyelhető meg, míg az AP súlyosabb formája nekrotikus sejtpusztulással társul [182]. Az előbbi folyamatot jellegzetes morfológiai változások kísérik: az apoptotikus sejtek zsugorodnak, felszínükről kisebb-nagyobb citoplazmadarabok fűződnek le, a kromatinállomány kondenzálódik, a DNS fragmentálódik, végül a sejt apoptotikus testekké esik szét. Az apoptotikus testeket fagocita sejtek kebelezik be, így a sejtközi térbe nem jutnak bomlástermékek, a sejt környezetének károsodása minimális. Ezzel szemben a nekrózis során a sejt megduzzad, a sejtmembrán integritása megszűnik és a sejttartalom a környezetbe áramlik. A nekrotizáló sejtekből kiszabaduló intracelluláris tartalom a gyulladásos sejtek infiltrációját idézi elő [182]. A nekrózis-apoptózis mértékének megállapítására hisztológiai vizsgálatokat végeztünk. Az OGG1 gátlása szignifikánsan csökkentette a nekrotizáló sejtek számát a pankreaszban, ugyanakkor növelte az apoptózis mértékét, amelyre a hasított PARP-1 emelkedett szintje utalt. A kapott eredményeket *in vitro* kísérletekben is megerősítettük. Az OGG1 gátlása csökkentette a Sytox Green pozitív sejtek számát és az LDH felszabadulást, amivel egyidejűleg növekedett a kaspáz-3 aktivitás. Ebből arra következtettünk, hogy az OGG1 gátlása az acinus sejtek halálát a nekrózis irányából az apoptózis felé tolta el, ezáltal csökkentve a szövetsérülés mértékét.

A TH5487 nekrózis csökkentő hatásának egyik magyarázata lehet az OGG1 PARP-1-re kifejtett hatása. Az OGG1 gátlása csökkentette a PARiláció mértékét a szövetben, amit immunfluoreszcens festéssel igazoltunk. A TH5487 viszont nem volt hatással a PARP-1 expressziójára. Ebből arra következtettünk, hogy az OGG1 inhibitorral kezelt egerekben a PARP-1 enzimaktivációja csökken, ugyanis az OGG1 gátlásával nem kerül eltávolításra a 8-oxoG, így az AP-endonukleáz nem hoz létre törést a DNS-ben. Mivel a DNS-törések a PARP-

l aktiválódásának az elsődleges stimulusai, ezért csökken a PARP-1 aktivációjához köthető nekrozis is.

Az OGG1 hatásmechanizmusa az apoptózis folyamatában jelenleg nem tisztázott. Bácsi és mtsai. kimutatták, hogy az OGG1 „kiütésével” növekedett a 8-oxoG léziók száma a MEF sejtekben. Vizsgálták a celluláris ROS mennyiségét is, mely alapján két OGG1^{-/-} csoportot különítettek el a citometriás kísérletekben: a nagy mennyiségű ROS-t termelő ^HROS sejteket és a fiziológiás mennyiségű szabadgyököket előállító ^LROS sejteket. A ^HROS sejtekben növekedett az apoptózis mértéke az ^LROS sejtekhez képest, amiből arra következtettek, hogy OGG1 hiányában a szabadgyökök emelkedése a sejtek apoptotikus halálát indítja el [192]. Hasonló eredményeket kaptak az OGG1 gátlásával is, ami indukálta az apoptózist a petefészek granulóza eredetű KGN sejtekben [193].

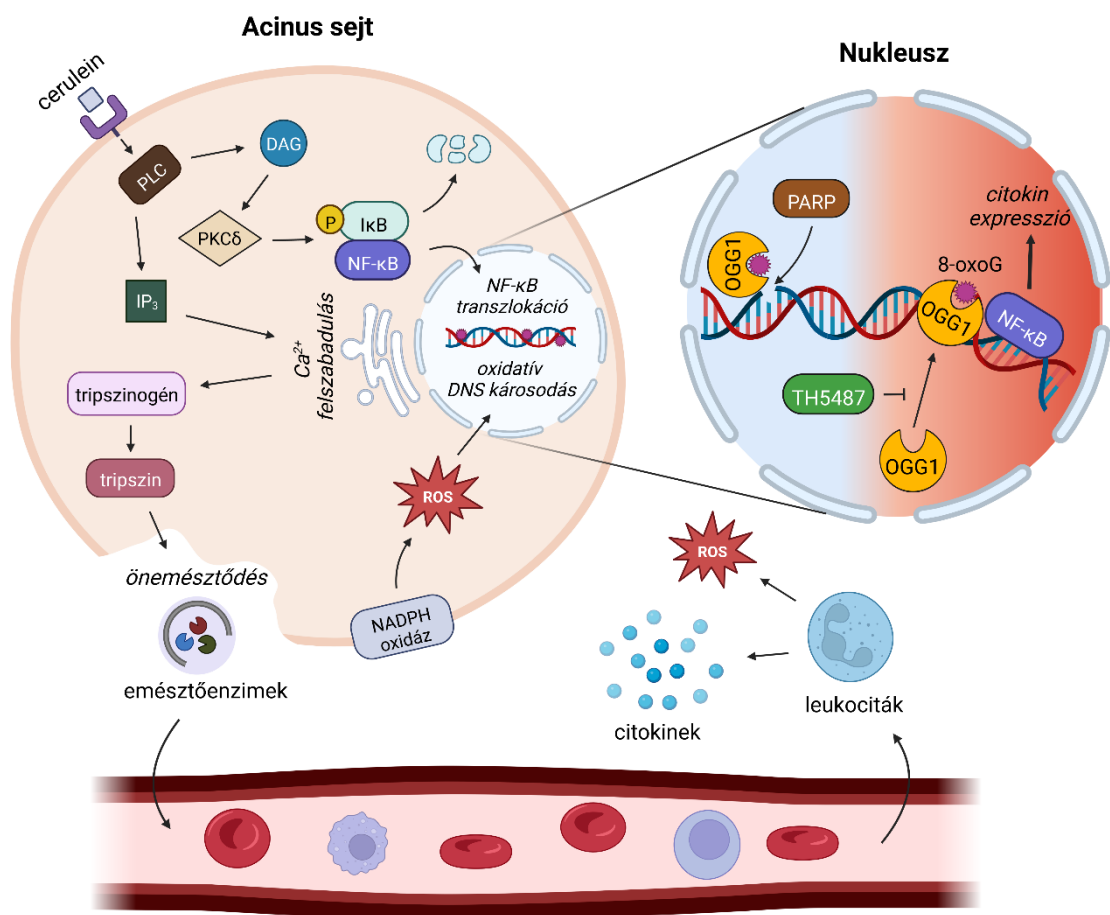
A pankreatitisz egyik patológiás eseménye a pro- és antioxidáns folyamatok közötti egyensúly felborulása, ami oxidatív stresszhez és a DNS károsodásához vezet a szervezetben. Az akut pankreatitiszben a ROS fő forrásának a xantin oxidázt és az infiltráló neutrofilek NADPH oxidázát tekintik, de képződhet lokálisan is az acinus sejtekben a mitokondrium és NADPH oxidáz enzim által [116] [175]. Abból a célból, hogy megvizsgáljuk az OGG1 gátlásának hatását a DNS károsodás mértékére, 8-oxoG immunfluoreszcens festést és comet esszét végeztünk. A TH5487 növelte a 8-oxoG mennyiségét a mirigyben, ugyanakkor csökkentette a cerulein kezelés által kiváltott egyszálú DNS törések számát az acinus sejtekben. Az OGG1 blokkolására fókuszáló tanulmányok egyik kulcsfontosságú kérdése az volt, hogy a sejtmagi 8-oxoG emelkedése okoz-e geno- és fenotípusos eltéréseket. A guanin lézió biológiai hatását vizsgálva kiderült, hogy az nem eredményez torzulást a DNS hélix szerkezetében, továbbá nem blokkolja a DNS replikációt és transzkripciót sem. Az OGG1^{-/-} egerek nem mutattak fenotípusos eltérést és fokozott hajlamot tumorok kialakulására, a TH5487-tel kezelt sejtek proliferációja pedig nem csökkent. Ebben szerepe lehet annak, hogy más enzimek is részt vesznek a 8-oxoG-hez köthető mutagenézis elleni védekezésben. Ilyen a MutY DNS glikoziláz, ami a 8-oxoG:A képződése esetén kihalítja az adenint, ezáltal lehetővé teszi a károsodott bázis citozinnal való párbaállítását és megakadályozza a mutáció kialakulását. Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy a 8-oxoG feldúsulása csökkenti a DNS szintézis és a transzkripció rátáját, és növeli a G:C → T:A transzverziók gyakoriságát [3] [154] [170] [194].

