

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Az OGG1 enzim szerepének vizsgálata az akut
hasnyálmirigy-gyulladásban**

Hajnády Zoltán

Témavezető: Prof. Dr. Virág László



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

AZ OGG1 ENZIM SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA AZ AKUT HASNYÁLMIRIGY- GYULLADÁSBAN

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

Írta: Hajnádý Zoltán okleveles biomérnök MSc

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Dr. Ujhelyi Zoltán, PhD

Dr. Madácsy Tamara, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

tagok: Dr. Ujhelyi Zoltán, PhD

Dr. Madácsy Tamara, PhD

Dr. Pallagi Petra, PhD

Dr. Szöllősi Attila Gábor, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati
Intézet „A” épület tanterme, 2023. október 27. 13:00 óra

Irodalmi áttekintés

Az AP incidenciája és etiológiája

Az akut pankreatitisz (AP) a hasnyálmirigy heveny gyulladásos betegsége, amelyet szignifikáns mortalitás jellemez. A betegség sugárzó hasi fájdalommal, hányingerrel, hányással jár, súlyosabb esetben láz, tachycardia, sokszervi elégtelenség alakulhat ki. A módosított Atlantai klasszifikáció alapján enyhe, közép súlyos és súlyos formáját különböztetjük meg. A kórlefolyás az esetek 80%-ában enyhe, amely koplalás és folyadékpótlás mellett egy héten belül meggyógyul; 20%-ban azonban a gyulladás súlyos, nekrotizáló formája alakul ki, ami a beteg életét veszélyeztető állapothoz is vezethet.

Az AP éves előfordulási gyakorisága országonként változó. Az egyik legfrissebb, 44 tanulmányt átfogó meta-analízis alapján növekvő tendenciát mutat a nyugati világ legtöbb országában. Magyarországon évente kb. 20-50 esetet regisztrálnak 100.000 lakosra vonatkoztatva.

Kialakulásáért nagyrészt az epekő és a krónikus alkoholfogyasztás felel, de számos más etiológiai tényező (vírusfertőzés, gyógyszerhatás, hipertrigliceridémia, tumor, trauma) is ismert. Az esetek 10-30%-ában nem lehet azonosítani a kiváltó okot (idiopátiás AP). Biliáris pankreatitisz esetén epekő keletkezik, amely migrációja során elakad az epevezeték és a hasnyálmirigy-vezeték egyesülésénél található Vater-papillánál. Az obstrukció az epe pankreaszba való visszafolyásához és intraduktális nyomásnövekedéshez vezet. Ennek következménye a kalcium homeosztázis felborulása és az emésztőenzimnek mirigyen belüli aktivációja. Magyarországon a hasnyálmirigy-gyulladás 50%-ának hátterében az alkoholfogyasztás áll, Európában hazánkat csak Lettország, Finnország, Románia és Oroszország előzi meg. Az alkohol fokozza az exokrin mirigy működését, ami a fehérjegyazdag pankreasz-nedv besűrűsödéséhez és a duktusz elzáródásához vezet. Továbbá toxikus hatással van az acinus sejtekre, mivel az oxidatív metabolizmus során reaktív oxigén gyökök keletkeznek, amelyek károsítják a sejt membránját, fehérjéit, DNS-ét.

Az akut pancreatitis patomechanizmusa

Az AP kialakulásának 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. Ezekről röviden az alábbiakban ejtek szót, részletesen az értekezésem IV.5 fejezetében ismertetem.

A proenzimek intraacináris aktiválódása

A tudomány mai állása szerint az egyik korai patológiás esemény a proenzimek transzportjának zavara az acinus sejten belül. Élettani körülmények között az emésztőenzimek az endoplazmás retikulumban történt szintézisüket követően zimogén granulumokba transzportálódnak és csak a szekréciót követően aktiválódnak a vékonybél lumenében. Patológiás esetekben azonban előfordul, hogy a proenzimek közös organellumba kerülnek a lizoszomális hidrolázokkal. A kolokalizáció során egy lizoszomális cisztein proteáz, a katepszin B aktiválja a tripszinogén-tripszin átalakulást, ami további proenzimek aktivációjának kaszkádját indítja el. Ez az acinus sejt károsodásához és a mirigy önemésztődéséhez vezet.

