

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Növényi hatóanyagok vizsgálata  
akut hasnyálmirigy-gyulladás egérmodelljében**

Nagy-Pénzes Máté

Témavezető: Prof. Dr. Virág László



**Debreceni Egyetem**  
**Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola**  
**Debrecen, 2023**

## **Növényi hatóanyagok vizsgálata akut hasnyálmirigy-gyulladás egérmodelljében**

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

**Írta: Nagy-Pénzes Máté okleveles biotechnológus**

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. Czifra Gabriella, PhD  
Dr. Farkas Orsolya, PhD

### **A bírálóbizottság:**

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

**tagok:** Dr. Czifra Gabriella, PhD

Dr. Farkas Orsolya, PhD

Dr. Kúthy-Sutus Enikő, PhD

Dr. Lekli István, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK Belgyógyászati Intézet A épület tanterme  
2023. december 11. 13:00

## BEVEZETÉS

A hasnyálmirigy egy belső és külső elválasztású mirigyként is működő szerv, mely előbbi funkciója révén a cukorháztartásban, utóbbi által pedig az emésztés folyamatában játszik nélkülözhetetlen szerepet. Az **exokrin pankreász** két meghatározó sejttípusa a szőlőfürtszerűen elhelyezkedő acinusokba tömörült acináris sejtek (vagy acinussejtek), melyek az emésztőenzimek szintetizálására, zimogén szemcsékben történő tárolására és szekretálására specializálódott, kiterjedt endoplazmatikus retikulummal (ER) rendelkező sejtek; továbbá pedig a szekrétumot gyűjtő, illetve a patkóbélbe elvezető csatornákat (duktuszokat) alkotó duktális sejtek. A szerv gyulladásos megbetegedései (akut és krónikus hasnyálmirigygyulladás) elsősorban eme sejttípusok funkcionalitásában bekövetkező defektusok okán, illetve a termelt hasnyálmirigy elvezetésének akadályozottsága okán alakulnak ki.

Az emésztőenzimek fiziológias működése során, a többségében inaktív pro-enzim formában szekretált enzimek aktivációja a patkóbélbe történő megérkezésük után zajlik le. **Az enzimek idő előtti aktiválódása** révén, történjen az akár már az acinussejtekben, a sejtek között, vagy az elvezető csatornák területén, a hasnyálmirigy szövete károsodik. Ennek során az enzimek elkezdik felemészteni a szövetet, akut hasnyálmirigy gyulladást hozva létre. A betegség kiváltó okai széles skálán mozognak. A két leggyakoribb ok az epekő és a nagyfokú alkoholfogyasztás. Az epekő képes eltömíteni a közös epevezetékét, ami megakadályozza a hasnyál távozását, valamint az epe beáramlását okozhatja a hasnyálmirigy elvezető csatornáiba. A másik gyakori kiváltó ok a nagyfokú alkoholfogyasztás. A mechanizmus pontos molekuláris háttere még tisztázatlan, de nagyrészt az acinussejtekre gyakorolt komplex (a kalcium háztartást, a mitokondriumokat, az endoplazmatikus retikulumot, a zimogén szekréciót és az autofágiás mechanizmusokat érintő) metabolikus zavarok okozzák az enzimek sejten belüli aktivációját. Ezen felül az alkohol az acinusokból kiinduló, kis elvezető csatornák eltömődését, abnormális véráramlást és a kolecisztokinin, illetve a szekretin termelődésének zavarát okozhatja, mely folyamatok mind hozzájárulhatnak a gyulladás kialakulásához. Az elmúlt 20 évben a hasnyálmirigy gyulladás incidenciája a globális átlagot tekintve 30-40 eset/100.000 fő/év között változott, egy lassú, de növekvő tendenciát mutatva. Az Európai Unióban 40-45, Magyarországon 60-65 eset/100.000 fő/év között alakult az elmúlt húsz évben tapasztalható incidencia mértéke.

Az akut pankreatitisz molekuláris etiológiai hátterét tekintve, **a betegség három fő funkcionális elváltozás miatt alakulhat ki.**

Az első, amikor a hasnyál kiürülése (a szervből a patkóbélbe) valamilyen oknál fogva akadályozott, és a csatornában felgyülemlett emésztőenzimek aktivációja az elvezetés hiányában a szervben történik meg. Egy másik megközelítés felől a Vater-papilla környékén a közös epevezeték és a fő hasnyálmirigy-csatorna összeömlése után, a járatot elzáró okok (pl. epekő) miatt az epe visszafolyhat a hasnyálmirigy területére, ahol az acinussejtek epesavakra érzékeny sejtfelszíni receptorai által közvetítve (vagy a sejtekbe közvetlenül bejutva) kalcium hiper-szignalizáció útján indukálja az emésztőenzimek sejten belüli aktivációját.

A második a duktális sejtek iontranszportjában történő zavar beállása külső, vagy belső behatás következtében. A különböző inzultusok (pl. erős alkoholfogyasztás) károsíthatják a duktális sejtek ion- és víztranszport rendszerét, minek következtében a termelődő hasnyál fluiditása, illetve pH-ja nem lesz megfelelő az emésztőenzimek inaktív állapotban tartásához, így azok a csatornarendszer területén aktiválódhatnak. A defektus hátterében állhat a mitokondriumok funkcióvesztése, az ER károsodása, az intracelluláris kalcium és/vagy cAMP egyensúly felborulása, illetve a CFTR csatorna aktivitásában keletkező zavar, például örökletes okok miatt.

A harmadik elváltozás az acinussejtekben bekövetkező zavar, melynek során az emésztőenzimek az acinusokon belül aktiválódnak felemésztve a környező sejteket. Ennek molekuláris oka lehet a lizoszomális és zimogén granulumok destabilizációja, mitokondriális diszfunkció (a mitokondriális permeabilitás tranzíciós pórus –MPTP– nyitva tartásán keresztül), ER stressz, kalcium és/vagy cAMP egyensúly felborulása, protein kináz C és NFκB útvonalak aktivációja, közvetlen tripszinogén aktiváció, vagy vakuolizáció miatt. A sejten belüli emésztőenzim-aktiváció mellett az apikális citoskeleton átépülése miatt az apikális oldali exocitózis blokkolódása is okozhatja a gyulladásos folyamatok indulását. Ebben az esetben megszakad a granulumok kötődése az apikális citoskeletonhoz és azok a bazális felszín felé kezdenek vándorolni, ahol az egyik membránfehérje protein kináz C általi foszforilációja lehetővé teszi a granulumok bazolaterális exocitózist az interstíciumba.

Az **akut hasnyálmirigy gyulladás** jellemző tünetei magában foglalják a hirtelen fellépő, erős, a has felső részén övszerűen sugárzó fájdalmat, mely puffadással, hányingerrel, hányással, hasmenéssel járhat együtt, mely tünetek étkezés után rosszabbodnak. A betegek lázzal, légszomjjal, gyors, vagy lassú szívveréssel és veseproblémákkal is küzdhetnek, az epevezeték elzáródásakor pedig sárgaság is kialakulhat. A sejtelhalás következtében vérükben megemelkednek az emésztőenzimek szintjei, így a komplexebb vizsgálati módszerek (pl. CT, hasi, vagy endoszkópos ultrasonográfia, ERCP) mellett egy vérvétellel is könnyen igazolható a betegség fennállása. Bár a gyógyszerek használatát a hasnyálmirigy gyulladásban általában túlzásba viszik, a betegség kezelési lehetőségei korlátozottak. A terápia fő pillére az intravénás folyadék és tápanyagellátással biztosított szigorú diéta általi nyugalomba helyezés. Célzott, specifikus terápiák sajnos nem állnak rendelkezésre, mindannak ellenére, hogy a tudomány kiterjedt erőfeszítésekkel próbálja azonosítani az „AP” megfelelő molekuláris célpontjait. Számos folyamatban lévő klinikai vizsgálat célja annak meghatározása, hogy ezen új terápiás megközelítések közül melyeket lehet hatékonyan átültetni a klinikumba.