Az acinus sejtek nekrozisa a pankreasz lokális károsodásához vezet, a sejtekből kiszabaduló DAMP molekulák a leukociták infiltrációját idézik elő, amelyek proinflammatorikus citokineket és kemokineket termelnek. Ez a folyamat további immunsejtek aktiválódásához és a gyulladás progressziójához vezet [189]. Az acinussejtek is képesek

citokineket termelni az őket ért stresszhatásra, ezáltal szerepet játszhatnak a gyulladás kialakulásában. A gyulladás mértékének vizsgálatára H&E festést végeztünk a pankreasz metszeteken, ami kimutatta, hogy a TH5487-tel kezelt egerekben csökkent az ödéma és az infiltráló immunsejtek mennyisége. Továbbá az MPO szintje is csökkent a pankreaszban, ami az infiltráló granulociták mennyiségének csökkenésére utal. A cerulein kezelés több citokin mRNS expresszióját megemelte a pankreaszban, melyek közül kiemelendő a közel 200-szoros növekedést mutató Ccl2 és a 61-szeresére emelkedett Il1b. Előbbi kemotaktikus hatást fejt ki az immunsejtekre, utóbbi pedig aktiválja a gyulladásos jelátviteli útvonalakat és indukálja az adhézións molekulák (pl. ICAM-1) expresszióját. Az OGG1 mRNS-szinten és fehérjeszinten is gátolta ezek, és számos más gyulladásos citokin expresszióját.

A citokinek és kemokinek emelkedett szintje összefüggésben áll az NF- κ B aktivációjával, melyet már az AP korai szakaszában leírtak. A transzkripciós faktor aktiválódása többféle útvonalon történhet. Szerepet játszhatnak benne a gyulladás során keletkező szabadgyökök és citokinek, valamint az enzimek elválasztásáért felelős szekretágók. Az NF- κ B a magba transzlokálódva gyulladásos gének átírását indukálja [77] [131]. Az OGG1 a DNS allosztérikus módosításán keresztül fokozza ezeknek a géneknek az expresszióját. Hipotézisünk szerint, mivel a TH5487 megakadályozza az OGG1 DNS-hez való kötődését, ezáltal nem jön létre a DNS szerkezeti módosulása, így csökkenni fog az NF- κ B DNS-kötő aktivitása a pankreaszban. Ennek igazolására EMSA kísérletet végeztünk a fizioiogiás sóoldattal vagy ceruleinnel kezelt egerek hasnyálmirigyéből izolált magextraktummal. A Ce magextraktumban már 30 perccel az oltás után detektálható volt az NF- κ B, szemben a Ctr magextraktummal, melyben nem volt jelen a transzkripciós faktor. Az NF- κ B DNS-hez való kötődésének affinitását növelte a 8-oxoG jelenléte az oligoban, melyet a TH5487 alkalmazása koncentrációfüggő módon csökkentett. A 8-oxoG hiányában azonban az inhibitor nem volt hatással a transzkripciós faktor kötődésére, ami arra utal, hogy az oxidált guaninok jelenléte esszenciális az OGG1-hez köthető transzkripciós folyamatok indukálásához.

Az OGG1 inhibitor klinikai alkalmazásának akadályát az enzim gátlása következtében kialakuló esetleges mutagén hatások jelenthetik. Mivel a gyulladást a reaktív oxigéngyökök emelkedett szintje kíséri, ezért felmerül a kérdés, hogy ilyen esetekben az OGG1 gátlás következtében fokozódó DNS-bázis sérülések milyen hatást fejtenek ki a szervezetben. Véleményem szerint amennyiben az OGG1 inhibitort a gyulladás korai – a redox egyensúly felborulását megelőző – fázisában használjuk, akkor lehet relevanciája a humán terápiában való alkalmazásának.



21. ábra: A ceruleinnel kiváltott AP-ben szerepet játszó patológiás folyamatok összefoglalása.

A szupramaximális koncentrációban alkalmazott cerulein aktiválja a foszfolipáz C-t (PLC), ami a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát hasításával diacilglicerolt (DAG) és inozitol-1,4,5-trifoszfátot (IP_3) állít elő. Az IP_3 indukálja a kalciumionok felszabadulását az endoplazmás retikulumból, ami tartós Ca^{2+} szint növekedést eredményez a citoszolban. Ez indukálja a tripszinogén tripszinné alakulását, ami további proenzimek intraacináris aktiválódásához és a mirigy önemésztődéséhez vezet. Az acinus sejtből kiszabaduló enzimek a szisztémás keringésbe jutnak, ami a szérum α -amiláz és lipáz szint növekedését okozza. A DAG aktiválja a protein kináz C-t ($PKC\delta$), ami foszforilálja az $I\kappa B\alpha$ -t, ezáltal indukálva a gátlófehérje NF- κB -ről való levását. Ennek következményeként az NF- κB nukleáris transzlokációs szignálja felszínre kerül és a transzkripciós faktor a sejtmagba transzlokálódik, majd számtalan, az AP-ben szerepet játszó gyulladásos gén expresszióját serkenti. A keletkező citokinek és a sejt sérülése során kiszabaduló intracelluláris molekulák (DAMP) aktiválják a leukocitákat, amelyek a szövetsérülés helyére áramlanak. Az immunsejtek további citokineket és reaktív oxigén intemediereket (ROS) termelnek. Az acinus sejtek is termelnek ROS-t az őket ért károsodás következtében, aminek forrása a mitokondrium és a NADPH oxidáz. A pro- és antioxidáns egyensúly felborulásával a szabadgyökök túlsúlyba kerülnek és károsítják a sejt makromolekuláit, beleértve a DNS-t, mely a leggyakoribb oxidatív DNS károsodáshoz, a

8-oxo-7,8-dihidroguanin (8-oxoG) képződéséhez vezet. Fiziológias körülmények között (nukleusz kék terület) az OGG1 a bázis excíziós repair első lépésében kivágja a hibás guanint, majd az AP endonukleáz az abázikus helynél hasítja a foszfodiészter kötést, ami a PARP-1 enzim aktivációját okozza. Nagy mennyiségű DNS törés esetén a PARP-1 hiperaktiválódik, és elfogyasztja a sejt NAD^+ készletét, ami ATP deplációhoz és a sejt nekrozisához vezet. Intenzív oxidatív stressz esetén (nukleusz piros terület) az OGG1 elveszíti a katalitikus aktivitását, ennek ellenére továbbra is képes a szubsztátjához kötődni, és így a DNS-ben $\sim 70^\circ$ -os hajlást indukálni. Ez növeli az NF- κ B hozzáférését a kötőhelyéhez és elősegíti a transzkripciós apparátus összeszerelődését, ami a proinflammatorikus gének megnövekedett transzkripciójához vezet. Az OGG1 inhibitor gátolja az OGG1 DNS-hez való kötődését, ezáltal nem jön létre a DNS allosztérikus módosulása, és csökken az NF- κ B DNS-kötő aktivitása, illetve a gyulladásos citokinek expressziója. (Saját ábra, amely BioRender.com szoftverrel készült.)

A PARP-1 „kiütése” csökkenti a gyulladást és az acinus sejtek nekrozisát a ceruleinnel indukált pankreatitiszben.