A citokinek szerepe az AP-ben

Már az 1990-es években ráirányult a figyelem az NF- κ B szerepére a hasnyálmirigy-gyulladásban. A kutatók kimutatták, hogy a transzkripciós faktor a pankreatitisz korai szakaszában aktiválódik és számos a gyulladásban szerepet játszó mediátorok átírását indukálja. Ezek közé tartoznak többek között a citokinek (tumor-nekrózis faktor, interleukinek, kemokinek) és az adhézións molekulák. A citokinek kis molekulású fehérjék, amelyeknek a forrásai nemcsak az aktiválódott leukociták lehetnek, hanem az acinus sejtek is. Az acinus sejtek károsodása és a citokinek képződése helyi gyulladásos válaszhoz vezetnek, amit a leukociták infiltrációja kísér. Az immunsejtek vándorlását a kapillárosok endotéliumán keresztül az adhézións molekulák (pl. ICAM-1) segítik, melyek expressziója az AP-ben emelkedik. A citokinek közül az egyik legszélesebb körben tanulmányozott fehérje a tumor nekrosis faktor- α (TNF- α), melyet főként a makrofágok termelnek, de az acinus sejtek is képesek a szintézisére. A citokin az NF- κ B aktiválásán keresztül vesz részt a gyulladásos folyamatok beindításában. A gyulladásos kaszkádban fontos szerepet játszik még az IL-1 β és az IL-6, melyek szintje a pankreasban korrelál a hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságával. Előbbi aktiválja a neutrofileket és indukálja az adhézións molekulák upregulációját, utóbbi az

sIL-6 receptorhoz kötődve vesz részt a proinflammatorikus folyamatok indukálásában (trans-signaling útvonal). Értekezésemben a IV.5.6 fejezetben tárgyalom a kemokinek szerepét is, melyek közül számosnak a szintje jelentősen emelkedik az AP-ben.

A kolecisztokinin szerepe az AP-ben

A kolecisztokinin (CCK) egy peptidhormon. 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.

Biliáris pankreatitisz esetén magas plazma CCK-szintet diagnosztizáltak a betegekben. A kutatók úgy vélik, hogy az emelkedett hormon koncentráció tovább súlyosbíthatja a gyulladást és az AP prognózisát, mivel stimulálja a sérült pankreaszt. A CCK hatásmechanizmusát állatkísérletekben is tanulmányozták, melyek során kimutatták, hogy a szupramaximális koncentrációban (maximális amiláz szekréciót előidéző dózis feletti koncentráció) alkalmazott CCK gátolta az enzimszekréciót, ami a zimogének akkumulációjához és aktivációjához vezetett a sejten belül. Ez a hatásmechanizmus az alapja a kísérleteinkben végzett ceruleinrel indukált AP modellnek. A cerulein egy CCK analóg, ami fiziológiás mennyiségben a CCK1R-hoz (magas affinitású CCKR) kötődve váltja ki a zimogének exocitózisát. 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 (hiperamilázémia, gyulladós sejtek infiltrációja, ödéma) jól reprodukálhatók állatkísérletekben.

Az oxidatív stressz szerepe az AP-ben

Az elmúlt évtizedek kutatásainak egyik fő irányvonala a reaktív oxigén gyökök (ROS) AP-ben betöltött szerepének feltárása volt. Kimutatták, hogy amíg az oxigéngyökök forrása a pankreatitisz enyhébb formájában az infiltrálódott leukociták, addig a nekrotizáló AP esetén a xantin oxidáz. Az acinus sejtek destrukciója során kiszabaduló proteolitikus enzimek katalizálják a xantin-dehidrogenáz $\rightarrow$ xantin-oxidáz konverziót. A xantin-oxidáz a hipoxantin és xantin oxidációja során állít elő szuperoxidot. Az oxigéngyökök másik forrása a granulociták NADPH oxidáza, azonban a kutatók leírták az enzim expresszióját az acinus sejtekben is.