A hasnyálmirigy akut gyulladásának in vitro modellezési lehetőségei között megemlítenéd az immortalizált sejtvonallal (pl. AR42J – *patkány acináris sejtvonala*) történő vizsgálatok végzése, illetve az élő állatból izolált primer sejtek (acináris és duktális egyaránt) használata a kísérletek során. Az izolált primer sejtek nagy előnye értelemszerűen a sejtzonosság, viszont korlátozott ideig lehet csak őket fenntartani, illetve osztódásra sem képesek. Az izolált acinusok további hátránya, hogy kb. két nap után duktális átalakulásba kezdenek. A sejteket a különböző vizsgálatok során legtöbbször epesavakkal (taurokolát, taurokenodezoxikolát), zsírsavakkal, alkohollal (vagy annak acetaldehid, vagy zsírsav-etilészter metabolitjaival), továbbá normál működés során a zimogén szemcsék ürülését kiváltó szekretagógok (pl. CCK,

szekretin, VIP) szuperfiziológiás koncentrációjával kezelik. Az utóbbi csoportból kiemelném a cerulein nevű oligopeptidet, ami az összetett emésztőrendszeri hatásokkal rendelkező kolecisztokinin, mesterséges analógja. Fiziológiás mennyiségben (pM) a cerulein a CCK-val analóg módon serkenti a zimogén szekréciót az acináris sejtekben, szupramaximális dózisban adva (10-100nM) viszont akut gyulladás-szerű választ generál a sejtekben (sejten belüli emésztőenzim-aktiváció, NFκB aktiváció, vakuólum képződés) és indukálja a sejtpusztulást.

In vivo történő hasnyálmirigy vizsgálatokra főként rágsálókat használnak, leginkább egereket vagy patkányokat. Az alkalmazott modelleket invazív és nem invazív csoportokba lehet rendszerezni. A nem invazív modellek közé tartozik a szekretagóg analógokkal (korábban említett cerulein, vagy karbakol – ami egy kolinerg agonista) történő parenterális kezelés intraperitoneális injekció(k) útján. A cerulein esetében 5-50 µg/ttkg óránkénti i.p. oltást tartalmaz a modell, 4-12 órán keresztül ismétléssel. Vizsgálataink során az izolált acinussejtek és az egerek *in vivo* kezelése alkalmával is a pankreatitisz ceruleinnel kiváltott modelljét alkalmaztuk.

Habár a „nyugati” orvoslás jórészt kritikus a tradicionális gyógyászati módokkal szemben, az ott használt **növényekben található hatóanyagok** még mindig jelentős gyógyszerjelölti potenciállal bírnak. A megfelelő növények és azok kivonatainak használata a népi orvoslás részeként évezredek óta rendelkezik a világ számos területén. Ilyen növény az iskolavirág, vagy ábécéfű (*Acmella oleracea*, *Spilanthes acmella*, *Spilanthes oleracea*) is melynek virágát, leveleit és szárát az Amazonas-medencétől Indiáig enyhe fájdalomcsillapító hatása miatt fogfájás, szájgyulladás, ínygyulladás és torokfájás gyógyítására rágják. Ezenkívül a növényt fertőtlenítő, vizelethajtó, parazita- és vírusellenes szerként, valamint sebgyógyítás céljából is használják. A növény fő gyógyhatású vegyülete a spilantol (SLT), mely többek között gyulladás gátló, fájdalomcsökkentő hatással is rendelkezik.

Az utóbbi évek kutatásaiban, az emberre kifejtett nagy biológiai aktivitásuk miatt vizsgált polifenolok több tagja is nagy potenciálú vegyületnek mutatkozott a hasnyálmirigy betegségei elleni harcban. A polifenolok egyik alcsoportja, a flavonoidok több tagjának akut gyulladásos folyamatokban mutatott potenciális védőhatását is igazolták már. A trictin (TCT) többféle növényben is megtalálható flavonoid, amely több kutatás szerint rákellenes, gyulladáscsökkentő és antidiabetikus aktivitással is rendelkezik. A legtöbb elérhető tanulmány a szer rákellenes potenciáljára összpontosít.

Kutatásunkban a fentiek okán azt kívántuk megvizsgálni, hogy az iskolavirágból kivont SLT, illetve a TCT rendelkezik-e akut hasnyálmirigy-gyulladás elleni terápiás potenciállal. A vizsgálatainkat izolált acinussejteken (*in vitro*) és az akut pankreatitisz egérmódeljében illetve egy lokális gyulladás, a bőr kontakt hiperszenzitivitásának vizsgálatában (*in vivo*) végeztük el.

## CÉLKITŰZÉSEK

A különböző növényi hatóanyagok felhasználása a modern kori gyógyászati eljárásokban egyre nagyobb teret hódít. Munkánk során két, eltérő szerkezetű növényi hatóanyag, a trictin és a spilantol hatását vizsgáltuk akut hasnyálmirigy gyulladás *in vitro* és *in vivo* egérmodelljében.

1. A trictin esetében célul tűztük ki a szer életképességre és gyulladás mediátorokra kifejtett hatásának vizsgálatát, továbbá hogy sejteken előidézett PARiláció mértékét hogyan befolyásolja. Ezen felül kíváncsiak voltunk, hogy milyen hatással bír az egerekben kiváltott akut hasnyálmirigy gyulladás súlyosságára és az esetlegesen a sejtekben kialakuló PARiláció mértékére.

2. A spilantol esetében a vizsgálatainkat az előzetesen elvégzett *in vitro* kísérletek eredményei alapján *in vivo* vizsgálatoknak vetettük alá, melyek során arra kerestük a választ, hogy a spilantol hogyan befolyásolja az akut hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságát, továbbá milyen hatása van egy kevésbé komplex gyulladásos modellben, a kontakt dermatitiszben.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### Anyagok

A Dulbecco's Modified Eagle's Medium-ot (DMEM), a főtális szarvasmarha szérumot (FBS), a szarvasmarha szérum albumint (BSA), a  $H_2O_2$ -ot, a P/S mixet, a DMSO-t, a HBSS puffer előállításához szükséges vegyszereket, a HEPES-t, a Triton-X reagenst, az MTT és a Griess módszerhez használt reagenseket, a rekombináns humán epidermális növekedési faktort (rhEGF) és a laminint Sigma-Aldrich Kft-től (Budapest, Magyarország) szereztük be. A kollagenázt (NB 8 Broad Range – kollagenáz I és II) a Nordmarktól (Nordmark Arzneimittel GmbH & Co. KG, Uetersen, Németország), a tripszin inhibitort a Gibco-tól (Waltham, Massachusetts, USA) vásároltuk meg. Az  $IFN\gamma$ -t a Bio-Vision-től (Waltham, Massachusetts, USA) a PMA-t és az LPS-t a pedig szintén a Sigma-tól szereztük be. A magfestésekhez használt DAPI és Hoechst festékeket a Thermo Fisher-től (Thermo Fisher Scientific, USA, Massachusetts, Waltham) vásároltuk.

A sejtek károsításához, illetve *in vivo* a szövet gyulladásának kiváltásához használt ceruleint a Medchem Express-től (Monmouth Junction, New Jersey, USA) szereztük be.

A sejteken okozott károsodás mértékében, illetve *in vivo* a szöveti gyulladás folyamatában vizsgált növényi hatóanyagok közül a tricetint az Extrasynthese-től (Genay, Franciaország), a spilitolt pedig a ChromaDex-től (Los Angeles, Kalifornia, USA) szereztük be.

### Hasnyálmirigy acinussejtek izolálása és tenyésztése

A kísérletek során használt acinussejteket 8-10 hetes, hím és nőstény nemű, C57BL/6j törzsű egerekből, protokoll alapján izoláltuk. A szövetet a kivágás után HBSS pufferbe helyeztük, majd ollóval pár milliméteres hosszúságú darabokra aprítottuk. Ezt követően a szövetet húsz perces kollagenázos emésztésnek tettük ki  $37^\circ\text{C}$ -on, miközben a darabokat 5 percenként szuszpendáltuk. A sejteket HBSS pufferrel négy alkalommal mostuk. A mosások között a sejteket  $450\text{ g}$ -n centrifugáltuk. A mosás után a klasztereket HBSS-ben vettük fel, és  $100\text{ }\mu\text{m}$ -es szűrőn keresztül szűrtük azokat a nagyobb, nem megfelelően felemésztett klaszterek eliminálása érdekében, majd a szűrőt átmostuk.

A szűrt klaszterhalmazt ezután BSA oldaton keresztül ülepítettük. Ezzel a lépéssel sikerült kiszűrni a túlemésztett, egyedi sejteket és a már szintén túlemésztett, csak pár sejtből álló klasztereket, melyek a tenyésztés ideje alatt károsító kezelés nélkül is meghalnának. A 10-30 sejtés klasztereket ezután HBSS-sel mostuk, majd 10 % FBS, 1 % antibiotikum (penicillin, streptomycin) és 25 ng/ml rhEGF tartalmú, magas glükóz koncentrációjú DMEM médiumban tenyésztettük.