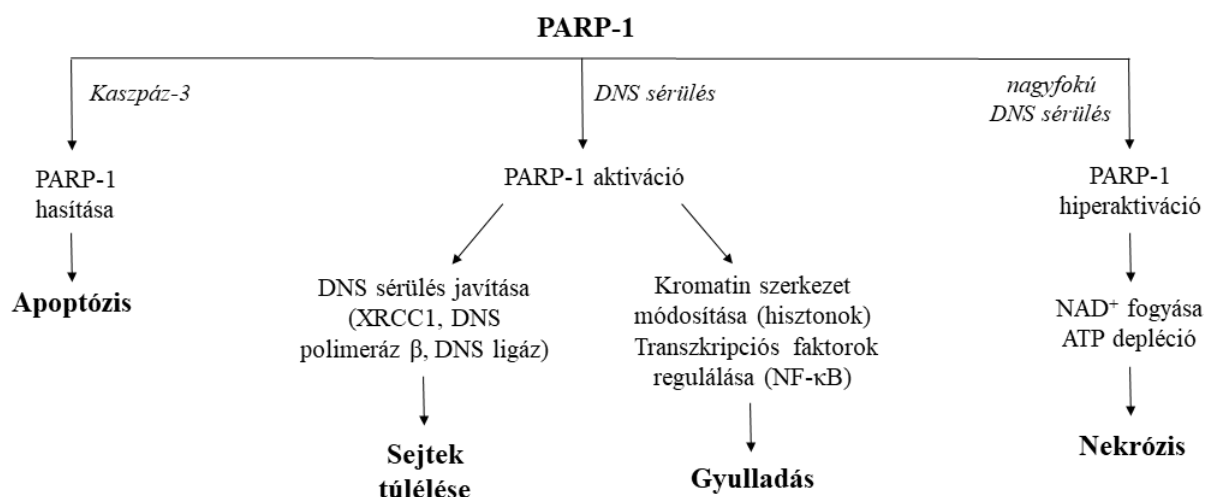
Az értekezésem alapjául szolgáló társszerzős cikkemben a PARP-1 szerepét vizsgáltam ceruleinnel kiváltott gyulladásos modellben. A PARP-1 a PARP család legintenzívebben tanulmányozott tagja, amely a celluláris PARiláció nagy részéért felelős sejtmagi fehérje. Számos sejt folyamat szabályozásában vesz részt, mint pl. a DNS hibajavítás, transzkripció, sejt differenciáció, sejthalál. A már korábban hivatkozott Los és mtsai. a PARP-1 szerepét az apoptózis és nekrozis folyamatában molekuláris kapcsolóként jellemezték, ugyanis nagymértékű DNS törés esetén az emelkedett PARP-1 aktivitás a NAD^+ fogyáshoz vezet, ami az ATP szintézis nélkülözhetetlen molekulája. Az ATP szint csökkenését tovább fokozza a nikotinamid NAD^+ molekulává történő rekonverziója: egy NAD^+ molekulához a sejt négy ATP-t használ fel [147]. Megállapítható tehát, hogy a sejtek nekrozisához vezető energiadeplációban a PARP-1 fontos szerepet tölt be. Az energiakészletek megóvása érdekében, az apoptotikus folyamatok indukálódása folyamán a kaspáz-3 hasítja a PARP-1-et, mely ennek a sejthaláltípusnak az egyik jellemzője. Fontos megemlíteni a PARP-1-hez köthető másik sejthalálformát is, mely során a PAR polimer sejtmagból a mitokondriumokhoz történő transzlokációja, egy jellegzetes AIF függő nekrotikus sejthalált, a parthanatost váltja ki [138].

Ezen kívül a PARP-1 szerepet játszik a gyulladásos folyamatokban is. A hisztonok PARilációja (pl. H1, H2B) a nukleoszóma destabilizálásához vezet, ami elősegíti a transzkripciós faktorok DNS-hez való hozzáférését. A PARP-1 képes kölcsönhatásba lépni az

NF- κ B-vel, illetve a p300-hoz kötődve szinergikusan koaktiválja a transzkripció faktort [143] [146].

A PARP-1^{-/-} egerekben csökkent az LPS-sel indukált gyulladás a tüdőben vad típusú társaikhoz képest, illetve ellenállóbbnak bizonyultak az endotoxinnal kiváltott sokkal szemben [195] [196]. Fontos megjegyezni, hogy a PARP-1^{-/-} egerek életképesek, termékenyek, nem mutatnak fenotípusos eltérést, viszont rendkívül érzékenyek az alkiláló ágensekkel (N-metil-N-nitrozo urea) és γ -sugárzással szemben. Továbbá a PARP-1^{-/-} sejtekben csökken a DNS-javító kapacitás [148] [197]. Ezek az eredmények rámutatnak a PARP-1 DNS hibajavításban betöltött fontos szerepére.

Kísérletünkben a gyulladást vad típusú és PARP-1^{-/-} egerekben indukáltuk. A PARP-1 „kiütése” csökkentette a szérum α -amiláz és lipáz szintjét és a granulociták infiltrációját a szövetben. A KO egerekből izolált primer acinus sejtekben alacsonyabb volt a nekrosis mértéke és növekedett a sejtek életképessége. A PARP-1 akut pankreatitiszben betöltött szerepét a 22. ábrán foglaltam össze.



22. ábra: A PARP-1 szerepe a sejthalálban és a gyulladásos folyamatokban.

A PARP-1 hozzájárul a gyulladásos folyamatokhoz: koaktivátorként hat az NF- κ B-re, valamint a hisztonok PARilációján keresztül dekonzenzálna a kromatint, ezáltal növelve a transzkripció faktorok hozzáférését a DNS-hez. Ezen kívül hozzájárul a gyulladás során keletkező oxidatív gyökök által okozott DNS léziók javításához, ezáltal segítve a sejtek túlélését. Azonban nagymértékű DNS károsodás esetén a PARP-1 a sejtek nekrosisát okozza. A gyulladás enyhébb formájában az acinus sejtekre jellemző sejthalál az apoptózis, amelynek fontos lépése – a sejt energiakészleteinek megőrzése érdekében – a PARP-1 hasítása.

IX. Összefoglalás

Az akut pankreatitisz az egyik leggyakoribb gasztrointesztinális kórkép. Kialakulásának oka sok esetben nem ismert, patomechanizmusa pedig a mai napig nem teljesen tisztázott. Már a betegség korai szakaszában felborul a pro- és antioxidáns folyamatok közötti egyensúly, ami a reaktív oxigén intermedierek fokozott termelődéséhez vezet.

Kutatásunk során az oxidatív stressz által kiváltott DNS sérülések javításában résztvevő OGG1 és PARP-1 enzimek szerepét vizsgáltuk az akut hasnyálmirigy-gyulladásban. Fiziológiás körülmények között az enzimek a sejtek túlélését segítik a DNS integritásának fenntartása révén, intenzív oxidatív stressz esetén azonban hozzájárulnak a gyulladásos folyamatok progressziójához.

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy az OGG1 gátlása (TH5487-tel) csökkenti az acinus sejtek nekrozisát, a proinflammatorikus citokinek képződését, a PAR akkumulációját, a leukociták infiltrációját és az ödémát a pankreaszban. A TH5487 gyulladáscsökkentő hatását két lehetséges mechanizmus vizsgálatával támasztottuk alá. Az egyik magyarázat az, hogy az OGG1 inhibitor csökkenti az NF- κ B DNS-kötő aktivitását, ezáltal csökken a gyulladásos gének expressziója. A másik jelenség a sejthalálhoz köthető. A TH5487 alkalmazása indukálja az apoptózist a sejtekben, ami csökkenti a szövetkárosodás mértékét. Továbbá, minthogy elmarad a 8-oxoG eltávolítása és az APE1 által okozott hasadás a DNS szálban, ezért csökken a PARP-1 aktiváció és a PARP-1 túlműködéséhez köthető nekrozis. Az utóbbi jelenség és a PARP-1 transzkripció szabályozásban betöltött szerepe lehet a magyarázat arra, hogy a PARP-1^{-/-} egerekben csökkent a szérum amiláz, lipáz szint és a granulociták infiltrációja, illetve az acinus sejtek nekrozisa.

Az eredményeink rávilágítanak az OGG1 enzim jelentőségére, ami ígéretes terápiás célpont lehet a hasnyálmirigy-gyulladás kezelésében. Mielőtt azonban az OGG1 inhibitor alkalmazása felmerülne a klinikumban, további kísérletek szükségesek az OGG1 gátlás esetleges, hosszútávú mutagén hatásainak a felderítésére. A PARP-1 akut pankreatitiszben betöltött szerepére irányuló kísérletek felhívják a figyelmet a PARP gátlószerek terápiás alkalmazásának lehetőségére is. A humán terápiában a BRCA mutációhoz köthető petefészek- és emlődaganatok kezelésére már használják a PARP inhibitorokat, de a nem onkológiai jellegű betegségek kezelésében felmerül néhány aggály, elsősorban a DNS-javítás gátlása kapcsán, ami növeli a mutagenézis kockázatát [198] [199].

X. Summary

Acute pancreatitis is one of the most common gastrointestinal disorders. Its pathogenesis is often unknown and its pathomechanism is still not entirely clarified. During the course of the disease, pro- and antioxidant processes become unbalanced relatively early on, leading to the accumulation of ROS-induced tissue damage.

We investigated the role of OGG1 and PARP-1 proteins as both enzymes are involved in the repair of oxidative stress-induced DNA damage. Under physiological conditions, the enzymes promote cell survival by maintaining DNA integrity but under intense oxidative stress they contribute to the progression of inflammation.