A reaktív gyökök már az AP korai szakaszában felszabadulnak, amit az endogén antioxidáns enzimek (szuperoxid-diszmutáz, kataláz, glutation-peroxidáz) mennyiségének csökkenése kísér. Ez a pro- és antioxidáns folyamatok közötti egyensúly felborulásához és oxidatív stresszhez vezet. A feleslegbe került ROS többféle útvonalon hat az acinus sejtekre. Egyrészt károsítják a sejtmembránt, mivel a zsírsavakkal reagálva a membránlipidek peroxidációját és a sejt dezintegrációját okozzák. A sérülés a kapillárisok és vénák endotél rétegére is kiterjed, ennek következtében növekedik az erek permeabilizációja, ami ödémát okoz. Másrészt részt vesznek az NF- κ B aktiválásában pl: a H_2O_2 IKK független útvonalon indukálja az NF- κ B aktivációját a hasnyálmirigy lobulusaiban.

A reaktív oxigén gyökök által kiváltott kóros folyamatok közé tartozik a kalcium homeosztázis felborulása is. Ennek magyarázata az acinus sejtek kalciumion-szint szabályozásban résztvevő csatornáinak a módosulásában keresendő. A rianodin receptor (RyR) oxidációja a csatorna aktiválásához vezet, a ROS pedig növeli az inozitol-1,4,5-triszfoszfát receptor (IP₃R) szenzitivitását az IP₃-mal szemben. A Ca^{2+} -ATPáz pumpák is szenzitívek a redox környezet változásaira. A H_2O_2 -vel kezelt acinus sejtekben a PMCA gátlás alá kerül. További fontos felfedezés volt, hogy a SERCA pumpák 6 redox-szenzitív cisztein véget tartalmaznak, melyek közül a Cys674 szulfonilációját és ezáltal a SERCA gátlását figyelték meg tartós oxidatív stressz körülmények között. Ezen folyamatok hatására a citoszolikus Ca^{2+} szint tartósan megemelkedik, ami az emésztőenzimek sejten belüli aktivációját okozza. Az intracelluláris Ca^{2+} túltelítődés további következménye a mitokondrium károsodása. Az emelkedett citoszolikus Ca^{2+} hatására kalciumionok áramlanak a mitokondriumba. Amennyiben tartós mitokondriális Ca^{2+} szint alakul ki, kinyílik a mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus (MPTP), ami a mitokondriális membránpotenciál csökkenéséhez, sérült ATP szintézishez és sejthalálhoz vezet.

PARP-1 szerepe az AP-ben

A gyulladás során keletkezett reaktív oxigén gyökök nemcsak a fehérjéket és a lipideket, hanem a nukleinsavakat is károsítják. A DNS hibák javítása alapvető fontosságú a genom-integritás megőrzéséhez. Ebben játszik szerepet a poli-ADP-ribóz polimeráz-1 (PARP-1) enzim, amely a DNS törés hatására a két Zn-ujj doménje segítségével hozzákötődik a DNS-hez, majd a NAD^+ hasításával nikotinamidot és ADP-ribózt (ADPR) állít elő, és az utóbbi molekulákat kovalens módon kapcsolja az akceptor proteinek oldalláncára. Az elágazó láncú PAR polimerek szignálmolekulaként szolgálnak a DNS hibajavításában résztvevő enzimek számára.

A PARP-1 enzim NAD^+ felhasználásához köthető az AP-ben betöltött egyik szerepe. A gyulladás során keletkező oxidatív stressz nagy mennyiségű DNS károsodást idéz elő, amely a PARP-1 hiperaktivációjához, ezáltal a NAD^+ molekula fogyásához és ATP deplációhoz vezet. Az energiaegyensúly felborulása végül a sejt nekrotikus halálát okozza. 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.

A PARP-1 a transzkripció folyamatok szabályozásán keresztül is hozzájárul a pankreatitisz kialakulásához. A hisztonok PARilációja nagy negatív töltést kölcsönöz a fehérjének. Ennek következtében elektrosztatikus taszítás lép fel a DNS és a hisztonok között, ami könnyíti a transzkripció faktorok DNS-hez való hozzáférését. Továbbá a PARP-1 a p300-zal komplexet alkotva szinergikusan koaktiválja az NF- κ B-t.

Az enzimnek a betegségben betöltött szerepét igazolja, hogy a pankreasz immunhisztokémiai vizsgálata során a PAR akkumulációját figyelték meg az AP-ben elhunyt pácienseknél, miközben az egészséges egyéneknél nem volt detektálható PARiláció. Ezek a megfigyelések irányították rá a kutatók figyelmét a PARP gátlók használatára, amellyel ígéretes állatkísérletes eredmények születtek. A PARP inhibitorok (PJ34, 3-AB, olaparib) alkalmazása csökkentette az amiláz, lipáz és citokinek (TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1) mennyiségét a szérumban, ezen felül csökkent az lipidperoxidáció mértéke és mieloperoxidáz aktivitás is a pankreaszban. Továbbá a gátlók csökkentették a PAR és ICAM-1 szintjét is a pankreaszban.