### *In vitro* kezelések

Az izolált sejteket kirakásuk másnapján kezeltük meg. A 3-10-30-100-300  $\mu\text{M}$  koncentrációjú tricetin előkezelést (1 óra) alkalmaztunk a ceruleinval, az LPS+ $IFN\gamma$ -val, a PMA-val, illetve a hidrogén peroxiddal történő kezelések előtt. A kísérletekben a cerulein (minden esetben 100 nM) kezelés rendre 24 órán keresztül tartott, kivéve a kaszpáz esszét, amikor is 18 órán keresztül vizsgáltuk a kezelt sejteket. Az egy órás LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) +  $IFN\gamma$  (20 ng/ml) kezelést, illetve a szintén 1 órás PMA (1  $\mu\text{M}$ ) kezeléseket az NF $\kappa$ B p65-ös alegységének DNS kötődési vizsgálatához használtuk. PARiláció kiváltásához 7,5 perces

hidrogén peroxiddal történő kezelést alkalmaztunk, mely a kutatócsoport korábbi tapasztalatai alapján megfelelően indukálja a PARilációt. Ezeken felül az életképességi vizsgálatok során az izolált sejteket 24 órán át tartó hidrogén peroxidos kezelésnek is kitettük.

### ***In vivo* kezelések és szövetfeldolgozás (pankreatitisz modell)**

A hasnyálmirigy gyulladást C57BL/6j törzsű egerekben fiziológias sóoldatban oldott ceruleinnel (50ug/ttkg) váltottuk ki. Kísérleteink során a vizsgált egereket (spilantol – 42 hím egér, tricitin – 18 hím egér) randomizálva 3 csoportba osztottuk: KTR – csak fiziológias sóoldatot kapó egereket, CERU – cerulein kezelésben részesülő egerek és N+CERU – a cerulein mellett növényi hatóanyaggal is kezelt állatok. Az egerekbe 8 db, óránkénti intraperitoneális (i. p.) oltással juttattuk be a ceruleint. A cerulein oltásban nem részesülő egerek azonos időben, megegyező DMSO tartalmú fiziológias sóoldatot kaptak. A munkánk során a spilantol hatását csak előkezelés, a tricitinét pedig elő és utókezelés formájában is vizsgáltuk. A tricitin vizsgálatánál, az előkezelés alkalmával kettő i. p. oltás során 10-10 mg/ttkg tricitint juttattunk be az egerek szervezetébe 12, illetve egy órával az első ceruleines oltás előtt. Az utókezelés alkalmával a tricitint a 4. és az 5. cerulein oltás között 30 mg/ttkg dózisban, illetve az utolsó oltás után 10 mg/ttkg dózisban, szintén i. p. oltással jutattuk be az állatok szervezetébe. A spilantol esetében 30 mg/ttkg szert jutattunk az egerekbe i. p. oltással, egy órával az első cerulein kezelés előtt. A növényi hatóanyag kezelésben nem részesülő állatok az oltásokkal egy időben megegyező DMSO tartalmú fiziológias sóoldatot kaptak. Az állatoktól a spilantolt vizsgáló kísérlet során az első cerulein oltástól számított 24 óra elteltével, a tricitint vizsgáló kísérletek során pedig 10 óra leteltével vért vettünk, majd a kísérletek terminálását követően eltávolítottuk a hasnyálmirigyüket további vizsgálatok céljából.

Az egerekből szívpunkcióval kinyert vért a megalvadás után 10 percig 5.000 g-n centrifugáltuk, majd a szérum frakciót lefagyasztottuk. A hasnyálmirigy szövet kinyerésekor a szövetet 3 részre vágtuk a szövettani mikroszkópos megfigyeléshez, a mieloperoxidáz enzim szöveti szintjének meghatározásához és az RT-qPCR vizsgálat lefolytatásához. A szövettanra szánt részt 10 %-os formalinba (formaldehid 4 %-os vizes oldata), az enzimvizsgálatra szánt részt folyékony nitrogénbe, az RT-qPCR-re szánt részt pedig TRIzol extrakciós reagensbe (Molecular Research Center, USA, Ohio, Cincinnati) helyeztük és lefagyasztottuk.

### ***In vivo* kezelések és szövetfeldolgozás (fülgulladás modell, spilantol esetében)**

A BALB/c törzsű egerekben a kontakt fülgulladást forbol-12-mirisztát-13-acetát (PMA) kezeléssel váltottuk ki. A kísérletek során a vizsgált állatokat (18 hím és 18 nőstény) randomizálva 3 csoportba osztottuk: KTR – csak DMSO-val kezelt egerek, PMA – 0,05%-os PMA kezelésben részesülő egerek és SLT+PMA – a PMA mellett 10 µM spilantollal is kezelt egerek. A felhasznált PMA és spilantol vegyületeket DMSO-ban oldva vittük fel az egérfülekre.

A gyulladás indukciója előtt az egerek fülvastagságát Mitutoyo vastagságmérővel (Sakado, Takatsu-ku, Kawasaki, Kanagawa, Japán) mértük meg. Ezután az egereket DMSO-val vagy DMSO-ban oldott PMA-val kezeltük (20 µl/fül, mikropipettás felvitel, 10-10 µl a fül mindkét oldalára). Hatvan perccel később a kontroll és a PMA csoportot DMSO-val, az SLT+PMA csoportot pedig 10 µM spilantollal kezeltük (20 µl/fül, mikropipettás felvitel, 10-10 µl a fül

mindkét oldalára). A spilanthol-koncentráció kiválasztása a spilanthol NO-termelésre gyakorolt hatását vizsgáló előzetes kísérleteken alapult. Hat órával a PMA kezelés után ismét megmértük a fülvastagságot, és az egereket izofluránnal elaltattuk. Az állatok fülét exterminalásuk után szövettani- (HE festés) és MPO-vizsgálatok végett eltávolítottuk. A fülek szövettanra szánt részét 10 %-os formalinba, az enzimvizsgálatra szánt részét pedig folyékony nitrogénbe helyeztük a hasnyálmirigy metszetekhez hasonlóan.

### **Gyökfogó hatás vizsgálata ABTS dekolorizációs módszerrel**

Az ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonsav) esszé gyökfogó képesség vizsgálatára használtuk. A módszer alapja a kromogén ABTS szabadgyök, amely káliumperszulfáttal előállítható, egy éjszakán át tartó reakcióval. A vegyületek antioxidáns tulajdonsága az ABTS gyök oldatának intenzív zöld színének elszíntelenedéséből határozható meg. A tricetin mellett a vizsgálatban pozitív kontrollként C-vitamint használtunk. A zöld szín intenzitásának csökkenéséből következtethetünk a vizsgált vegyületek gyökfogó képességére (a gyökfogási mechanizmus elszínteleníti a zöld oldatot).

### **PARP inhibíció esszé**

A tricetin PARP enzim gátló hatásának vizsgálatához a Trevigen (USA, Maryland, Gaithersburg) „PARP Activation Kit”-jét használtunk, mely hisztonnal bevont felületű lyukakat tartalmazó 96 lyukú lemezeket tartalmaz, és a reakció során a platekhez PARP enzimet és biotinilált NAD-ot tartalmazó puffert adtunk. A PARiláció során a PARP biotinnal jelölt NAD-ot épít be a poli-ADP-ribóz láncba, melynek mennyiségét peroxidázzal jelölt sztreptavidinnel detektáltuk. A tricetin mellett az esszében 3-aminobenzamid (3-AB) PARP gátló szert használtunk pozitív kontrollként.

### **NFκB aktiváció mérése**

Az NFκB transzkripciós faktor aktiválódásának vizsgálatához az NFκB p65 Transzkripciós Faktor Esszé Kitet (Abcam, Egyesült királyság, Cambridge) a gyártó utasításai alapján használtunk. Az esszéhez, annak végrehajtása előtt, a 6 lyukú platekben tenyésztett, izolált acinussejtekből magextraktumot izoláltunk a kithez mellékelt protokoll alapján, mellyel a kezelt sejtekben a faktor magi traszlokációjának mértékét kívántuk megvizsgálni. Ezen felül a TCT előkezelésben nem részesülő sejtek magextraktumának egy részét egy órán keresztül kezeltük a tricetin, az előkezelésnél is alkalmazott 30 μM-os koncentrációjú oldatával. Ezzel a szer p65-ös alegység DNS-hez történő bekötődésére gyakorolt hatását kívántuk megvizsgálni. Az esszé során a plate-hez rögzített DNS-hez adott magextraktumban található faktorok kötődnek a DNS-hez, majd a rendszerhez elsődleges anti-NFκB antitestet (kecske), illetve a HRP-hez kötött másodlagos anti-kecske antitestet adunk, majd az enzimreakció lezajlása után „platereader” segítségével mértük az oldatok színintenzitását.

### **Kalcein esszé**

A Kalcein-AM (Sigma–Aldrich Kft, Magyarország, Budapest) törzsoldatot (4mM, DMSO-ban oldva) 1μM-os végkoncentrációban adtuk a vizsgált sejtekhez. A hidrofób kalcein-AM könnyen bejut az élő sejtekbe, ahol az intracelluláris észterázok egy hidrofil, fluoreszcens

vegyületté (kalcein) alakítják azt, ami már nem jut ki a sejtekből. A sejtek életképessége a kontroll sejteknél kapott adatok százalékában lett kiszámolva és bemutatva.