We found that inhibition of OGG1 with TH5487 reduced acinar cell necrosis, proinflammatory cytokine formation, PAR accumulation, leukocyte infiltration and edema in the pancreas. We have confirmed the anti-inflammatory effect of TH5487 by examining two possible mechanisms. One explanation is that the OGG1 inhibition decreases DNA-binding activity of NF- κ B, thereby reducing the expression of inflammatory genes. The other phenomenon is related to cell death. TH5487 diverts necrosis to apoptosis in cells which decreases tissue damage. Furthermore, since 8-oxoG deletion and DNA cleavage caused by APE1 are prevented, PARP-1 activation and PARP-1 activation mediated necrosis are both reduced. The latter phenomenon and the role of PARP-1 in transcriptional regulation may explain the decreased serum amylase and lipase levels, decreased granulocyte infiltration and necrosis of acinar cells in PARP-1^{-/-} mice.

The results obtained in our experiments highlight the importance of the OGG1 enzyme which may be a promising therapeutic target for the treatment of acute pancreatitis. However, before TH5487 could be therapeutically used, further experiments are needed to elucidate the long-term mutagenic effects of OGG1 inhibition. Studies discussing the role of PARP-1 in acute pancreatitis have drawn attention to the potential therapeutic use of PARP inhibitors. PARP inhibitors are already used in human therapy to treat *BRCA* mutant ovarian and breast cancers, but concerns related to compromised DNA repair and increased mutagenesis so far prevented the use of PARP inhibitors in non-oncological diseases.

XI. Irodalomjegyzék

- [1] Lotte Boxhoorn, Rogier P. Voermans, Stefan A. Bouwense: "Acute pancreatitis." *Lancet* (2020); 396: 726–34.
- [2] Pérez, Salvador, et al. "Redox signaling in acute pancreatitis." *Redox biology* 5 (2015): 1-14.
- [3] Ba, Xueqing and Istvan Boldogh. "8-Oxoguanine DNA glycosylase 1: Beyond repair of the oxidatively modified base lesions." *Redox biology* 14 (2018): 669-678.
- [4] Bürkle, Alexander and László Virág: Poly(ADP-ribose): "PARadigms and PARadoxes." *Molecular aspects of medicine* 34.6 (2013): 1046-1065.
- [5] Pál, Röhlich. "Szövektan." *Budapest: Semmelweis Kiadó* (2006).
- [6] DeLisle, Robert C. "Role of the actin cytoskeleton in acinar cell protein secretion." *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base* (2020)
- [7] Williams, John A. "Cholecystokinin (CCK) regulation of pancreatic acinar cells: physiological actions and signal transduction mechanisms." *Comprehensive Physiology* 9.2 (2011): 535-564.
- [8] Pandol, Stephen J. "The exocrine pancreas." *Colloquium series on integrated systems physiology: from molecule to function*. Vol. 3. №. 1. Morgan & Claypool Life Sciences, 2011.
- [9] Bonner-Weir Susan. "The endocrine pancreas." *Encyclopedia of Gastroenterology* (2004), Pages 675-680
- [10] Xiao, Amy Y., et al. "Global incidence and mortality of pancreatic diseases: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression of population-based cohort studies." *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* 1.1 (2016): 45-55.
- [11] Dunás-Varga, Veronika, et al. "Gyógyszer indukálta akut pancreatitis." *Central European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 5.3 (2019)
- [12] Paul G. Lankisch, Minoti Apte, and Peter A. Banks. "Acute pancreatitis." *Lancet* (2015): 386: 85–96
- [13] Colvin, Stephanie D., et al. "Acute pancreatitis: an update on the revised Atlanta classification." *Abdominal Radiology* 45.5 (2020): 1222-1231.

- [14] Szatmary, Peter, et al. "Acute pancreatitis: Diagnosis and treatment." *Drugs* (2022): 1-26.
- [15] Wang, Guo-Jun, et al. "Acute pancreatitis: etiology and common pathogenesis." *World journal of gastroenterology: WJG* 15.12 (2009): 1427.
- [16] Shelton, Celeste, et al. "PRSS1-related hereditary pancreatitis." *GeneReviews* (2019)
- [17] Del Vecchio Blanco, Giovanna, et al. "Idiopathic acute pancreatitis: a review on etiology and diagnostic work-up." *Clinical journal of gastroenterology* 12.6 (2019): 511-524.
- [18] Roberts, Stephen E., et al. "The incidence and aetiology of acute pancreatitis across Europe." *Pancreatology* 17.2 (2017): 155-165.
- [19] Stanley Robbins: A patológia alapjai (2009)
- [20] Jakkampudi, Aparna, et al. "Fatty acid ethyl ester (FAEE) associated acute pancreatitis: An ex-vivo study using human pancreatic acini." *Pancreatology* 20.8 (2020): 1620-1630.
- [21] Clemens, Dahn L., et al. "Alcoholic pancreatitis: New insights into the pathogenesis and treatment." *World journal of gastrointestinal pathophysiology* 7.1 (2016): 48.
- [22] Siegmund, Eva, et al. "Ethanol modifies the actin cytoskeleton in rat pancreatic acinar cells—comparison with effects of CCK." *Pancreatology* 4.1 (2004): 12-21.
- [23] Pallagi, Petra, et al. "Intracellular Ca²⁺ signalling in the pathogenesis of acute pancreatitis: recent advances and translational perspectives." *International Journal of Molecular Sciences* 21.11 (2020): 4005.
- [24] Kim, Joo Young, et al. "Transporter-mediated bile acid uptake causes Ca²⁺-dependent cell death in rat pancreatic acinar cells." *Gastroenterology* 122.7 (2002): 1941-1953.
- [25] Muili, Kamaldeen A., et al. "Bile acids induce pancreatic acinar cell injury and pancreatitis by activating calcineurin." *Journal of Biological Chemistry* 288.1 (2013): 570-580.
- [26] Ona, Xavier Basurto, David Rigau Comas, and Gerard Urrútia. "Opioids for acute pancreatitis pain." *Cochrane Database of Systematic Reviews* 7 (2013).
- [27] Munoz, Abilio, and David A. Katerndahl. "Diagnosis and management of acute pancreatitis." *American family physician* 62.1 (2000): 164-174.
- [28] Xia, Liang, et al. "A clinical study of early continuous high-volume-hemofiltration in the treatment of severe acute pancreatitis." *Zhonghua nei ke za zhi* 51.11 (2012): 871-874.

- [29] Frieden, Julian H. "The significance of jaundice in acute pancreatitis." *Archives of Surgery* 90.3 (1965): 422-426.
- [30] Waller, Anna, et al. "Acute pancreatitis: updates for emergency clinicians." *The Journal of emergency medicine* 55.6 (2018): 769-779.
- [31] Sugimoto, Maki, et al. "MPR-hCT imaging of the pancreatic fluid pathway to Grey-Turner's and Cullen's sign in acute pancreatitis." *Hepato-gastroenterology* 52.65 (2005): 1613-1616.
- [32] Ismail, Ola Z., and Vipin Bhayana. "Lipase or amylase for the diagnosis of acute pancreatitis?." *Clinical biochemistry* 50.18 (2017): 1275-1280.
- [33] Gomez, Dhanwant, et al. "Retrospective study of patients with acute pancreatitis: is serum amylase still required?." *BMJ open* 2.5 (2012): e001471.
- [34] Afghani, Elham. "Introduction to pancreatic disease: acute pancreatitis." *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base* (2014).
- [35] Takács, Tamás, et al. "Changes in diagnostic and therapeutic standards of acute pancreatitis in the clinical practice." *Orvosi Hetilap* 149.14 (2008): 645-654.
- [36] Hritz, István, et al. "Akut pancreatitis. A Magyar Hasnyálmirigy Munkacsoport bizonyítékon alapuló kezelési irányelvei." *Orvosi Hetilap* 156.7 (2015): 244-261.
- [37] Choi, T. K., et al. "Somatostatin in the treatment of acute pancreatitis: a prospective randomised controlled trial." *Gut* 30.2 (1989): 223-227.
- [38] Andriulli, A., et al. "Meta-analysis of somatostatin, octreotide and gabexate mesilate in the therapy of acute pancreatitis." *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 12 (1998): 237-245.
- [39] Seta, Takeshi, et al. "Treatment of acute pancreatitis with protease inhibitors: a meta-analysis." *European journal of gastroenterology & hepatology* 16.12 (2004): 1287-1293.
- [40] Nathens, Avery B., et al. "Management of the critically ill patient with severe acute pancreatitis." *Critical care medicine* 32.12 (2004): 2524-2536.
- [41] Poropat, Goran, et al. "Systematic Review with Trial Sequential Analysis of Prophylactic Antibiotics for Acute Pancreatitis." *Antibiotics* 11.9 (2022): 1191.
- [42] Kapetanos, Dimitrios J. "ERCP in acute biliary pancreatitis." *World Journal of Gastrointestinal Endoscopy* 2.1 (2010): 25