A 8-oxoG és az OGG1 szerepe a gyulladásban

A ROS által okozott egyik leggyakoribb oxidatív DNS károsodás a 8-oxo-7,8-dihidroguanin (8-oxoG). Ehhez a lézióhoz köthető a redox-patobiokémia területének egyik legújabb fejleménye, amelyet Boldogh István és kutatócsapata tárt fel. Megfigyelték, hogy a proinflammatorikus gének promóterei magas GC tartalmúak és a gyulladás során keletkező 8-oxoG léziók mennyisége korrelál a transzkripció aktivitással ezekben a génszabályozó régiókban. A folyamatban szerepet játszik a 8-oxoG javításáért felelős enzim, a 8-oxoguanin DNS glikoziláz-1 (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 fehérjéi fejezik be a DNS szál helyreállítását. 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. Ekkor az OGG1 visszanyeri enzimaktivitását, ami a hibás bázis kivágásához és a transzkripció gépezet szétszerelődéséhez vezet.

Az OGG1 gyulladásban betöltött szerepét számos experimentális kutatás támasztotta alá. Az OGG1 knockout egerek ellenállóbbak voltak az LPS-sel, oxazolonnal vagy ovalbuminnal kiváltott gyulladással szemben. Továbbá az OGG1-csendesített egerekben csökkent a légúti gyulladás mértéke.

Célkitűzések

Az akut hasnyálmirigy-gyulladás incidenciája az elmúlt évtizedekben növekvő tendenciát mutat az életmóddal összefüggésbe hozható rizikófaktorok (magas zsírtartalmú táplálkozás következtében epekő kialakulása, krónikus alkoholfogyasztás) egyre gyakoribb 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.

Olyan molekulák vizsgálatát tűztük ki célul, amelyek hipotézisünk szerint a pankreasz gyulladásos folyamataiban szerepet játszhatnak. A patomechanizmus feltárásával lehetőség nyílna 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. 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.

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:

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

Módszerek

Az állatkísérletek kiváló lehetőséget teremtenek a hasnyálmirigy-gyulladás modellezésére, a patomechanizmus tanulmányozására és különböző farmakológiai ágensek tesztelésére. Kísérleteinkhez a ceruleinrel indukált AP modellt választottuk. Ez egy jól reprodukálható, nem invazív modell, mely megfelelően reprezentálja a humán gyulladás jellegzetességeit, szövettani elváltozásait.

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 µg/kg mennyiségű cerulein intraperitoneális injekcióval idéztük elő, mialatt a kontroll egerek fiziológias sóoldatot kaptak. A vér és szövetminták begyűjtése 10 órával az első cerulein oltás után történt.

A TH5487 hatását primer acinus sejteken is teszteltük, melyek jó lehetőséget nyújtanak az exokrin pankreaszban bekövetkező ceruleinrel indukált sejthalálnak az *in vitro* tanulmányozására.

A munkánk során alkalmazott anyagokat és módszereket terjedelmi okok miatt a tézisben nem ismertetem, az értekezés VI. fejezetében megtalálható.

Eredmények

Az OGG1 gátlása csökkenti az acinus sejtek károsodását és az inflammatorikus sejtek extravazációját

Annak érdekében, hogy megállapítsuk az OGG1 inhibitor hatásosságát az AP modellben, elsőként az α -amiláz és lipáz szintjét mértük meg a szérumban, illetve az MPO szintjét a szövetben. A szérum-enzimek szintjének emelkedése az acinus sejtek károsodását jelzi, míg az utóbbi paraméterből a granulociták infiltrációjára lehet következtetni a pankreaszban. A cerulein kezelés 4-szeresére növelte a szérum α -amiláz, és 14-szeresére a szérum lipáz szintjét. Az MPO szintje közel 7-szeresére emelkedett. Az OGG1 inhibitor előkezelés redukálta az cerulein injekciók által kiváltott szérum-enzimek szintjének emelkedését, illetve szigfinikásan csökkentette a neutrofilek mennyiségét a szövetben.