### **LDH esszé**

A sejtek felülúszójának 50-50µl-ét egy másik 96 lyukú sejttenyésztő edénybe helyeztük, majd hozzá 50-50µl LDH reagens mixet (G-Biosciences, USA, Missouri, St. Louis) adtunk. Az esszé során pozitív kontrollként a 10%-os Triton-X vegyülettel lizált sejtek felülúszója szolgált.

### **Membránpermeabilizáció kimutatása propidium-jodid esszével**

Az izolált sejtek CellCarrier Ultra 96 lyukú sejttenyésztő edényben (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) történt kezelése után a sejteket 2,5 µg/ml propidium jodiddal (Sigma–Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) és 5 µg/ml Hoechst342 (Sigma–Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) festékekkel 15 percig inkubáltuk. A sejtekről az Opera Phenix High-Content Analysis System („HCA”; Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) segítségével képeket készítettünk, majd azokat a Harmony szoftver (Waltham, MA, USA) segítségével értékeltük ki.

### **Kaspáz aktivitás mérése**

Az izolált sejteket a cerulein kezelés elindítását követően Hoechst festékekkel és CellEvent Caspase-3/7 Green reagenssel kezeltük (Thermo Fisher Scientific, USA, Massachusetts, Waltham), majd a propidium-jodid esszé során is alkalmazott „HCA” eszközzel vizsgáltuk a sejtekben mutatózó kaspáz enzim aktivitását.

### **Immunfluoreszcens festés és fluoreszcens mikroszkópia**

A sejteket az izolálást követően lamininnal bevont, 13 milliméter átmérőjű fedőlemez korongokra tettük ki, 24 lyukú sejttenyésztő edényben. A sejteket H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -dal kezeltük. A kezelés után a sejteket fixáltuk, majd a PBS-es mosást követően permeabilizáltuk azokat. A blokkolás után a sejteket 10H hibridómából házilag előállított, egér monoklonális poli(ADP-ribóz) (PAR) specifikus antitesttel (IgG3 izotípus) egy éjszakán át, 4°C-on kezeltük. Mosás után a sejteket Alexa633 festékekkel konjugált kecske, anti-egér másodlagos antitesttel Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) és DAPI festékekkel kezeltük. A fedőlemezekeken másnap konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk meg a sejteket.

### **RNS izolálás, RT-qPCR**

A vizsgálathoz az izolált sejteket 6 lyukú sejttenyésztő edénybe helyeztük ki. Az egy órás 30µM-os tricetin előkezelés, majd az azt követő 24 órás cerulein kezelés után (illetve az *in vivo* modellnél a szövet kinyerése után) a sejtek/szövetek teljes RNS készlete került izolálásra TRIzol reagens felhasználásával a gyártó protokollja alapján. A reverz transzkripció során a Thermo Fishertől vásárolt, random primereket tartalmazó RT kitet használtuk. A Roche (Roche Applied Science, Penzberg, Németország) LightCycler 480 berendezésével mért real-time PCR során SYBR Green festéket (Institute of Applied Biotechnologies, Strašnice, Csehország) alkalmaztunk az expressziós mintázatok megfigyeléséhez.

## **SDS-PAGE és Western blot**

A vizsgálathoz az izolált sejteket 6 lyukú sejttenyésztő edénybe helyeztük ki. Az egy óras 30 $\mu$ M-os tricetin előkezelés, majd az azt követő H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezeléseket után a sejtekben található teljes fehérje mennyiség lizálása történt meg. A fehérjéket SDS-PAGE gélen szeparáltuk. A fehérjéket ezután nitrocellulóz membránra transzferáltuk, majd a membránokat egy órán át BSA-val blokkoltuk szobahőn. A blokkolás után a membránokat 4°C-on, egy éjszakán át az immunfluoreszcens festés során leírt anti-PAR antitesttel kezeltük majd PBST-vel mostuk. A mosás után HRP-vel konjugált nyúl anti-egér másodlagos antitesttel és anti- $\beta$ -aktin antitesttel kezeltük a membránokat. A membránok előhívása WestFemto kemilumineszcens reagenssel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) történt, a Chemidoc Touch géldokumentációs rendszert (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) használva.

## **Szérum $\alpha$ -amiláz és lipáz esszé**

A szérum  $\alpha$ -amiláz és lipáz aktivitást a Diagnosticum Zrt. (Budapest) enzimátikus esszé kitjét használva, kinetikus reakcióban, 20 percen keresztül mértük a gyártó utasításainak megfelelően, „platereader” készülékkel 405 nm-en az  $\alpha$ -amiláz esetében és 580 nm-en a lipáz esetében.

## **Szöveti mieloperoxidáz (MPO) aktivitás meghatározása**

A szöveti mieloperoxidáz enzim aktivitását a hasnyálmirigyben és a fülminákban a neutrofil granulocita infiltráció indikátoraként mértük. A folyékony nitrogénben lefagyasztott szövetmintákat felolvasztottuk, és foszfát pufferben homogenizáltuk, majd centrifugáltuk. Az így kapott pelletet foszfátpufferben reszuszpendáltuk és szonikáltuk. A mintákat ezután centrifugáltuk és a felülúszókat összegyűjtöttük és összfehérje-koncentrációt mértünk. A felülúszók 100  $\mu$ l-jét megegyező térfogatú szubsztrátoldattal kevertük. Az elegyet 37 °C-on 1,5 percig inkubáltuk, majd a reakciót kénsavval állítottuk le.

## **Szöveti vizsgálat és TUNEL festés**

A hasnyálmirigy szöveteket és fülmintákat, az izolálásuk után formalinban fixáltuk. A dehidratálást, beágyazást (paraffin), metszést (4 $\mu$ m) és a hematoxin-eozinnal történő festést a szövettani módszerekről szóló útmutató szerint végeztük. A hasnyálmirigy metszetekben megfigyelhető apoptotikus sejtek jelölésére használt TUNEL esszét (TUNEL Assay Kit - HRP-DAB, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság) gyártó utasításai alapján végeztük el. A hasnyálmirigy metszetek esetében festéseket egy patológus értékelte ki, aki számára a kísérleti terv és a minták kezelési előzményei ismeretlenek voltak. Az ödéma, a leukocita infiltráció, a nekrosis és a TUNEL festés tekintetében egy 0-tól 3-ig terjedő pontozási sémát alkalmaztunk.

## **Hasnyálmirigy szöveti metszet immunfluoreszcens festése**

A hasnyálmirigy szövetek 4 $\mu$ m vastag metszeteit 1%-os BSA-val blokkoltuk PBS-ben, 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten, majd a immunfluoreszcens festésről szóló leírás szerinti anti-PAR antitesttel kezeltük egy éjszakán át, 4°C-on. A szöveteket ezután Alexa633-konjugált kecske anti-egér Ig másodlagos ellenanyaggal (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) és DAPI-val (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) inkubáltuk

szobahőmérsékleten. A metszeteket konfokális mikroszkóppal (Leica, Wetzlar, Németország) vizsgáltuk meg.

### **Statisztikai elemzés**

Az *in vitro* kísérleteket legalább három alkalommal megismételtük és a belőlük származó eredményeket a három kísérlet átlagával és tapasztalti szórásával (SD) ábrázoltuk.

Az AP *in vivo* kísérleteit rendre 18 (csoportonként 6) hím egeret használva, a kontakt hiperszenitivitás *in vivo* kísérleteket pedig 18 hím és 18 nőstény (csoportonként 6 hím és 6 nőstény) egeret használva végeztük el, mely kísérletek adatait szintén azok átlagának és szórásának bemutatásával ábrázoltuk. A folytonos változók kiértékelésére Tukey post hoc próbával kombinált egy-utas ANOVA elemzést alkalmaztunk. A kapott diszkrét változókat (szövegtani kiértékelés) Fisher egzakt tesztnek vetettük alá. A statisztikai elemzéshez a Microsoft Excel, a GraphPad, illetve a STATA programokat használtuk. A statisztikai tesztek mindegyike során 5%-os szignifikancia szintet alkalmaztunk.

## EREDMÉNYEK

### A tricetin flavonoid vizsgálatának eredményei

#### **A tricetin jelentős antioxidáns hatással bíró vegyület**

Az irodalomban számos flavonoid vegyület antioxidáns hatással bír. ABTS gyökfogó vizsgálatban szeretnénk volna bebizonyosodni arról, hogy a tricetin is rendelkezik-e ezen tulajdonsággal. A tesztben a tricetin a kontrolljaként alkalmazott C-vitaminhoz hasonló gyökfogó aktivitást mutatott. A C-vitamin  $IC_{50}$  értéke a vizsgálat során 65,15  $\mu M$ -nak, a tricetiné pedig 49,64  $\mu M$ -nak adódott.

#### **A tricetin alacsonyabb dózisban nem toxikus az izolált sejtekre**

Az izolált acinussejtek jó sejtmoddelt jelentenek az exokrin hasnyálmirigy tanulmányozására. Ezért egerekből izoláltunk primer acinussejteket, és alkalmazásukkal megvizsgáltuk a tricetin toxicitását. A sejtek életképességét kalcein-tesztel, míg a plazmamembrán-károsodást LDH-felszabadulási tesztel értékeltük. Azt találtuk, hogy a TCT nem toxikus a primer acinussejtekre 30  $\mu M$  koncentrációig. Háromszor nagyobb koncentrációban (100  $\mu M$ ) a tricetin kis mértékben, de szignifikáns toxikus hatást gyakorolt a sejtekre, viszont ez elhanyagolható volt a pozitív kontrollként 1 mM koncentrációban alkalmazott hidrogén-peroxid esetében tapasztalathoz képes. Ez mind a két vizsgálatban megfigyelhető volt, ezért a későbbi sejthalapú kísérletekhez a 30  $\mu M$  koncentrációt választottuk ki.

#### **A tricetin megvédi a sejteket a cerulein által kiváltott sejthaláltól, de a $H_2O_2$ -indukált sejthaláltól nem**

A kolecisztokinin analóg peptid ceruleint széles körben használják a túlstimuláció által kiváltott acináris sejtkárosodás modellezésére mind sejthalapú kísérletekben, mind *in vivo*. Azt találtuk, hogy 100 nM koncentrációban a cerulein csökkenti a primer acinussejtek életképességét, amit kalcein-tesztel vizsgáltunk és ez a hatás az LDH-felszabadulási módszerrel is megfigyelhető volt. A sejtek 30  $\mu M$  tricetinnel történő előkezelése mindkét modellben szignifikánsan megvédte az acinussejteket a cerulein által kiváltott károsodástól. Mivel a nekrotikus sejthalál és a kapcsolódó sejtmembrán-sérülés az AP kritikus jellemzője, ez utóbbi eredményt egy alternatív módszerrel kívántuk megerősíteni. Ebből a célból megvizsgáltuk a sejtek propidium-jodid (PJ) felvételét. Eredményeink szerint megállapítható, hogy a PJ felvétel mérésével nyert adatok összhangban voltak mind a kalcein vizsgálat, mind az LDH felszabadulási teszt eredményeivel, sőt ebben a tesztben már a 10  $\mu M$  tricetin kezelés is szignifikáns javulást eredményezett a cerulein kezelés okozta nekrosis mértékében. Ezek után megvizsgáltuk, hogy cerulein kezelésben tapasztaltak a  $H_2O_2$  kezelés által kiváltott sejsérülés esetén is érvényesülnek-e. Az oxidáló  $H_2O_2$  koncentrációfüggő citotoxicitást okozott, a tricetin azonban nem volt hatással a  $H_2O_2$  sejtkárosító hatására, ami azt jelzi, hogy a flavonoid valószínűleg nem egyszerűen antioxidánsként hat, hanem specifikusan avatkozik be a cerulein által kiváltott acináris sejtkárosodási útvonalba.

### **A tricetin gátolja az apoptózis mértékét a ceruleinnel kezelt acinussejtekben**

A high-content analízissel mért, 18 órán keresztül végzett, 3 óránkénti megfigyelés eredménye azt mutatja, hogy az alkalmazott 100  $\mu\text{M}$ -os cerulein kezelés már 3 óra elteltével is szignifikánsan növelte a sejtekben talaszthalható kaszpáz aktivitást, melyet CellEvent reagens fluoreszcenciája mutat. Ezt a megnövekedett kaszpáz aktivitást a 30  $\mu\text{M}$ -os tricetin előkezelés szignifikánsan csökkentette már az első megfigyelt időpontban, mely hatás a későbbi időpontok során is megmaradt és a szer a záró időpontban is majdnem harmadára csökkentette a cerulein kezelés hatására kialakult kaszpáz aktivitást.

A „HCA” készülékkel készült képeken (első és utolsó mérési időpont) jól látható a sejtekben megfigyelhető CellEvent jel. A nem fluoreszcens festék a kaszpáz általi hasítást követően képes bekötödni a DNS-hez, amely folyamat után a festék zöld fluoreszcens jelet generál, melynek mértéke egyenesen arányos a sejtekben megfigyelhető kaszpáz enzim aktivitásával, melyből következtethetünk az apoptózis mértékére.

### **A tricetin gátolja a ceruleinnel indukált gyulladásos génexpressziót izolált acinussejtekben**

A gyulladásos komponens egyértelműen hozzájárul az AP kialakulásához. Az AP kórétanának egyik különlegessége a legtöbb akut gyulladással szemben, hogy itt az elsődleges esemény a sejtkárosodás, és a gyulladás a szövethkárosodás következményeként, másodlagosan alakul ki. Ennek ellenére a sérüléssel kapcsolatos gyulladás gátlása jótékony hatással van az AP lefolyására. Ezért összeállítottunk egy gyulladásos mediátor panelt, és megvizsgáltuk a tricetin hatását a gének expressziójára. A cerulein kezelés indukálta az IL1 $\beta$ , IL6 és MMP2 mRNS-ek expresszióját, míg a TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , valamint a CCL5 és CXCL10 kemokinek expresszióját nem váltotta ki. Hasonlóképpen a TGF $\beta$ , és az IL10 expressziója sem változott. A sejtek tricetinnel történő előkezelése szignifikánsan csökkentette az IL1 $\beta$ , IL6 és MMP2 cerulein által indukált expresszióját.

### **A tricetin visszafogja az NF $\kappa$ B p65-ös alegységének transzlokációját a sejtmagba, de nem gátolja kötődését a DNS-hez**

Az NF $\kappa$ B transzkripciós faktor nyugalmi állapotban a citoszolban, inaktivált állapotban található. Különböző iniciáló tényezők hatására az NF $\kappa$ B transzlokálódik a magba, ahol a legtipusosabb komplexében a p50 alegységgel heterodimert alkotva kötődik a gyulladásos célgénnek promóteréhez, beindítva a génexpressziót. A p65-ös alegység DNS kötődési esszéjének eredményei azt mutatják, hogy mind az LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) + IFN $\gamma$  (20  $\text{ng/ml}$ ) kezelés, mind pedig a PMA (1  $\mu\text{M}$ ) kezelés szignifikánsan megnövelte a transzkripciós faktor magi transzlokációját, amint azt a magextraktumokban lévő NF $\kappa$ B DNS próbához történő bekötődésének megnövekedett mértéke jelzett. Szintén megfigyelhető, hogy az egy órás tricetin előkezelés (30  $\mu\text{M}$ ) szignifikánsan csökkentette a bekötődés mértékét.

Annak tisztázására, hogy a bekötődés csökkent mértéke a magi transzlokáció gátlásában, vagy magának a DNS-hez történő kapcsolódásnak az akadályozásában rejlik, tricetin-előkezelés nélküli sejtek magextraktumát tricetin „utókezelésnek” vetettük alá, mely vizsgálat eredménye alapján megállapítható, hogy a gyulladást kiváltó kezelések hatására megemelkedett magi NF $\kappa$ B szintből adódó megnövekedett DNS bekötődési rátát nem sikerült

csökkentenie a tricetin „utókezelésnek”. Ebből arra következtethetünk, hogy a tricetin csak az NF $\kappa$ B magi transzlokációját gátolja, a magba bejutott faktor DNS-kötődését már nem.

### **A tricetin gátolja a PARP1 enzimet**

A PARP1 aktivációja hozzájárul a szöveti sérüléshez és gyulladásokhoz akut és krónikus pancreatitisben. Ez alapján megvizsgáltuk, hogy a tricetin kedvező hatásaiban szerepet játszhat-e a PARilációs gátlása. Enzimaktivitási vizsgálatban a tricetin a referencia vegyületként használt 3-aminobenzamid (3-AB) hatásához hasonlóan PARP-gátló aktivitást mutatott.

### **A tricetin csökkenti a hidrogén peroxid által indukált PARiláció mértékét izolált hasnyálmirigy acinussejtekben**

Ezután sejtes rendszerben vizsgáltuk meg a tricetin PARilációra gyakorolt hatását. Az izolált acinussejteket 250 $\mu$ M hidrogén-peroxiddal kezeltük, amely az elvégzett IF és WB vizsgálómódszerek alapján sikeresen indukálta a PARilációt. Az egy órás előkezelésben alkalmazott 10 $\mu$ M, illetve 30 $\mu$ M tricetin, szignifikánsan csökkentette a PARiláció mértékét a vizsgált sejtekben.

### **A tricetin előkezelés egérmodellben csökkenti az akuthasnyálmirigy gyulladás súlyosságát**

A tricetin primer acinussejtekben mért citoprotektív hatása alapján és a cerulein által kiváltott gyulladásos mediátorok elnyomása alapján feltételeztük, hogy a szer jótékony hatással lesz az AP cerulein által kiváltott állatmodelljében is. A cerulein által kiváltott AP *in vivo* modelljét a tricetin esetében is egerekben állítottuk be az anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint. Ez a protokoll egy 8 órán át tartó, óránkénti i. p. injekciósorozaton alapul. A tricetin dózisát (10 mg/ttkg) olyan *in vivo* vizsgálat alapján választottuk ki, amelyben egy hasonló vegyületet, a fisetint (egy flavonolt) vizsgálták.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy - az irodalmi adatokkal összhangban - a cerulein a hasnyálmirigy acinussejtjeinek károsodását okozta, amit az  $\alpha$ -amiláz és lipáz emésztőenzimek emelkedett szérumszintje jelzett. Látható továbbá, hogy a csökkent szérum enzimszintek alapján a tricetin előkezelés szignifikánsan csökkentette az acinussejtek károsodását.

A H&E-festett metszeteken ödéma és neutrfil granulocita infiltráció, illetve nekrosis jelei mutatkoztak a ceruleinnel kezelt egerek hasnyálmirigyében. A szöveti képeken látható, hogy tricetin visszafogta mind az ödéma képződését, mind pedig az infiltráció és a nekrosis mértékét, amit a metszetek patológus általi szemikvantitatív elemzése is igazolt.

### **A tricetin *in vivo* is csökkenti a cerulein kezelés hatására kialakult apoptotikus testek mennyiségét**

A TUNEL esszé eredménye jól korrelál a korábban bemutatott H&E festés során tapasztaltakkal. A cerulein kezelés hatására nagy számú apoptotikus sejt megfigyelése volt megfigyelhető a hasnyálmirigy metszetekben. Az apoptózis intenzitása a tricetinnel kezelt metszetekben csökkent. A patológus által elvégzett szemikvantitatív kiértékelés szignifikáns különbséget mutatott mind a kontroll (KTR) és a ceruleinnel kezelt egerek között, mind pedig

a ceruleinrel kezelt és a cerulein kezeléson kívül trisetin előkezelést is kapott egerek metszetei között.

### **A trisetin gátolja a granulocita infiltrációt akut pancreatitis egérmódelében**

A gyulladás egyik jellemzője a fehérvérsejtek, különösen a granulociták megjelenése az érintett szövetben. A szöveti myeloperoxidáz (MPO) szintjének mérése jó indikátora a különböző szövetek granulocita-tartalmának. A hasnyálmirigy szövetben mért MPO-aktivitás több mint hatszorosára nőtt az AP indukcióját követően. A trisetin kezelés jelentősen csökkentette a szöveti MPO-szintet, ami a granulociták szövetbe történő migrációjának gátlására utal. Ez az eredmény korrelál a H&E-festett metszetek esetében tapasztaltakkal.

### **A trisetin *in vivo* is csökkenti a cerulein által indukált gyulladáson génexpressziót**

Hasonlóan a ceruleinrel kezelt izolált acinussejtekben tapasztaltakhoz, az IL1 $\beta$  és IL6 gyulladáson citokinek mRNS mennyisége *in vivo* is hasonlóan változott: az AP mintákban megnövekedett expressziós szintet, de a trisetinnel előkezelt egerek hasnyálmirigyében csökkent kifejeződést tapasztaltunk. Az acinussejteken kapott eredményekkel ellentétben az MMP2 szintje nem változott *in vivo* az AP csoportban, és a trisetinnel sem volt rá hatása. Bár a TNF $\alpha$  expressziójának mértéke izolált acinussejtekben nem emelkedett meg a ceruleinrel kezelt mintákban, *in vivo* az – irodalmi adatokkal összhangban – emelkedett a TNF $\alpha$  mRNS-szintje a ceruleinrel kezelt csoportban, melynek mértékét a trisetin előkezelés szignifikánsan gátolta.

### **A trisetin *in vivo* csökkenti a cerulein kezelés által indukált PARiláció mértékét a hasnyálmirigy acinusaiban**

A PARP1 a gyulladás, valamint a programozott nekrotikus sejthalál központi közvetítője. A szöveti metszetekben, a cerulein kezelés hatására kimutattuk a PARP1 termékét, a poli(ADP-ribóz) (PAR) polimert. Az exokrin hasnyálmirigyben a kezelés következtében a sejtmagok nagy száma volt immunpozitív a PAR-ra, ami az acináris PARP aktiválódására utal az AP-ben. Ezzel szemben a trisetinnel is előkezelt állatok hasnyálmirigye alig tartalmazott PAR-polimert. A konfokális mikroszóppal készült képek elemzése igazolta, hogy a trisetin előkezelés szignifikánsan csökkentette a PAR polimerek képződését az állatok cerulein által károsított hasnyálmirigy szövetében.

### **A trisetin utókezelésként alkalmazva is csökkenti az egerekben a ceruleinrel kiváltott hasnyálmirigy gyulladás súlyosságát**

Az trisetin előkezelés pozitív eredményei után azt is meg szeretnénk volna vizsgálni, hogy a flavonoid utókezelésként alkalmazva is csökkenti-e az AP lefolyásának súlyosságát. A gyulladás kiváltására itt is a már korábban bemutatott módoüst alkalmaztuk, de a trisetint a negyedik és ötödik cerulein injekció között (30mg/ttkg), illetve az utolsó cerulein injekció beadása után (10mg/ttkg) jutattuk be az egerekbe.

Az utókezelési módellet alkalmazva is azt találtuk, hogy a trisetin kezelés jelentősen csökkentette az acinussejtek károsodását, amint azt az  $\alpha$ -amiláz és lipáz enzimek szérumszintjének csökkenése mutatta. Ezen felül a trisetin utókezelésben alkalmazva is

szignifikánsan csökkentette a szöveti MPO szintjét, ami ebben az esetben is a granulociták szövetbe történő migrációjának gátlására utal.

### **A spilantol hatása in vivo gyulladásos modellekben**

#### **A spilantol in vivo csökkentette a kontakt dermatitisz következtében kialakuló ödémát, és a neutrofil infiltráció mértékét.**

Korábbi kísérleteink megállapították, hogy a spilanthol gátolja az iNOS fehérje génexpresszióját és a NO-termelést és megzavarja a gyulladásos transzkripciós faktor aktivációt a makrofágokban. Ezek alapján érdemesnek találtuk a szert az *in vivo*, gyulladásos modellben történő vizsgálatra. Először a gyulladásos folyamatok egyik legegyszerűbb, helyi gyulladásos kísérleti modelljében, az irritatív kontakt dermatitiszben folytattuk le a vizsgálatot, melyhez könnyen elérhető, helyi kezelési lehetőséggel rendelkező állatmodellt használtunk. BALB/c egerek fülére PMA felkenésével bőrirritációt idéztünk elő, a kontroll egereket csak az oldószerrel (DMSO) kezeltük.

A gyulladás kialakulására utaló erythemát és duzzanatot az irritálószer felvitelét követő 6. órában vizsgáltuk. A gyulladásos válasz követése érdekében mikrométeres mérőműszerrel megmértük a fülek vastagságát. A fülek hematoxin-eozinnal festett szövettani metszetei kimutatták, hogy a PMA masszív gyulladást idézett elő.

A spilantol-kezelés hatására, a PMA kezelés által megnövekedett átlagos fülvastagság 0,34 mm-ről 0,26 mm-re csökkent, s így a szer a gyulladás következtében kialakuló fülvastagodást 40%-kal fogta vissza. Kijelenthetjük, hogy a spilantol gátolta az ödémás választ, mint ahogyan az a szöveti metszeteken is megfigyelhető. A minták mieloperoxidáz (MPO) szintjének változásait vizsgálva, a PMA kezelés hatására kialakult leukocita infiltráció mértéke is jelentősen csökkent a spilantollal is kezelt csoportban.

#### **A spilantol in vivo csökkentette a hasnyálmirigy gyulladás következtében kialakuló neutrofil infiltráció mértékét, de a sejtkárosodást nem**

A kontakt dermatitisz vizsgálatainkban kapott pozitív eredményeket követően, szeretnénk volna megvizsgálni a spilantol hatását egy jóval összetettebb gyulladásos folyamatban, mint a milyen a hasnyálmirigy gyulladás is. A pankreatitisz cerulein kezeléssel kiváltott egérmodelljét az anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint állítottuk be egy 8 órán át tartó, óránkénti intraperitoneális (i. p.) injekciósorozat formájában. A spilantol dózisát olyan kutatás alapján választottuk, ahol az *A. oleracea* virága alkoholos extraktumának i. p. bejuttatásával kezelték az egereket.

A cerulein kezeléssel szignifikáns sejtkárosodást váltottunk ki, melyet az alkalmazott 30mg/ttkg spilantol kezelés nem csökkentett a vizsgált  $\alpha$ -amiláz és lipáz szérumszint alapján. Ezzel ellentétben a cerulein kezelés következtében megnövekedett neutrofil infiltráció mértékét a spilantol kezelés a szöveti mieloperoxidáz szint alapján szignifikánsan

csökkentette. Az enzimszintek eredményét megerősíti a H&E festett szövettani metszetek képe is: a cerulein által kiváltott szövetkárosodás mértékét a spilantol nem gátolta, a megnövekedett neutrofil infiltrációt viszont csökkentette.

## MEGBESZÉLÉS

A hasnyálmirigy-gyulladás a fejlettebb társadalmak egyre gyakoribb megbetegedése, amire még mindig nem rendelkezünk specifikus terápiával. Több növényi alkilamidról és flavonoidról kimutatták már, hogy enyhítik a gyulladásos folyamatok lefolyását. Az iskolavirágból izolált spilantol alkilamid, illetve a tricetin nevű flavonvegyületet gyulladásos folyamatokban már többször vizsgálták, de az akut hasnyálmirigy gyulladás terápiajában még feltérképezetlenek.

A számos növényben megtalálható **tricetin** flavonoid akut hasnyálmirigy gyulladásban kifejtett hatásának vizsgálatához a cerulein kezelés által kiváltott sejt-, és szövetkárosítási módszert választottuk az *in vitro* és *in vivo* vizsgálatainkhoz egyaránt. Ez a sokak által használt rendszeralkalmas az akut pankreatitisz kulcsfontosságú eseményeinek vizsgálatára mind primer acinussejt-kultúrában, mind pedig *in vivo* állatmodellben. Szuprafiziológiás dózisban ez a kolekisztokinin (CCK) analóg peptid stimulálja mind a CCK1, mind a CCK2 receptorokat. Ezek a G-protein-kapcsolt receptorok inozitol-triszfoszfáton keresztül kalciumszignalizációt indítanak el, ami reaktív oxigéngyökök termelődését, gyulladásos folyamatokat és sejthalált eredményez. A sérült acináris sejtek *in vivo* kommunikálnak a szöveti makrofágokkal, amelyek gyulladásos citokinek és kemokinek termelésével hozzájárulnak az AP patogeneziséhez.

Kísérleteinkben a cerulein kezelés sejtpusztulást váltott ki az egerekből izolált primer acinussejtekben. A kezelt sejtek életképességének kalcein-tesztekkel értékelt csökkenése a CCK receptor hiperstimulációjának toxikus hatását bizonyítja. A kiváltott sejthalál az apoptózis és a nekrosis jellemzőit egyaránt hordozza, amint azt a kaszpár aktiváció (apoptózis), valamint az LDH felszabadulás és a propidium-jodid felvétel (nekrosis) jelezte. A TCT jelentős citoprotektív hatása mind az általános életképességi vizsgálatban, mind az apoptózis és nekrosis vizsgálatokban megfigyelhető volt.

Ezen túlmenően a TCT-kezelés az AP egérmodelljében is hozzájárult a sejtek életképességének fenntartásához, amit az állatok szérumból mért csökkent amiláz- és lipáz szint jelzett. Érdekes módon a TCT hatása kifejezettebb volt a szérumból mért lipáz aktivitásra, mint az amiláz aktivitásra. Ez – véleményünk szerint - valószínűleg a ceruleinnel kezelt állatoknál tapasztalt, kevésbé kifejezett amiláz-felszabaduláshoz képest erőteljesebb lipáz-felszabadulási válasznak tulajdonítható. Egy korábbi tanulmány szerint is a lipáz valóban a hasnyálmirigy-gyulladás érzékenyebb indikátora. Mindazonáltal mindkét szérummarker megerősítette a TCT *in vivo* citoprotektív hatását.

A TCT-vel kezelt állatok megtartott hasnyálmirigy-szöveti architektúrája szintén arra utal, hogy a cerulein hatására kevésbé súlyos szöveti károsodás következett be, továbbá a metszeteken végzett TUNEL-festés is azt mutatja, hogy a TCT megakadályozza az apoptotikus sejthalált *in vivo*.

Az oxidatív stressz a gyulladás különböző formáinak közös jellemzője, és az akut hasnyálmirigy gyulladás patomechanizmusában is kulcsszerepet játszik. Mivel számos flavonoid antioxidáns tulajdonságokkal rendelkezik, feltételeztük, hogy a TCT AP-ben kifejtett védőhatásához antioxidáns mechanizmus is hozzájárulhat. A TCT valóban rendelkezik gyökfogó aktivitással, amint azt az ABTS teszt is kimutatta. Érdekes módon azonban a TCT nem védett a hidrogén-peroxid által kiváltott acináris sejtkárosodással szemben. Ennek oka lehet a hidrogén-peroxid-specifikus antioxidáns aktivitás hiánya a vizsgálatban használt TCT koncentrációban. Ezenkívül pedig az antioxidánsok a szabad gyökök eliminálása helyett elsősorban a nukleofil tónus növelésével hatnak, többek között az Nrf2 aktiválásán keresztül indukálják az antioxidáns választ. Hogy ez a tricetin esetében is így van-e, az további vizsgálatot igényel.

Mivel a ROS-termelődést már kapcsolatba hozták a cerulein által kiváltott acináris sejtkárosodással és az AP-vel, feltételeztük, hogy a TCT legalább részben a PARP1 által közvetített, ROS-indukált sejthalál útvonal gátlásával hathat. Megjegyzendő, hogy az oxidatív stressz által kiváltott és a PARP1 által közvetített sejthalál útja a nekrosis jellemzőit mutatja (leginkább a membrán permeabilizáció révén), ami összhangban van az acinussejtek általunk is kimutatott részlegesen nekrotikus halálával AP-ben. Egyes flavonoidokról beszámoltak, hogy DNS-alkiláció hatására PARP-gátló hatást fejtenek ki. Nem sejtes rendszerben vizsgáltuk a tricetin PARP enzim aktivitására gyakorolt hatását és azt találtuk, hogy a TCT a 3-aminobenzamidhoz hasonló hatékonysággal gátolja az enzimet.

Az oxidatív stressznek kitett primer hasnyálmirigy acinussejtekben PAR polimer képződést lehetett megfigyelni, ami a PARP aktiválódására utal. A TCT *in vitro* megszüntette a PAR-szintézist, amint azt az immunfluoreszcens festés és Western blot is kimutatta. Az acináris sejtmagok a ceruleinnel indukált *in vivo* AP modellben is tartalmaztak PAR polimert, míg a TCT-vel is kezelt csoportban a PAR képződés elmaradt. Korábban kimutatták, hogy a PARP1 és a PARiláció hozzájárul az AP patogenezéséhez. Jelenlegi eredményeink megerősítik, hogy a tricetin *in vitro* PARP-gátló hatása *in vivo* körülményekre is átvihető, ami arra utal, hogy a PARP-gátlás kulcsfontosságú tényező lehet a TCT által akut pankreatitiszben nyújtott védelemben. Egyéb kutatásokban felmerült, hogy a flavonoidok citoprotektív hatásában az PI3K-Akt jelátvitelre gyakorolt aktiváló hatásuk is szerepet játszhat.

Adataink egyértelműen azt mutatják, hogy a TCT elnyomja a gyulladást az AP-ben. A csökkent ödéma, a visszafogott gyulladásos infiltráció és a megőrzött szöveti architektúra mind alátámasztja ezt az állítást. A TCT gyulladáscsökkentő hatásának hátterében a gyulladásos mediátorok termelésének gátlása áll. A sejtes kísérletekből meg tudtuk állapítani, hogy a TCT gátolja gyulladásos mediátor gének (IL1 $\beta$ , IL6, MMP2) aktiválódását. *In vivo* adataink kibővítették ezt a listát a TNF $\alpha$ -val, mint a cerulein által kiváltott gyulladás központi mediátorával, melynek expresszióját a TCT gátolta. A TNF $\alpha$  nem indukálódott az acinussejteken végzett kísérletekben, ami összhangban van jelenlegi felfogásunkkal, miszerint az AP-ben ennek a citokinnek a makrofágok a fő forrásai.

A leírtak alapján arra következtethetünk, hogy a TCT képes gátolni a gyulladásos génaktivációt mind az acinussejtekben, mind pedig a makrofágokban. Feltételezésünk szerint az NF $\kappa$ B gátlása állhat e hatás hátterében, eredményeink pedig valóban azt mutatják, hogy a TCT gátolja az NF $\kappa$ B aktiválódását az acinussejtekben. Ugyanakkor a szernek nem volt közvetlen hatása a transzkripciós faktor konszenzus szekvenciájához történő kötődésére, ami arra utal, hogy a TCT az NF $\kappa$ B jelátviteli útvonal egy proximális lépésénél hat, ami csökkenti a transzkripciós faktor magba történő belépését.

A tricetin NF $\kappa$ B-re gyakorolt, hatása feltételezhetően a vegyület PARP-gátló hatásának is köszönhető, mivel a PARP1 az NF $\kappa$ B koaktivátoraként működik, és a PARP-gátlás/PARP1 knockout az NF $\kappa$ B aktiváció szuppresszióját okozta különböző modellrendszerekben.

Annak ellenére, hogy a hasnyálmirigy-gyulladás leginkább vizsgált oka az acinussejtek károsodása, és a mi tricetinnel kapcsolatos vizsgálataink során is őket taulmányoztuk, nem hagyhatjuk figyelmen kívül azt a tényt, hogy a betegség nem csak ezeknek a sejteknek a meghibásodása miatt alakul ki. A korai proteáz-aktiváció és az NF $\kappa$ B-aktiváció az AP alapvető jellemzői; mindkettő párhuzamosan zajlik a betegség manifesztációja során, és erősen befolyásolják egymást. Azonban nemcsak a proteáz és az NF $\kappa$ B aktiváció játszik kritikus szerepet, hanem az is fontos, hogy milyen sejttypusban történik az aktivációjuk.

Bár e munka középpontjában a TCT antioxidáns és PARP-gátló hatása állt, meg kell jegyezni, hogy a TCT-nek további hatásai is hozzájárulhatnak a pancreatitis elleni védelemhez. A hasnyálmirigy iszkémiája domináns szerepet játszik az AP kialakulásában, valamint a betegség súlyos formákba való progressziójában. Ezt az állítást alátámasztják azok a megfigyelések, amelyek szerint a hasnyálmirigy vérrellátásának csökkenése növeli az akut pancreatitis súlyosságát, míg a hasnyálmirigy vérrellátásának javulása csökkenti az akut pancreatitis súlyosságát és gyorsítja a hasnyálmirigy regenerációját. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a flavonoid kvercetin AP-ben növelte a hasnyálmirigy véráramlását, ami szövetvédő hatásban és a hasnyálmirigy gyorsabb felépülésében nyilvánult meg. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a tricetin hasnyálmirigyre gyakorolt védő hatása a cerulein által kiváltott AP-ben legalábbis részben a hasnyálmirigy véráramlásának javulásával is összefügghet.

Az iskolavirág (ábécéfü, *A. oleracea*) legpotensebb sejtvédő hatású vegyülete, a **spilantol** korábbi kísérleteink alapján RAW makrofág sejtekben szignifikánsan csökkentette az iNOS gén és fehérje expresszióját és a sejtek által termelt NO mennyiségét, mely molekula többek között indukálhatja fehérjék porsztanszlációs módosításait (nitrozálás, nitroziláció, nitráció), cXMP jelátviteli folyamatokat indíthat be (pl. sejtproliferáció) és képezhet reaktív nitrogén-származékokat (pl. peroxinitrit). E hatások eredményeként a szer szignifikánsan növelte a kezelt sejtek életképességét is.

A makrofág sejtek vizsgálatából származó eredmények alapján a spilantolt gyulladásos folyamatokban is teszteltük (kontakt hiperszenzitivitás és akut hasnyálmirigy gyulladás). A spilantol – valószínűleg iNOS-, s így NO termelés gátló hatásával összefüggésben – a dermatitisz egérmódeljében gyulladáscsökkentő szernek mutatkozott. A vegyület jelentősen csökkentette a fülödémát és a szövet granulocita infiltrációját. Korábbi vizsgálatainkból arra következtethetünk, hogy a gyulladásos transzkripciós faktorok aktivációs útvonalainak átprogramozása valószínűleg döntő fontosságú a gyulladáscsökkentő hatás mögöttes mechanizmusaként. A szer granulocita infiltráció gátló hatása tekintetében, a spilanthol gátolja az adhéziónak molekulák expresszióját és többek között ezen események járulhatnak hozzá a gyulladásos sejtváándorlás csökkenéséhez a spilantollal kezelt egerekben.

A cerulein indukálta akut pankreatitisz módeljben már vizsgálták az iNOS aktiválódását, és azt találták, hogy az acináris sejtekből induló gyulladásos folyamatokban is jellemző az enzim emelkedett szintje. A spilantol – szintén az iNOS-gátló hatásával összefüggésben – a hasnyálmirigy területére történő granulocita infiltrációt és ezáltal a kialakult gyulladás mértékét csökkentette. Ugyanakkor a sejteket nem védte meg a cerulein kezelés káros következményeitől, ami arra utalhat, hogy a sejtkárosodás kialakulásában az iNOS emelkedett szintje és így a NO képződése nem játszik kardinális szerepet. A gyulladásos sejtváándorlás csökkenésének hátterében egyebek között itt is a spilantol adhéziónak molekulák expresszióját gátló képessége állhat.

Összegzőképpen elmondható, hogy a megvizsgált két növényi hatóanyag közül a spilantol kevésbé hatásos vegyület az AP kezelésében, a tricetin viszont új jelölt lehet a betegség súlyosságának csökkentésében, hiszen gátolja az AP patofiziológiájának két központi útvonalát: az acinussejtek pusztulását és magát a gyulladást is. A TCT antioxidáns és PARP-gátló hatása pedig központi szerepet játszhat a flavonoid akut pankreatitiszben kifejtett védő hatásában.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Az akut hasnyálmirigy-gyulladás (AP) növekvő gyakorisága, potenciálisan életveszélyes lefolyása és szövődményei miatt világszerte nagy kihívást jelent az egészségügyi rendszerek számára. Speciális célzott terápiák nem állnak rendelkezésre, ezért új utak és új terápiás megközelítések azonosítására kell törekedni.

Az alkilamidok és flavonoidok a biológiailag aktív vegyületek számos csoportját foglalják magukban, amelyeknek széles körű hatásai vannak. A spilantol (alkilamid) és tricetin (flavonoid) még nem vizsgálták hasnyálmirigy gyulladásban, de az irodalomban található jelentések sokféle biológiai aktivitásukat, köztük gyulladáscsökkentő hatásukat más betegségmodellekben is kimutatták. Jelen tanulmányban a spilantol (SLT) és a tricetin (TCT) lehetséges terápiás hatásait tanulmányoztuk akut hasnyálmirigy gyulladásban.

A tricetin védelmet nyújtott az izolált primer acinussejteknek a CCK-analóg cerulein citotoxikus hatásával szemben. A szer szignifikánsan csökkentette a sejtekben az oxidatív stressz hatására kialakult PARiláció mértékét. A TCT hatásai valószínűleg nem kapcsolódtak a szer antioxidáns hatásához, mivel gyökfogó aktivitása ellenére nem nyújtott védelmet a  $H_2O_2$  által kiváltott acináris sejthalállal szemben. Az IL1 $\beta$ , IL6 és a mátrix metalloproteináz 2 (MMP2) cerulein által kiváltott expresszióját a TCT kezelés szintén szignifikánsan csökkentette.

Az *in vivo* kísérletek során a tricetin gátolta a hasnyálmirigyben az ödéma képződését, valamint megvédte a sejteket a pusztulástól. A TCT ezen felül gátolta az IL1 $\beta$ , IL6 és TNF $\alpha$  expresszióját a hasnyálmirigy szövetben, és csökkentette az oxidatív DNS-károsodást, amit a poli(ADP-ribóz) polimeráz 1 (PARP1) enzim termékének, a PAR szintjének csökkenése jelzett. A spilantol *in vivo* vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a szer szignifikánsan csökkentette a gyulladásos ödémát és a szöveti granulocita infiltrációt, de nem nyújtott védelmet a ceruleinnel kezelt egerek hasnyálmirigy acinussejtjeinek pusztulásával szemben.

Adataink arra utalnak, hogy a tricetint potenciális kezelési lehetőségként érdemes lehet figyelembe venni az AP terápiájában.



**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/16/2023.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Nagy-Pénzes Máté  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10067941

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **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)
2. Bakondi, E., Singh, S. B., Hajnádý, 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

### További közlemények

3. 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)





**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

4. Regdon, Z., Demény, M. Á., Kovács, K., Hajnád, 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. 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>  
IF: 6.208

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 29,751**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
9,313**

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

Debrecen, 2023.01.17.



A PhD értekezésben bemutatott eredmények létrejöttét a GINOP-2.3.2-15-2016-00020-TUMORDNS, a GINOP-2.3.2-15-2016-00048-STAYALIVE, az OTKA K112336, az OTKA K132193 és az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 pályázatok támogatták.