- [43] Cooley, Michelle M., et al. "Pancreatic acinar cell protein synthesis, intracellular transport, and export." *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base* (2020).
- [44] Minotti V. Apte, Romano C. Pirola, Jeremy S. Wilson. "Alcohol and the Pancreas" *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base* (2016)
- [45] Saluja, Ashok, et al. "Early intra-acinar events in pathogenesis of pancreatitis." *Gastroenterology* 156.7 (2019): 1979-1993.
- [46] van Acker, Gijs JD, George Perides, and Michael L. Steer. "Co-localization hypothesis: a mechanism for the intrapancreatic activation of digestive enzymes during the early phases of acute pancreatitis." *World journal of gastroenterology: WJG* 12.13 (2006): 1985.
- [47] Kang, Rui, et al. "Cell death and DAMPs in acute pancreatitis." *Molecular medicine* 20.1 (2014): 466-477.
- [48] Frossard, Jean-Louis, et al. "The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury." *Gastroenterology* 116.3 (1999): 694-701.
- [49] Makgoba, Malegapuru W., et al. "ICAM-1 a ligand for LFA-1-dependent adhesion of B, T and myeloid cells." *Nature* 331.6151 (1988): 86-88.
- [50] Fonyó, Attila. "Az orvosi élettan tankönyve." *Medicina könyvkiadó Rt, Budapest* (1999): 969-970.
- [51] Petersen, Ole H., and Robert Sutton. "Ca²⁺ signalling and pancreatitis: effects of alcohol, bile and coffee." *Trends in pharmacological sciences* 27.2 (2006): 113-120.
- [52] Zhao, Yongjuan, Richard Graeff, and Hon Cheung Lee. "Roles of cADPR and NAADP in pancreatic cells." *Acta Biochim Biophys Sin* 44.9 (2012): 719-729.
- [53] Petersen, Ole H., and Alexei V. Tepikin. "Polarized calcium signaling in exocrine gland cells." *Annu. Rev. Physiol.* 70 (2008): 273-299.
- [54] Li, Jun, et al. "Calcium signaling of pancreatic acinar cells in the pathogenesis of pancreatitis." *World Journal of Gastroenterology: WJG* 20.43 (2014): 16146.
- [55] Gerasimenko, Julia V., et al. "NAADP, cADPR and IP3 all release Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum and an acidic store in the secretory granule area." *Journal of Cell Science* 119.2 (2006): 226-238.

- [56] Gerasimenko, Julia V., et al. "Both RyRs and TPCs are required for NAADP-induced intracellular Ca^{2+} release." *Cell calcium* 58.3 (2015): 237-245.
- [57] Walseth, Timothy F., and Andreas H. Guse. "NAADP: from discovery to mechanism." *Frontiers in Immunology* 12 (2021).
- [58] Yule, David I. " Ca^{2+} signaling in pancreatic acinar cells." *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base* (2015).
- [59] Krüger, Burkhard, Elke Albrecht, and Markus M. Lerch. "The role of intracellular calcium signaling in premature protease activation and the onset of pancreatitis." *The American journal of pathology* 157.1 (2000): 43-50.
- [60] Raraty, Michael, et al. "Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97.24 (2000): 13126-13131.
- [61] Husain, Sohail Z., et al. "The ryanodine receptor mediates early zymogen activation in pancreatitis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102.40 (2005): 14386-14391.
- [62] Petersen, Ole H., et al. "The roles of calcium and ATP in the physiology and pathology of the exocrine pancreas." *Physiological Reviews* 101.4 (2021): 1691-1744.
- [63] Barrow, Stephanie L., et al. "ATP depletion inhibits Ca^{2+} release, influx and extrusion in pancreatic acinar cells but not pathological Ca^{2+} responses induced by bile." *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 455.6 (2008): 1025-1039.
- [64] Peng, Tsung-I., and Mei-Jie Jou. "Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1201.1 (2010): 183-188.
- [65] Duchen, Michael R. "Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death." *The Journal of physiology* 529.1 (2000): 57-68.
- [66] Giorgi, Carlotta, Saverio Marchi, and Paolo Pinton. "The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium." *Nature reviews Molecular cell biology* 19.11 (2018): 713-730.
- [67] Chandra, Rashmi, and Rodger A. Liddle. "Cholecystokinin." *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 14.1 (2007): 63-67.

- [68] Williams, John A. "Cholecystikinin (CCK) regulation of pancreatic acinar cells: physiological actions and signal transduction mechanisms." *Comprehensive Physiology* 9.2 (2011): 535-564.
- [69] Otsuki, Makoto. "Pathophysiological role of cholecystikinin in humans." *Journal of gastroenterology and hepatology* 15 (2000): 71-83.
- [70] Watanabe, T., M. Kudo, and W. Strober. "Immunopathogenesis of pancreatitis." *Mucosal immunology* 10.2 (2017): 283-298.
- [71] Saluja, Ashok K., et al. "Why does pancreatic overstimulation cause pancreatitis?." *Annu. Rev. Physiol.* 69 (2007): 249-269.
- [72] Hegyi, Péter, et al. "Commonly employed rodent models of experimental acute pancreatitis: their strengths and weaknesses, relevance to human disease, selection, and appropriate use." *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base* (2013).
- [73] Hyun, Jong Jin, and Hong Sik Lee. "Experimental models of pancreatitis." *Clinical endoscopy* 47.3 (2014): 212-216.
- [74] Steinberg, Susan F. "Structural basis of protein kinase C isoform function." *Physiological reviews* 88.4 (2008): 1341-1378.
- [75] Alexandre, Martine, and Edwin Thrower. "PKC." *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base* (2012).
- [76] Gaisano, Herbert Y. "A hypothesis: SNARE-ing the mechanisms of regulated exocytosis and pathologic membrane fusions in the pancreatic acinar cell." *Pancreas* 20.3 (2000): 217-226.
- [77] Rakonczay, Zoltan, et al. "The role of NF- κ B activation in the pathogenesis of acute pancreatitis." *Gut* 57.2 (2008): 259-267.
- [78] Oeckinghaus, Andrea, and Sankar Ghosh. "The NF- κ B family of transcription factors and its regulation." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1.4 (2009): a000034.
- [79] Gukovsky, Ilya, et al. "Early NF- κ B activation is associated with hormone-induced pancreatitis." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 275.6 (1998): G1402-G1414.

- [80] Virlos, Ioannis, et al. "Calpain I inhibitor ameliorates the indices of disease severity in a murine model of cerulein-induced acute pancreatitis." *Intensive care medicine* 30.8 (2004): 1645-1651.
- [81] Altavilla, Domenica, et al. "Attenuated Cerulein-Induced Pancreatitis in Nuclear Factor- κ B-Deficient Mice." *Laboratory investigation* 83.12 (2003): 1723-1732.
- [82] Szatmary, Peter, and Ilya Gukovsky. "The Role of Cytokines and Inflammation in the Genesis of Experimental Pancreatitis." *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base* (2016).
- [83] Kang, Miran, et al. "Lycopene inhibits IL-6 expression in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells." *Genes & nutrition* 6.2 (2011): 117-123.
- [84] Pandol, Stephen J., et al. "Ethanol diet increases the sensitivity of rats to pancreatitis induced by cholecystokinin octapeptide." *Gastroenterology* 117.3 (1999): 706-716.
- [85] Norman, James G., Gregory W. Fink, and Michael G. Franz. "Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression." *Archives of surgery* 130.9 (1995): 966-970.
- [86] Wajant, Harald, and Daniela Siegmund. "TNFR1 and TNFR2 in the Control of the Life and Death Balance of Macrophages." *Frontiers in cell and developmental biology* 7 (2019): 91.
- [87] Gukovskaya, Anna S., et al. "Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor- α . Role in regulating cell death and pancreatitis." *The Journal of clinical investigation* 100.7 (1997): 1853-1862.
- [88] Viatour, Patrick, et al. "Phosphorylation of NF- κ B and I κ B proteins: implications in cancer and inflammation." *Trends in biochemical sciences* 30.1 (2005): 43-52.
- [89] Denham, W. O. O. D. Y., et al. "Gene targeting demonstrates additive detrimental effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor during pancreatitis." *Gastroenterology* 113.5 (1997): 1741-1746.
- [90] Baumann, Bernd, et al. "Constitutive IKK2 activation in acinar cells is sufficient to induce pancreatitis in vivo." *The Journal of clinical investigation* 117.6 (2007): 1502-1513.
- [91] Zhang, Jun-Ming, and Jianxiong An. "Cytokines, inflammation and pain." *International anesthesiology clinics* 45.2 (2007): 27.