Az OGG1 gátlása csökkenti a pankreasz szöveti károsodásának mértékét

Az AP-re jellemző hisztológiai elváltozásokat a hasnyálmirigy paraffinos metszetein vizsgáltuk, melyet hematoxilinnel és eozinnal festettünk meg. A morfológiai változásokat a Debreceni Egyetem Patológiai Intézetének munkatársa értékelte ki és egy 0-tól (nincs patológiai elváltozás) 3-ig (nagy mértékű elváltozás) terjedő skálán pontozta. Az OGG1 gátlása szignifikánsan csökkentette az intersticiális ödémát, az infiltrálódott immunsejtek számát és a nekrozis mértékét.

Az OGG1 gátlása csökkenti a sejtmagi PARilációt, viszont nincs hatással a PARP-1 enzim expressziójára

Az OGG1 gátlásának PARilációra kifejtett hatását immunfluoreszcens kísérletben vizsgáltuk. A PAR polimerek mennyisége szignifikánsan emelkedett a ceruleinnel indukált gyulladásban, amit a TH5487 kezelés csökkentett. Annak megállapítására, hogy a redukálódott PARiláció köthető-e a PARP-1 enzim szintjének változásához a pankreaszban, PARP-1 immunfestést végeztünk. A ceruleinnel kezelt egerekben kétszeresére nőtt a PARP-1 enzim mennyisége a kontroll csoporthoz képest, viszont a TH5487 kezelés nem volt hatással az enzim expressziójára. Az eredményekből azt a megállapítást vontuk le, hogy AP modellünkben az OGG1 gátlása a PARP-1 aktivitására volt hatással.

Az OGG1 gátlás hatására az acinus sejtek pusztulása a nekrozis irányából az apoptózis felé tolódik, miközben a sejtek életképessége nő

Kísérletünkben hasított PARP-1 immunfestéssel következtettünk az apoptózis mértékére a pankreaszban. A ceruleinnel kezelt csoportokban szignifikánsan nőtt a hasított PARP-1 mennyisége a kontroll egerekhez viszonyítva, ugyanakkor a TH5487-tel kezelt egerekben volt a legmagasabb az apoptózis mértéke. Az OGG1 inhibitor sejtpusztulásra kifejtett hatását *in vitro* kísérletekben is tanulmányoztuk. Ehhez C57BL/6 egérből izolált primer sejteket használtunk. A sejtekhez különböző koncentrációjú TH5487-tel kezeltük elő, majd 24 órás cerulein kezeléssel váltottuk ki a sejtpusztulást. A sejtek életképességét calcein esszével, a nekrozist Sytox Green festéssel és a felülúszó LDH szintjének a mérésével határoztuk meg. A TH5487 kezelés szignifikánsan csökkentette a nekrozist és növelte a sejtek életképességét. Kaszpáz 3/7 aktivációs esszével vizsgáltuk a sejtekben az apoptotikus sejthalál mértékét: 24 órán keresztül végeztük a mérést környezeti kontroll (5% CO₂, 37 °C) mellett, 3 óránként detektálva a fluoreszcens jel változását 502/530 nm-en. A TH5487 szignifikánsan növelte az apoptózis mértékét a sejtekben.

Az OGG1 gátlás csökkenti a gyulladásos citokinek expresszióját az akut hasnyálmirigy-gyulladásban

Az OGG1 gátlásának gyulladásra kifejtett hatását a citokinek szintjének mérésével vizsgáltuk a pankreaszban. A ceruleinnel kezelt egerekben a 40 vizsgált citokin közül 10 szintje több mint háromszorosára növekedett a kontroll csoporthoz képest, melyek közül számosnak a szintjét csökkentette a TH5487 kezelés. A citokin array-ben kapott eredmények megerősítésére qPCR-rel vizsgáltuk a gyulladásban növekedett fehérjeszintet mutató citokinek expresszióját. A gyulladás kialakulásában és progressziójában szerepet játszó 12 citokin közül 10 expresszióját az OGG1 inhibitor szignifikánsan csökkentette.

Az OGG1 gátlása csökkenti az NF- κ B DNS-kötő aktivitását

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. Hipotézisünk szerint ezt a folyamatot az OGG1 szelektív inhibitora képes gátolni. Az OGG1 inhibitor NF- κ B DNS-kötődésre kifejtett hatását EMSA kísérletben erősítettük meg. A ceruleinnel kezelt egerekben már 30 perccel az oltás után detektáltuk az NF- κ B-t a magban. A 8-oxoG módosítás fokozta a transzkripciós faktor DNS-kötő aktivitását a 8-oxoG-t nem tartalmazó duplaszálú oligohoz (natív) képest. 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 transzkripciós faktor kötődésére a natív próbával végzett kísérletben.

Az OGG1 gátlása növeli a 8-oxoG akkumulációját a pankreaszban, viszont csökkenti az egyszálú DNS törések számát

A TH5487 sejthalálra és gyulladásra kifejtett hatását állat- és sejtes kísérletekkel is igazoltuk, de érdekelt bennünket az is, hogy a hibajavító enzim gátlása hogyan befolyásolja az oxidatív DNS károsodás mértékét a pankreaszban. Ennek vizsgálatára 8-oxoG immunfluoreszcens festést végeztünk. A sejtmagi 8-oxoG szint nőtt a ceruleinnel kezelt egerekben, aminek a mennyiségét tovább növelte a TH5487 kezelés. Comet esszében

kimutattuk, hogy cerulein kezelés által kiváltott egyszálú DNS törések mennyisége csökkent a TH5487 kezelés hatására.

A PARP-1 „kiütése” csökkenti a gyulladás és az acinus sejtek károsodásának mértékét

A PARP-1 enzim szerepét ceruleinnel indukált AP modellben vizsgáltuk C57BL/6 hím, vad típusú (WT) és azonos genetikai háttérű PARP-1 KO (KO) egerekben. Négy kezelési csoportot különítettünk el: WT kontroll csoport, WT ceruleinnel kezelt csoport, KO kontroll csoport, és KO ceruleinnel kezelt csoport. Az egerekben a gyulladást a cerulein (50 µg/kg) óránkénti intraperitoneális injekcióival – 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 PARP-1 inaktiválása csökkentette a szérum α -amiláz és lipáz, valamint a szöveti MPO szintjét. A primer acinus sejteket 24 órán keresztül kezeltük ceruleinnel, majd MTT esszét és PI festést végeztünk. A KO sejtek életképessége nőtt, a nekrosis mértéke pedig csökkent a vad típusú egerhez viszonyítva a ceruleinnel kezelt csoportokban.

Konklúziók

Az OGG1 és PARP-1 heveny hasnyálmirigy-gyulladás patogenezisében játszott szerepének tisztázásához állatkísérleteket végeztünk, amiket primer sejtes vizsgálatokkal egészítettünk ki. Kísérleteinkből az alábbi megállapítások vonhatók le:

1. A 8-oxoG mennyisége emelkedett a pankreaszban a hasnyálmirigy-gyulladás során.
2. Az oxidált guaninhoz kötődő OGG1 enzim növeli az NF- κ B DNS-kötő aktivitását, ami számos gyulladásos citokin és kemokin fokozott expresszióját idézi elő.
3. Az OGG1 a gyulladásos folyamatok progresszióján keresztül növeli az immunsejtek infiltrációját és az ödémát a pankreaszban.
4. Az OGG1 hatással van a PARP-1 aktivitásra, ami emelkedett PARilációt okoz a pankreaszban.
5. A PARP-1 fokozott működése energia depléciót idéz elő, ami az acinus sejtek nekrozisához vezet a mirigyben.
6. A pankreasz szöveti sérülése az emésztőenzimek szérumszintjének emelkedéséhez és a granulociták infiltrációjához vezet a mirigyben.

Bízom benne, hogy eredményeim alapjául szolgálhatnak a jövőbeni kutatásoknak és új terápiás módszerek kidolgozásának, hogy az orvostudomány ne csak palliatív módszerek alkalmazásához folyamodjon a heveny hasnyálmirigy gyulladás kezelésében, amelyek csupán időlegesen enyhítik a tüneteket.

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. Fiziológiai 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 apurinikus/apirimidinikus endonukleáz (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 gátlók terápiai 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.



Nyilvántartási szám: DEENK/12/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Hajnád Zoltán
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Hajnád 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. *, **Hajnád 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., **Hajnád 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.