- [92] Arend, William P. "The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease." *Cytokine & growth factor reviews* 13.4-5 (2002): 323-340.
- [93] Fink, Gregory W., and James G. Norman. "Specific changes in the pancreatic expression of the interleukin 1 family of genes during experimental acute pancreatitis." *Cytokine* 9.12 (1997): 1023-1027.
- [94] Bhatia, Madhav, et al. "Inflammatory mediators in acute pancreatitis." *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland* 190.2 (2000): 117-125.
- [95] Scheller, Jürgen, Christoph Garbers, and Stefan Rose-John. "Interleukin-6: from basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities." *Seminars in immunology*. Vol. 26. No. 1. Academic Press, 2014.
- [96] Garbers, Christoph, and Jürgen Scheller. "Interleukin-6 and interleukin-11: same same but different." *Biological chemistry* 394.9 (2013): 1145-1161.
- [97] Salemi, Rossella, et al. "Co-Occurrence of Interleukin-6 Receptor Asp358Ala Variant and High Plasma Levels of IL-6: An Evidence of IL-6 Trans-Signaling Activation in Deep Vein Thrombosis (DVT) Patients." *Biomolecules* 12.5 (2022): 681.
- [98] Zhang, Hong, et al. "IL-6 trans-signaling promotes pancreatitis-associated lung injury and lethality." *The Journal of clinical investigation* 123.3 (2013): 1019-1031.
- [99] Rabe, Björn, et al. "Transgenic blockade of interleukin 6 transsignaling abrogates inflammation." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 111.3 (2008): 1021-1028.
- [100] Jones, Simon A., et al. "The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease." *The FASEB Journal* 15.1 (2001): 43-58.
- [101] Lesina, Marina, et al. "Interleukin-6 in inflammatory and malignant diseases of the pancreas." *Seminars in immunology*. Vol. 26. No. 1. Academic Press, 2014.
- [102] Bhatia, Madhav, et al. "MCP-1 but not CINC synthesis is increased in rat pancreatic acini in response to cerulein hyperstimulation." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 282.1 (2002): G77-G85.

- [103] Zhang, Xuan, et al. "Monocyte chemoattractant protein-1 induces endothelial cell apoptosis in vitro through a p53-dependent mitochondrial pathway." *Acta Biochim Biophys Sin* 43.10 (2011): 787-795.
- [104] Frossard, Jean Louis, et al. "Role of CCL-2, CCR-2 and CCR-4 in cerulein-induced acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury." *Journal of clinical pathology* 64.5 (2011): 387-393.
- [105] Menten, Patricia, Anja Wuyts, and Jo Van Damme. "Macrophage inflammatory protein-1." *Cytokine & growth factor reviews* 13.6 (2002): 455-481.
- [106] Sun, Jia, and Madhav Bhatia. "Blockade of neurokinin-1 receptor attenuates CC and CXC chemokine production in experimental acute pancreatitis and associated lung injury." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 292.1 (2007): G143-G153.
- [107] Zhou, Guo-Xiong, et al. "Protective effects of MCP-1 inhibitor on a rat model of severe acute pancreatitis." *Hepatobiliary & pancreatic diseases international: HBPD INT* 9.2 (2010): 201-207.
- [108] Bhatia, Madhav, et al. "Treatment with bindarit, a blocker of MCP-1 synthesis, protects mice against acute pancreatitis." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 288.6 (2005): G1259-G1265.
- [109] Nakamura, Yuji, et al. "CCR2 knockout exacerbates cerulein-induced chronic pancreatitis with hyperglycemia via decreased GLP-1 receptor expression and insulin secretion." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 304.8 (2013): G700-G707.
- [110] Guo, Chunyan, et al. "Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases." *Neural regeneration research* 8.21 (2013): 2003.
- [111] Yang, Shenshu, and Gaojian Lian. "ROS and diseases: Role in metabolism and energy supply." *Molecular and cellular biochemistry* 467.1 (2020): 1-12.
- [112] Ahmadinejad, Fereshteh, et al. "Molecular mechanisms behind free radical scavengers function against oxidative stress." *Antioxidants* 6.3 (2017): 51.
- [113] Milkovic, Lidija, et al. "Short overview of ROS as cell function regulators and their implications in therapy concepts." *Cells* 8.8 (2019): 793.

- [114] Tirichen, Hasna, et al. "Mitochondrial reactive oxygen species and their contribution in chronic kidney disease progression through oxidative stress." *Frontiers in physiology* (2021): 398.
- [115] Sanfey, Hilary, GREGORY B. Bulkley, and JOHN L. Cameron. "The role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis." *Annals of surgery* 200.4 (1984): 405.
- [116] Closa, D., et al. "Xanthine oxidase activation in cerulein-and taurocholate-induced acute pancreatitis in rats." *Archives internationales de physiologie, de biochimie et de biophysique* 102.3 (1994): 167-170.
- [117] Cao, Wei-Li, et al. "Potential role of NADPH oxidase in pathogenesis of pancreatitis." *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* 5.3 (2014): 169.
- [118] Yu, Ji Hoon, Kyung Hwan Kim, and Hyeyoung Kim. "Role of NADPH Oxidase and Calcium in Cerulein-Induced Apoptosis: Involvement of Apoptosis-Inducing Factor." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1090.1 (2006): 292-297.
- [119] Yu, Ji Hoon, et al. "NADPH oxidase and apoptosis in cerulein-stimulated pancreatic acinar AR42J cells." *Free Radical Biology and Medicine* 39.5 (2005): 590-602.
- [120] Gukovskaya, Anna S., et al. "Neutrophils and NADPH oxidase mediate intrapancreatic trypsin activation in murine experimental acute pancreatitis." *Gastroenterology* 122.4 (2002): 974-984.
- [121] Schoenberg, Michael H., Dieter Birk, and Hans G. Beger. "Oxidative stress in acute and chronic pancreatitis." *The American journal of clinical nutrition* 62.6 (1995): 1306S-1314S.
- [122] Schoenberg, M. H., et al. "Effect of antioxidant treatment in rats with acute hemorrhagic pancreatitis." *Digestive diseases and sciences* 39.5 (1994): 1034-1040.
- [123] Neuschwander-Tetri, B. A., et al. "Glutathione monoethyl ester ameliorates caerulein-induced pancreatitis in the mouse." *The Journal of clinical investigation* 89.1 (1992): 109-116.
- [124] Lavrovsky, Y., et al. "Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases." *Experimental gerontology* 35.5 (2000): 521-532.
- [125] Ushio-Fukai, Masuko. "Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS." *Antioxidants & redox signaling* 11.6 (2009): 1289-1299.

- [126] Zhang, Jixiang, et al. "ROS and ROS-mediated cellular signaling." *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016 (2016).
- [127] Oliveira-Marques, Virgínia, et al. "Role of hydrogen peroxide in NF- κ B activation: from inducer to modulator." *Antioxidants & redox signaling* 11.9 (2009): 2223-2243.
- [128] Lingappan, Krithika. "NF- κ B in oxidative stress." *Current opinion in toxicology* 7 (2018): 81-86.
- [129] Morgan, Michael J., and Zheng-gang Liu. "Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling." *Cell research* 21.1 (2011): 103-115.
- [130] Gloire, Geoffrey, and Jacques Piette. "Redox regulation of nuclear post-translational modifications during NF- κ B activation." *Antioxidants & redox signaling* 11.9 (2009): 2209-2222.
- [131] Algül, Hana, et al. "Different modes of NF- κ B/Rel activation in pancreatic lobules." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 283.2 (2002): G270-G281.
- [132] Booth, David M., et al. "Calcium and reactive oxygen species in acute pancreatitis: friend or foe?." *Antioxidants & redox signaling* 15.10 (2011): 2683-2698.
- [133] Bruce, Jason IE, and Austin C. Elliott. "Oxidant-impaired intracellular Ca²⁺ signaling in pancreatic acinar cells: role of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase." *American journal of physiology-cell physiology* 293.3 (2007): C938-C950.
- [134] Yu, Ji Hoon, and Hyeyoung Kim. "Oxidative stress and inflammatory signaling in cerulein pancreatitis." *World journal of gastroenterology: WJG* 20.46 (2014): 17324.
- [135] Esrefoglu, Mukaddes. "Experimental and clinical evidence of antioxidant therapy in acute pancreatitis." *World Journal of Gastroenterology: WJG* 18.39 (2012): 5533.
- [136] Du, Wei-Dong, et al. "Therapeutic efficacy of high-dose vitamin C on acute pancreatitis and its potential mechanisms." *World Journal of gastroenterology* 9.11 (2003): 2565.
- [137] Martínez-Bosch, Neus, et al. "Poly (ADP-ribose) polymerases: new players in the pathogenesis of exocrine pancreatic diseases." *The American Journal of Pathology* 186.2 (2016): 234-241.

- [138] Virág, László, et al. "Poly (ADP-ribose) signaling in cell death." *Molecular aspects of medicine* 34.6 (2013): 1153-1167.
- [139] Virág, László. "Structure and function of poly (ADP-ribose) polymerase-1: role in oxidative stress-related pathologies." *Current vascular pharmacology* 3.3 (2005): 209-214.
- [140] Alemasova, Elizaveta E., and Olga I. Lavrik. "Poly (ADP-ribosyl) ation by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins." *Nucleic acids research* 47.8 (2019): 3811-3827.
- [141] Gibson, Bryan A., and W. Lee Kraus. "New insights into the molecular and cellular functions of poly (ADP-ribose) and PARPs." *Nature reviews Molecular cell biology* 13.7 (2012): 411-424.
- [142] Beggs, Reena, and Eddy S. Yang. "Targeting DNA repair in precision medicine." *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* 115 (2019): 135-155.
- [143] Jubin, T., et al. "The PARP family: insights into functional aspects of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in cell growth and survival." *Cell proliferation* 49.4 (2016): 421-437.
- [144] Gupte, Rebecca, Ziyang Liu, and W. Lee Kraus. "PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes." *Genes & development* 31.2 (2017): 101-126.
- [145] Hassa, Paul O., et al. "The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF- κ B coactivator function." *Journal of Biological Chemistry* 276.49 (2001): 45588-45597.
- [146] Hassa, Paul O., and Michael O. Hottiger. "PARP-1 as Novel Coactivator of NF- κ B in Inflammatory Disorders." *Poly (ADP-Ribosyl) ation*. Springer, Boston, MA, 2006. 75-90.
- [147] Los, Marek, et al. "Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling." *Molecular biology of the cell* 13.3 (2002): 978-988.
- [148] Oliver, F. Javier, Josiane Menissier-de Murcia, and Gilbert de Murcia. "Poly (ADP-ribose) polymerase in the cellular response to DNA damage, apoptosis, and disease." *American journal of human genetics* 64.5 (1999): 1282.
- [149] Kim-Campbell, Nahmah, Hernando Gomez, and Hülya Bayir. "Cell death pathways: apoptosis and regulated necrosis." *Critical care nephrology*. Elsevier, 2019. 113-121.

- [150] Ahmad, Akbar, et al. "Effects of the poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in cerulein-induced pancreatitis." *Shock (Augusta, Ga.)* 53.5 (2020): 653.
- [151] Mazzon, Emanuela, et al. "Effects of 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase, in a mouse model of acute pancreatitis induced by cerulein." *European journal of pharmacology* 549.1-3 (2006): 149-156.
- [152] Yu, Jia, et al. "Poly (ADP-ribose) polymerase inhibition suppresses inflammation and promotes recovery from adrenal injury in a rat model of acute necrotizing pancreatitis." *BMC gastroenterology* 16.1 (2016): 1-10
- [153] Mota, R., et al. "Therapeutic treatment with poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors attenuates the severity of acute pancreatitis and associated liver and lung injury." *British journal of pharmacology* 151.7 (2007): 998-1005.
- [154] D'augustin, Ostiane, et al. "Lost in the crowd: how does human 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) find 8-oxoguanine in the genome?." *International Journal of Molecular Sciences* 21.21 (2020): 8360.
- [155] Ba, Xueqing, et al. "The role of 8-oxoguanine DNA glycosylase-1 in inflammation." *International journal of molecular sciences* 15.9 (2014): 16975-16997.
- [156] Bhakat, Kishor K., et al. "Acetylation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by p300 and its role in 8-oxoguanine repair in vivo." *Molecular and cellular biology* 26.5 (2006): 1654-1665.
- [157] Marsin, Stéphanie, et al. "Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1." *Journal of Biological Chemistry* 278.45 (2003): 44068-44074.
- [158] Hu, Jingping, et al. "Phosphorylation of human oxoguanine DNA glycosylase (α -OGG1) modulates its function." *Nucleic acids research* 33.10 (2005): 3271-3282.
- [159] Hooten, Nicole Noren, et al. "Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) binds to 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1)." *Journal of Biological Chemistry* 286.52 (2011): 44679-44690.
- [160] Wang, Katarina, et al. "The role of cysteines in the structure and function of OGG1." *Journal of Biological Chemistry* 296 (2021).

- [161] Bruner, Steven D., Derek PG Norman, and Gregory L. Verdine. "Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA." *nature* 403.6772 (2000): 859-866.
- [162] Park, Jong Woo, et al. "8-OxoG in GC-rich Sp1 binding sites enhances gene transcription in adipose tissue of juvenile mice." *Scientific reports* 9.1 (2019): 1-12.
- [163] Wang, Ruoxi, et al. "The roles of base excision repair enzyme OGG1 in gene expression." *Cellular and molecular life sciences* 75.20 (2018): 3741-3750.
- [164] Fedorova, Olga S., et al. "Stopped-flow kinetic studies of the interaction between Escherichia coli Fpg protein and DNA substrates." *Biochemistry* 41.5 (2002): 1520-1528.
- [165] Pan, Lang, et al. "Oxidized guanine base lesions function in 8-oxoguanine DNA glycosylase-1-mediated epigenetic regulation of nuclear factor κ B-driven gene expression." *Journal of Biological Chemistry* 291.49 (2016): 25553-25566.
- [166] Wang, Tao, et al. "The CpG dinucleotide adjacent to a κ B site affects NF- κ B function through its methylation." *International journal of molecular sciences* 18.3 (2017): 528.
- [167] Lao, Victoria Valinluck, Agus Darwanto, and Lawrence C. Sowers. "Impact of base analogues within a CpG dinucleotide on the binding of DNA by the methyl-binding domain of MeCP2 and methylation by DNMT1." *Biochemistry* 49.47 (2010): 10228-10236.
- [168] Ling, Charlotte, and Leif Groop. "Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes." *Diabetes* 58.12 (2009): 2718-2725.
- [169] Valinluck, Victoria, et al. "Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2)." *Nucleic acids research* 32.14 (2004): 4100-4108.
- [170] Arai, Tsuyoshi, et al. "High accumulation of oxidative DNA damage, 8-hydroxyguanine, in Mmh/Ogg1 deficient mice by chronic oxidative stress." *Carcinogenesis* 23.12 (2002): 2005-2010.
- [171] Mabley, Jon G., et al. "Potential role for 8-oxoguanine DNA glycosylase in regulating inflammation." *The FASEB journal* 19.2 (2005): 1-18.

- [172] Li, Guoping, et al. "8-Oxoguanine-DNA glycosylase 1 deficiency modifies allergic airway inflammation by regulating STAT6 and IL-4 in cells and in mice." *Free Radical Biology and Medicine* 52.2 (2012): 392-401.
- [173] Visnes, Torkild, et al. "Small-molecule inhibitor of OGG1 suppresses proinflammatory gene expression and inflammation." *Science* 362.6416 (2018): 834-839.
- [174] Hanna, Bishoy MF, Thomas Helleday, and Oliver Mortusewicz. "OGG1 inhibitor TH5487 alters OGG1 chromatin dynamics and prevents incisions." *Biomolecules* 10.11 (2020): 1483.
- [175] Robles, Lourdes, Nosratola D. Vaziri, and Hirohito Ichii. "Role of oxidative stress in the pathogenesis of pancreatitis: effect of antioxidant therapy." *Pancreatic disorders & therapy* 3.1 (2013): 112.
- [176] Kim, Hyeyoung. "Cerulein pancreatitis: oxidative stress, inflammation, and apoptosis." *Gut and liver* 2.2 (2008): 74.
- [177] Davies, Michael J., and Clare L. Hawkins. "The role of myeloperoxidase in biomolecule modification, chronic inflammation, and disease." *Antioxidants & Redox Signaling* 32.13 (2020): 957-981.
- [178] Gout, Johann, et al. "Isolation and culture of mouse primary pancreatic acinar cells." *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 78 (2013): e50514.
- [179] Williams, John A. "Isolation of rodent pancreatic acinar cells and acini by collagenase digestion." *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base* (2010).
- [180] Regdon, Zsolt, et al. "High-content screening identifies inhibitors of oxidative stress-induced parthanatos: cytoprotective and anti-inflammatory effects of ciclopirox." *British Journal of Pharmacology* 178.5 (2021): 1095-1113.
- [181] Brunyánszki, Attila, et al. "Genetic ablation of PARP-1 protects against oxazolone-induced contact hypersensitivity by modulating oxidative stress." *Journal of Investigative Dermatology* 130.11 (2010): 2629-2637.
- [182] Bhatia, Madhav. "Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 286.2 (2004): G189-G196.

- [183] Mathy, N. L., et al. "Interleukin-16 stimulates the expression and production of pro-inflammatory cytokines by human monocytes." *Immunology* 100.1 (2000): 63-69.
- [184] Pezzilli, Raffaele, et al. "Serum interleukin-10 in human acute pancreatitis." *Digestive diseases and sciences* 42.7 (1997): 1469-1472.
- [185] Iain, L. Campbell "Chemokines." *Encyclopedia of the Neurological Sciences* (2003) Pages: 686-691
- [186] Tando, Yusuke, et al. "Caerulein-induced NF- κ B/Rel activation requires both Ca^{2+} and protein kinase C as messengers." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 277.3 (1999): G678-G686.
- [187] Steinle, Anne U., et al. "NF- κ B/Rel activation in cerulein pancreatitis." *Gastroenterology* 116.2 (1999): 420-430.
- [188] Algül, Hana, et al. "Pancreas-specific RelA/p65 truncation increases susceptibility of acini to inflammation-associated cell death following cerulein pancreatitis." *The Journal of clinical investigation* 117.6 (2007): 1490-1501.
- [189] Lee, Peter J., and Georgios I. Papachristou. "New insights into acute pancreatitis." *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 16.8 (2019): 479-496.
- [190] Watanabe, T., M. Kudo, and W. Strober. "Immunopathogenesis of pancreatitis." *Mucosal immunology* 10.2 (2017): 283-298.
- [191] Ba, Xueqing, et al. "8-oxoguanine DNA glycosylase-1 augments proinflammatory gene expression by facilitating the recruitment of site-specific transcription factors." *The Journal of Immunology* 192.5 (2014): 2384-2394.
- [192] Bacsi, Attila, et al. "Increased ROS generation in subsets of OGG1 knockout fibroblast cells." *Mechanisms of ageing and development* 128.11-12 (2007): 637-649.
- [193] Xia, Jing, et al. "Inhibition of 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) expression suppresses polycystic ovarian syndrome via the NF- κ B signaling pathway." *Reproductive Biology* 22.3 (2022): 100679.
- [194] Minowa, Osamu, et al. "Mmh/Ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97.8 (2000): 4156-4161.

- [195] Oliver, F. Javier, et al. "Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF- κ B activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice." *The EMBO journal* 18.16 (1999): 4446-4454.
- [196] Liaudet, Lucas, et al. "Activation of poly (ADP-Ribose) polymerase-1 is a central mechanism of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation." *American journal of respiratory and critical care medicine* 165.3 (2002): 372-377.
- [197] Krishnakumar, Raga, and W. Lee Kraus. "The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets." *Molecular cell* 39.1 (2010): 8-24.
- [198] Chen, Alice. "PARP inhibitors: its role in treatment of cancer." *Chinese journal of cancer* 30.7 (2011): 463.
- [199] Berger, Nathan A., et al. "Opportunities for the repurposing of PARP inhibitors for the therapy of non-oncological diseases." *British journal of pharmacology* 175.2 (2018): 192-222.

XII. Tárgyszavak/Key words

heveny hasnyálmirigy-gyulladás / acute pancreatitis

oxidatív stressz / oxidative stress

NF- κ B transzkripció faktor / NF- κ B transcription factor

citokinek / cytokines

sejthalál / cell death

PARP-1 enzim / PARP-1 enzyme

8-Oxoguanin DNS glikoziláz 1 / 8-Oxoguanine DNA glycosylase 1

XIII. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Prof. Dr. Virág Lászlónak, aki segítette szakmai fejlődésemet és értékes tanácsaival támogatta PhD értekezésem elkészítését.

Továbbá köszönettel tartozom munkatársaimnak Nagy-Pénzes Máténak, Dr. Tarek El-Hamolynak, Dr. Kovács Katalinnak, Dr. Regdon Zsoltnak, Dr. Demény Máténak, Dr. Hegedűs Csabának, Dr. Kiss Alexandrának, Dr. Polgár Zsuzsannának, Dr. Kókai Endrének, Varga Dávidnak, Tankáné Farkas Andreának, Herbály Mihálynének a kísérletekhez nyújtott segítségükért.

Illetve szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátnőmnek, akik támogattak és bátorítottak céljaim elérésében.

A PhD értekezésben bemutatott eredmények létrejöttét a GINOP-2.3.2.-STAY ALIVE pályázatok támogatták.

XIV. Publikációs lista



**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/12/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Hajnádý Zoltán

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Hajnádý, Z.**, Nagy-Pénzes, M., Demény, M. Á., Kovács, K., El-Hamoly, T., Maléth, J., Hegyi, P. J., Polgár, Z., Hegedűs, C., Virág, L.: OGG1 Inhibition Reduces Acinar Cell Injury in a Mouse Model of Acute Pancreatitis.
Biomedicines. 10 (10), 1-17, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines10102543>
IF: 4.757 (2021)
2. El-Hamoly, T.*, **Hajnádý, Z.***, Nagy-Pénzes, M., Bakondi, E., Regdon, Z., Demény, M. Á., Kovács, K., Hegedűs, C., Abd El-Rahman, S. S., Szabó, É., Maléth, J., Hegyi, P. J., Virág, L.: Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Promotes Inflammation and Fibrosis in a Mouse Model of Chronic Pancreatitis.
Int. J. Mol. Sci. 22 (7), 1-15, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22073593>
* Megosztott első szerzős közlemény.
IF: 6.208

További közlemények

3. Nagy-Pénzes, M., **Hajnádý, Z.**, Regdon, Z., Demény, M. Á., Kovács, K., El-Hamoly, T., Maléth, J., Hegyi, P., Hegedűs, C., Virág, L.: Tricetin Reduces Inflammation and Acinar Cell Injury in Cerulein-Induced Acute Pancreatitis: the Role of Oxidative Stress-Induced DNA Damage Signaling.
Biomedicines. 10 (6), 1-20, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines10061371>
IF: 4.757 (2021)





4. Regdon, Z., Demény, M. Á., Kovács, K., **Hajnády, Z.**, Nagy-Pénzes, M., Bakondi, E., Kiss, A., Hegedűs, C., Virág, L.: High-Content Screening identifies inhibitors of oxidative stress-induced parthanatos: cytoprotective and anti-inflammatory effects of ciclopirox.
Br. J. Pharmacol. 2021, 1-19, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.15344>
IF: 9.473
5. Bakondi, E., Singh, S. B., **Hajnády, Z.**, Nagy-Pénzes, M., Regdon, Z., Kovács, K., Hegedűs, C., Madácsy, T., Maléth, J., Hegyi, P., Demény, M. Á., Nagy, T., Kéki, S., Szabó, É., Virág, L.: Spilanthol Inhibits Inflammatory Transcription Factors and iNOS Expression in Macrophages and Exerts Anti-inflammatory Effects in Dermatitis and Pancreatitis.
Int. J. Mol. Sci. 20 (17), 1-18, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20174308>
IF: 4.556
6. Fellows, R., Denizot, J., Stellato, C., Cuomo, A., Jain, P., Stoyanova, E., Balázs, S., **Hajnády, Z.**, Liebert, A., Kazakevych, J., Blackburn, H., Correa, R. O., Fachí, J. L., Sato, F. T., Ribeiro, W. R., Ferreira, C. M., Perée, H., Spagnuolo, M., Mattiuz, R., Matolcsi, C., Guedes, J., Clark, J., Veldhoen, M., Bonaldi, T., Vinolo, M. A. R., Varga-Weisz, P.: Microbiota derived short chain fatty acids promote histone crotonylation in the colon through histone deacetylases.
Nat Comms. 9 (1), 1-15, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-02651-5>
IF: 11.878

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 41,629

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,965**

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

Debrecen, 2023.01.16.



XV. Függelék

A függelék az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatait tartalmazza: