

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Növényi hatóanyagok vizsgálata akut hasnyálmirigy-gyulladás egérmodelljében

Nagy-Pénzes Máté

Témavezető: Prof. Dr. Virág László



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

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	- 4 -
I. BEVEZETÉS	- 7 -
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	- 10 -
II.1. A hasnyálmirigy	- 10 -
II.1.1. A szerv anatómiája és fejlődéstana	- 10 -
II.1.2. A hasnyálmirigy szövettana	- 12 -
II.1.3. Az exokrin hasnyálmirigy funkcionális működése	- 14 -
II.1.3.1. Az acinussejtek funkcionális működése	- 15 -
II.1.3.2. A duktális sejtek funkcionális működése	- 16 -
II.1.3.3. A hasnyál termelésének szabályozása	- 17 -
II.2. Az exokrin hasnyálmirigy megbetegedései	- 18 -
II.2.1. Az akut hasnyálmirigy-gyulladás	- 18 -
II.2.1.1. Az akut hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásának molekuláris háttere.....	- 20 -
II.2.2. Krónikus hasnyálmirigy-gyulladás	- 21 -
II.2.3. Az exokrin hasnyálmirigy megbetegedéseinek diagnosztikai és kezelési lehetőségei.....	- 21 -
II.3. Az akut hasnyálmirigy-gyulladás vizsgálati modellrendszerei.....	- 22 -
II.3.1. <i>In vitro</i> modellek	- 22 -
II.3.2. <i>In vivo</i> modellek.....	- 24 -
II.4. Gyulladásos mediátorok pancreatitisben	- 25 -
II.5. Antioxidáns mechanizmusok	- 26 -
II.6. Poli-ADP-ribóziláció	- 27 -
II.7. Növények és növényi kivonatok a gyulladások kezelésében.....	- 30 -
II.7.1. Növényi alkilamidok	- 31 -
II.7.1.1. Spilantol.....	- 31 -
II.7.2. Flavonoidok.....	- 32 -
II.7.2.1. Tricetin.....	- 34 -
III. CÉLKITŰZÉSEK	- 36 -
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	- 37 -
IV.1. Anyagok	- 37 -
IV.1.1. Cerulein.....	- 37 -
IV.1.2. Spilantol, tricetin.....	- 37 -

IV.2. Módszerek	- 38 -
IV.2.1. Hasnyálmirigy acinussejtek izolálása és tenyésztése	- 38 -
IV.2.2. <i>In vitro</i> kezelések	- 39 -
IV.2.3. Állatok (C57BL/6j, BALB/c) tartási körülményei	- 39 -
IV.2.4. <i>In vivo</i> kezelések és szövetfeldolgozás (pankreatitisz modell).....	- 40 -
IV.2.5. <i>In vivo</i> kezelések és szövetfeldolgozás (fülgulladás modell, spilantol esetében)...	- 42 -
IV.2.6. Vizsgálati módszerek.....	- 42 -
IV.2.6.1. Gyökfogó hatás vizsgálata ABTS dekolorizációs módszerrel	- 42 -
IV.2.6.2. PARP inhibíciós esszé	- 43 -
IV.2.6.3. NFκB aktiváció mérése	- 43 -
IV.2.6.4. Sejtéletképesség és citotoxicitás meghatározása.....	- 44 -
IV.2.6.4.1. Kalcein esszé	- 44 -
IV.2.6.4.2. LDH esszé	- 44 -
IV.2.6.4.3. Membránpermeabilizáció kimutatása propidium-jodid esszével	- 44 -
IV.2.6.4.4. Kaszpáz aktivitás mérése.....	- 45 -
IV.2.6.5. Immunfluoreszcens festés és fluoreszcens mikroszkópia	- 45 -
IV.2.6.6. RNS izolálás, RT-qPCR.....	- 45 -
IV.2.6.7. SDS-PAGE és Western blot.....	- 46 -
IV.2.6.8. Szérum α-amiláz és lipáz esszé	- 47 -
IV.2.6.9. Szöveti mieloperoxidáz (MPO) aktivitás meghatározása	- 47 -
IV.2.6.10. Szövettani vizsgálat és TUNEL festés	- 47 -
IV.2.6.11. Hasnyálmirigy szöveti metszet immunfluoreszcens festése	- 48 -
IV.2.7. Statisztikai elemzés.....	- 49 -
V. EREDMÉNYEK	- 50 -
V.1. A tricetin flavonoid vizsgálatának eredményei	- 50 -
V.1.1. <i>In vitro</i> eredmények	- 50 -
V.1.1.1. A tricetin jelentős antioxidáns hatással bíró vegyület	- 50 -
V.1.1.2. A tricetin alacsonyabb dózisban nem toxikus az izolált sejtekre	- 50 -
V.1.1.3. A tricetin megvédi a sejteket a cerulein által kiváltott sejthaláltól, de a H ₂ O ₂ - indukált sejthaláltól nem	- 52 -
V.1.1.4. A tricetin gátolja az apoptózis mértékét a ceruleinnel kezelt acinussejtekben...	- 55 -

V.1.1.5. A tricetin gátolja a ceruleinrel indukált gyulladásos génexpressziót izolált acinussejtekben.....	- 56 -
V.1.1.6. A tricetin visszafogja az NFκB p65-ös alegységének transzlokációját a sejtmagba, de nem gátolja kötődését a DNS-hez	- 57 -
V.1.1.7. A tricetin gátolja a PARP1 enzim működését	- 58 -
V.1.1.8. A tricetin csökkenti a hidrogén peroxid által indukált PARiláció mértékét izolált hasnyálmirigy acinussejtekben.....	- 59 -
V.1.2. <i>In vivo</i> eredmények	- 62 -
V.1.2.1. A tricetin előkezelés egérmodellben csökkenti a ceruleinrel kiváltott AP súlyosságát	- 62 -
V.1.2.2. A tricetin <i>in vivo</i> csökkenti a cerulein kezelés hatására kialakult DNS törések mennyiségét.....	- 64 -
V.1.2.3. A tricetin gátolja a granulocita infiltrációt akut pancreatitis egérmodelljében ..	- 65 -
V.1.2.4. A tricetin <i>in vivo</i> is csökkenti a cerulein által indukált gyulladásos génexpressziót	- 66 -
V.1.2.5. A tricetin <i>in vivo</i> csökkenti a cerulein kezelés által indukált PARiláció mértékét a hasnyálmirigy acinusaiban	- 67 -
V.1.2.6. A tricetin utókezelésként alkalmazva is csökkenti az egerekben a ceruleinrel kiváltott hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságát.....	- 68 -
V.2. A spilantol hatása <i>in vivo</i> gyulladásos modellekben.....	- 71 -
V.2.1. A spilantol <i>in vivo</i> csökkentette a kontakt dermatitisz következtében kialakuló ödémát, és a neutrofil infiltráció mértékét.	- 71 -
V.2.2. A spilantol <i>in vivo</i> csökkentette a hasnyálmirigy-gyulladás következtében kialakuló neutrofil infiltráció mértékét, de a sejtkárosodást nem	- 73 -
VI. MEGBESZÉLÉS	- 76 -
VII. ÖSSZEFOGLALÁS	- 82 -
VIII. SUMMARY	- 83 -
IX. TÁRGYSZAVAK / KEY WORDS.....	- 84 -
X. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	- 85 -
XI. IRODALOMJEGYZÉK.....	- 86 -
XII. PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	- 116 -
XIII. FÜGGELÉK.....	- 118 -

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

36B4: riboszómális foszfoprotein P0

ABTS: 2,2'-azino-bisz(3-etilbenzotiazolin-6-szulfonsav)

Akt: Protein kináz B

AP: akut hasnyálmirigy-gyulladás „*acute pancreatitis*”

ATP: adenosin-trifoszfát

BSA: szarvasmarha szérum albumin „*bovine serum albumin*”

cAMP: ciklikus adonozin-monofoszfát

cGMP: ciklikus guanozin-monofoszfát

CCK:olecisztokinin

CCL5: „*C-C Motif Chemokine Ligand 5*”

CP: krónikus hasnyálmirigy-gyulladás „*chronic pancreatitis*”

CXCL10: „*C-X-C motif chemokine ligand 10*”

cXMP: ciklikus nukleozid monofoszfát

DAB: 3, 3'-diaminobenzidin

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorid

DMSO: dimetil-szulfoxid

DNS: dezoxiribonukleinsav

ER: endoplazmatikus retikulum

ERCP: endoszkópos retrográd kolangiopankreatográfia „*endoscopic retrograde cholangiopancreatography*”

FBS: főtális szarvasmarha szérum „*fetal bovine serum*”

PS: penicillin-streptomycin keverék

H₂O₂: hidrogén peroxid

HBSS: Hanks' balanced salt solution

HCA: „*high-content*” analízis

HTAB: hexadeciltrimetilammonium-bromid

ICC: immuncitokémia

IFN γ : interferon gamma

IHC: immunhisztokémia

IL1 β : interleukin 1 béta

IL6: interleukin 6

IL10: interleukin 10

IP₃: inozitol-triszfoszfát

Jak/STAT: Janus kináz/szignál transzducer és aktivátor transzkripció fehérje

LDH: laktát-dehidrogenáz

LPS: lipopoliszacharid

KEAP1: Kelch-szerű ECH-asszociált fehérje 1

KTR: kontroll

MMP2: mátrix metalloproteináz

MPO: mieloperoxidáz

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólium bromid

NADPH: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NFκB: nuklár faktor kappa B

NOS: nitrogén-oxid-szintáz

NSAIDs: nem szteroid gyulladáscsökkentők „*nonsteroidal anti-inflammatory drugs*”

PAR: poli(ADP-ribóz)

PARP: poli(ADP-ribóz) polimeráz

PARPi: PARP inhibitor

PARG: poli(ADP-ribose) glikohidroláz

PARiláció: poli(ADP-ribozil)áció

PC: hasnyálmirigy rák „*pancreatic cancer*”

PD: „*pancreas divisum*”

PI: propidium-jodid

PMA: forbol 12-mirisztát 13-acetát

PSC: hasnyálmirigy csillagsejtek „*pancreatic stellate cells*”

rhEGF: rekombináns humán epidermális növekedési („*growth*”) faktor

ROS: reaktív oxigén származékok

RPS26: riboszómális fehérje S26

RT-qPCR: Reverz transzkripció követő valós idejű kvantitatív polimeráz-láncreakció „*Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction with Reverse Transcription*”

SDS-PAGE: nátrium dodecil szulfát – poliakrilamid gél elektroforézis „*sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis*”

SLT: spilantol

TBST: 0,1 v/v% Tween 20 tartalmú tris-pufferelt sóoldat „*tris-buffered saline with 0.1 v/v% Tween 20*”

TCT: tricetin

TGF β : transzformáló növekedési („*growth*”) faktor béta

TNF α : tumornekrozis faktor alfa

I. 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. A szerv endokrin működését vizsgálva a Langerhans-szigetek által termelt hormonok egyensúlyával, az exokrin funkciót tekintve pedig az emésztőenzimek széles spektrumával (kimotripszin, tripszin, amiláz, lipáz stb.) találkozunk (Czakó és mtsai., 2009). A hasnyálmirigy-gyulladás (akut pankreatitisz – AP, illetve a krónikus pankreatitisz – CP) a külső elválasztású mirigyrészekben meginduló káros, önmérsztő folyamatok következményeként kialakuló kórkép. Az exokrin mirigysejtek által proenzim (zimogén) formában termelt emésztőenzimek autoaktiválódását jellemzően a mértéktelen alkoholfogyasztás, illetve a hasnyálmirigy- és az epevezeték terminális szakaszát elzáró epekövek képződése váltja ki. (Hegyi és mtsai., 2013) Ezenkívül a hipertrigliceridémia, dohányzás, fertőzések, toxinok, gyógyszerek, különböző vizsgálmódszerek (pl. endoszkópos retrográd kolangiopankreatográfia – ERCP) és műtétek is összefüggésbe hozhatóak az akut hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásával, mely a kiváltó okok megszüntetése és a beteg kezelése nélkül sokszor csak maradványtünetekkel gyógyul, vagy krónikus formába csap át, illetve hasnyálmirigy rák kifejlődéséhez is vezethet. Kialakulásában különböző genetikai tényezők is közrejátszhatnak, az esetek pedig mintegy 10%-a idiopátiásnak minősíthető. (Párnichky és mtsai., 2016; Meczker és mtsai., 2020) Az AP súlyossági spektruma egyezményesen három részre tagolt: enyhe, spontán gyógyuló (60-70%), mérsékelten súlyos (20-30%) és súlyos, életveszélyes állapotot előidéző forma (5-10%), mely halálozási rátája 30% körül mozog. (Mosztbacher és mtsai., 2020; Abu-El-Haija és mtsai., 2018; Hritz és mtsai., 2015)

A globális egészségügyi adatelemzéssel is foglalkozó IHME (Institute for Health Metrics and Evaluation – healthdata.org) adatai alapján 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. Területi eloszlását tekintve a betegségnek jellemzően a jobb szocio-gazdasági státuszú országokban nagyobb az incidenciája (2019-ben 53 eset/100.000 fő, mely több mint kétszerese a fejletlenebb országokban tapasztaltaknak) illetve a betegség etiológiája is eltér az alacsonyabb és a magasabb jövedelmű országokban. Míg az előbbinél az alkohol a leggyakoribb kiváltó ok, addig az utóbbinál az epekő. Ugyanez az incidencia-arány és oki különbség figyelhető meg a középkorú és az idősebb korosztály, illetve a férfiak és a

nők tekintetében is. (Roberts és mtsai., 2017; Yadav és mtsai., 2013; Gullo és mtsai., 2002; vizhub.healthdata.org) Az USA-ban 60-70, az Európai Unióban 40-45, Magyarországon 60-65 eset/100.000 fő/év között alakult az elmúlt húsz évben tapasztalható incidencia mértéke. (vizhub.healthdata.org)

Bár a gyógyszerek használatát a hasnyálmirigy-gyulladásban általában túlzásba viszik, (Párniczky és mtsai., 2019; Demcsák és mtsai., 2020), a betegség kezelési lehetőségei korlátozottak. A terápia fő pillére az intravénás folyadék és tápanyagellátással biztosított szigorú diéta általi nyugalomba helyezés (Hritz és mtsai., 2015). Megjegyzendő viszont, hogy a súlyos állapotú betegek esetében az ellenőrzött enterális táplálás csökkenti a szövődmények kialakulásának esélyét a betegség korai szakaszában (Márta és mtsai., 2016). Célzott, specifikus terápiák sajnos nem állnak rendelkezésre, mindannak ellenére, hogy a tudomány kiterjedt erőfeszítésekkel próbálja azonosítani az „AP” megfelelő molekuláris célpontjait. Habár a preklinikai vizsgálatok számos új kezelési lehetőségként használható vegyületet azonosítottak, azonban ezeknek a klinikumba történő átültetése többnyire nem hozott eredményt. Az AP preklinikai modelljeiben megfigyelt, hatásos terápiák közé tartoznak többek között a NSAID-ok (pl. indometacin, diclofenac) (Patai és mtsai., 2017), a pentoxifillin (Abdin és mtsai., 2010), a CM4620 kalciumcsatorna-gátló (Waldron és mtsai., 2019), a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) gátlók (Mota és mtsai., 2007), az antikoagulánsok (pl. antitrombin III) (Hagiwara és mtsai., 2009) a peptidhormonok (pl. szomatosztatin) (Wang és mtsai., 2016), a hemin (Aziz és mtsai., 2017), a neostigmin (Schneider és mtsai., 2014) az infliximab (Tekin és mtsai., 2015), illetve különböző növényi hatóanyagok (pl. rezveratrol) (Agah és mtsai., 2021). Számos folyamatban lévő klinikai vizsgálat célja annak meghatározása, hogy ezen új terápiás megközelítések közül melyeket lehet hatékonyan átültetni a klinikumba. (Abu-El-Haija és mtsai., 2018; Moggia és mtsai., 2017)

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*, vagy *Spilanthes acmella*) is melynek virágát, leveleit és szárát az Amazonas-medencétől Indiáig enyhe fájdalomcsillapító hatása miatt fogfájás, szájgyulladás, ínygyulladás és torokfájás kezelésére rágják. Ezenkívül a növényt fertőtlenítő,

vizelethajtó, parazita- és vírusellenes szerként, valamint sebgyógyítás céljából is használják (Prachayasittikul és mtsai., 2013; Dubey és mtsai., 2013). A növény fő gyógyhatású vegyülete a spilantol (SLT), mely többek között gyulladásgátló, fájdalomcsökkentő hatással is rendelkezik. (Gerbino és mtsai., 2016; Savic és mtsai., 2021)

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. (Gašić és mtsai., 2020) A polifenolok egyik alcsoportja, a flavonoidok több tagjának akut gyulladásos folyamatokban mutatott potenciális védőhatását is igazolták már. Ilyen vegyület például a luteolin (Aziz és mtsai., 2018; Xiong és mtsai., 2017), a fisetin (Ren és mtsai., 2020), a naringenin (Hernández-Aquino és mtsai., 2018), a heszperidin (Köksoy és mtsai., 2013) és a genisztein (Siriviriyakul és mtsai., 2020). A tricetin (TCT) többféle növényben is megtalálható flavonoid, amely több kutatás szerint antikarcinogén (Chies és mtsai., 2017; Hsu és mtsai., 2009), gyulladáscsökkentő (Cai és mtsai., 2020) és antidiabetikus (Wang és mtsai., 2019) 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 egérmodelljében illetve egy lokális gyulladás, a bőr kontakt hiperszenzitivitásának vizsgálatában (*in vivo*) végeztük el.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

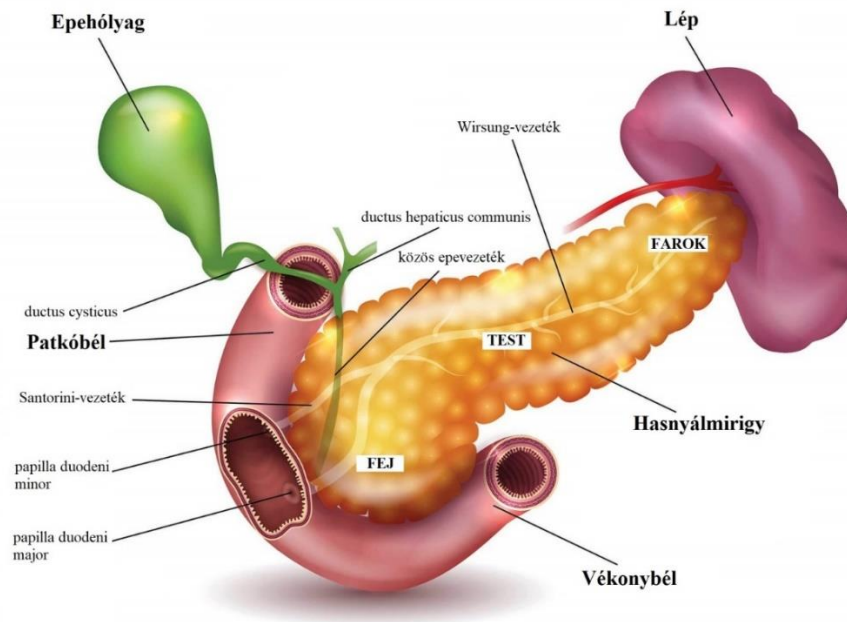
II.1. A hasnyálmirigy

A hasnyálmirigy vagy pankreász a hasüreg felső részében, az L1-es és L2-es csigolyák magasságában, a gyomor mögött haránt elhelyezkedő, retroperitoneálisan fekvő, mirigyes szerv, melynek súlya egy felnőtt férfinak nagyjából 100 gramm, hossza pedig 14-23 cm. A szerv egyfelől a gasztrointesztinális rendszer része, amely emésztőenzimeket állít elő és választ ki a bélbe, valamint endokrin mirigyként is funkcionál, amely hormonokat termel és választ ki a vérbe, ami által szabályozza az energia anyagcserét és -tárolást az egész szervezetben. (Longnecker, 2021)

II.1.1. A szerv anatómiája és fejlődéstana

A hasnyálmirigyet az irodalom három, funkcionálisan nem elkülöníthető részre tagolja, melyek a fej, a test és a farok. (1. ábra) A széles, feji rész (*caput pancreatis*) kötőszövetesen összenőtt a patkóbéllel, melynek homorulatában fekszik. A szerv a fejet elhagyva a *vena cava inferior* és az *aorta abdominalis* előtt elhelyezkedő, egyre vékonyuló testi részben (*corpus pancreatis*) folytatódik, ami ezután észrevehető különbség nélkül végződik a keskeny farokban (*cauda pancreatis*), mely eléri a lépkaput. A *processus uncinatus* a szerv feji részéről eredő és balra, a patkóbél kanyarulatát követve haladó nyúlványa, melynek eredetét a feji résztől egy *incisura pancreatis* nevű bevágás jelzi. A hasnyálmirigy ventro-dorzális irányban lapított szerv, ennek okán elülső és hátsó felszínét különböztethetjük meg. A mirigy körül vékony kötőszövetes réteg képez egyfajta tokot, melyből szeptumok nyomulnak be a szervbe, azt kisebb, szabálytalan lebenyekre osztva. A hasnyálmirigy teljes hosszában (a test középtáján, de a hátsó felszínhez közelebb) végighúzódik a *ductus pancreaticus major*, vagy más néven Wirsung-vezeték, mely a szerv által termelt hasnyál fő gyűjtő és elvezető csatornája, ami a *papilla duodeni majornál* (Vater-papilla) szájadzik a duodenumba. Nem sokkal a szájadzás előtt a vezetékbe nyílik a májból és az epehólyagból érkező (a korábban a *ductus hepaticus communis* és a *ductus cysticus* összeömléséből kialakuló) közös epevezeték (*ductus biliaris communis* vagy *ductus choledochus*), így a két vezeték tartalma együtt, az *ampulla hepatopancreaticaban* egyesülve ürül a patkóbélbe. Az ampullát körbevevő *Oddi sphincter* egyrészt szabályozza az ampulla tartalmának ürülését, továbbá megakadályozza a béltartalom visszafolyását a vezetékekbe. Egyéni variációként ritkán, de előfordul, hogy a közös epevezeték külön bélbeszájadzással rendelkezik, aminek az élettani jelentőségére a későbbiekben még kitérek. Szintén egyéni variációként jelenhet meg (viszont az előbbinél

gyakrabban), hogy a hasnyálmirigy vezetékrendszere egy alternatív bélbeszájazzással is rendelkezik a Vater-papilla mellett, attól a gyomor irányában. Az alternatív szájadzást *papilla duodeni minor*nak, az odavezető csatornát pedig, mely a Wirsung-vezetékbe ágazik le, *ductus pancreaticus minor*nek, *ductus pancreaticus accessorius*nak vagy Santorini-vezetéknek nevezzük. Az alteráció fejlődéstani okokra vezethető vissza (lásd később). (Longnecker, 2021; Pin és mtsai., 2020; Szentágothai és mtsai., 2002; Michael és mtsai., 2007)

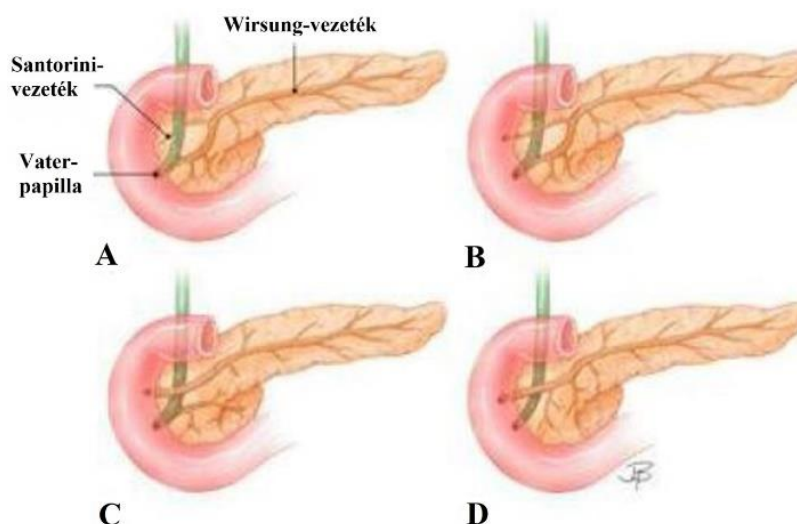


1. ábra: A hasnyálmirigy főbb részei

Forrás: <https://www.hopkinsmedicine.org>, 2022. december (magyarított ábra)

A hasnyálmirigy endodermális eredetű szerv, mely a primitív előbélből alakul ki, az ott található ventrális és dorzális, azaz elülső és hátsó pankreásztelepek egyesülésével. Az előbél ventrális divertikulumából ered a közös epevezeték, az epehólyag, a máj és az elülső hasnyálmirigytelep, amely később csatornarendszerével együtt a szerv fejének egy részévé válik beleértve a *processus uncinatus* is. A hátsó hasnyálmirigytelep a hasnyálmirigy farkát, testét és fejének egy részét adja, beleértve a három területen keresztül haladó gyűjtőcsatornát is. A két telep, a fejlődésük során összeolvad (gyűjtőcsatornáikat is beleértve), mégpedig úgy, hogy a ventrális rész vezetéke és bélbeszájazzása adja a kialakuló Wirsung-vezeték disztális szakaszát. A dorzális telep csatornájának disztális szakasza ezután vagy funkcióvesztés miatt eltűnik, vagy a már korábban említett Santorini-vezeték néven marad meg saját bélbeszájazzással, vagy anélkül. A két pankreásztelep egyesülésében megjelenő defektusok következtében kialakuló alterációkat *pancras divisum*oknak (PD) nevezik, mely kifejezés

számos, eltérő jelentőségű anatómiai variációt foglal magába, melyek a kivezetés nélküli mellékág-formálódásától akár a *papilla duodeni majoron* keresztüli ürülés teljes megszűnéséig terjedhetnek (2. ábra). A PD a társadalom nagyjából 10%-át érinti és a jelenséget rizikótényezőként tartják számon az idiopátiás, az ERCP komplikációjaként fellépő és a visszatérő hasnyálmirigy-gyulladás etiológiájában. Mindazonáltal megjegyzendő, hogy az említett ábra „D” paneljén látható *divisum*, amelynél a hasnyál csupán a Santorini-vezetéken keresztül ürül, mentesül az epekő általi elzáródás okozta akut gyulladás kialakulásától. (Pin és mtsai., 2020; Gonoi és mtsai., 2011; Moffatt és mtsai., 2011)



2. ábra: A leggyakoribb hasnyálmirigy divisumok

A: A Wirsung-vezetékből eredő, beszájadzás nélküli Santorini-vezeték, **B:** A Wirsung-vezetékből eredő, beszájadzással rendelkező Santorini-vezeték, **C:** A két pankreásztelep vezetékrendszere nem egyesült, így a fő elvezető rendszer nem a Vater-papillán keresztül ürül, **D:** Az első pankreásztelep vezetékrendszere hiányzik, így Vater-papillán keresztül nem ürül hasnyál.

Forrás: Longnecker, Daniel S. 2021. Anatomy and Histology of the Pancreas

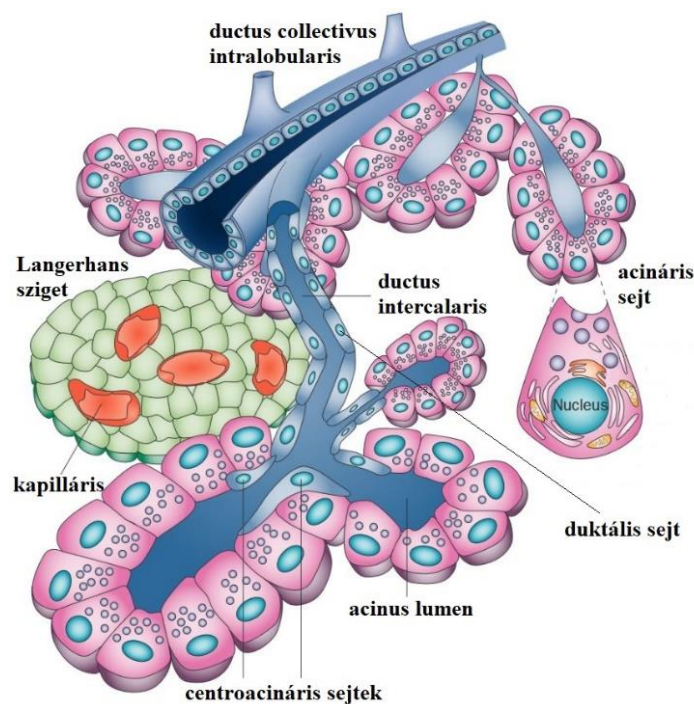
II.1.2. A hasnyálmirigy szövettana

A humán gesztáció 26. napja körül az előbél multipotens pankreász progenitor sejtjei két kitüremkedés (első és hátsó pankreásztelepek) létrehozásába kezdenek, melyekben azok később differenciálódnak endokrin-, acináris-, és dukális progenitor sejtekké. Az **endokrin pankreász** a szervben belül elkülönült, többségében amorf gömb alakú, ún. Langerhans-szigetekbe (3. ábra) tömörülve működik. A szigetekben öt sejtípust különíthetünk el, melyek

közül három típus a cukorháztartásban szerepet játszó, sokszor emlegetett hormonokat termel (**alfa-sejtek**: glükagon, **béta-sejtek**: inzulin, **delta-sejtek**: szomatosztatin), míg a **gamma-sejtek** (nevezik őket pankreász polipeptid- illetve F-sejteknek is) polipeptideket termelnek, melyek a visszafogják epeszekréciót és a bélmozgást, továbbá az exokrin szervrészen az emésztőenzimek és a bikarbonácion szekrécióját is gátolják. A legkisebb számban előforduló sejttípus, az **epszilon-sejtek**, a ghrelin nevű peptidhormont szintetizálják, melynek fő funkciója az éhségérzet kiváltása és az energia zsírsavak és glikogén formájában történő raktározásának serkentése. (Ezen utóbbi sejtek a gyomor és a nyombél falában nagyobb számban találhatóak meg.) A Langerhans-szigetek vérellátása után, az onnan kilépő, nagy efferens kapillárisok az acinusokat körbevevő kisebb kapilláris hálózatra bomlanak, lehetőséget teremtve ezzel az exokrin állomány endokrin szekrétumok általi szabályozásának. A hormonok közül az inzulin és a ghrelin serkenti, a glükagon, a szomatosztatin és a pankreász polipeptid pedig gátolja az exokrin szekréciót. (Longnecker, 2021, Pandol 2015; Michael és mtsai., 2007)

Az **exokrin pankreász** két meghatározó sejttípusa a szőlőfürtszerűen elhelyezkedő acinusokba tömörült acináris sejtek (vagy acinussejtek) és azok szekrétumait gyűjtő, illetve elvezető csatornákat (duktuszokat) alkotó duktális sejtek (3. ábra). A **centroacináris sejtek** (vagy centoracinussejtek) az acinusok lumenében elhelyezkedő, duktális sejtekhez hasonlatos sejtek. Az **acináris sejtek** hematoxilín-eozinnal festett metszeteken típusosan festődő, jellemzően kúp alakú sejtek, melyeknek bazális része a nagy mennyiségű RNS-től erősen bazofil, apikális felük pedig a nagy mennyiségű, fehérje tartalmú zimogén granulumtól eozinofil. A gyűjtővezetéseket határoló **duktális sejtek** a centroacinussejtek folytatásaként megjelenő, lapított, tipikus laphámsejt kinézetű, komplex iontranszport-hálózattal rendelkező sejtek. Az emésztőenzimek patkóbélbe juttatásáért felelős vezetékrendszer kialakításának feladata mellett nagy mennyiségű nátrium- és bikarbonácion-tartalmú folyadékot szekretálnak a csatornák lumenébe, mely a hasnyál viszkozitásának és optimális pH tartományának beállításáért felel. Ennek révén hozzájárulnak az emésztőenzimek idő előtti aktiválódásának megakadályozásához. A sejtek duktális felszínén, a fejlett transzportrendszer működésének megfelelő méretű területet adó, nagyszámú mikrovillus található. Az acinusok területéről kilépő csatornák, a *ductus intercalarisok* rövid időn belül a *ductus collectivus intralobularisokban* futnak össze, melyek a lebenyek területéről gyűjtik a szekretált hasnyálat (3. ábra). E csatornák komplex, elágazó hálózata később az alacsony hengerhám által bélelt *ductus interlobularisokon* keresztül a *ductus pancreaticus majorba* (illetve a PD állapotól és

az adott interlobuláris vezeték helyzetétől függően a *ductus pancreaticus minor*ba) fut, mely fő vezeték (fő vezetékek) a patkóbél lumenébe juttatja (juttatják) a hasnyálat. Az exokrin hasnyálmirigynek van egy jellegzetes, negyedik sejttípusa is, melyek speciális kötőszöveti sejtekként működnek, a *hasnyálmirigy csillagsejtek* (PSC – „*pancreatic stellate cells*”). A szervben megtalálható extracelluláris mátrix számos komponensét szekretálják, káros túlműködésüket pedig számos faktor aktiválhatja: gyulladásos mediátorok, daganatos sejtekből származó faktorok, endotoxinok, illetve az alkohol és annak metabolitjai. Az aktivált PSC-k fibroblasztként működnek, így hozzájárulnak a krónikus pankreatitisz elhúzódásához és a hasnyálmirigy duktális adenokarcinómájához társuló fibrózishoz. (Longnecker, 2021; Pandol, 2015; Mekapogu és mtsai., 2020; Michael és mtsai., 2007)



3. ábra: *A hasnyálmirigy szövetének főbb képletei*

Forrás: Logsdon és Ji, 2013.

II.1.3. Az exokrin hasnyálmirigy funkcionális működése

Az acinussejtek az emésztőenzimek szintetizálására, tárolására és szekretálására specializálódtak, kiterjedt endoplazmatikus retikulummal (ER) rendelkező sejtek. A megtermelt enzimek a citoplazma zimogén granulumaiban tárolódnak, és innen szekretálódnak az acinusok lumenébe. A szekréciót hormonok és neurotranszmitterek szabályozzák. Az acináris sejtek több fehérjét termelnek, mint az emberi test bármelyik másik sejttípusa. Az ehhez szükséges, fejlett endoplazmatikus retikulum rendszer nemcsak fehérjék termelését és érését biztosítja, hanem kalciumraktárként is szolgál, melyből az felszabadulva

másodlagos hírvivőként szabályozza az acinusok lumenébe történő stimulált exocitózist. Az ER-ben történő fehérjeérést kedvezőtlenül befolyásolhatják többek között olyan környezeti tényezők, mint az alkohol, a dohányzás, a megváltozott anyagcsere és különböző gyógyszerek. A ductális sejtekben ezzel szemben nagy mennyiségű mitokondrium található, melyek a sejtek által végzett, jelentős iontranszporthoz szükséges megnövekedett energiaigényt hivatottak fedezni. (Pandol, 2015)

II.1.3.1. Az acinussejtek funkcionális működése

A hasnyálmirigy acináris sejtjei egy izotóniás, nátrium-kloridban gazdag, az emésztőenzimeket tartalmazó folyadékot választanak ki. A termelt emésztőenzimek négy fő csoportba oszthatóak: fehérjék (proteolitikus), szénhidrátok (amilolitikus), zsírok (lipolitikus) és nukleinsavak (nukleolitikus) lebontásáért felelős enzimek. Ezen enzimek egy része enzimatis aktivitással nem rendelkező pro-enzim formában szintetizálódik és tárolódik granulumokban, a sejtek apikális oldalán. Ez az egyik védelmi mechanizmus, ami óvja az acinussejteket az emésztőenzimek hatásától. Emellett az enzimeknek a savas közegű zimogén szemcsékben történő tárolása és a szemcsék tripszinaktivitást gátló anyagai (pl. az SPINK1 fehérje – lásd később) is hozzájárulnak az enzimek idő előtti aktiválódásának elmaradásához és ezáltal a sejtek védelméhez. A patkóbélbe jutott emésztőenzimek aktiválása a bélhám felszínén történik, ahol az enterociták által termelt enterokináz nevű glikoprotein peptidáz eltávolítja a tripszinogén N-terminális hexapeptid fragmentumát, ami így az enzimatisz aktív tripszinné válik, ami ezután kaszkádszerűen aktiválja a többi inaktív enzimet is. (Pandol, 2015; Chen, 2021)

Termelődésük során az emésztőenzimek végighaladnak a fehérjeszintézis és -érés lépésein az ER-ből kiindulva, majd a Golgi-készülékből klatrin-mediált lefűződés útján az éretlen szekretoros granulumokba csomagolódnak, melyek érése során kondenzált szekréción szemcsékké, zimogén granulumokká fejlődnek, és a szekréción tárolják az enzimeket. Az érett zimogén szemcsék a szekréción szignálok hatására, a citoszkeleton (aktin, dinein, miozin) közreműködésével megérkeznek az apikális sejtmembránhoz, ahol a SNARE-fűgű („soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptor proteins”) membránfűzión megtörténik. (Cooley és mtsai., 2020; Sans, 2021; Chen, 2021)

A zimogén granulumokban tárolt emésztőenzimek szekréción a granulumok membránjának a sejtmembránnal történő összefűződésén, majd a beolvadás következtében a

granulum tartalmának a lumenbe történő kilökődésén keresztül megy végbe. A folyamatot több neurohumorális ágens is szabályozza, melyek közül a két legfontosabb az acetil-kolin (ACh – „*acetylcholine*”) és a kolecisztokinin (CCK – „*cholecystokinin*”). Ezeken kívül megemlítendő még a gasztrint felszabadító peptid (GRP – „*gastrin releasing peptide*”), a vazóaktív intesztinális peptid (VIP) és a szekretin is. Mindegyik a saját receptorán keresztül hat, megnövelve az intracelluláris kalcium vagy cAMP/cGMP (ciklikus adenzin/guanin monofoszfát) szintet, melyeken keresztül serkentik az emésztőenzimek termelődését és szekrécióját. A ligandok bekötődése a G-protein kötött receptoraikhoz vagy inozitol-1,4,5-triszfoszfát (IP₃) képződését eredményezi, mely az ER és a mitokondriumok receptorain hatva kalcium kiáramlást indukál a citoszolba, vagy pedig aktiválja a cikláz enzimeket, melyek ATP-t vagy GTP-t alakítanak cAMP-vé vagy cGMP-vé, amely másodlagos hírvivők stimulálják többek között a protein kináz A-t, ami az exocitotikus szabályozó fehérjék foszforilációjával beindítja az exocitózist. (Pandol, 2015; Cooley és mtsai., 2020; Sans, 2021; Williams, 2010; Chnadra és mtsai., 2020; Yule, 2012; Albers és mtsai., 2020)

II.1.3.2. A duktális sejtek funkcionális működése

Az emberi hasnyálmirigy naponta 1-2 liter, emésztőenzimeket tartalmazó hasnyálat termel, mely egy bikarbonát (HCO₃⁻) ion alapú puffer rendszer. A puffer fontos feladata, hogy inaktívan tartsa az emésztőenzimeket, hogy azok csak a vékonybélbe kerülés után aktiválódjanak. Ezen felül a gyomortartalom savas kémhatását is a hasnyál semlegesíti a patkóbélben. A hasnyálmirigy csatornáinak duktális sejtei választják ki a hasnyál víz és iontartalmát (nátrium, kálium, klorid és bikarbonát ionok). Az iontermelés folyamatát két fő hormon, az acinusoknál is nagy szerepet játszó kolecisztokinin és a szekretin, illetve az acetilkolin neurotranszmitter szabályozza. Az intracelluláris térben a beérkező szignálok hatására az acinussejtekhez hasonlóan a duktális sejtekben is cAMP és kalcium által közvetített jelátvitel zajlik le. A sejtekben a nagy mennyiségű bikarbonátió két forrásból halmozódik fel, mielőtt a duktális lumenbe pumpálódna. Az egyik a vérből történő közvetlen felvétel, mely nátriumionnal történő kotranszport útján megy végbe. A másik lehetőség, hogy a vérből felvett vizet és szén-dioxidot felhasználva a sejt maga állítja elő a bikarbonátió a szénsav-anhidráz enzimek segítségével. Ezután a sejtben felhalmozott kloridion ellenében történő antiporttal vagy az ATP függő CFTR (cisztikus fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor) egységen keresztül kerül a duktális lumenbe, mely segítségével kloridion is jut ki a sejtől. (Lee és mtsai., 2020; Venglovecz és mtsai., 2021; Pallagi és mtsai., 2015; Ishiguro és mtsai., 2012; Hart és mtsai., 2021)

II.1.3.3. A hasnyál termelésének szabályozása

A hasnyál szekréciója az étkezésre adott válaszként három (+1) főbb, egymást átfedő fázisban zajlik. Az egyes fázisokat a bevitt táplálék aktuális helye alapján (testen kívül-szájban, gyomorban, bélben) lehet elkülöníteni. A fázisokhoz visszacsatolós szabályozás társul, ezáltal biztosítva a megfelelő, de nem túlzott enzim- és bikarbonát szekréciót. Az egyes fázisokat neurális, humorális és parakrin visszacsatolási mechanizmusok összetett hálózata szabályozza, amelyek segítenek fenntartani a táplálék emésztéséhez és felszívódásához szükséges optimális környezetet. (Chandra, 2014)

Az **első fázisban** látás, szaglás, ízlelés és rágás ingerek is beindítják a hasnyál termelődését. A teljes szekréció nagyjából 20-25%-a ebben a szakaszban történik meg. Az ekkor keletkezett hasnyál enzimekben gazdag, de alacsony bikarbonát tartalmú, ami arra utal, hogy az acinussejtek hamarabb/könnyebben stimulálódhatnak. A **második fázist** a táplálék gyomorba érkezése indítja be. Ehhez a szakaszhoz a teljes szekréció csupán mintegy 10%-a köthető. Az előző fázishoz hasonlóan itt is kisebb mértékű a duktális szekréció. Mind a két fázis fő szabályozója a bolygóideg dorzális ága, így az acetilkolin a szekréció aktiválásáért felelős fő ágens (a muszkarin M3 receptorokon keresztül). (Anagnostides és mtsai., 1984; Becker és mtsai., 1988; Cargill, 1979; Chandra és mtsai., 2014; Babic és mtsai., 2016)

A **harmadik fázisban** történik a hasnyál termelésének nagy része (50-70%), melyben már a bikarbonát is nagyobb mennyiségben szekretálódik, a szabályozás folyamatában pedig a bolygóideg mellett megjelennek a CCK (enteroendokrin I-sejtek termelik) és a szekretin (enteroendokrin S-sejtek termelik) hormonok is. Az előbbi az acinussejteken (CCK1 receptorokon), illetve a központi idegrendszerben (CCK2 receptorokon serkentve a bolygóidegi folyamatokat), az utóbbi pedig a duktális sejteken fejti ki fő hatását. A szekretin termelés beindításának és így a bikarbonát szekréció serkentésének is a gyomorsav bélbe történő megérkezése a fő stresszora (Bilski és mtsai., 1992). A CCK termelését és így a zimogén szekréció serkentését pedig a patkóbélbe érkező zsírsavak aktiválják (Meyer és mtsai., 1974). A duodenumba érkező fehérjék és aminosavak (Solomon, 1984) egyaránt serkentik mind a zimogén, mind pedig a bikarbonát szekréciót. (Dale és mtsai., 1989; Alcón és mtsai., 1996; Baća és mtsai., 1983; Chandra és mtsai., 2020)

Megemlítendő még egy **negyedik fázis** is, amikor a már felszívódott tápanyagok képesek serkenteni a hasnyál szekrécióját közvetlenül a sejteken, vagy a már leírt humorális, vagy idegi útvonalakon. (Konturek és mtsai., 1979; Chandra és mtsai., 2020)

A hasnyál termelésének fő negatív regulátorai a patkóbélben megjelenő hasnyál proteázai, melyek az enteroendokrin sejtek által termelt proteázérzékeny, CCK-felszabadító faktoron keresztül képesek visszajelzést adni a hasnyálmirigynek. Ha a szabad proteázok lekötik a faktort, a CCK termelése visszaszorul, és csökken a zimogén szekréció. Ha viszont a bélben nincs szabad proteáz, a faktor serkenti a CCK kiválasztást, ami hat a zimogén szekrécióra. (Liddle, 1995) A hormonális gátlást tekintve többek között a már korábban említett Langerhans-szigetsejtek által termelt hormonok (az inzulint és a ghrelint kivéve) is negatívan befolyásolják az exokrin szekréciót. (Chandra és mtsai., 2020)

II.2. Az exokrin hasnyálmirigy megbetegedései

A szerv kettős funkcionalitásából adódóan betegségei is két nagyobb csoportra oszthatóak; az endokrin és az exokrin szervrészeket érintőekre. Minthogy témám az exokrin hasnyálmirigy egyik fő betegségével foglalkozik, az endokrin szövetállomány megbetegedéseinek taglalása nem képezi a dolgozat tárgyát. Ebből kifolyólag ehelyütt csupán említés szintjén szólnék többek között az egyes és kettes típusú diabéteszről, melyek a cukorháztartás zavarait okozzák a csökkent inzulinszekréció, illetve az inzulinhatás célsejteken bekövetkező elmaradása okán. (Sapra és mtsai., 2021) Továbbá megemlítendő, hogy a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás talaján kialakulhat az úgynevezett IIIc típusú, azaz pankreatogenikus cukorbetegség is. (Hart és mtsai., 2016)

II.2.1. Az akut hasnyálmirigy-gyulladás

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, lokális gyulladást hozva létre. (Aghani és mtsai., 2014)

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. Az epe visszaáramlás szerepére utal az a megfigyelés is, hogy azon anatómiai variánsok fennállása esetén, melyekben az epevezeték nem közlekedik a fő hasnyálmirigy vezetékkel, az epekövesség nem társul AP-vel. (Venglovecz és mtsai., 2016; Lerch és mtsai., 2016) 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 autofágias mechanizmusokat érintő) metabolikus zavarok okozzák az enzimek sejten belüli aktivációját. Ezen felül az alkohol az acinusokból kiinduló, kis elvezető csatornák eltömődését, abnormális véráramlást, az *Oddi sphincter* működési zavarait és a kolecisztokinin, illetve a szekretin termelődésének zavarát okozhatja, mely folyamatok mind hozzájárulhatnak a gyulladás kialakulásához. (Lerch és mtsai., 2013; Aghani, 2014; Rasineni és mtsai., 2020; Yadav és mtsai., 2009; Lugea és mtsai., 2017; Samokhvalov és mtsai., 2015; Clemens és mtsai., 2014)

A fenti két fő tényezőn kívül a hasnyálmirigy akut gyulladásának előidézésében szerepet játszhat még az emelkedett trigliceridszint a kalcium háztartás zavarán és a mitokondriumok diszfunkcióján keresztül (Criddle, 2015). Továbbá a dohányzás (Yuhara és mtsai., 2014), gyógyszerek és drogok (Badalov és mtsai., 2007), különféle fertőzések, például mumpsz, vagy hepatitisz (Werge és mtsai., 2016), az invazív műtéti és diagnosztikai beavatkozások (van Baal és mtsai., 2012; Tryliskyy és mtsai., 2018), illetve egyéb okok miatt pl. az *Oddi sphincter* zavarai, anatómiai alterációk is előidézhetik a hasnyálmirigy akut gyulladását (van Brumelen és mtsai., 2003).

A betegség kialakulásában szerepet játszó tényezők közül, az említetteken kívül nem hagyhatók ki a genetikai okok sem. Leggyakrabban a PRSS1, a SPINK1, a CTRC és a CFTR gének mutációi találhatók meg az etiológiai faktorok sorában. A PRSS1 gén a tripszinogén termelésért felelős, és mutációi az enzim idő előtti aktivációját okozzák, még az acinussejteken belül. A SPINK1 gén egy inhibitor fehérjét kódol, mely a tripszin aktivációt gátolja, mutációja így elősegíti a tripszin korai aktiválódását. A CTRC gén a kimotripszin C nevű enzimet kódolja, mely képes degradálni a tripszinogént és tripszint, segítve így azok szabályozási mechanizmusát, így mutációja ezt a szabályozási folyamatot akadályozza. A CFTR gén a cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor nevű fehérjét kódolja, mely többek között a duktális sejtekben felelős a nátrium-, klorid- és bikarbonát iontranszport

működéséért. A gén mutációja következtében a csatorna működési hibája miatt a duktális rendszerben képződő hasnyál túl viszkózus és savas pH-jú lesz, ami a megfelelő elvezetést akadályozza. A gén mutációjakor kialakuló örökletes kórkép neve cisztás fibrózis, mely a hasnyálmirigyen kívül érinti egyebek mellett a tüdőt, és a mellékheréket is. (Raphael és mtsai., 2016)

II.2.1.1. Az akut hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásának molekuláris háttere

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 (lásd korábban) akadályozott, és a csatornában felgyülemlett emésztőenzimek aktivációja az elvezetés hiányában a szervben történik meg. Egy másik megközelítés felől (mely összefügg az alább közölt második és harmadik típusú elváltozással is) 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. (Lerch és mtsai., 2016)

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. (Maléth és mtsai., 2016; Venglovecz és mtsai., 2016)

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

NF κ B 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 granulomok kötődése az apikális citoskeletonhoz, és azok a bazális felszín felé kezdenek vándorolni, ahol az egyik membránfehérje protein kináz C általi foszforilációja lehetővé teszi a granulomok bazolaterális exocitózist az interstíciumba. (Gorelick és mtsai., 2009; Apte és mtsai., 2016; Wen és mtsai., 2016; Waldron és mtsai., 2015; Dixit és mtsai., 2016)

II.2.2. Krónikus hasnyálmirigy-gyulladás

A krónikus pankreatitist úgy definiálhatjuk, mint a szerv tartósan fennálló gyulladását, ami irreverzibilis morfológiai elváltozásokkal jár együtt, melynek során az exokrin és endokrin szövet egyaránt károsodást szenved. A betegség során a hasnyálmirigy atrofias, fibrotikus szervvé alakul át, kitágult csatornarendszerrel és változó fokú meszesedéssel. A betegség akut formájával ellentétben itt nem nekrozis és ödéma figyelhető meg, hanem nagy mennyiségű extracelluláris mátrix lerakódásával és erős fibroblaszt proliferációval járó, kiterjedt szöveti átalakulás, ami funkcióvesztést von maga után. A betegség kialakulásában feltehetőleg mind a három főbb exokrin sejttípus (acináris-, duktális- és csillagsejtek) defektusa szerepet játszik. A sejteket károsító behatások olyan citokinek és kemokinek felszabadulását indukálják a sejtekből, melyek elősegítik a csillagsejtek aktiválódását, beindítva ezzel a fibroblaszt proliferációt és az extracelluláris fehérjék (pl. fibronectin, kollagének, proteoglikánok) megemelkedett termelését. A betegség etiológiájában nagy szerepet játszik az alkohol, illetve a csatornarendszer eltömődése. Ezen felül az iszkémia, relapszáló akut hasnyálmirigy-gyulladás, a dohányzás, az oxidatív stressz, toxinok és autoimmun betegségek (pl. Sjögren szindróma). A genetikai okok közül többségében az akut hasnyálmirigy-gyulladás rizikótényezőiként is megjelenő mutációk említhetők meg (PRSS1 és 2, SPINK, CTFR, CFTR gének mutációi). (Kleeff és mtsai., 2017; Aghdassi, 2016; Brock és mtsai., 2013; Guda és mtsai., 2015; Hamada és mtsai., 2015; Mekapogu és mtsai., 2020)

II.2.3. Az exokrin hasnyálmirigy megbetegedéseinek diagnosztikai és kezelési lehetőségei

Az **akut hasnyálmirigy-gyulladás** jellemző tünetei magukban 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, retrográd kolangio-pankreatográfia –ERCP–) mellett egy vérvétellel is könnyen igazolható a betegség fennállása. Az akut pankreatitisz fő kezelési lehetősége a fájdalomcsillapítás mellett a hasnyálmirigy nyugalomba helyezése diétával, illetve antibiotikum profilaxis alkalmazása, de egyes esetekben műtéti beavatkozásra is szükség (pl. a duktális ürülést akadályozó epekő eltávolítása, vagy fertőzés esetén nekrektómia). (Aghani, 2014)

A **krónikus hasnyálmirigy-gyulladásnál** szintén hányingerrel, hányással, hasmenéssel kísért erős hasi fájdalom jelentkezik, mely a hátba sugárzik, és étkezések után súlyosbodik. A betegség során az emésztési folyamatok defektusa miatt súlyvesztés figyelhető meg, illetve az endokrin állomány károsodása miatt cukorbetegség is kialakulhat. Egyértelmű diagnózishoz a meszesedést és a duktális csatornatágulatokat értékelő képalkotó eljárásokat (CT, MRI), vagy endoszkópos ultrasonográfiát alkalmaznak. Ezen felül az ERCP, illetve a hasnyálminta elemzés is alkalmazható a diagnózis felállításához. A betegség kezelése itt is a fájdalomcsillapításra, illetve a kiváltó okok megszüntetésére összpontosít. Az étkezések során a szervezetbe vitt emésztőenzimek alkalmazása sikerrel csökkenti a kórral járó fájdalmat. A meszesedés során a csatornában kialakult hasnyálmirigy-kövek endoszkópiával eltávolíthatóak, továbbá az esetleges csatornaszűkületek sztentelése is javíthat a beteg állapotán. Végszükség esetén pedig a disztális, vagy teljes pankreatektómia során távolítják el az érintett területet vagy az egész hasnyálmirigyet. (Aghani, 2015)

II.3. Az akut hasnyálmirigy-gyulladás vizsgálati modellrendszerei

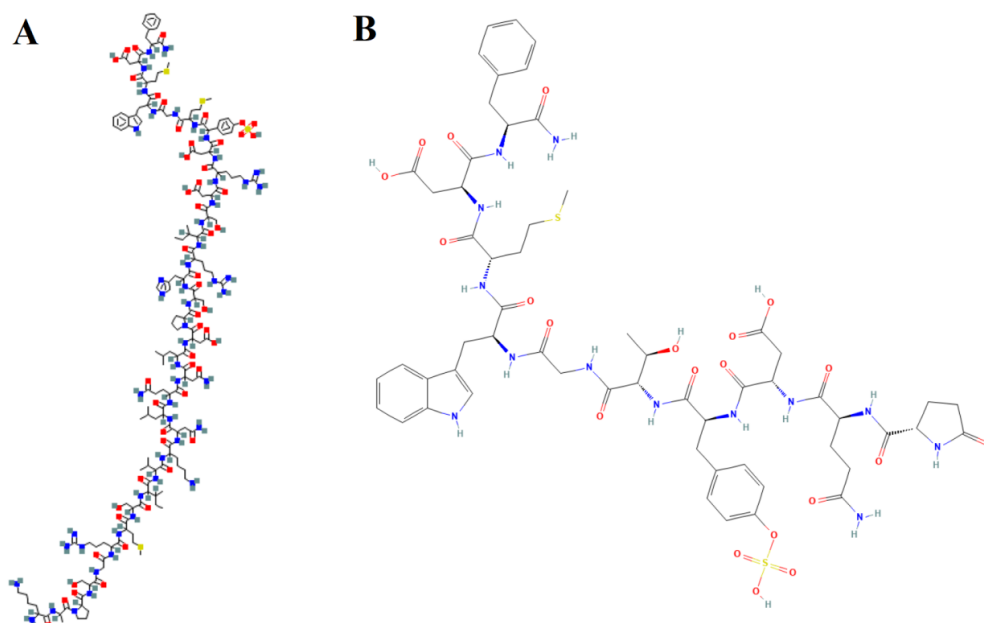
II.3.1. *In vitro* modellek

A hasnyálmirigy akut gyulladásának *in vitro* modellezési lehetőségei között megemlítendő az immortalizált sejtvonallal (pl. AR42J – *patkány acináris sejtvonal* és 266-6 – *egér acináris sejtvonal*) történő vizsgálatok végzése, illetve az élő állatból izolált primer sejtek (acináris és duktális egyaránt) használata a kísérletek során. A sejtvonalak előnye, hogy sokáig fenntarthatóak, de fenotípusosan nem egyeznek meg az izolált sejtekkel. Az AR42J sejtek nem differenciált sejtek, melyeket dexametazon kezeléssel lehet fenotípusos acinussejteké érlelni, a 266-6 sejtekkel ellentétben, amelyek már részlegesen differenciált fenotípussal rendelkeznek. 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-három nap után duktális átalakulásba kezdenek. (Mareninova és mtsai., 2015)

További *in vitro* lehetőségek között szerepel a háromdimenziós organoidképzés, élő állatból vett hasnyálmirigy daganatsejtek felhasználásával, illetve egész lobulusok preparátumának pár óráig történő fenntartása és vizsgálata, továbbá a hasnyálmirigy szövetéből egy kb. 100 μm vastag szelet metszése és egy-két nap erejéig történő fenntartása, melynél az élő szövetbe juttatott, melegített agaróz gél szilárdulása teremti meg a vágás lehetőségét. Ezen műveletek nagy előnye, hogy a különböző típusú sejtek interakcióját igénylő vizsgálatokat is végezhetünk. (Mareninova és mtsai., 2015)

A sejteket a különböző vizsgálatok során legtöbbször epesavakkal (taurokolát, taurokenodezoxikolát), zsírsavakkal, alkohollal (illetve annak acetaldehid, vagy zsírsav-etilészter metabolitjaival) és szekretagókkal kezelik (pl. CCK, szekretin, VIP). Az utóbbi csoportból kiemelném a cerulein nevű oligopeptidet (4. ábra), ami az összetett emésztőrendszeri hatásokkal rendelkezőolecisztokinin (4. ábra) mesterséges analógja, gyakorlatilag a hormon receptorhoz kötődő része, kisebb módosításokkal. A CCK fiziológiás mennyiségének megfelelő koncentrációban (pM) a cerulein a CCK-val analóg módon serkenti a zimogén szekréciót az acináris sejtekben, szupramaximális dózisban adva (10-100 nM) viszont akut gyulladás-szerű választ generál a sejtekben (sejten belüli emésztőenzim-aktiváció, NF κ B aktiváció, vakuólum képződés) és indukálja a sejtpusztulást. (Chandra és mtsai., 2018; Mareninova és mtsai., 2015)



4. ábra: *A kolecisztokinin (A) és a cerulein (B) szerkezete*

Forrás: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, 2022. október

II.3.2. *In vivo* modellek

Az élőben történő hasnyálmirigy vizsgálatokra főként rágszálókat használnak, leginkább egereket vagy patkányokat. Az alkalmazott modelleket invazív és nem invazív csoportokba lehet rendszerezni. A nem invazív modellek közé tartozik a szekretagóg analógokkal (cerulein, karbakol – 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. A karbakol modell esetében egy egyszeri 25-250 µg/ttkg szertartalmú i.p. oltás használatos. Különböző aminosavak nagy mennyiségben történő i.p. oltása szintén indukálja az akut gyulladást. Az L-arginin esetében 2,5-5 g/ttkg, L-ornitinnál 1,5-3 g/ttkg, L-lizin esetében pedig 1-2 g/ttkg erős AP-t indukál. Szintén nem invazív modell a CDE (choline-deficient, ethionine-supplemented) diéta, ami kolin csökkentett és 0,5 m/m% etionint tartalmazó diétát jelent. A diéta 2-3 nap leforgása alatt kiváltja az akut hasnyálmirigy-gyulladást. Az ad libitum hozzáférés a táplálékhoz viszont 4-5 nap alatt halálos kimenetelű, ezért egerek esetében 3 g/nap-ban kell maximalizálni a táp adagját. (Hegyí és mtsai., 2013)

Az invazív eljárások közé tartozik a retrográd duktális infúzió, melynek során a Vater-papillán keresztül a hasnyálmirigy vezetékrendszerébe epesav oldatot juttatunk. 3-5 m/v%-os Na-taurokolát esetében 1 ml/ttkg mennyiségben alkalmazzuk az oldatot, ügyelve arra, hogy a bejuttatott oldat ne feszítse szét a vezetékrendszer falát (kb. 0,1 ml/perc sebességgel adva).

Ritkábban alkalmazott eljárás a biliopankreatikus csatorna ligálása és a hasnyálszekréció stimulálásának együttes alkalmazása, mely patkányokban és oposszumokban szintén akut gyulladást generál. (Hegyi és mtsai., 2013)

Vizsgálataink során az izolált acinussejtek és az egerek *in vivo* kezelése alkalmával is a pankreatitisz ceruleinrel kiváltott modelljét alkalmaztuk.

II.4. Gyulladásos mediátorok pancreatitisben

A szervezet káros hatások elleni védekező mechanizmusainak fontos elemei a gyulladásos folyamatok, melyek során testünk felszámolja a kiváltó okokat, továbbá eliminálja a sérült sejteket, szöveteket, hogy elkezdődhessen a gyógyulás folyamata. Mindemellett a gyulladásban részt vevő ágensek a környező ép sejteket is károsíthatják. Sokszor maga a túlzott gyulladás lép fel súlyos betegségek induktoraként. A folyamat során a megnövekedett permeabilitású érfalon keresztül a sérült területre jutó leukocyták és mediátorok hozzájárulnak a gyulladás már az ókorban is ismert öt jellemzőjéhez: emelkedett hőmérséklet (*calor*), vörös szín (*rubor*), duzzanat (*tumor*), fájdalom (*dolor*) és funkcióvesztés (*functio laesia*). (Stanley és mtsai., 2019.)

Molekuláris folyamatokat tekintve a gyulladás számos mediátora (Cavaillon, 2001) közül kiemelendő az IL1 β (NF κ B útvonalon keresztül), az IL6 (Jak/STAT útvonalon keresztül) (Dmitrieva és mtsai., 2016) és a gyulladásos jelátviteli folyamatok széles spektrumában résztvevő tumornekrózis faktor alfa (TNF α) (Zelová és mtsai., 2013). Az anti-inflammatorikus citokinek közül az IL10 (Iyer és mtsai., 2012) emelendő ki, mely a gyulladások visszaszorításában játszik szerepet a gyulladásos mediátorok termelődésének gátlása által. A transzformáló növekedési faktor béta 3 (TGF β 3) (Kubiczkova és mtsai., 2012; Stolfi és mtsai., 2020; Lutgens és mtsai., 2002), illetve az interferon gamma (IFN γ) (Zhang és mtsai., 2007) pedig kettős hatásuk révén a sejtek állapotától függő módon segíthetik és gátolhatják is a gyulladásos folyamatokat.

Kemokinek közül a főként T-sejtek és monocyták által termelt kemokin C-C motívum ligand 5 (CCL5) a foszfatidilinozitol 3 kinázon (PI3K) és a protein kináz B-n (PKB, Akt) keresztül járul hozzá a gyulladás folyamatához (Marques és mtsai., 2013; Zeng és mtsai., 2022). A szintén gyulladást támogató kemokin C-X-C motívum ligand 10 (CXCL10) főként

az IFN γ hatására termelődik többek között monocitákban (Booth és mtsai., 2002; Luster és mtsai., 1985).

A mátrix metalloproteinázok (MMP) a gyulladás során egyrészt segítik a fehérvérsejtek kilépését az erekből a szövetekbe, másfelől pedig az ECM komponensek bontásával, illetve többek között az IL1 β és a TNF α aktivitásának növelésével hozzájárulnak súlyosabb gyulladások kialakulásához (Cui és mtsai., 2017). Több kutatás során vizsgálták már az MMP2 zselatináz szerepét a hasnyálmirigy-gyulladás folyamataiban (Kurzepa és mtsai., 2014; Bísaro és mtsai., 2005).

II.5. Antioxidáns mechanizmusok

A sejteket külső és belső forrásból egyaránt folyamatosan bombázó szabadgyökökről, illetve egyéb, nagy reaktivitású vegyületekre (pl. H₂O₂) sokáig csak negatív hatású anyagokként tekintettek, de valójában több molekuláris folyamatban is fontos mediátorok (pl. jelátvitel, proliferáció, autofágia, mikroorganizmusok elleni védekezés). Mindazonáltal nagy mennyiségben történő termelődésük mindenképp káros következményekkel jár. Átfedő kategóriaként sokszor használják együtt a ROS (reaktív oxigén származékok/spieces) elnevezéssel. A ROS nagy reaktivitású oxigéntartalmú vegyületeket takar, melyek nem feltétlen szabadgyökök, a szabadgyökök pedig nem feltétlen tartalmazznak oxigént így kiegészítő fogalmakként helyes a használatuk, de a két fogalom nem egymás helyettesítője. Ezen vegyületek egyik leggyakrabban emlegetett negatív hatása a DNS károsító képességük. Éppen ezért a sejtek komplex mechanizmusokkal rendelkeznek annak érdekében, hogy a keletkező, illetve a környezetből érkező nagy reaktivitású vegyületek mennyiségét kordában tartsák, a felesleget pedig minél hatékonyabban eliminálják. Eme a folyamatok két alapra (enzimek és kismolekulájú antioxidáns vegyületek) épülő rendszerét értjük az antioxidáns mechanizmusok alatt. A résztvevő enzimek között megtalálhatjuk pl. a katalázt, a mieloperoxidázt, vagy a szuperoxid dizmutázt. Az ilyen hatású, nem enzim molekulák képesek elektronátadással megszüntetni az oxidáns hatásért felelős elektron párosítatlan állapotát anélkül, hogy ők maguk szabadgyökké válnának. Ilyen molekula többek között a C-vitamin (aszcorbinsav), E-vitamin (α -tokoferol), a karotinoidok és a később részletesen bemutatásra kerülő flavonoidok több képviselője is. Az említett nagy reaktivitású vegyületek káros hatásainak kivédése érdekében tett elimináló lépések mellett, a sejtek természetesen nagy energiát fektetnek túlzott képződésük elkerülésébe (alternatív reakció utak, kelátképzés),

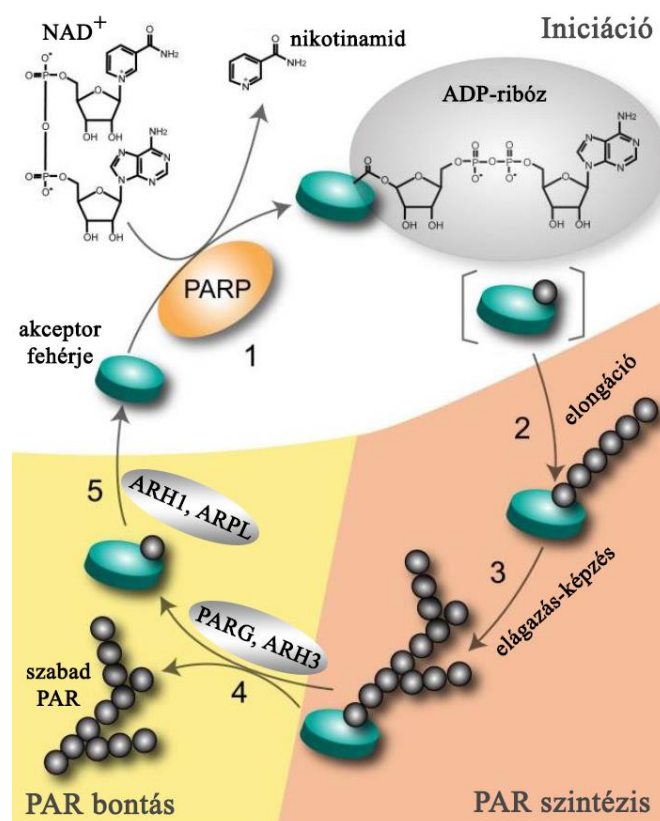
illetve értelemszerűen a bekövetkezett károsodások kijavításába is (hősokk fehérjék, DNS javító enzimek). (Gulcin, 2020; Elias és mtsai., 2008)

A szóbanforgó vegyületek között különleges helyet foglal el a nitrogén-monoxid (NO), mivel egyben kiemelten fontos neurotranszmitter és jelátviteli molekula is, melynek termeléséért a nitrogén-oxid-szintáz (NOS) enzimek felelősek. Hatásai között fellelhető a fehérjék poszttranszlációs módosításai (nitroziláció, nitrozálás), guanilát-cikláz aktiváció (cGMP – protein kináz G), nagy mennyiségben pedig apoptózist indukálhat. Más molekulákkal reagálva RNSz (reaktív nitrogén származékok) vegyületeket képezhet, például peroxinitritet a szuperoxid anionnal történő reakció során. (Nakamura és mtsai., 2016)

Az enzimatis antioxiáns útvonalakat tanulmányozva egy központi regulátor transzkripciós faktort találhatunk, az Nrf2-t (az angol „nuclear factor E2-related factor 2” kifejezésből), ami a megfelelő káros ingerek hatására felszabadul a citoszolikus KEAP1 nevű gátló fehérjéhez kötött állapotából, majd transzlokálódik a magba, ahol számos antioxiáns és méregtelenítő hatású enzim génjéről (pl. glutation termelést elősegítő, detoxifikáló, NADPH regeneráló, hem és vas metabolizmust elősegítő fehérjék génjei) indukál transzkripciót. (Tonelli és mtsai., 2018)

II.6. Poli-ADP-riboziláció

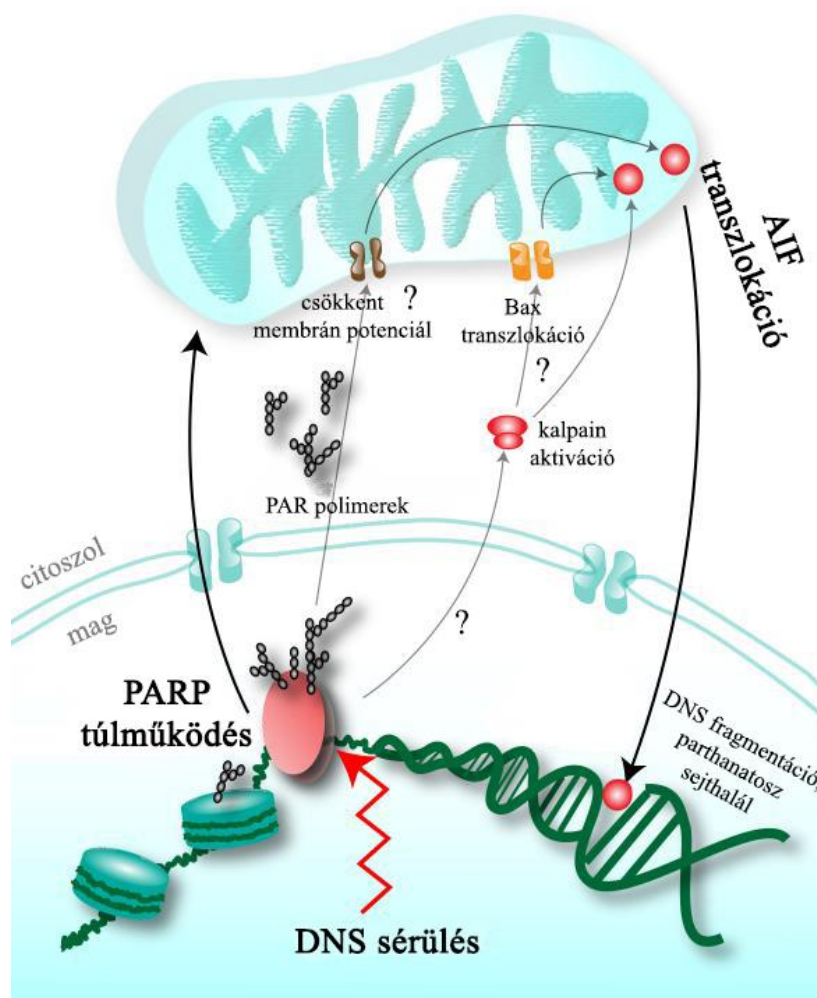
A DNS épségének a megvédése kulcsfontosságú az organizmusok számára. Ahogyan az az előző fejezetben is említésre került, a DNS folyamatos intrinszik és extrinszik inzultusoknak van kitéve, melyek olykor komoly sérülésekhez és így sejthalálhoz is vezethetnek. A DNS törések érzékelésében a 17 tagú poli-ADP-ribóz polimeráz (PARP) enzimcsalád „alapító” tagja, a 116 kDa méretű, 6 doménből álló PARP-1 fehérje fontos szerepet játszik. (Virág és mtsai., 2002)



5. ábra: A poli ADP-ribóz polimeráz enzimek működése

Forrás: David és mtsai., 2009. (magyarított ábra)

Az enzim a NAD^+ (nikotinamid-adenin-dinukleotid) felhasználásával ADP-ribóz egységekből poli-ADP-ribóz (PAR) elágazó láncolatát polimerizálja az akceptor fehérjék (pl. hisztonok) arginin, aszpartát, glutamát, szerin vagy lizin oldalláncaira (5. ábra). A fehérjék PARilációja a sérülés helyét megjelölve biztosítja a hibajavításban részt vevő enzimek DNS-hez történő hozzáférését, illetve azok kihorgonyzását. A polimereket később a PARG [poli(ADP-ribóz) glikohidroláz] és az ARH3 (ADP-ribozil hidroláz 3) enzimek bontják le, a fehérjéken maradt utolsó ADP-ribóz egységet pedig az ARH1 és az ARPL (ADP-ribozil protein liáz) hasítják le. A folyamat szabályozása főként a PARP1 gátló hatású autoparilációja által megy végbe, de több enzim is módosítani tudja a PARP aktivitását (pl. a SIRT1, ami deacetilálással inaktíválja az enzimet). (Virág és mtsai., 2009; David és mtsai., 2009; Min és mtsai., 2020)



6. ábra: *A parthanatosz sejthalál folyamata*

Forrás: David és mtsai., 2009 (magyarított ábra)

A PARiláció folyamata tehát segíti a DNS-t ért károsodások kijavítását, ugyanakkor a folyamat „túlpörgése” (pl. nagy intenzitású károsodás esetén) sejthalált indukálhat. A keletkező nagyszámú PAR polimer kijuthat a sejtmagból a citoszolba, ahol az apoptózis indukáló faktor (AIF) mitokondriumokból a sejtmagba történő transzlokációját indukálja, ami a DNS fragmentációját idézi elő. A folyamat még részletesen fel nem térképezett eseményei közé tartozik a kaspain (egy cisztein proteáz) aktiválódása és a Bax (Bcl-2 asszociált X fehérje) transzlokációja a mitokondriumba, mely események szerepet játszhatnak az AIF felszabadulásában. A PAR láncok citoszolikus megjelenése által indukált sejthalált parthanatosznak (PAR + Thanatosz, görög halálisten) nevezik (6. ábra). (Virág és mtsai., 2009; David és mtsai., 2009; Min és mtsai., 2020) A leírtakon felül, mivel az apoptózis energiaigényes folyamat, így a nagyfokú sérülések esetén létrejövő magas szintű PARiláció

során a NAD^+ elhasználásának következtében kialakuló energiadepláció is hozzájárulhat a nekrosis kialakulásához.

A PARiláció fontosságát a gyulladásban, (Cuzzocrea 2005; Martínez-Morcillo és mtsai., 2021) így a hasnyálmirigy-gyulladás folyamatában is (Mota és mtsai., 2007; Ahmad és mtsai., 2020) már többen kutatták és bizonyították. Az enzim gátlásával megtakarított NAD^+ mennyisége és a citoszolba jutott PAR csökkenése mindenképp hozzájárul a gyulladásos folyamatok visszaszorításához, hiszen így a nekrotikus folyamatok helyett a gyulladással nem járó apoptózis kerülhet előtérbe. Ezen felül valószínűleg több pro-inflammatorikus mediátor expressziójának modulációja is kapcsolódik a gyulladás mértékének csökkentéséhez, hiszen az a tény is ismert, hogy a PARP enzimek kromatinlazító funkciójuk és NF κ B/AP1 koaktivátor funkcióik révén több, gyulladásban fontos gén expressziójához is hozzájárulnak. (Kim és mtsai., 2004; Oliver és mtsai., 1999)

II.7. Növények és növényi kivonatok a gyulladások kezelésében

Ismert, hogy a kiegyensúlyozott táplálékkösztetélt követő, feldolgozatlan, vagy megfelelően feldolgozott növényi élelmiszereket nagyobb mértékben magában foglaló étrendek bevitele a krónikus betegségek alacsonyabb kockázatával jár együtt. A növényi élelmiszerekben gazdag táplálkozási formák kulcsszerepet játszanak a betegségek megelőzésében az immunrendszer serkentésére és a gyulladásos reakciók visszafogására irányuló sokrétű hatásuk révén. (Raskin és mtsai., 2002; Rates, 2001) Az utóbbi években a növényi eredetű, természetes hatóanyagokkal történő kezelések iránti igény mindenki által jól megfigyelhetően megnőtt. Az *in silico* módszerek és a nagy áteresztőképességű szűrések széleskörű alkalmazása ellenére is a népi gyógyászat által használt hatóanyagok kutatása még mindig jelentős forrása az új gyógyszerjelölteknek. A növényi eredetű gyógyszerek növekvő népszerűsége, a dózisok csökkentése iránti igény, valamint a hatékonyság és biztonságosság javítását célzó, többcélú kezelési megközelítés legitimálja a természetben előforduló, kiegészítő gyulladáscsökkentő szerekként alkalmazható hatóanyagok keresését (pl. berberin, gyömbér, epigallokatechin, kapszaicin, resveratrol, kannabinoidok, kurkuminok és különböző növényi polifenolok). (Cavalcanti és mtsai., 2021; Li és mtsai., 2018; Lin és mtsai., 2019; Arunachalam és mtsai., 2021)

II.7.1. Növényi alkilamidok

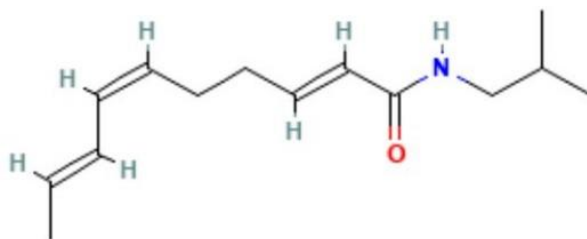
Az alkilamidok a bioaktív vegyületek egy csoportja, amelyek különböző növényekből is kinyerhetők. Az irántuk való érdeklődés az elmúlt években óriási mértékben megnőtt, ami az élelmiszerekben, kozmetikumokban és gyógyászatban felhasznált számos növénynek köszönhető. Általánosságban elmondható, hogy a növényi alkilamidok számos biológiai aktivitással rendelkeznek, amelyek között megemlíthetjük antitrombotikus, antimikrobiális, antivirális, antioxidáns, gyulladáscsökkentő, fájdalomcsillapító, daganatellenes és immunrendszer támogató hatásukat. A növényekből kinyert alkilamidok vagy zsírsavamidok általában lipofil molekulák, amelyek olyan savamid vegyületek, melyekben egy 8-18 szénatomból álló, telített vagy telítetlen zsírsavlánchoz kovalens kötéssel egy alifás, ciklikus vagy aromás amin vegyület kapcsolódik. (Elufioye és mtsai., 2020)

II.7.1.1. Spilantol

A bioaktív spilantol (7. ábra) a háromszorosan telítetlen dekánsav (2,6,8-dekatriénsav) és az izobutil amid savamidja, melyet affininnek is szokás nevezni (IUPAC név: (2E,6Z,8E)-N-(2-metilpropil)deka-2,6,8-triénamid). Molekulatömege 221,34 g/mol, toxicitása egerben mérve: LD₅₀ = 4378 mg/kg. Vízben rosszul oldódik, oldata szintelen (pubchem.ncbi).

Több tradicionálisan fűszerként és/vagy gyógynövényként is használt növényben megtalálható, mint például a napszemvirág (*Helopsis* fajok, pl. *H. longipes*) vagy az Ázsiában és Dél-Amerikában őshonos iskolavirág vagy ábécéfű (*Acmella* fajok, pl. *A. oleracea*). Mint a bevezetésben már említettem, a növényt fájdalomcsillapító hatása miatt, illetve fertőtlenítő, vizelethajtó, parazita- és vírusellenes szerként használják az alternatív népi gyógyászatban. (Savic és mtsai., 2021; Alan és mtsai., 2016; pubchem.ncbi)

Az irodalomban a spilantol különböző biológiai aktivitásainak széles spektrumát vizsgálták. Kimutatták gyulladásgátló (Wu és mtsai., 2008), antioxidáns (Abeyisiri és mtsai., 2013), antiproliferatív (Mishra és mtsai., 2015), érzéstelenítő (Chakraborty és mtsai., 2010) és fájdalomcsillapító hatását (Rios és mtsai., 2014). Ezen kívül serkentheti különböző gyógyszerek bőrön át történő felszívódását (De Spiegeleer és mtsai., 2013) és vazorelaxáns (Wongsawatkul és mtsai., 2008), diuretikus (Ratnasooriya és mtsai., 2004) és ráncatlanító hatásai is ismertek (Dermane és mtsai., 2009). A spilantol molekuláris szintű hatásait tekintve gátolja a P450 enzimeket (Rodeiro és mtsai., 2009), csökkenti a megemelkedett TNF α szintet (Dallazen és mtsai., 2018) és az NF κ B útvonal aktivációját (Mercurio és mtsai., 1999).

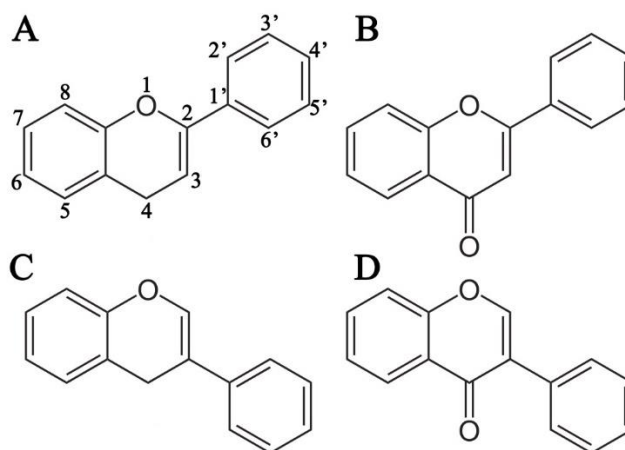


7. ábra: A spilanthol szerkezete

Forrás: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Spilanthol>, 2022. szeptember

II.7.2. Flavonoidok

A növények másodlagos anyagcseretermékeiként megjelenő polifenolok részt vesznek a pigmentációban, a szaporodásban és a kórokozók elleni védelemben is. A flavonoidok több, mint 8000 tagot számláló családja az emberi táplálkozásban legnagyobb mennyiségben jelen lévő polifenol-félék, melyek a 15 szénatomos 2-fenilkromán (illetve 3-fenilkromán), vagy más néven flaván (illetve izoflaván) gerincszerkezeten osztoznak meg. A váz szénatomjaihoz különböző funkciós csoportok kapcsolódásának variációi adják a vegyületcsalád tagjait. (Manach és mtsai., 2004) A vegyületcsalád nevét a tagjai többségének sárga színe után kapta (*flavus*=sárga). A flavonoidok szinte minden növényben jelen vannak, megoszlásukat tekintve mindegyik növényi részben megtalálhatóak. (Brouillard, 1988) Az emberi táplálkozás gyakori összetevői, többek között az olívaolaj, fekete és zöld teák, zöldségek és gyümölcsök fogyasztása által. Becslések szerint nagyjából 23 mg/nap az átlagos beviteli mennyiségük, melyben főként a flavonol és a flavonon osztályok tagjai jelennek meg. (Hertog és mtsai., 1993) Egyre több tanulmány támasztja alá azt a megfigyelést, miszerint a flavonoidokban gazdag táplálkozás a krónikus betegségekre való csökkent hajlammal társul. (Arts és mtsai., 2005) A molekulacsalád kilenc alcsoportot foglal magában, melyek közül ötben a flaván (izoflaván) váz 4-es pozícióban lévő szénatomjához egy oxo-csoport kapcsolódik, kialakítva így a flavon (izoflavon), azaz a 2-fenil-1,4 benzopiron (3-fenil-1,4 benzopiron) vázat. (8. ábra) Az apoláris gerincen történő hidroxiláció, metiláció, glikoziláció és szulfonáció szemi-poláris vegyületekké teszik a flavonoidokat. A vegyületcsoport aromás gyűrűi és fenolos hidroxilcsoportjai miatt a flavonoidok könnyen kimutatóak ultraibolya spektroszkópiával (UV) és tömegspektroszkópiával (MS). (Lei és mtsai., 2018; Cook és mtsai., 1996)



8. ábra: *A flaván (A), a flavon (B), az izoflaván (C), és az izoflavon (D) vázak szerkezete, saját munka*

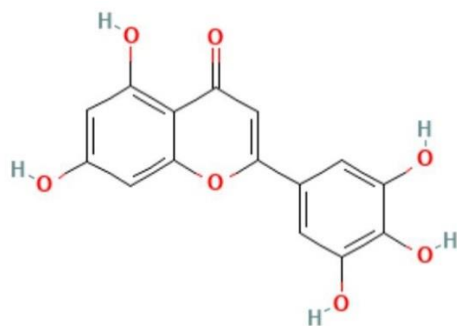
A legegyszerűbb felépítésű flavonoidok flavanolok, melyekben a flaván váz 3-as és/vagy 4-es szénatomjához hidroxil csoport kapcsolódik. Ilyen vegyület például a katechin. A flavonoidok második csoportja az antocianidinek, melyek alapváza a flavilium kation, melyben a flaván váz oxigénatomja pozitív töltéssel bír. Ilyen vegyületek többek között az aurantinidin és a delfinidin. A harmadik vegyületegyüttes a flavonok csoportja, melyben megjelenik a 4-es szénatomhoz kapcsolódó oxo-csoport (pl. apigenin, luteolin, tricetin). A következő csoport, a flavonolok az előző csoport hármas szénatomjához kapcsolt hidroxil funkciós csoportot tartalmaznak (pl. fisetin, miricetin, quercetin). Az ötödik csoportba tartoznak a dihydroflavonolok, melyekben a flavonolváz oxigént tartalmazó gyűrűjének aromás jellege megszűnik a 2-es és 3-as helyzetben lévő szénatomokhoz történő további hidrogénatomok bekapcsolódásával (taxifolin, fusztin). A hatodik csoport a flavanonok csoportja, melyekben szintén a váz 2-es és 3-as helyzetben lévő szénatomjaihoz kapcsolódnak további hidrogénatomok (megszüntette így a gyűrű aromás jellegét), de itt a flavonváz 3-as szénatomjához nem kapcsolódik hidroxil csoport (heszperidin, naringenin, szterubin). A hetedik csoport, a flavanonolok, melyekben a flavonolok mintájára a flavanonok vázában a hármas szénatomjához egy hidroxil csoport kapcsolódik (taxifolin, aromadetrin). A flavonoidok utolsó két csoportja az izoflavánok és az izoflavonok, melyekben a fenil csoport a hármas szénatomhoz kapcsolódik, a korábbi csoportok kettes szénatomú kapcsolódási pontja helyett. Az izoflavánokban a fenil csoport a flavánokhoz hasonlóan kromán vázhoz, míg az izoflavonokban a fenil csoport 1,4-benzopirán (kromon) vázhoz kapcsolódik. Ilyen vegyületek például az equol (izoflaván) és a genisztein (izoflavon). (Serafini és mtsai., 2010; Cook és mtsai., 1996).

A flavonoidok gyulladásgátló hatásának a háttérében valószínűleg a proinflammatorikus enzimek (pl. ciklooxygenáz-2, NO-szintáz) gátlása, az NF κ B gátlása, különböző citokinek (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-12) illetve a gyulladásos jelátvitelben szerepet játszó enzimek (pl. MAP-kináz, protein-kináz C, PI3 kináz/Akt) termelésének/aktivitásának gátlása áll. Daganatellenes hatásmechanizmusukat tekintve megemlítendő a proliferációt (protein kináz C, c-FOS, JNK, c-Jun/AP-1 gátló hatásuk révén) és inváziót (a VEGF receptor, MMP enzim és β -katenin fehérje gátlása útján) gátló, továbbá apoptózist indukáló (p53, citokróm C és kaszpáz-9 aktiváció) képességük. A flavonoid tartalmú étrenddel végzett humán vizsgálatok eredményei összességében viszont ellenmondásosak voltak, mivel a hatás nagyban függ a felszívódási mechanizmustól és a felszívódott hatóanyag mennyiségétől, illetve a metabolizmus gyorsaságától, s így attól, hogy milyen táplálékkal visszük be a szervezetbe a flavonoidokat, függ tehát azok biológiai hozzáférhetőségétől. Ezen felül felszívódáskor a flavonoidok könnyen metabolizálódnak a bélsejtekben, és glükuronid- és szulfátkonjugátumokat képeznek, melyek bioaktivitása eltér az eredeti molekuláétól. (Serafini és mtsai., 2010; Zeng és mtsai., 2019; Peluso és mtsai., 2015; Romagnolo és mtsai., 2012)

II.7.2.1. Tricetin

A tricetin (9. ábra) vagy más néven hieracin a flavonoidokon belül a flavonok al csoportjának tagja. A vegyületben a csoportot jellemző flavon gerinchez az 5-ös, 7-es és a 3'-s, 4'-s, 5'-s szénatomokhoz hidroxil csoportok kapcsolódnak (UIPAC név: 5,7-dihidroxi-2-(3,4,5-trihidroxifenil)kromén-4-on). Molekulatömege 302 g/mol, olvadáspontja 330°C, vízben 486 mg/l-ig sárga színnel oldódik. Jelenlétét leírták már többek között gabonákban (Zhou és mtsai., 2006), ginkófélekben, hüvelyesekben (Ren és mtsai., 2019), eukaliptuszokban (Chien és mtsai., 2017) és mirtuszfélékben (Campos és mtsai., 2002).

A tricetin flavonoidnak az irodalomban szélesebb körben leírt daganatellenes és áttétképzést gátló (Chang és mtsai., 2017; Chao és mtsai., 2015; Hung és mtsai., 2015) hatásai, továbbá anti-inflammatorikus (Sun és mtsai., 2019; Cai és mtsai., 2020; Geraets és mtsai., 2009) tulajdonságai mellett, bizonyított bioaktivitása van a neurotoxicitás (Kuppusamy és mtsai., 2017; Ren és mtsai., 2019), a cukorbetegség (Wang és mtsai., 2019; Ge és mtsai., 2018) és a bakteriális fertőzések (Pistelli és mtsai., 2009) modelljeiben.



9. ábra: A tricetin szerkezete

Forrás: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tricetin>, 2022. szeptember

III. CÉLKITŰZÉSEK

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

1. A tricetin esetében célul tűztük ki a szer életképességre és gyulladásos 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.

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

IV.1. 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 $\text{IFN}\gamma$ -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.

IV.1.1. Cerulein

A sejtek károsításához, illetve *in vivo* a szövet gyulladásának kiváltásához használt ceruleint a Medchem Express-től (Monmouth Junction, New Jersey, USA) szereztük be, melyet a sejtes és az állatkísérletes vizsgálatokhoz DMSO-ban oldva, törzsoldatként, fagyasztva tároltunk. A törzsoldatok koncentrációját úgy állítottuk be, hogy az *in vitro* kezelések során a végkoncentrációra történő hígításkor a törzsoldat legalább ezerszeresére híguljon. A törzsoldat koncentrációját állatkísérletek esetében úgy állítottuk be, hogy a végkoncentrációra történő hígításkor a munkaoldatban a DMSO mennyisége maximálisan 1 v/v% legyen, mely a korábbi kísérleteink alapján nincs hatással az állatokra.

IV.1.2. Spilantol, tricetin

A sejteken okozott károsodás mértékében, illetve *in vivo* a szöveti gyulladás folyamatában vizsgált növényi hatóanyagok közül a tricetint az Extrasynthese-től (Genay, Franciaország), a spilantolt pedig a ChromaDex-től (Los Angeles, Kalifornia, USA) szereztük be, melyeket a sejtes és az állatkísérletes vizsgálatokhoz szintén DMSO-ban oldva, törzsoldatként, fagyasztva tároltunk. A törzsoldatok koncentrációját az előző fejezetben leírt módon állítottuk be.

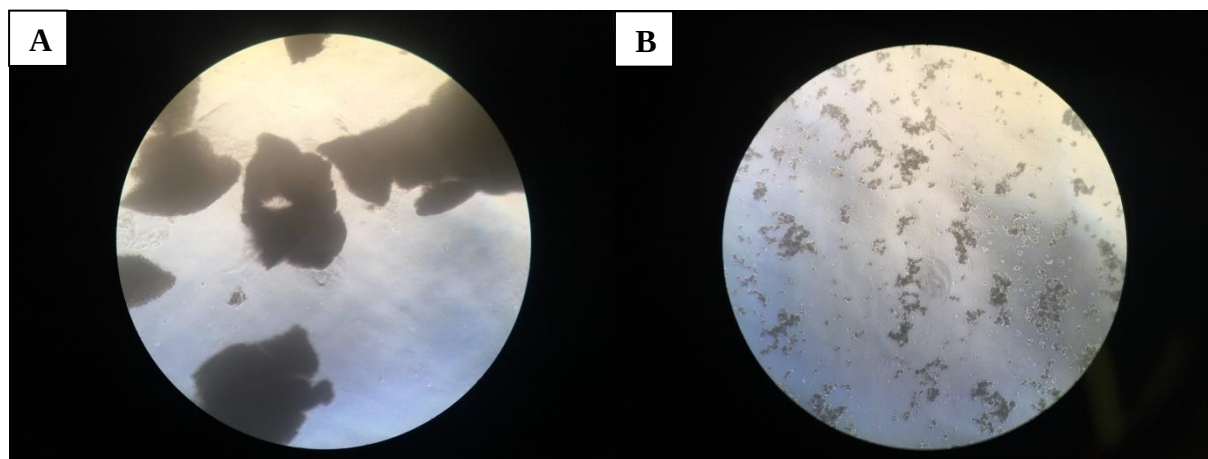
IV.2. Módszerek

A fejezetben bemutatott módszerek / kísérletek túlnyomó többségét a mű szerzője önállóan hajtotta végre. A IV.2.6.4.3. és IV.2.6.4.4. fejezetekben leírt „High Content Analysis” képkalkotási és képelemzési folyamatban a Szerző segítséget vett igénybe, melyek esetében a segítséget nyújtó személyek neve feltüntetésre került az adott fejezet végén. Ezen felül a Szerző a IV.2.6.9. fejezetben leírt metszetkészítési folyamatban is segítséget kért, mely esetében a személyek az adott fejezet végén szintén megjelölésre kerültek.

IV.2.1. Hasnyálmirigy acinussejtek izolálása és tenyésztése

A kísérletek során használt acinussejteket 8-10 hetes, hím és nőstény nemű, C57BL/6j törzsű egeremből, protokoll alapján izoláltuk (Gout és mtsai., 2013). 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°C-on, miközben a darabokat 10 ml-es szerológiai pipettával 5 percenként szuszpendáltuk. Emésztőoldatként 200 U/ml kollagenázt, 0,25 mg/ml tripszin inhibitort és 10 mM HEPES-t tartalmazó HBSS puffert használtunk. A folyamat végeztével a szövetdarabok mikroszkóp alatt jól megfigyelhető, maximum nagyjából 100-200 sejtes klaszterekre estek szét. (10. ábra) A sejteket ezután 5 v/v% FBS-t és 10 mM HEPES-t tartalmazó HBSS pufferrel négy alkalommal mostuk. A mosások között a sejteket 450 g-n centrifugáltuk. A mosás után a klasztereket 5 ml HBSS-ben vettük fel, és 100 µm-es szűrőn keresztül szűrtük azokat a nagyobb, nem megfelelően felemésztett klaszterek eliminálása érdekében, majd a szűrőt újabb 5 ml HBSS-sel átmostuk.

Az egerenként 10 ml-nyi, szűrt klaszterhalmazt ezután 5-5 ml-enként 5-5 ml, 80 mg/ml-es BSA oldaton keresztül 2 percig 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 sejtes klasztereket ezután HBSS-sel mostuk, majd 10 v/v% FBS, 1 v/v% antibiotikum (penicillin, streptomycin) és 25 ng/ml rhEGF tartalmú, magas glükóz koncentrációjú DMEM médiumban tenyésztettük. A sejteket az életképességi és a citotoxicitási esszékhöz 96 lyukú, az immuncitokémiához 24 lyukú, az NFκB esszéhez, az RT-qPCR-hez és a western blot-hoz pedig 6 lyukú sejttenyésztő edényben tenyésztettük. A sejtek edényekbe történő kirakása előtt az edények alját PBS-ben 100-szorozása kihígított laminin oldattal kezeltük (legalább 30 perc, 37°C), a sejtek kitapadását segítve ezzel elő. A laminin kezelés után a lyukakat PBS-sel két alkalommal mostuk, majd megszáritottuk azokat.



10. ábra: *Hasnyálmirigy szövet emésztése kollagenáz oldattal (250×-es nagyítás). Az emésztési folyamat elején (A) és az emésztési folyamat végén készült (B) képek.*

IV.2.2. *In vitro* kezelések

Az izolált sejteket kirakásuk másnapján kezeltük meg. A 3-10-30-100-300 μM koncentrációjú tricetin előkezelést (1 óra) alkalmaztunk a ceruleinnel, az LPS+IFN γ -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 essztét, amikor is 18 órán keresztül vizsgáltuk a kezelt sejteket. Az egy órás LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) + IFN γ (20 ng/ml) kezelést, illetve a szintén 1 órás PMA (1 μM) kezeléseket az NF κB 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.

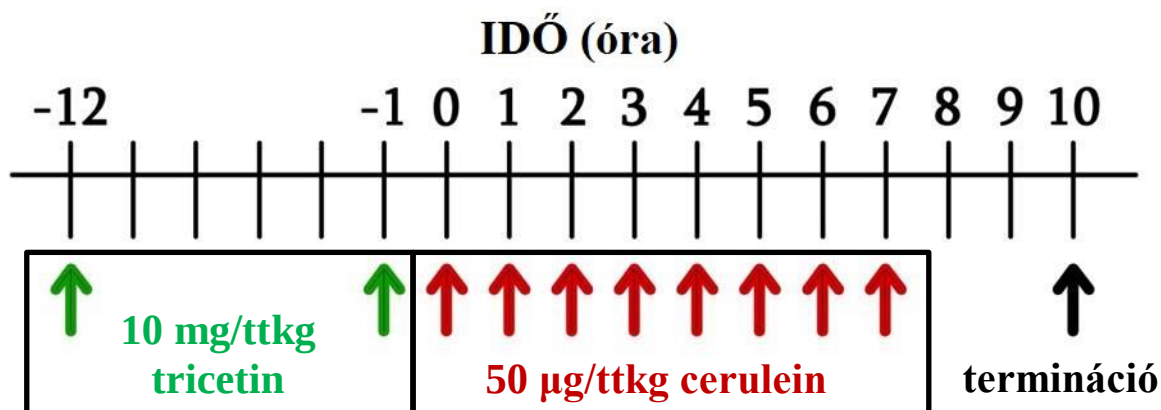
IV.2.3. Állatok (C57BL/6j, BALB/c) tartási körülményei

Az állatkísérletek elvégzését a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága jóváhagyta, mely szervezet a C57BL/6j egereken végzett hasnyálmirigy gyulladásos vizsgálatok tekintetében a 25/2017/DEMÁB számon, a BALB/c egereken végzett kontakt dermatitisz vizsgálatok tekintetében pedig a 15/2016/DEMÁB számon tartotta nyilván kísérletek elvégzésére vonatkozó engedélyt. Az állatokat szabályozott hőmérséklet (22-24°C), páratartalom (30-60%) és 12-12 órás nap-éj ciklus mellett, Eurostandard II-es típusú ketrecekben tartották a Debreceni Egyetem Élettudományi Központ állatházában. Az állatok víz és étel (VRF1 (P) táplálék) hozzáférése ad libitum történt. A vizsgálatok során az egerek rendre 10-12 hetes korukban kerültek felhasználásra.

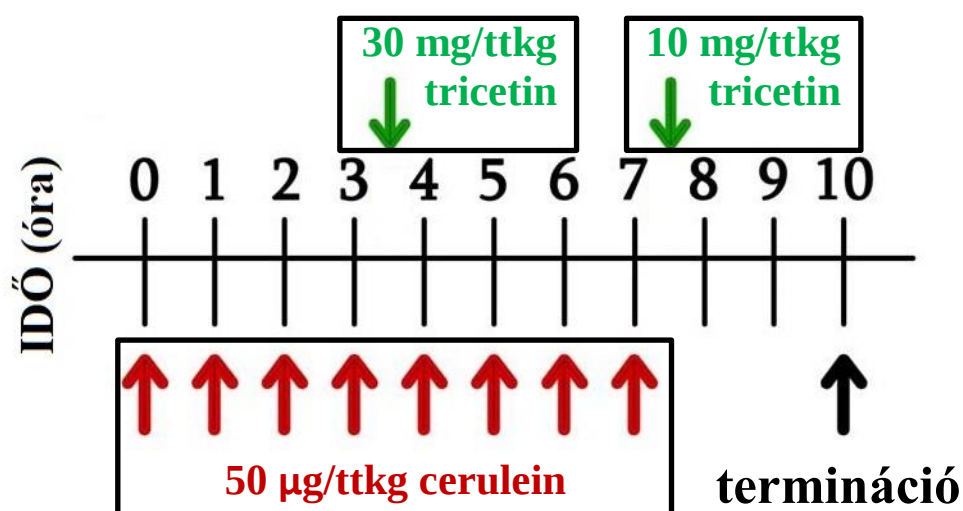
IV.2.4. *In vivo* kezelések és szövetfeldolgozás (pankreatitisz modell)

A hasnyálmirigy-gyulladást C57BL/6j törzsű egerekben fiziológiás sóoldatban oldott ceruleinnel (50 µg/ttkg) váltottuk ki. Kísérleteink során a vizsgált egereket (spilantol – 42 hím egér, tricetin – 18 hím egér) randomizálva 3 csoportba osztottuk: KTR – csak fiziológiás 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. (Malla és mtsai., 2016) A cerulein oltásban nem részesülő egerek azonos időben, megegyező DMSO tartalmú fiziológiás sóoldatot kaptak. A munkánk során a spilantol hatását csak előkezelés, a tricetint pedig elő és utókezelés formájában is vizsgáltuk. A tricetin vizsgálatánál, az előkezelés alkalmával kettő i. p. oltás során 10-10 mg/ttkg tricetint juttattunk be az egerek szervezetébe 12, illetve egy órával az első ceruleines oltás előtt (11. ábra). Az utókezelés alkalmával a tricetint 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 (12. ábra). A spilantol esetében 30 mg/ttkg szert jutattunk az egerekbe i. p. oltással, egy órával az első cerulein kezelés előtt (13. ábra). A növényi hatóanyag kezelésben nem részesülő állatok az oltásokkal egy időben megegyező DMSO tartalmú fiziológiás sóoldatot kaptak. Az állatoktól a spilantolt vizsgáló kísérlet során az első cerulein oltástól számított 24 óra elteltével, a tricetint vizsgáló kísérletek során pedig 10 óra leteltével vért vettünk, majd a kísérletek terminálását követően eltávolítottuk a hasnyálmirigyüket további vizsgálatok céljából.

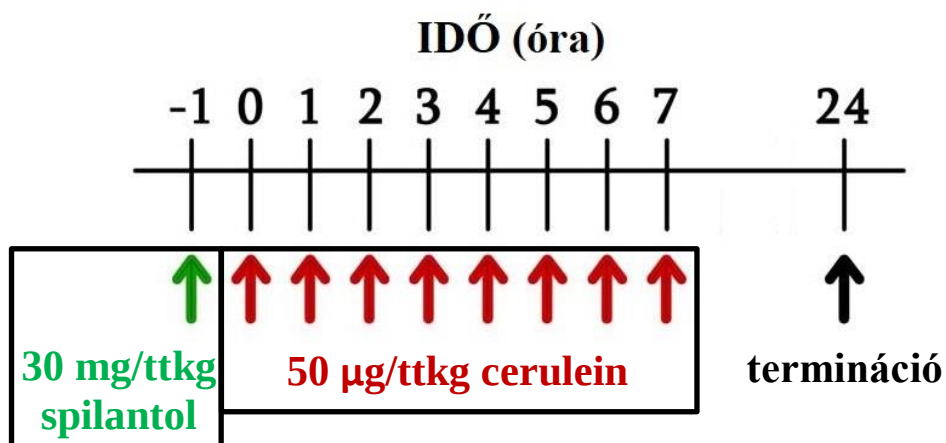
Az egerekből szívpunkcióval kinyert vért a megalvadás után 10 percig 5.000 g-n centrifugáltuk, majd a szérum frakciót lefagyasztottuk. A hasnyálmirigy szövet kinyerésekor a szövetet 3 részre vágtuk a szövettani mikroszkópos megfigyeléshez, a mieloperoxidáz enzim szöveti szintjének meghatározásához és az RT-qPCR vizsgálat lefolytatásához. A szövettanra szánt részt 10 v/v%-os formalinba 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.



11. ábra: A tricetint előkezelésben vizsgáló AP egérmodell kezelési sémája



12. ábra: A tricetint utókezelésben vizsgáló AP egérmodell kezelési sémája



13. ábra: A spilantolt vizsgáló AP egérmodell kezelési sémája

IV.2.5. *In vivo* kezelések és szövetfeldolgozás (fülgyulladás modell, spilantol esetében)

A BALB/c törzsű egrekben a kontakt fülgyulladást forbol-12-mirisztát-13-acetát (PMA) kezeléssel váltottuk ki. (Bai és mtsai., 2009) A kísérletek során a vizsgált állatokat (18 hím és 18 nőstény) randomizálva 3 csoportba osztottuk: KTR – csak DMSO-val kezelt egerek, PMA – 0,05 v/v%-os PMA kezelésben részesülő egerek és SLT+PMA – a PMA mellett 10 μ M 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 μ l/fül, mikropipettás felvitel, 10-10 μ l a fül mindkét oldalára). Hatvan perccel később a kontroll és a PMA csoportot DMSO-val, az SLT+PMA csoportot pedig 10 μ M spilantollal kezeltük (20 μ l/fül, mikropipettás felvitel, 10-10 μ l a fül mindkét oldalára). A spilantol-koncentráció kiválasztása a spilantol 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 exterminálásuk után szövettani- (HE festés) és MPO-vizsgálatok végett eltávolítottuk. A fülek szövettanra szánt részét 10 v/v%-os formalinba, az enzimvizsgálatra szánt részét pedig folyékony nitrogénbe helyeztük a hasnyálmirigy metszetekhez hasonlóan.

IV.2.6. Vizsgálati módszerek

IV.2.6.1. Gyökfogó hatás vizsgálata ABTS dekolorizációs módszerrel

Az ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonsav) esszét gyökfogó képesség vizsgálatára használtuk. A módszer alapja a kromogén ABTS szabadgyök, amely káliumperszulfáttal előállítható, egy éjszakán át tartó reakcióval [7,4 mM ABTS (Merck Millipore, USA, Massachusetts, Burlington) + 10 v/v% 24,5 mM K-perszulfát]. A vegyületek antioxidáns tulajdonsága az ABTS gyök oldatának intenzív zöld színének elszíntelenedéséből határozható meg. Az ABTS oldatot 50 mM Gly-HCl pufferrel úgy hígítottuk, hogy annak abszorbanciája A=1 legyen (1 cm fényút, 405 nm) Spark fotométerben mérve (Tecan Spark, Svájc, Männedorf). A tricetin mellett a vizsgálatban pozitív kontrollként C-vitamint használtunk. A tricetin és a C-vitamin harmadoló hígításait a hígított ABTS oldatot tartalmazó 96 lyukú lemezekre pipettáztuk. 30 perc inkubációs idő után 405 nm-en mértük az oldatok

abszorbanciáját, melynek csökkenéséből következtethetünk a vizsgált vegyületek gyökfogó képességére (a gyökfogási mechanizmus elszínteleníti a zöld oldatot).

IV.2.6.2. PARP inhibíciós 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 rendszerhez adott PARP gátló szerek gátolják a PARP aktivitását, így a szer hatásosságától függően kevesebb PAR lánc keletkezik, ami kisebb jelet fog generálni az esszé kiértékelésekor. A tricetin mellett az esszében 3-aminobenzamid (3-AB) PARP gátló szert használtunk pozitív kontrollként. Az esszé lyukaiba a két szer harmadoló hígítási sorát helyeztük el. A kísérletet a gyártó utasításai alapján végeztük.

IV.2.6.3. NFκB aktiváció mérése

Az NFκB transzkripció faktor aktiválódásának vizsgálatához az NFκB p65 Transzkripció Faktor Esszé Kitet (Abcam, Egyesült királyság, Cambridge) a gyártó utasításai alapján használtuk. 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 (Tecan Spark, Svájc, Männedorf) mértük az oldatok színintenzitását 450 nm-en.

IV.2.6.4. Sejtéletképesség és citotoxicitás meghatározása

IV.2.6.4.1. Kalcein esszé

A Kalcein-AM (Sigma–Aldrich Kft, Magyarország, Budapest) törzsoldatot (4 mM, DMSO-ban oldva) 1 μ M-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 40 percen keresztül tartó, 37°C-os inkubáció után a sejtek fluoreszcencia intenzitását 485/535 nm-es gerjesztési és detektálási hullámhosszpáron olvastuk le mikroplate olvasó segítségével. A sejtek életképessége a kontroll sejteknél kapott adatok százalékában lett kiszámolva és bemutatva.

IV.2.6.4.2. LDH esszé

A sejtek felülúszójának 50-50 μ l-ét egy másik 96 lyukú sejttenyésztő edénybe helyeztük, majd hozzá 50-50 μ l LDH reagens mixet (G-Biosciences, USA, Missouri, St. Louis) adtunk. Az esszé során pozitív kontrollként a 10 v/v%-os Triton-X vegyülettel lizált sejtek felülúszója szolgált. A lemezek 20 perces, szobahőmérsékleten történő inkubációja után a lyukakban található elegyek abszorbanciáját mikroplate olvasó segítségével határoztuk meg 490 nm-en. Az LDH felszabadulását a pozitív kontroll százalékában mutatom be.

IV.2.6.4.3. 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 μ g/ml propidium jodiddal (Sigma–Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) és 5 μ g/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 (Regdon és mtsai., 2021). A kiértékelés során a sejtklaszterekben található magokat a Hoechst342 által adott jel alapján detektáltuk, majd az így beazonosított magokban megvizsgáltuk a propidium-jodid által adott jelet, mely csak a nekrotizált sejtekben volt megfigyelhető. A nekrozist mutató sejtek arányát az összes vizsgált sejt százalékában adtuk meg. A kísérletben dr. Regdon Zsolt segítsége lett igénybe véve.

IV.2.6.4.4. Kaszpáz aktivitás mérése

Az izolált sejteket a cerulein kezelés elindítását követően 5 µg/ml Hoechst342 festékkel és 5 µM CellEvent Caspase-3/7 Green reagenssel kezeltük (Thermo Fisher Scientific, USA, Massachusetts, Waltham), melynek a sejtekben aktiválódott kaszpáz enzim általi háttér fluoreszcenciát eredményez. A sejtekben mutatózó kaszpáz enzim aktivitását a propidium-jodid esszé során is alkalmazott „HCA” eszközzel vizsgáltuk meg. A 3 óránként készült képek kiértékelése során a CellEvent reagensből eredő fluoreszcens intenzitás mértékét a Hoechst342 festék segítségével beazonosított sejtszámra korrigáltuk. A kísérletben dr. Hegedűs Csaba segítségével lett igénybe véve.

IV.2.6.5. Immunfluoreszcens festés és fluoreszcens mikroszkópia

A sejteket az izolálást követően lamininral bevont, 13 milliméter átmérőjű fedőlemez korongokra tettük ki, 24 lyukú sejtenyésző edényben. A sejteket 7,5 percig 250 µM H₂O₂ -dal kezeltük. A kezelés után a sejteket 20 percig fixáltuk -20°C-os metanolban, majd a PBS-es mosást követően 10 v/v%-os Triton-X (PBS-ben oldva) oldattal permeabilizáltuk azokat 20 percen keresztül. Az 1 v/v% BSA (PBS-ben oldva) felhasználásával történő egy órás blokkolás után a sejteket 10H hibridómából házilag előállított, egér monoklonális poli(ADP-ribóz) (PAR) specifikus antitesttel (IgG3 izotípus) egy éjszakán át, 3 µg/ml koncentrációval, 4°C-on kezeltük. Mosás után a sejteket Alexa633 festékkel konjugált kecske, anti-egér másodlagos antitesttel (1:1.000, 1 óra) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) és DAPI festékkel (5 µg/ml, 10 perc) kezeltük. Belső kontrollként elsődleges antitesttel nem kezelt lemezeket használtunk. A fedőlemezeket másnap SP8 Leica konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk meg a sejteket. A vizsgálat során a különböző korongok megfigyelése minden tekintetben azonos standard protokollt követve történt, a felvételek teljesen azonos beállítások mellett készültek korongonként legalább 25 látótérrel. A megfigyelhető PAR jel intenzitását ImageJ szoftver segítségével értékeltük ki.

IV.2.6.6. RNS izolálás, RT-qPCR

A vizsgálathoz az izolált sejteket 6 lyukú sejtenyésző edénybe helyeztük ki. Az egy órás 30 µM-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. Az izolált RNS tisztaságának ellenőrzése és az RNS tartalom megállapítása 260/280 nm-en mért abszorpció arány alapján történt. 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. A vizsgált gének expressziós mintázatának normalizálása az izolált sejtes és szöveti mintáknál is a 36B4 és az RPS26 referencia gének kiértékelése során kapott adatok harmonikus közepe alapján történt. A felhasznált primerek szekvenciáját az 1. táblázatban adjuk meg.

1. táblázat: Az RT-qPCR vizsgálatokhoz felhasznált primerszekvenciák

Gene	Forward primerek (5→3)	Reverse primerek (5→3)
IL1 β	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	GATCCACACTCTCCAGCTGCA
IL6	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
IL10	GGCGCTGTCATCGATTTCTC	ATGGCCTTGTAGACACTTTGG
TNF α	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
TGF β	CCGCAACAACGCCATCTATG	GTTCCACATGTTGCTCCACAC
IFN γ	GGAAGTGGCAAAAGGATGGTG	ATGTTGTTGCTGATGGCCTG
CCL5	TGCAGTCGTGTTTGTCCTC	AGAGCAAGCAATGACAGGGA
CXCL10	GATGACGGGCCAGTGAGAAT	CGTGGCAATGATCTCAACAC
MMP2	AACGGTCGGGAATACAGCAG	GTAAACAACGCTTCATGGGGG
36B4	GGACCCGAGAAGACCTCCTT	GCACATCACTCAGAATTCAATCC
RPS26	CCACAATTCAGACCTGCTG	GGGTAATTTTCCTTCCGTCCT

IV.2.6.7. SDS-PAGE és Western blot

A vizsgálathoz az izolált sejteket 6 lyukú sejtenyésző edénybe helyeztük ki. Az egy órás 30 μ M-os tricetin előkezelés, majd az azt követő 7,5 perces 250 μ M-os H₂O₂ kezelése után a sejtekben található teljes fehérje mennyiség lizálása történt meg. A fehérjéket 8 v/v%-os SDS-PAGE gélen 100 V-tal, 90 percen keresztül futtattuk. A fehérjéket ezután nitrocellulóz membránra transzferáltuk (100 V, 90 perc), majd a membránokat egy órán át PBST-ben oldott, 5 m/v% BSA-val blokkoltuk szobahőn. A blokkolás után a membránokat 4°C-on, egy éjszakán át a IV.2.6.5. bekezdésben leírt anti-PAR antitesttel kezeltük (3 μ g/ml) majd PBST-vel 3x10 percig mostuk. A mosás után HRP-vel konjugált nyúl anti-egér másodlagos antitesttel (1:1.000, 1 óra) és anti- β -aktin (1:20.000, 1 óra) antitesttel kezeltük a membránokat. Az újabb mosás után a membránok előhívása WestFemto kemilumineszcens

reagenssel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) történt, a Chemidoc Touch gél dokumentációs rendszert (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) használva. Az aktin által adott jelre normalizált denzitást az Image Lab software (BioRad) segítségével elemeztük ki.

IV.2.6.8. Szérum α -amiláz és lipáz esszé

A szérum α -amiláz és lipáz aktivitást a Diagnosticum Zrt. (Budapest) enzimatis esszé kitjét használva, kinetikus reakcióban, 20 percen keresztül mértük a gyártó utasításainak megfelelően, „Spark multimode microplate reader” készülékkel (Tecan, Männendorf, Svájc) 405 nm-en az α -amiláz esetében és 580 nm-en a lipáz esetében.

IV.2.6.9. 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 1 mL 20 mM foszfát pufferben (pH 7,4) homogenizáltuk, majd 13 000 g-nél 30 percig 4°C-on centrifugáltuk. Az így kapott pelletet 0,5 mL 50 mM foszfát pufferben (pH 6,0) reszuszpendáltuk, amely 0,5 m/v% hexadecil-trimetil-ammónium-bromidot (HTAB; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tartalmazott. A homogenizátumokat ezután újra lefagyasztottuk, majd felolvasztottuk (ezt háromszor megismételve a sejtalkotók további roncsolása végett) a pulzálva szonikálás előtt (20 kHz, 60 impulzus/perc, egy percen keresztül). A mintákat ezután centrifugáltuk (13.000 g, 30 perc, 4°C), és a felülúszókat összegyűjtöttük. Az összfehérje-koncentrációt Direct Detect Spectrometerrel (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) mértük. A felülúszók 100 μ L-jét megegyező térfogatú szubsztrátoldattal kevertük, amely 1,6 mM 3,3',5,5'-tetrametilbenzidint (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) és 1 mM hidrogén-peroxidot tartalmazott. Az elegyet 37 °C-on inkubáltuk 90 másodpercig, majd a reakciót 200 μ L 2 M kénsavval állítottuk le. Az abszorbanciát „platereaderrel” 450 nm-en mértük, majd az összfehérje-tartalomra normalizáltuk.

IV.2.6.10. Szöveti vizsgálat és TUNEL festés

A hasnyálmirigy szöveteket és fülmintákat, az izolálásuk után 48 órán keresztül 10 v/v%-os formalinban fixáltuk. A dehidratálást, beágyazást (paraffin), metszést (4 μ m) és a hematoxin-eozinnal történő festést a szöveti módszerekről szóló útmutató szerint végeztük. (Kiernan, 2015) A hasnyálmirigy metszetekben megfigyelhető apoptotikus sejtek jelölésére használt TUNEL esszét (TUNEL Assay Kit - HRP-DAB, Abcam, Cambridge,

Egyesült Királyság) gyártó utasításai alapján végeztük el. Az esszé során a metszetekhez adott deoxinukleotidil transzferáz a fragmentálódott DNS egységek 3'-OH végéhez biotinált deoxinukleotidokat köt. Később a metszetekhez adott, HRP-vel konjugált sztreptavidin a rendszer 3,3'-diaminobenzidin tartalmát oxidálva, barna csapadékká alapítja azt, mely megfigyelhető. A hasnyálmirigy metszetek esetében festéseket rendre két asszisztens (Herbály Mihályné és Tankáné Farkas Angdrea) készítette el, a metszeteket pedig egy patológus (dr. Balázs Lídia) értékelte ki, aki számára a kísérleti terv és a minták kezelési előzményei ismeretlenek voltak. Az ödéma, a leukocita infiltráció, a nekrózis és a TUNEL festés tekintetében egy 0-tól 3-ig terjedő pontozási sémát alkalmaztunk, amelyet a 2. táblázat mutat be.

2. táblázat: Szöveti metszetek szemikvantitatív kiértékelése

	0	1	2	3
Ödéma	nem figyelhető meg, vagy elhanyagolható	interlobuláris	interlobuláris és mérsékelt intralobuláris	interlobuláris és nagy mértékű intralobuláris
Infiltráció	nem figyelhető meg, vagy elhanyagolható	alacsony szintű perivaszkuláris	mérsékelt perivaszkuláris és alacsony szintű diffúz	nagy mértékű diffúz
Nekrózis	nem figyelhető meg, vagy elhanyagolható	a sejtek mintegy harmadában megfigyelhető	nagyjából a sejtek felében megfigyelhető	a sejtek többségében megfigyelhető
TUNEL	0-5 átlag folt szám / látótér (400×-os nagyítás)	6-15 átlag folt szám / látótér (400×-os nagyítás)	15-35 átlag folt szám / látótér (400×-os nagyítás)	több, mint 35 átlag folt szám / látótér (400×-os nagyítás)

IV.2.6.11. Hasnyálmirigy szöveti metszet immunfluoreszcens festése

A hasnyálmirigy szövetek 4 µm vastag metszeteit 1 m/v%-os BSA-val blokkoltuk PBS-ben, 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten, majd a IV.2.6.5. bekezdésben található leírás szerinti anti-PAR antitesttel kezeltük 3 µg/ml koncentrációban, egy éjszakán át, 4°C-on. A szöveteket ezután Alexa633-konjugált kecske anti-egér Ig másodlagos ellenanyaggal (Thermo

Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) (1:1000) és DAPI-val (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (1:2.000) inkubáltuk szobahőmérsékleten. A metszeteket Leica Sp8 konfokális mikroszkóppal (Leica, Wetzlar, Németország) vizsgáltuk meg. A megfigyelhető PAR jel intenzitását ImageJ szoftver segítségével értékeltük ki.

IV.2.7. 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. Az adatok kiértékelése előtt először Kolmogorov-Szmirnov tesztnek vetettük alá a használt folytonos változókat, normál eloszlásukat vizsgálva. Ellenőrzött adataink mindegyike normál eloszlást mutatott. A folytonos változók kiértékelésére Tukey post hoc próbával kombinált egy-utas ANOVA elemzést alkalmaztunk. A kapott diszkrét változókat (szöveti kiértékelés) Fisher egzakt tesztnek vetettük alá. A statisztikai elemzéshez a Microsoft Excel 2016 (Microsoft, Redmond, Washington, USA), a GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, California, USA) illetve a STATA 11 (StataCorp LLC, College Station, Texas, USA) programokat használtuk. A statisztikai tesztek mindegyike során 5%-os szignifikancia szintet alkalmaztunk. A kapott eredményeinket a vizsgálatok átlagát és azoknak tapasztalati szórását (SD) felhasználva mutatjuk be.

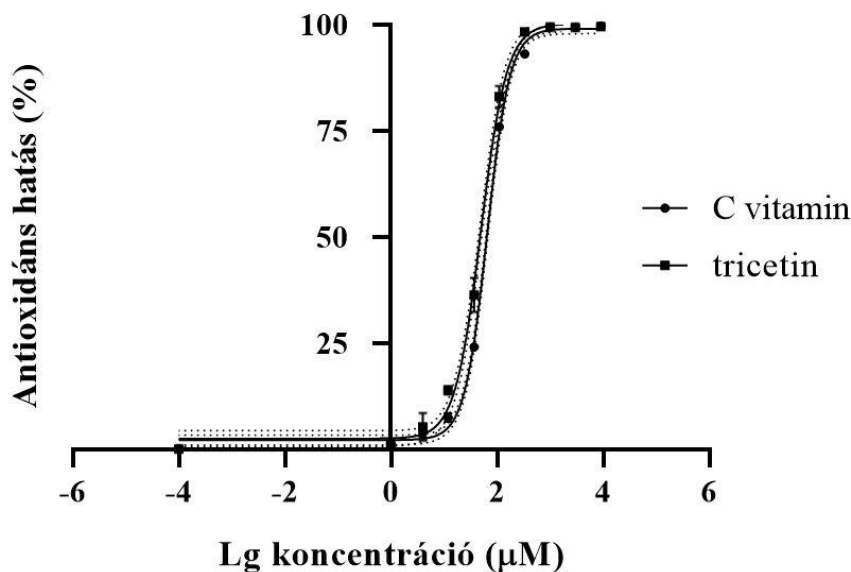
V. EREDMÉNYEK

V.1. A tricetin flavonoid vizsgálatának eredményei

V.1.1. *In vitro* eredmények

V.1.1.1. A tricetin jelentős antioxidáns hatással bíró vegyület

Az irodalomban számos flavonoid vegyület antioxidáns hatással bír. ABTS gyökfogó vizsgálatban szerettünk volna bebizonyosodni arról, hogy a tricetin is rendelkezik-e ezen tulajdonsággal. A tesztben a tricetin a kontrolljaként alkalmazott C-vitaminhoz hasonló gyökfogó aktivitást mutatott (14. ábra). A C-vitamin EC_{50} értéke a vizsgálat során $65,15 \mu M$ -nak, a tricetiné pedig $49,64 \mu M$ -nak adódott.

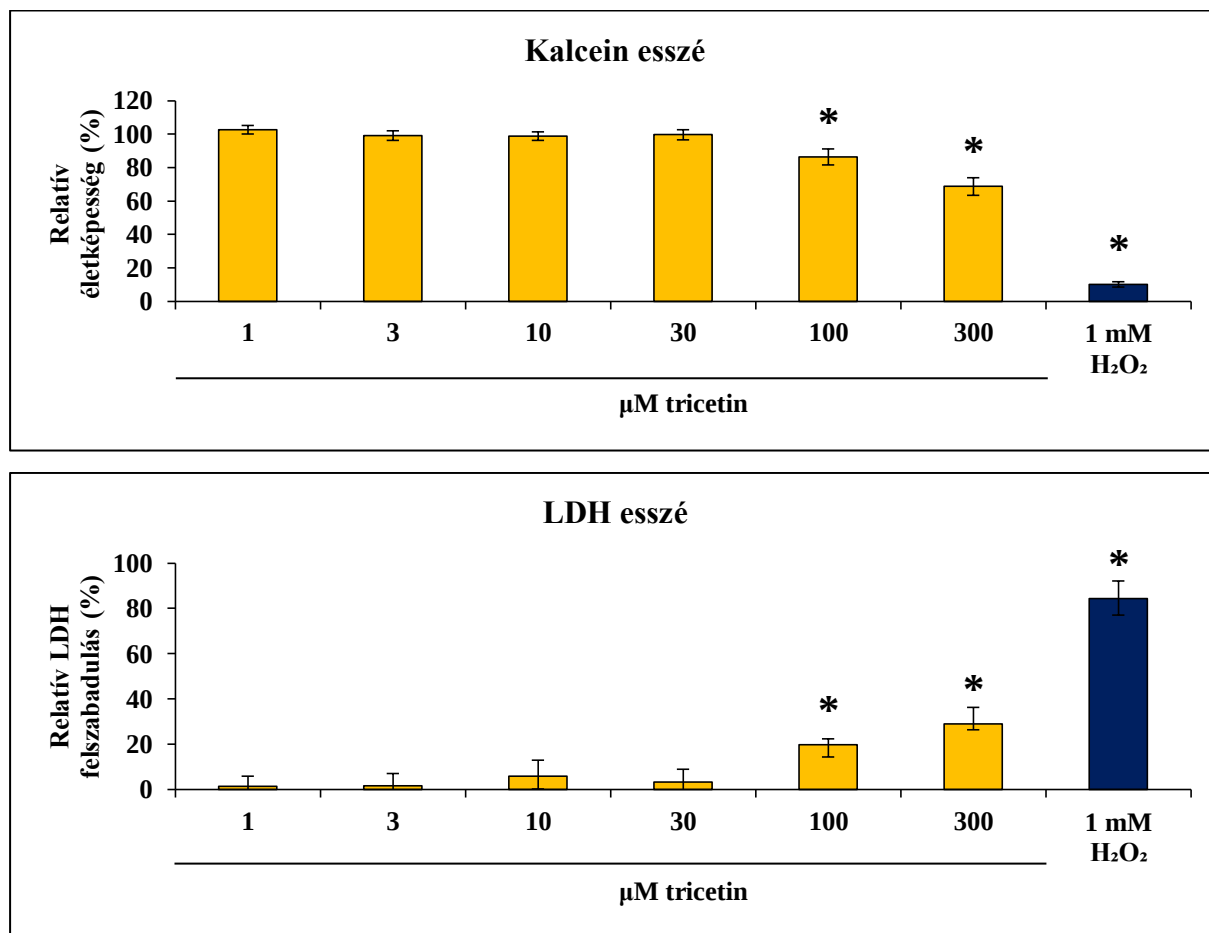


14. ábra: *A tricetin antioxidáns hatása* – A tricetin és a standardként használt C-vitamin harmadoló hígítási sorát alkalmaztuk ($10 \text{ mM} \rightarrow 1,5 \mu M + 0,1 \text{ nM}$) az ABTS gyökfogó vizsgálat során. A C-vitamin EC_{50} értéke $65,15 \mu M$ -nak, a TCT EC_{50} értéke pedig $49,64 \mu M$ -nak adódott. – 3 mérés átlaga tapasztalati szórással (SD) ábrázolva –

V.1.1.2. 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 μM koncentrációig. (15. ábra) Háromszor nagyobb koncentrációban (100 μM) 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 (15. ábra), ezért a későbbi sejtalapú kísérletekhez a 30 μM koncentrációt választottuk ki.

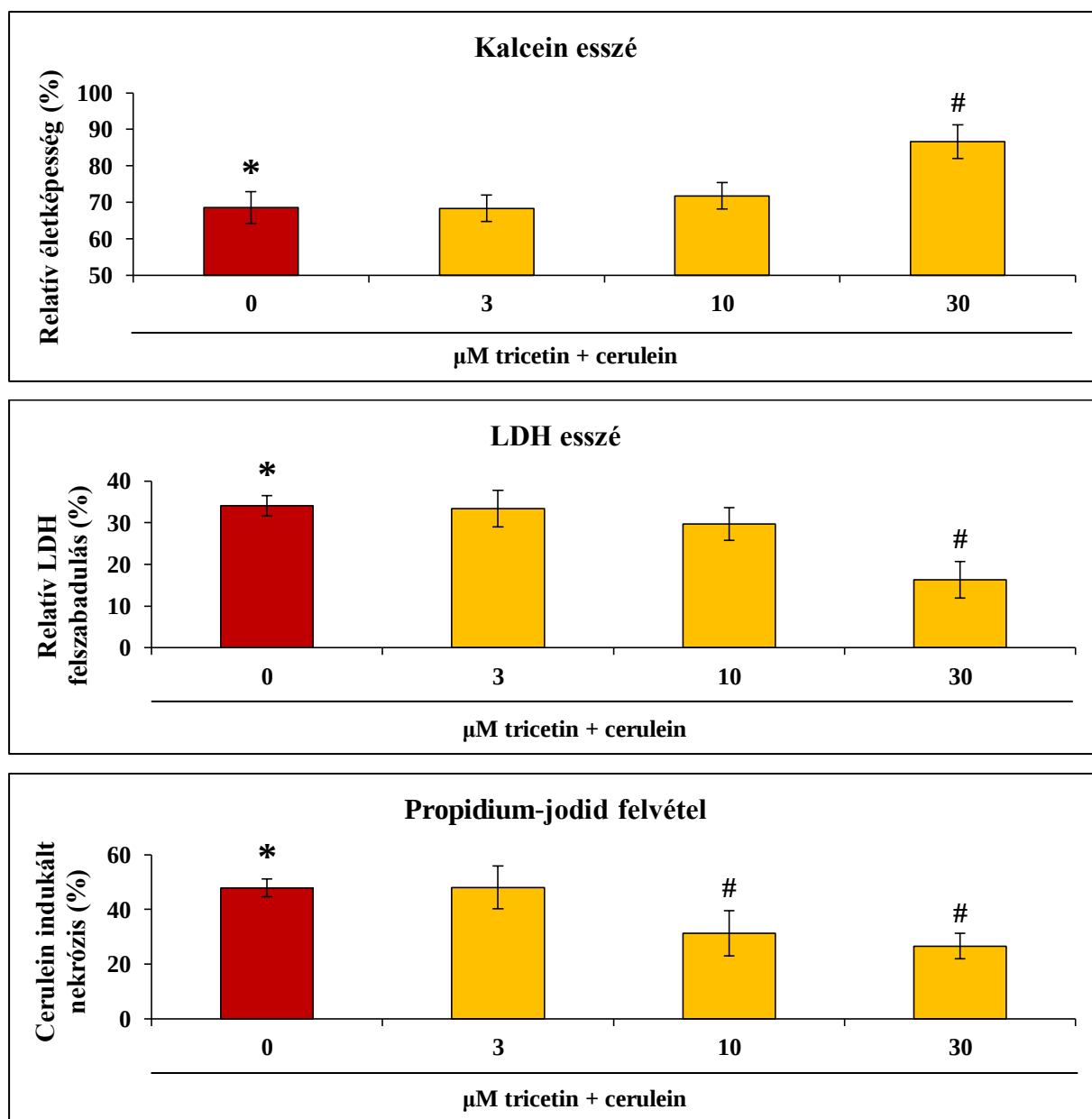


15. ábra: A tricetin sejtelétképességre kifejtett hatása (kalcein- és LDH -esszével vizsgálva) – A 96 lyukú edényben tenyésztett izolált sejteket 24 órán keresztül, különböző koncentrációban adott tricetinnel, illetve hidrogén-peroxiddal kezeltük. A kalcein esszé esetében a kontroll sejteknél tapasztalt életképességet 100%-nak, míg az LDH esszé esetében a kontroll sejtek felülúszójában tapasztalható LDH szintet 0-nak, a lizált sejtek felülúszójában tapasztaltat pedig 100%-nak vettük. – 3 mérés átlaga tapasztalati szórással (SD) ábrázolva, ANOVA + Tukey post hoc próba, * a kontroll sejtekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés –

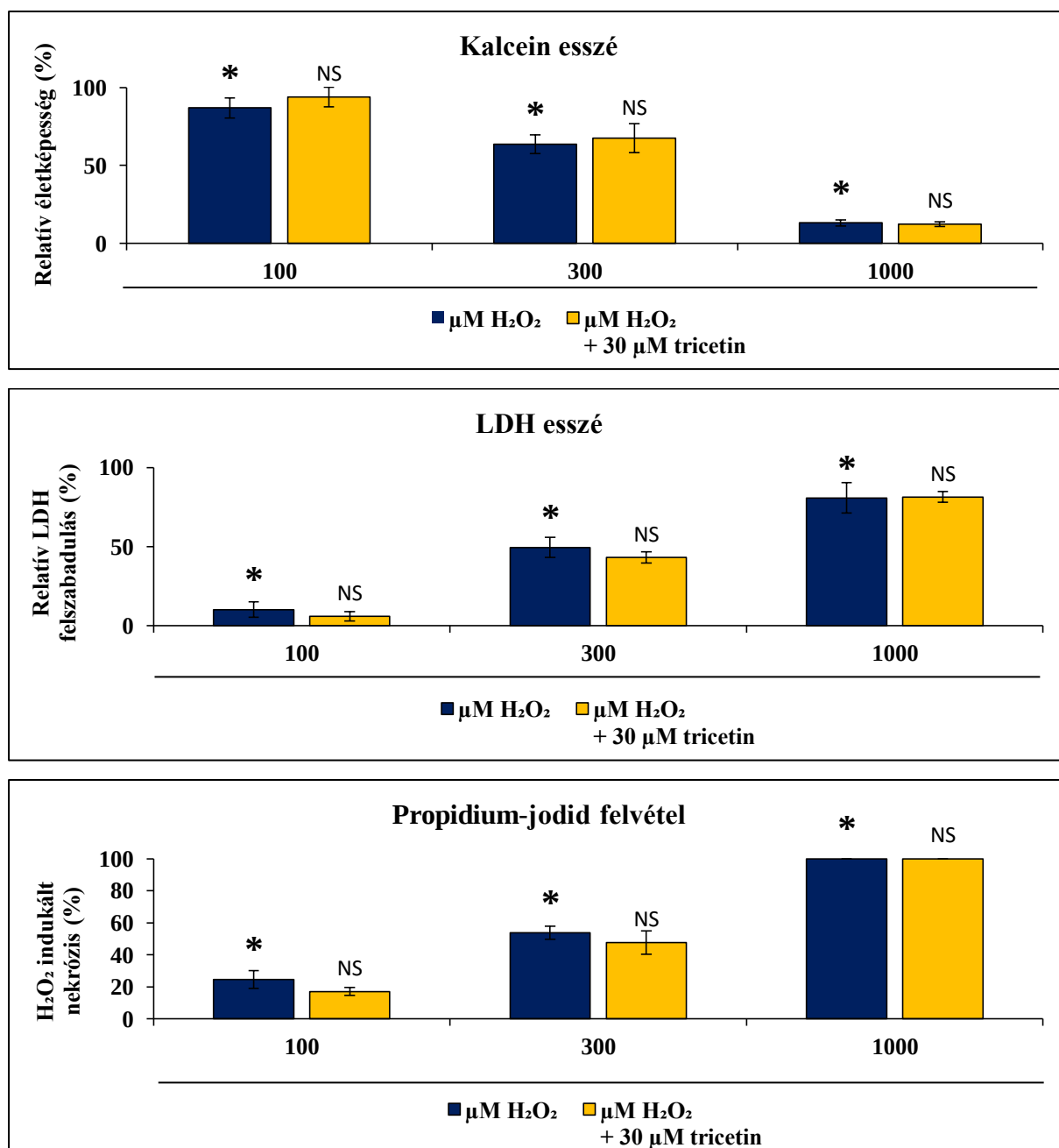
V.1.1.3. A tricetin megvédi a sejteket a cerulein által kiváltott sejthaláltól, de a H₂O₂-indukált sejthaláltól nem

A kolecisztokinin analóg peptid ceruleint széles körben használják a túlstimuláció által kiváltott acináris sejtkárosodás modellezésére mind sejtalapú kísérletekben, mind *in vivo*. Azt találtuk, hogy 100 nM koncentrációban a cerulein csökkenti a primer acinussejtek életképességét, amit kalcein-tesztel vizsgáltunk (16. ábra), és ez a hatás az LDH-felszabadulási módszerrel is megfigyelhető volt. A sejtek 30 µM tricetinnel történő előkezelése mindkét modellben szignifikánsan megvédte az acinussejteket a cerulein által kiváltott károsodástól (16. ábra). 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 10µM tricetin kezelés is szignifikáns javulást eredményezett a cerulein kezelés okozta nekrosis mértékében. (16. ábra)

Ezek után megvizsgáltuk, hogy cerulein kezelésben tapasztaltak a H₂O₂ kezelés által kiváltott sejtsérülés esetén is érvényesülnek-e. Az oxidáló H₂O₂ koncentrációfüggő citotoxicitást okozott (17. ábra), a tricetin azonban nem volt hatással a H₂O₂ sejtkárosító hatására, ami azt jelzi, hogy a flavonoid valószínűleg nem egyszerűen antioxidánsként hat, hanem specifikusan avatkozik be a cerulein által kiváltott acináris sejtkárosodási útvonalba.



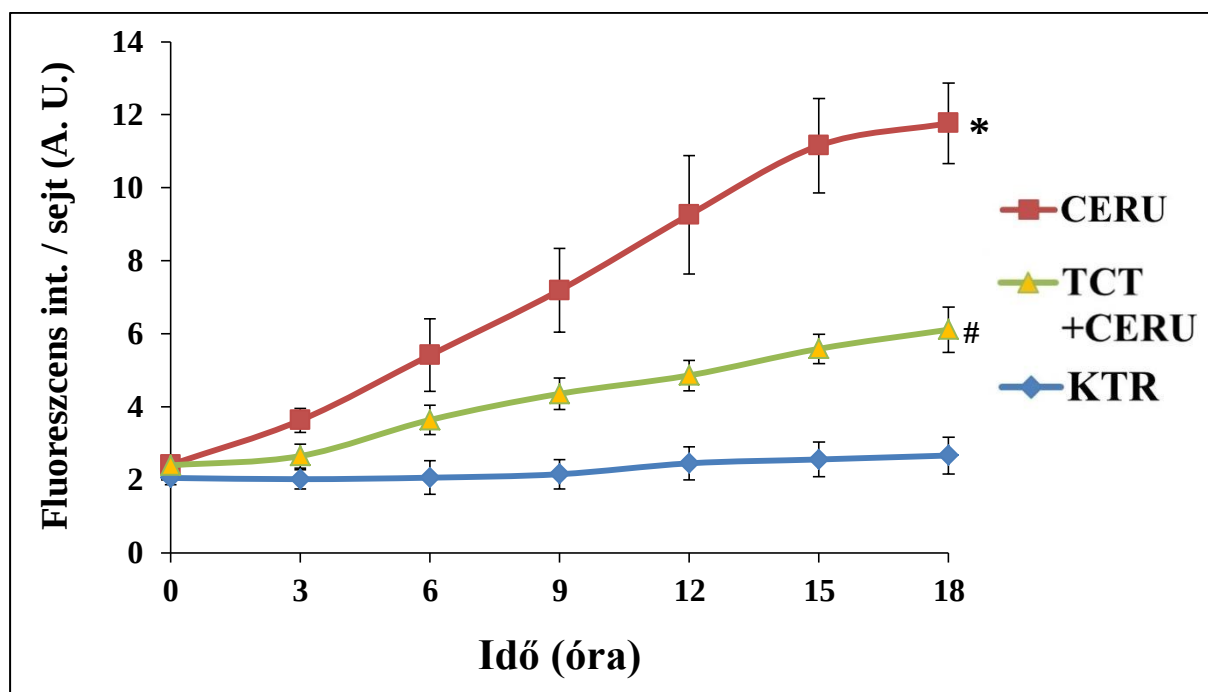
16. ábra: A tricetin hatása a ceruleinnel kezelt sejtek életképességére (kalcein-, LDH- és PJ módszerrel vizsgálva) – A 96 lyukű edényben tenyésztett izolált sejteket 1 órán keresztül, különböző koncentrációban (0, 3, 10, 30 μM) adott tricetinnel kezeltük a 24 órás cerulein kezelés (100 nM) előtt. A kalcein esszé esetében a kontroll sejteknél tapasztalt életképességet 100%-nak, míg az LDH esszé esetében a kontroll sejtek felülszójában tapasztalható LDH szintet 0-nak, a lizált sejtek felülszójában tapasztaltat pedig 100%-nak vettük. A propidium-jodid esszé esetében mintákban detektált nekrozist korrigáltuk a kontroll sejteknél megfigyelt átlagos nekrozis mértékével. – 3 mérés átlaga tapasztalati szórással (SD) ábrázolva, ANOVA + Tukey post hoc próba, * a kontroll sejtekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés, # a cerulein kezelt sejtekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés –



17. ábra: A tricetin hatása a H₂O₂ kezelt sejtek életképességére (kalcein-, LDH- és PJ esszén vizsgálva).– A 96 lyukú edényben tenyésztett izolált sejteket 1 órán keresztül, 30 μM koncentrációban adott tricetinnel kezeltük a 24 órás H₂O₂ kezelés (10 μM, 300 μM, 1 mM) előtt. A kalcein esszé esetében a kontroll sejteknél tapasztalt életképességet 100%-nak, míg az LDH esszé esetében a kontroll sejtek felülszójában tapasztalható LDH szintet 0-nak, a lizált sejtek felülszójában tapasztaltat pedig 100%-nak vettük. A propidium jodid esszé esetében mintákban detektált nekrozist korrigáltuk a kontroll sejteknél megfigyelt átlagos nekrozis mértékével. – 3 mérés átlaga tapasztalati szórással (SD) ábrázolva, ANOVA + Tukey post hoc próba, * a kontroll sejtekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés, „NS” a H₂O₂ kezelt sejtekhez képest nem tapasztalható szignifikáns eltérés –

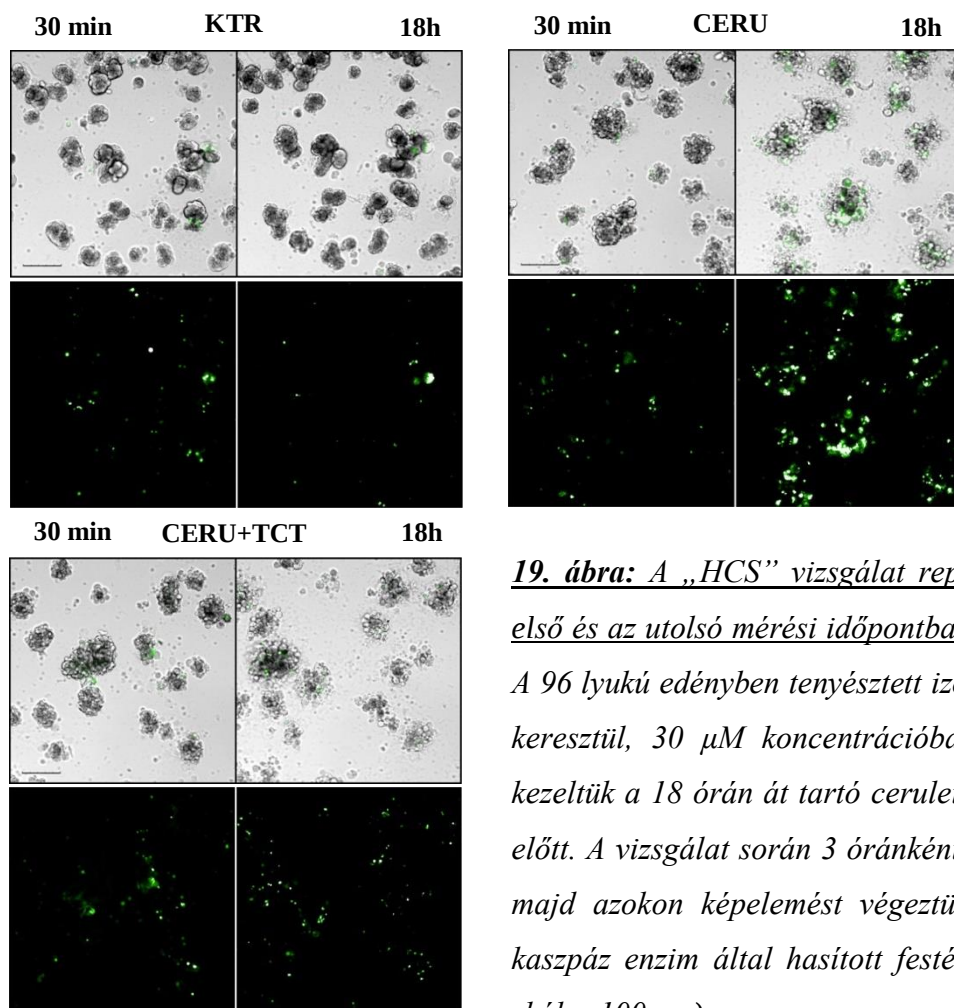
V.1.1.4. A tricetin gátolja az apoptózis mértékét a ceruleinnel kezelt acinussejtekben

A high-content analízissel mért, 18 órán keresztül végzett, 3 óránkénti megfigyelés eredménye azt mutatja, hogy az alkalmazott 100 nM-os cerulein kezelés már 3 óra elteltével is szignifikánsan növelte a sejtekben talaszthalható kaspáz aktivitást, melyet CellEvent reagens fluoreszcenciája mutat (18. ábra). Ezt a megnövekedett kaspáz aktivitást a 30 μ 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 kaspáz aktivitást.



18. ábra: A tricetin hatása a cerulein kezeléssel kiváltott kaspáz aktivációra – A 96 lyukú edényben tenyésztett izolált sejteket 1 órán keresztül, 30 μ M koncentrációban adott tricetinnel kezeltük a 18 órán át tartó cerulein kezelés (100 nM) előtt. A vizsgálat során 3 óránként fotóztuk a sejteket, majd azokon képelemést végeztünk. – 3 mérés átlaga tapasztalati szórással (SD) ábrázolva, ANOVA + Tukey post hoc próba, * a kontroll sejtekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés, # a cerulein kezelt sejtekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés —

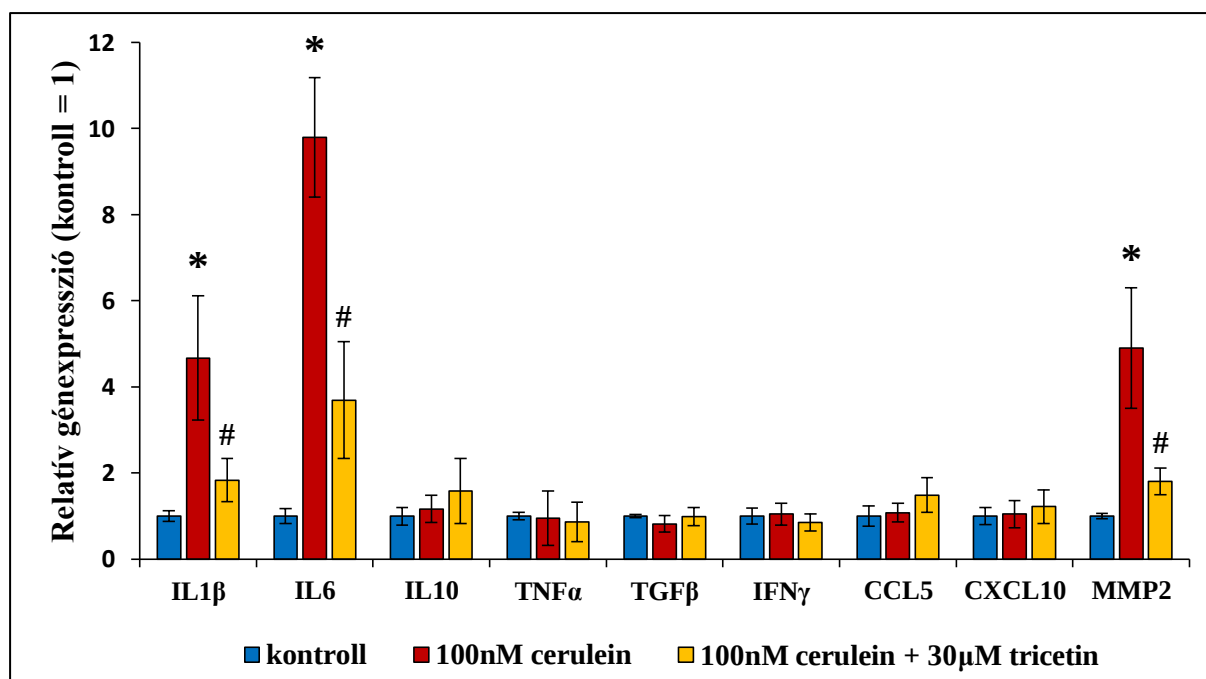
A „HCA” készülékkel készült képeken (első és utolsó mérési időpont) jól látható a sejtekben megfigyelhető CellEvent jel (19. ábra). A nem fluoreszcens festék a kaspáz általi hasítást követően képes bekötődni a DNS-hez, amely folyamat után a festék zöld fluoreszcens jelet generál, melynek mértéke egyenesen arányos a sejtekben megfigyelhető kaspáz enzim aktivitásával, melyből következtethetünk az apoptózis mértékére.



19. ábra: A „HCS” vizsgálat reprezentatív képei az első és az utolsó mérési időpontban (skála: 100 μ m) – A 96 lyukú edényben tenyésztett izolált sejteket 1 órán keresztül, 30 μ M koncentrációban adott tricetinnel kezeltük a 18 órán át tartó cerulein kezelés (100 nM) előtt. A vizsgálat során 3 óránként fotóztuk a sejteket, majd azokon képelemést végeztünk. (Zöld szín: a kaszpáz enzim által hasított festék fluoreszcens jele, skála: 100 μ m)

V.1.1.5. A tricetin gátolja a ceruleinnel indukált gyulladásos génexpressziót izolált acinussejtekben

A gyulladásos komponens egyértelműen hozzájárul az AP kialakulásához. Az AP kórélettanának egyik különlegessége a legtöbb akut gyulladásal szemben, hogy itt az elsődleges esemény a sejtkárosodás, és a gyulladás a szövetkárosodás 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 e gének expressziójára (20. ábra). A cerulein kezelés indukálta az IL1 β , IL6 és MMP2 mRNS-ek expresszióját, míg a TNF α , IFN γ , valamint a CCL5 és CXCL10 kemokinek expresszióját nem fokozta. Hasonlóképpen a TGF β , és az IL10 expressziója sem változott. A sejtek tricetinnel történő előkezelése szingifikánsan csökkentette az IL1 β , IL6 és MMP2 cerulein által indukált expresszióját (20. ábra).



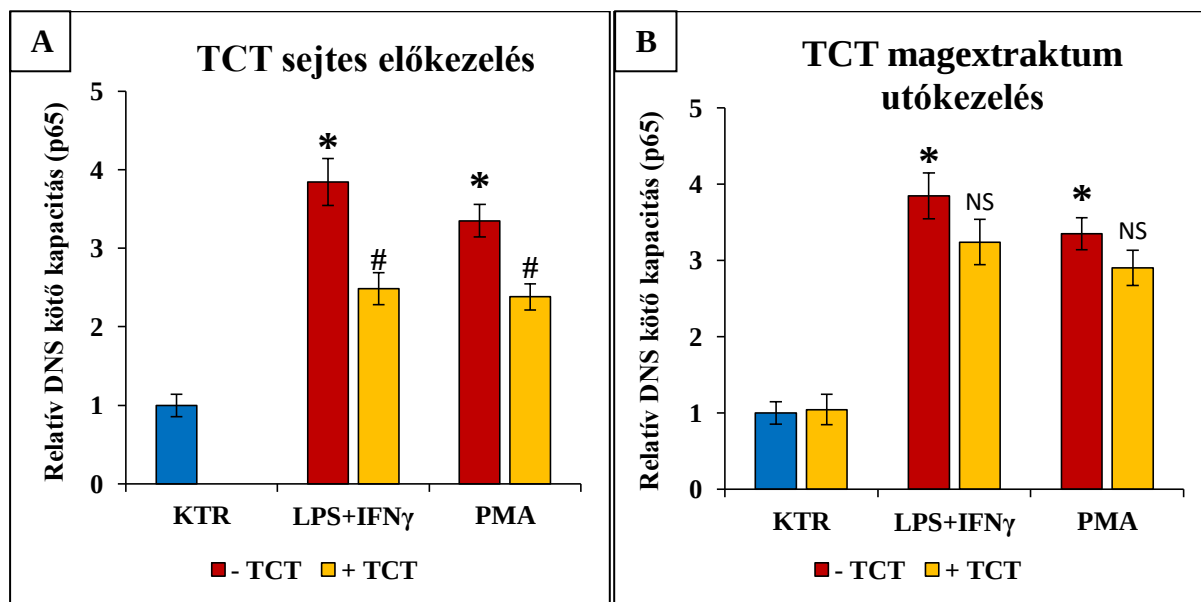
20. ábra: A tricetin kezelés hatása a ceruleinnel kiváltott génexpresszióra – A 6 lyukú edényben tenyésztett izolált sejteket 1 órán keresztül, 30 μ M koncentrációban adott tricetinnel kezeltük a 24 órán át tartó cerulein kezelés (100 nM) előtt. Az RT-qPCR vizsgálat során megfigyelésre került gének közül megnövekedett expressziót mutattak az IL1 β , az IL6 és az MMP2 gének. – 3 mérés átlaga tapasztalati szórással (SD) ábrázolva, ANOVA + Tukey post hoc próba, * a kontroll sejtekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés, # a cerulein kezelt sejtekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés –

V.1.1.6. A tricetin visszafogja az NF κ B p65-ös alegységének transzlokációját a sejtmagba, de nem gátolja kötődését a DNS-hez

Az NF κ B transzkripciós faktor nyugalmi állapotban a citoszolban, inaktív állapotban található. Különböző iniciáló tényezők hatására az NF κ B transzlokálódik a magba, ahol a legtipusosabb komplexében a p50 alegységgel heterodimert alkotva kötődik a gyulladásos célgének promóteréhez, beindítva a génexpressziót. A p65-ös alegység DNS kötődési esszéjének eredményei azt mutatják, hogy mind az LPS (1 μ g/ml) + IFN γ (20 ng/ml) kezelés, mind pedig a PMA (1 μ M) kezelés szignifikánsan megnövelte a transzkripciós faktor magi transzlokációját, amit a magextraktumokban lévő NF κ B DNS próbához történő bekötődésének megnövekedett mértéke jelzett (21. A ábra). Szintén megfigyelhető, hogy az egy órás tricetin előkezelés (30 μ 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 κ B szintből adódó megnövekedett DNS bekötődési rátát nem sikerült csökkentenie a tricetin „utókezelésnek” (21. B ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy a tricetin csak az NF κ B magi transzlokációját gátolja, a magba bejutott faktor DNS-kötődését már nem.

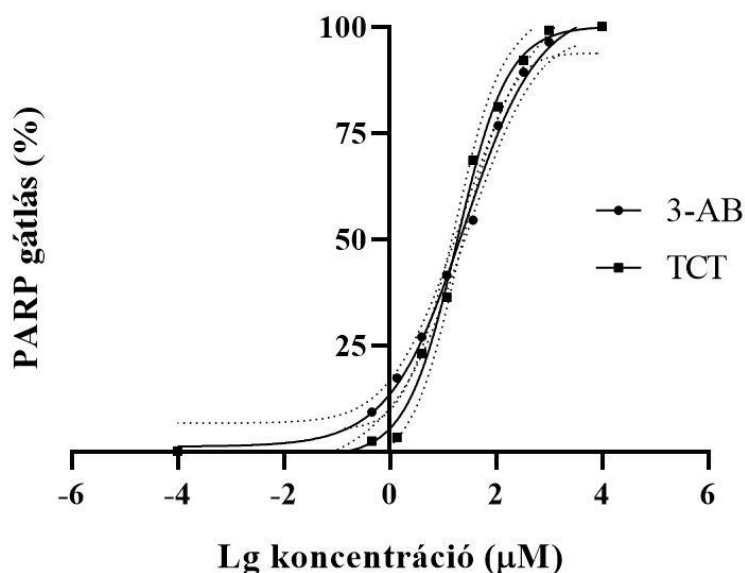


21. ábra: A cerulein kezelés hatása az NF κ B magi transzlokációjára és DNS-hez történő bekötődésére – A 6 lyukú edényben tenyésztett izolált sejteket 1 órán keresztül, 30 μ M koncentrációban adott tricetinnel kezeltük a szintén 1 órán át tartó LPS (1 μ g/ml) + IFN γ (20 ng/ml) vagy PMA (1 μ M) kezelés előtt, majd a sejtekből magextraktumot izoláltunk (A). A tricetin előkezelésben nem részesülő sejtek izolált magextraktumát szintén egy órán keresztül tartó, 30 μ M koncentrációban adott tricetin kezelésnek vetettük alá, összehasonlítva a TCT kezelésben egyáltalán nem részesülő magextraktumokkal (B). – 3 mérés átlaga tapasztalati szórással (SD) ábrázolva, ANOVA + Tukey post hoc próba, * a kontroll sejtekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés, #/”NS” az NF κ B aktivátor vegyületekkel kezelt sejtekhez/magokhoz képest tapasztalt szignifikáns eltérés, vagy annak hiánya –

V.1.1.7. A tricetin gátolja a PARP1 enzim működését

A PARP1 aktivációja hozzájárul a szöveti sérüléshez és gyulladáshoz akut és krónikus pankreatitiszben (Martínez-Bosch és mtsai., 2016; El-Hamoly és mtsai., 2021). Ez alapján megvizsgáltuk, hogy a tricetin kedvező hatásaiban szerepet játszhat-e a PARiláció gátlása.

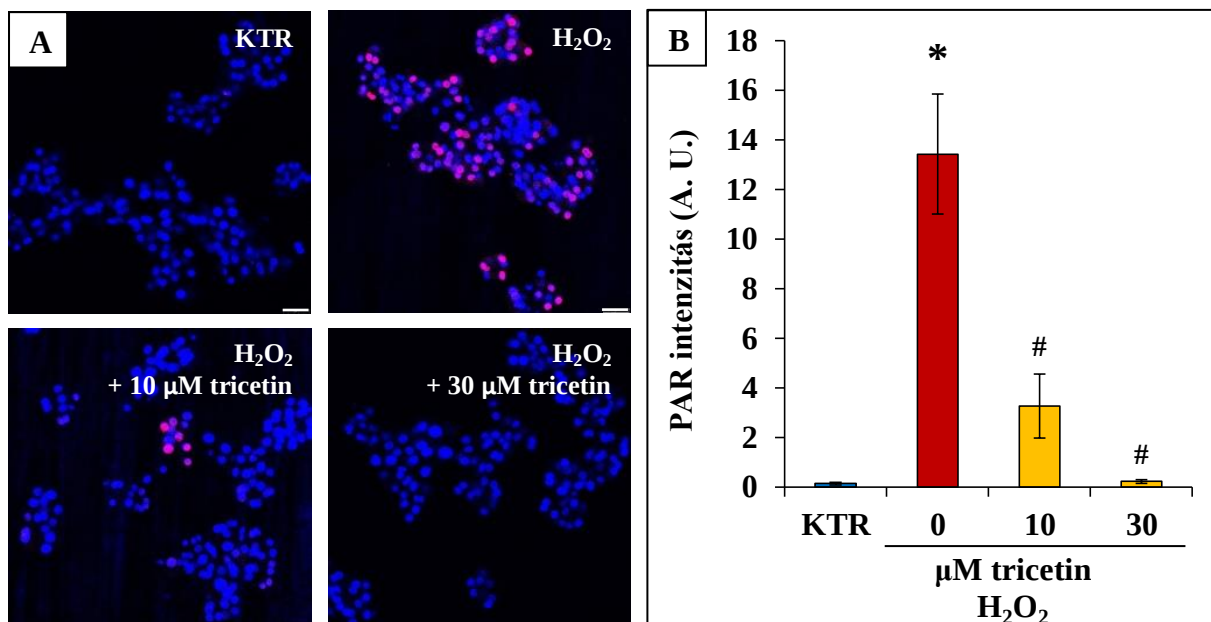
Enzimaktivitási vizsgálatban a tricetin a referencia vegyületként használt 3-aminobenzamid (3-AB) hatásához hasonlóan PARP-gátló aktivitást mutatott (22. ábra).



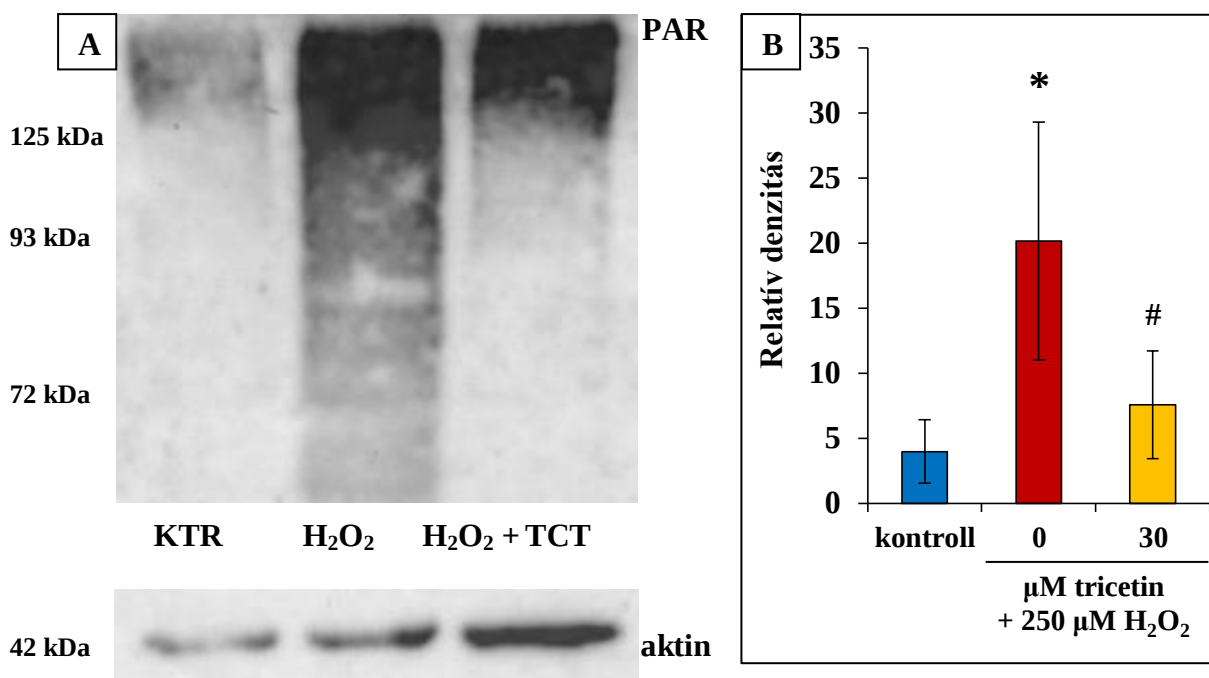
22. ábra: A tricetin PARP-gátló hatása – A TCT és a standardként használt 3-AB harmadoló hígítási sorát alkalmaztuk ($10\text{ mM} \rightarrow 1,5\text{ }\mu\text{M} + 0,1\text{ nM}$ -os végpont) a vizsgálat során. A 3-AB IC_{50} értéke $25,34\text{ }\mu\text{M}$ -nak, a TCT IC_{50} értéke pedig $18,11\text{ }\mu\text{M}$ -nak adódott.

V.1.1.8. 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 $250\text{ }\mu\text{M}$ hidrogén-peroxiddal kezeltük, amely az elvégzett IF és WB vizsgálómódszerek alapján sikeresen indukálta a PARilációt (23. A-B és 24. A-B ábra). Az egy órás előkezelésben alkalmazott $10\text{ }\mu\text{M}$, illetve $30\text{ }\mu\text{M}$ tricetin, szignifikánsan csökkentette a PARiláció mértékét a vizsgált sejtekben (23. A-B és 24. A-B ábra).



23. ábra: PARiláció vizsgálata IF módszerrel, izolált acinussejteken. Kék szín: a DAPI festék magi jele, piros szín: PARiláció (A – reprezentatív konfokális mikroszkópos kép (400×-os nagyítás), B – az elvégzett képelemzés eredménye) – A 24 lyukú edényben, fedőlemez korongokon tenyésztett izolált sejteket 1 órán keresztül 10 μM, illetve 30 μM koncentrációban adott tricetinnel kezeltük a 7,5 percen át tartó H₂O₂ (250 μM) kezelés előtt. Kék szín: sejtmagok, piros szín: a sejtmagokban megfestett PAR polimerek, skála: 50 μm. – 3 mérés átlaga tapasztalati szórással (SD) ábrázolva, ANOVA + Tukey post hoc próba, * a kontroll sejtekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés, # a H₂O₂-dal kezelt sejtekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés –



24. ábra: PARiláció vizsgálata izolált acinus sejteken WB módszerrel

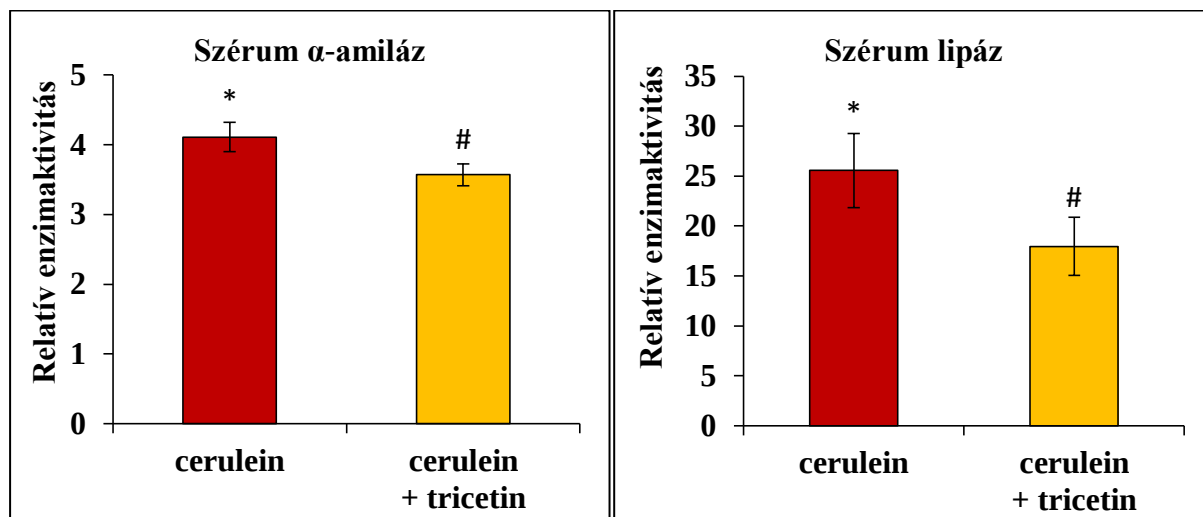
(A - reprezentatív membránkép, B – az elvégzett denzitometria eredménye) – A 6 lyukú edényben tenyésztett izolált sejteket 1 órán keresztül 30 μM koncentrációban adott tricetinnel kezeltük a 7,5 percen át tartó H₂O₂ (250 μM) kezelés előtt. – 3 mérés átlaga tapasztalati szórással (SD) ábrázolva, ANOVA + Tukey post hoc próba, * a kontroll sejtekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés, # a H₂O₂-dal kezelt sejtekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés –

V.1.2. *In vivo* eredmények

V.1.2.1. A tricetin előkezelés egérmodellben csökkenti a ceruleinnel kiváltott AP súlyosságát

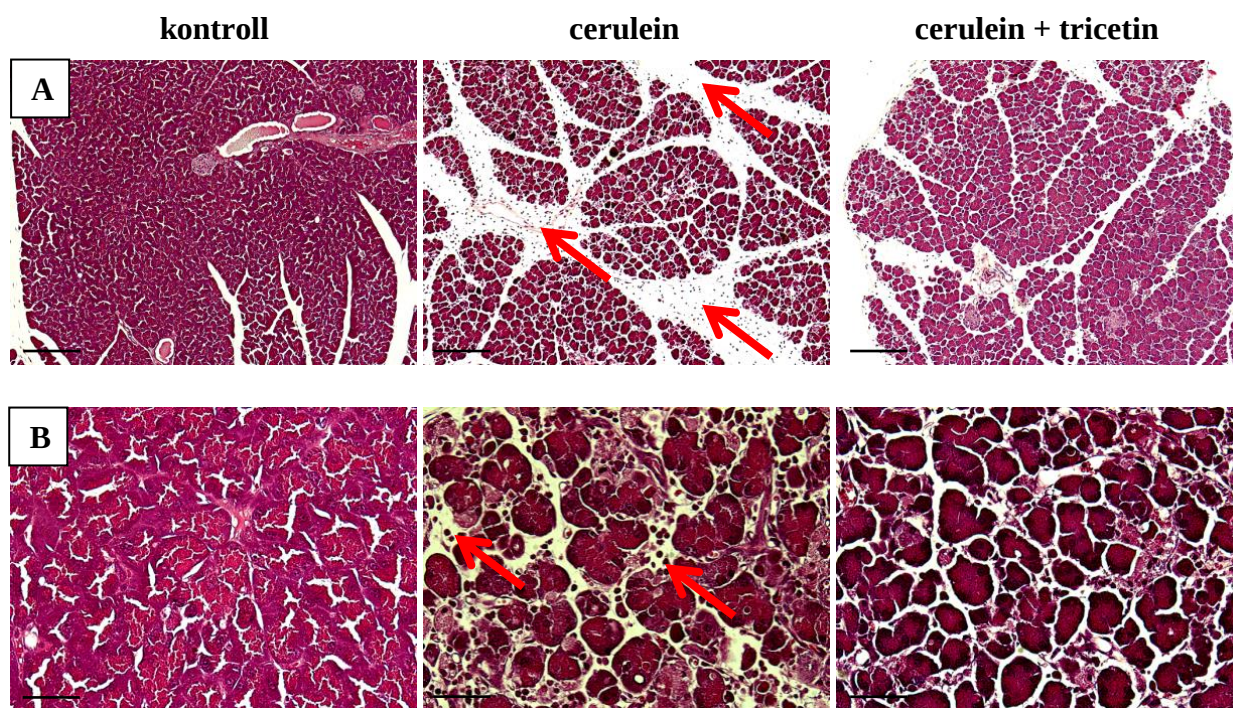
A tricetin primer acinussejtekben mért citoprotektív hatása alapján és a cerulein által kiváltott gyulladásos mediátorok elnyomása alapján feltételeztük, hogy a szer jótékony hatással lesz az AP cerulein által kiváltott állatmodelljében is. A cerulein által kiváltott AP *in vivo* modelljét a tricetin esetében is egerekben állítottuk be az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint. Ez a protokoll egy 8 darabos, 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 (Jo és mtsai., 2014).

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy - az irodalmi adatokkal összhangban - a cerulein a hasnyálmirigy acinussejtjeinek károsodását okozta, amit az α -amiláz és lipáz emésztőenzimek emelkedett szérumszintje jelzett (25. ábra). Látható továbbá, hogy a csökkent szérumszintek alapján a tricetin előkezelés szignifikánsan csökkentette az acinussejtek károsodását (25. ábra).

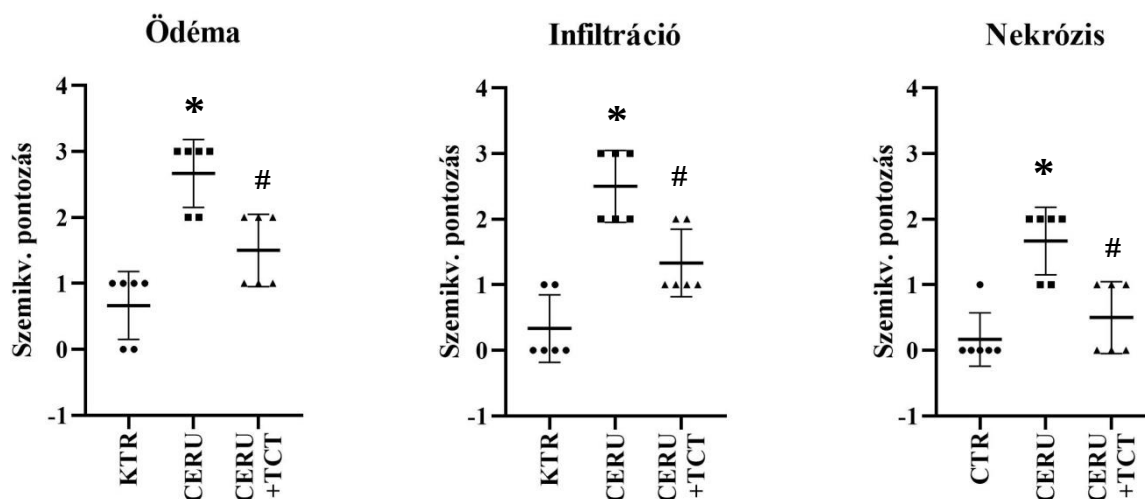


25. ábra: A tricetin csökkenti a pankréász szövet sérülését az AP *in vivo* modelljében – A tricetin kezelésben is részesülő egerek 12 és 1 órával a cerulein i.p. oltássorozat ($8 \times 50 \mu\text{g/ttkg}$) megkezdése előtt kaptak TCT i.p. injekciót (10 mg/ttkg). Mindkét emésztőenzim-vizsgálat eredményének ábrázolásakor a kontroll állatok szérumában tapasztalt enzimszintet 1-nek vettük. – A csoportonkénti 6 hím egér átlaga tapasztalati szórással (SD) ábrázolva, ANOVA + Tukey post hoc próba, * a kontroll állatokhoz képest tapasztalt szignifikáns eltérés, # a ceruleinnel kezelt egerekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés –

A H&E-festett metszeteken ödéma és neutrofil granulocita infiltráció, illetve nekrózis jelei mutatkoztak a ceruleinnel kezelt egerek hasnyálmirigyében (26. A-B ábra). A szöveti képeken látható, hogy tricetin visszafogta mind az ödéma képződését, mind pedig az infiltráció és a nekrózis mértékét (26. A-B ábra), amit a metszetek patológus általi szemikvantitatív elemzése is igazolt (27. ábra).



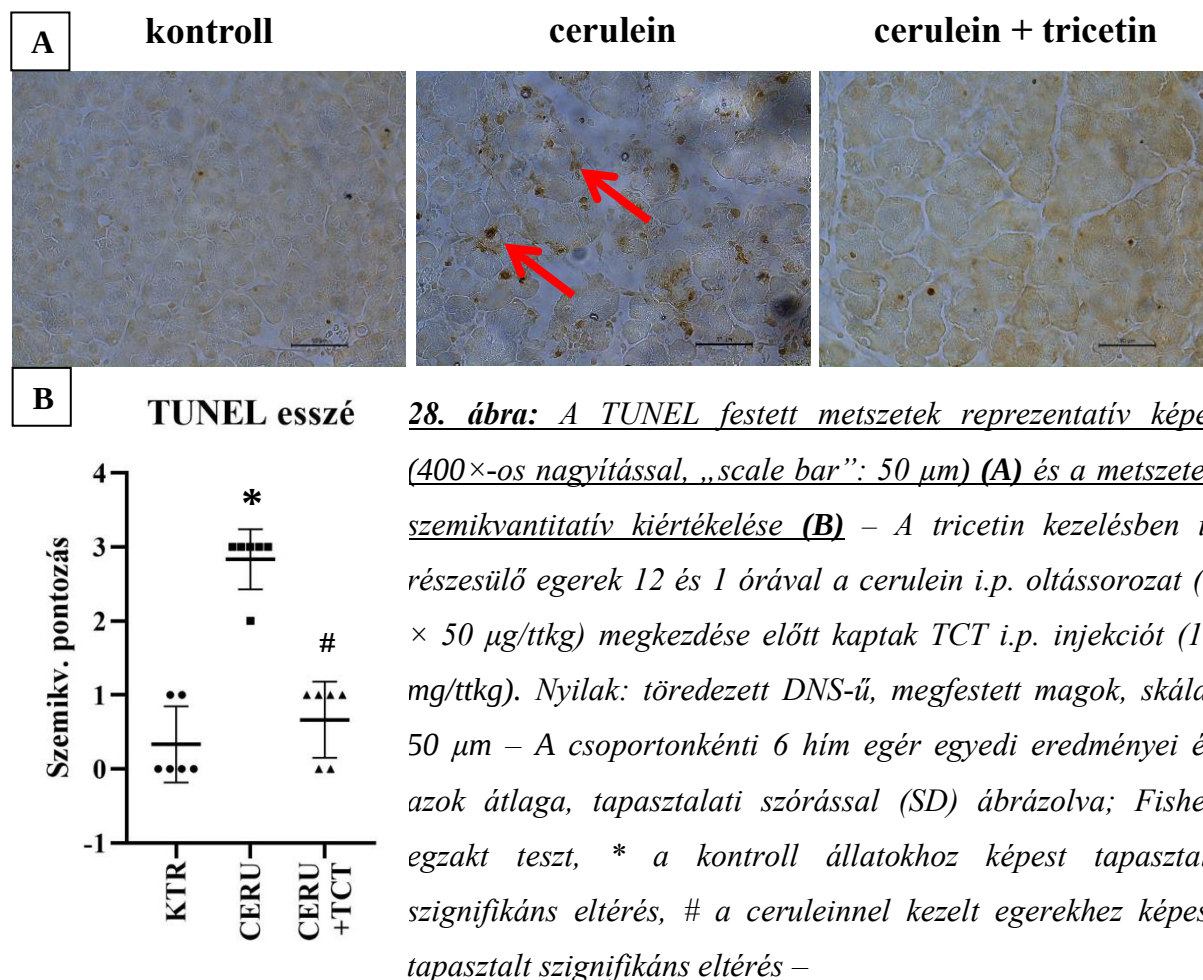
26. ábra: *A tricetin szövettanilag is igazolható módon csökkenti a pankréász szövet sérülését az AP in vivo modelljében – A tricetin kezelésben is részesülő egerek (6 hím egér/csoport) 12 és 1 órával a cerulein i.p. oltássorozat ($8 \times 50 \mu\text{g}/\text{ttkg}$) megkezdése előtt kaptak TCT i.p. injekciót ($10 \text{ mg}/\text{ttkg}$). – Hematoxin-Eozin festés, **A:** 100×-os nagyítás, nyilak: ödéma, skála: $200 \mu\text{m}$; **B:** 400×-os nagyítás, nyilak: infiltrálódott leukociták, skála: $50 \mu\text{m}$) –*



27. ábra: A H&E festett metszetek szemikvantitatív kiértékelése: ödéma, granulocita infiltráció és nekrózis – A tricetin kezelésben is részesülő egerek 12 és 1 órával a cerulein i.p. oltássorozat ($8 \times 50 \mu\text{g/ttkg}$) megkezdése előtt kaptak TCT i.p. injekciót (10 mg/ttkg). – A csoportonkénti 6 hím egér egyedi eredményei és azok átlaga, tapasztalati szórással (SD) ábrázolva; Fisher egzakt teszt, * a kontroll állatokhoz képest tapasztalt szignifikáns eltérés, # a ceruleinnel kezelt egerekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés –

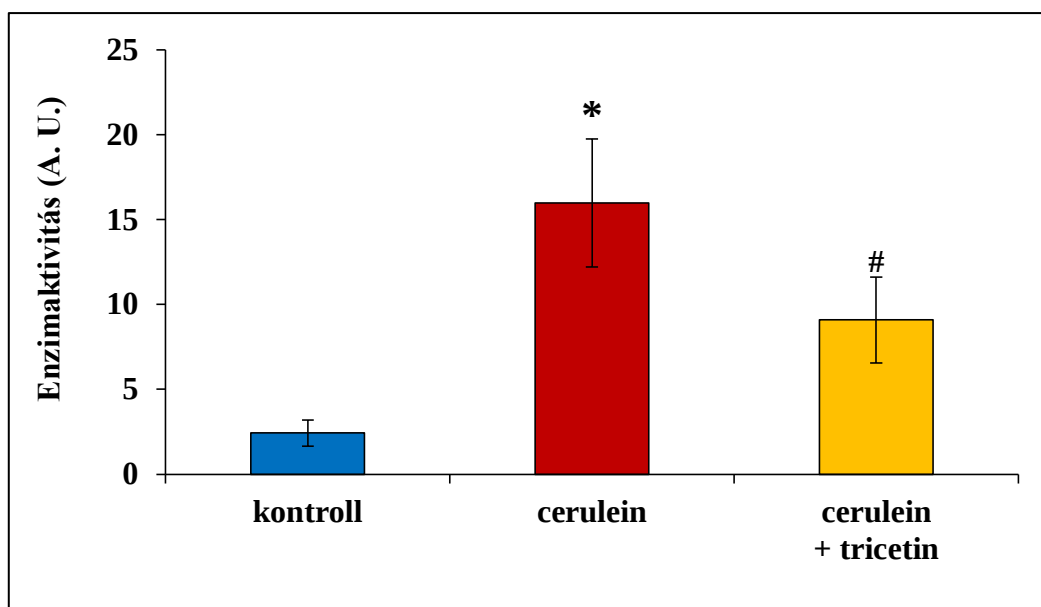
V.1.2.2. A tricetin *in vivo* csökkenti a cerulein kezelés hatására kialakult DNS törések mennyiségét

A TUNEL esszé eredménye jól korrelál a korábban bemutatott H&E festés során tapasztaltakkal. A cerulein kezelés hatására nagyszámú apoptotikus sejt megjelenése volt megfigyelhető a hasnyálmirigy metszetekben. Az apoptózis intenzitása a tricetinnel kezelt metszetekben csökkent (28. A ábra). A patológus által elvégzett szemikvantitatív kiértékelés szignifikáns különbséget mutatott mind a kontroll (KTR) és a ceruleinnel kezelt egerek között, mind pedig a ceruleinnel kezelt és a cerulein kezelésen kívül tricetin előkezelést is kapott egerek metszetei között (28. B ábra).



V.1.2.3. A tricetin gátolja a granulocita infiltrációt akut pancreatitis egérmódeljében

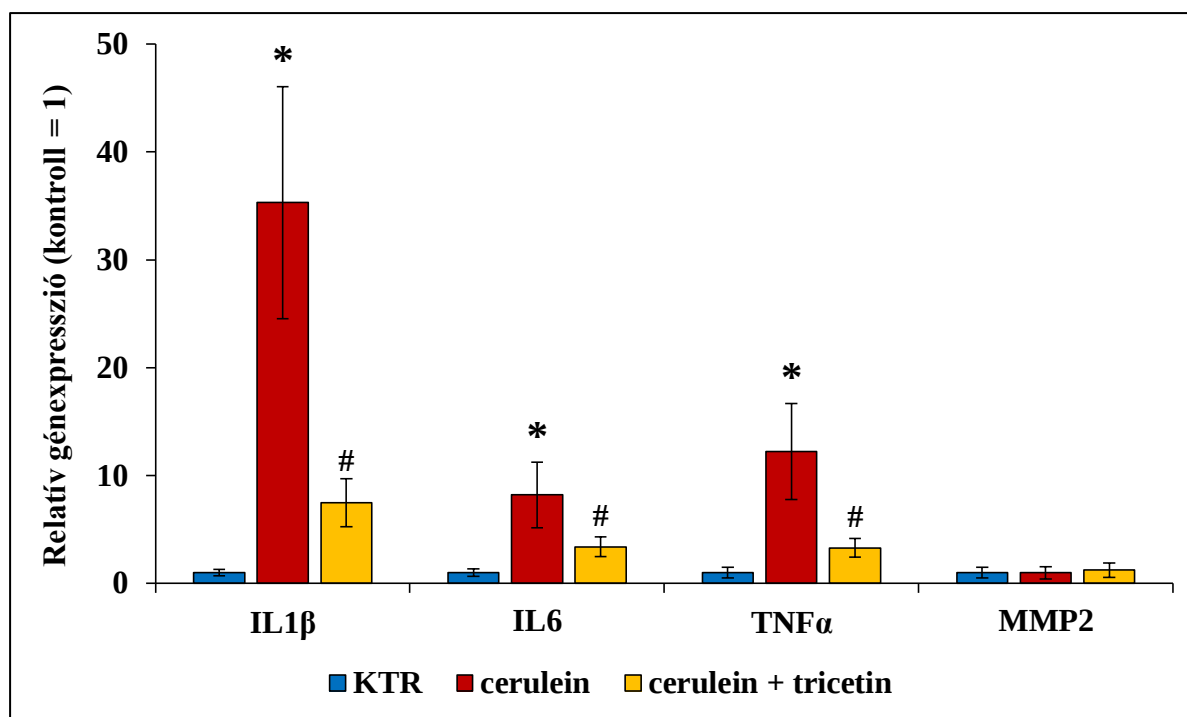
A gyulladás egyik jellemzője a fehérvérsejtek, különösen a granulociták megjelenése az érintett szövetben. A szöveti myeloperoxidáz (MPO) szintjének mérése jó indikátora a különböző szövetek granulocita-tartalmának. A hasnyálmirigy szövetben mért MPO-aktivitás több mint hatszorosára nőtt az AP indukcióját követően (29. ábra). A tricetin 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.



29. ábra: Az egerek hasnyálmirigy szövetének MPO aktivitása (tricetin előkezelés) – A tricetin kezelésben is részesülő egerek 12 és 1 órával a cerulein i.p. oltássorozat ($8 \times 50 \mu\text{g/ttkg}$) megkezdése előtt kaptak TCT i.p. injekciót (10 mg/ttkg). – A csoportonkénti 6 hím egér átlaga tapasztalati szórással (SD) ábrázolva, ANOVA + Tukey post hoc próba, * a kontroll állatokhoz képest tapasztalt szignifikáns eltérés, # a ceruleinnel kezelt egerekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés –

V.1.2.4. A tricetin *in vivo* is csökkenti a cerulein által indukált gyulladásos génexpressziót

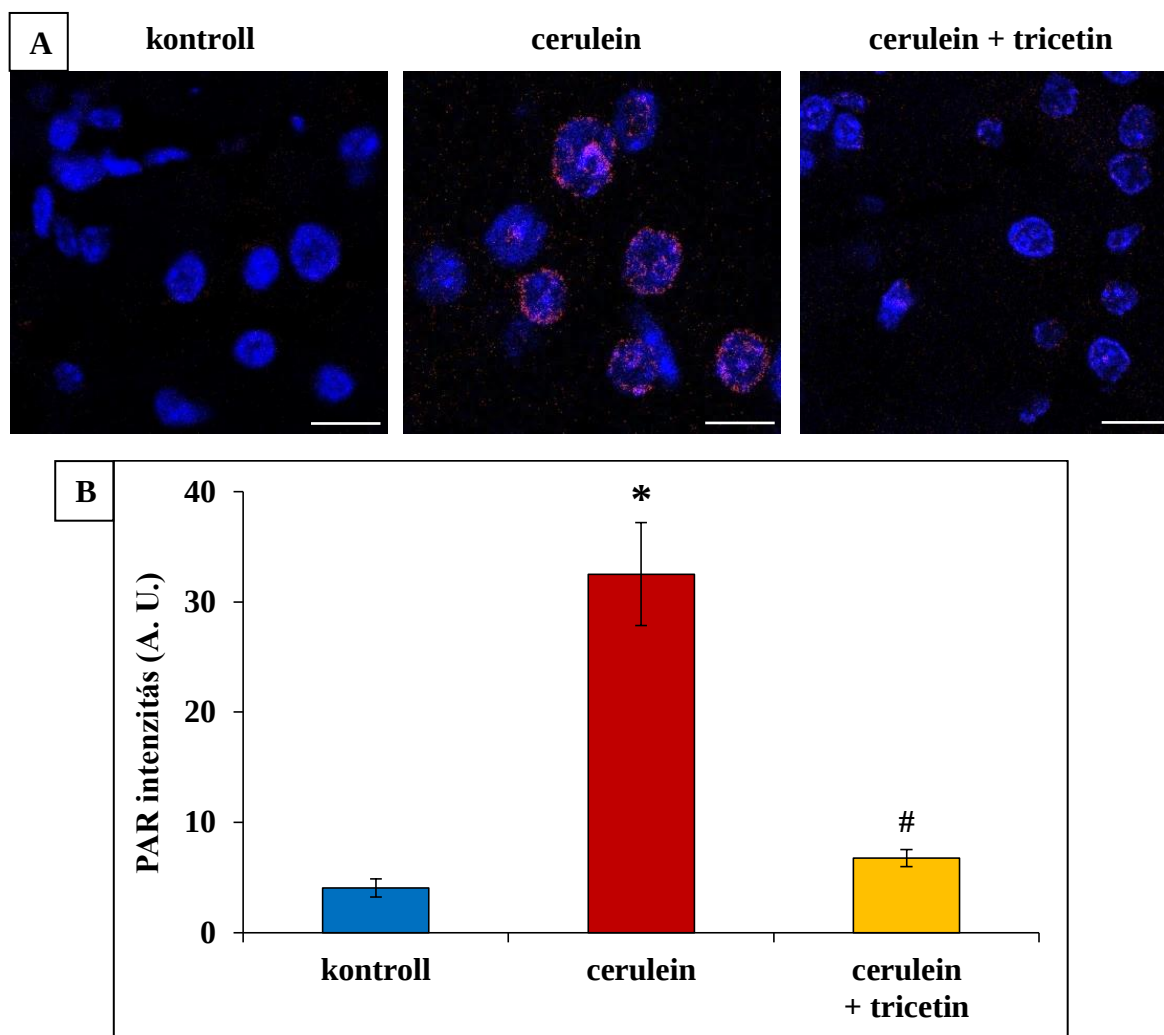
Hasonlóan a ceruleinnel kezelt izolált acinussejtekben tapasztaltakhoz, az IL1 β és IL6 gyulladásos citokinek mRNS mennyisége *in vivo* is változott: az AP mintákban megnövekedett expressziós szintet, de a tricetinnel előkezelt egerek hasnyálmirigyében csökkent kifejeződést tapasztaltunk (30. ábra). Az acinussejteken kapott eredményekkel ellentétben az MMP2 szintje nem változott *in vivo* az AP csoportban, és a tricetinnek sem volt rá hatása (30. ábra). Bár a TNF α expressziójának mértéke izolált acinussejtekben nem emelkedett meg a ceruleinnel kezelt mintákban, *in vivo* az – irodalmi adatokkal összhangban (Tasci és mtsai., 2019) – emelkedett a TNF α mRNS-szintje a ceruleinnel kezelt csoportban, melynek mértékét a tricetin előkezelés szignifikánsan gátolta (30. ábra).



30. ábra: *A hasnyálmirigy szövetek génexpressziós mintázata* – A trisetin kezelésben is részesülő egerek 12 és 1 órával a cerulein i.p. oltássorozat ($8 \times 50 \mu\text{g/ttkg}$) megkezdése előtt kaptak TCT i.p. injekciót (10 mg/ttkg). Az RT-qPCR vizsgálat során megfigyelésre került gének közül megnövekedett expressziót mutattak az IL1β, az IL6 és a TNFα gének – A csoportonkénti 6 hím egér átlaga tapasztalati szórással (SD) ábrázolva, ANOVA + Tukey post hoc próba, * a kontroll állatokhoz képest tapasztalt szignifikáns eltérés, # a ceruleinnel kezelt egerekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés –

V.1.2.5. 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 (31. A ábra), ami az acináris PARP aktiválódására utal az AP-ben. Ezzel szemben a trisetinnel is előkezelt állatok hasnyálmirigye alig tartalmazott PAR-polimert (31. A ábra). A konfokális mikroszóppal készült képek elemzése igazolta, hogy a trisetin előkezelés szignifikánsan csökkentette a PAR polimerek képződését az állatok cerulein által károsított hasnyálmirigy szövetében (31. B ábra).



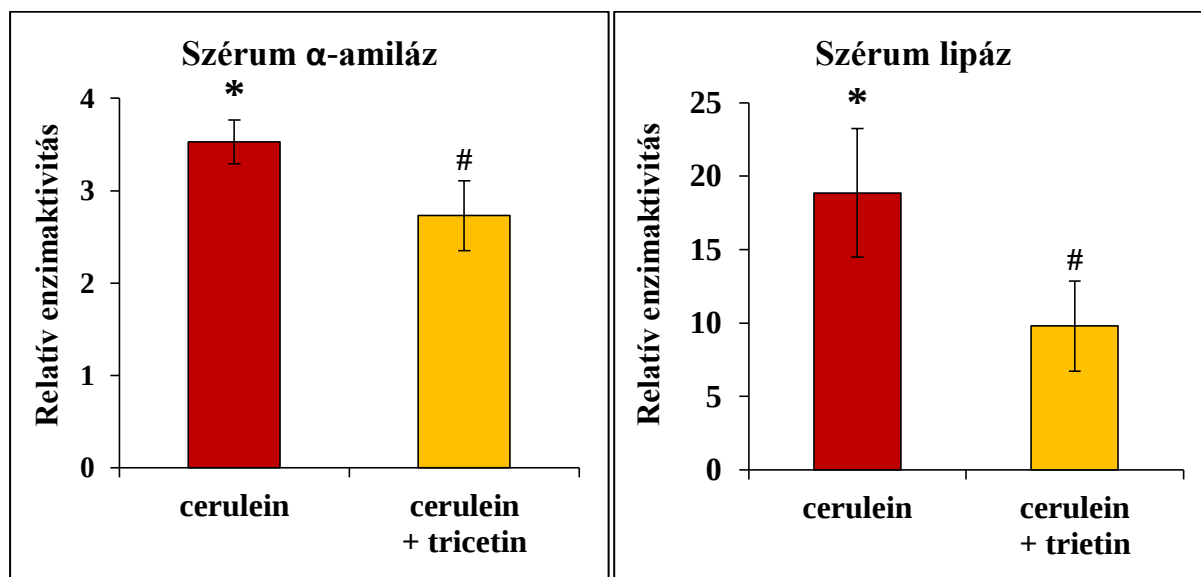
31. ábra: PARiláció vizsgálata a hasnyálmirigy szövetben IF módszerrel. Kék szín: a DAPI festék magi jele, piros szín: PARiláció a magban (A – reprezentatív konfokális mikroszkópos képek (630×-os nagyítás), B – az elvégzett képelemzés eredménye) – A tricetin kezelésben is részesülő egerek 12 és 1 órával a cerulein i.p. oltássorozat ($8 \times 50 \mu\text{g/ttkg}$) megkezdése előtt kaptak TCT i.p. injekciót (10 mg/ttkg). Kék szín: sejtmagok, piros szín: a sejtmagokban megfestett PAR polimerek, skála $20 \mu\text{m}$. – A csoportonkénti 6 hím egér átlaga tapasztalati szórással (SD) ábrázolva, ANOVA + Tukey post hoc próba, * a kontroll állatokhoz képest tapasztalt szignifikáns eltérés, # a ceruleinnel kezelt egerekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés –

V.1.2.6. A tricetin utókezelésként alkalmazva is csökkenti az egerekben a ceruleinnel kiváltott hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságát

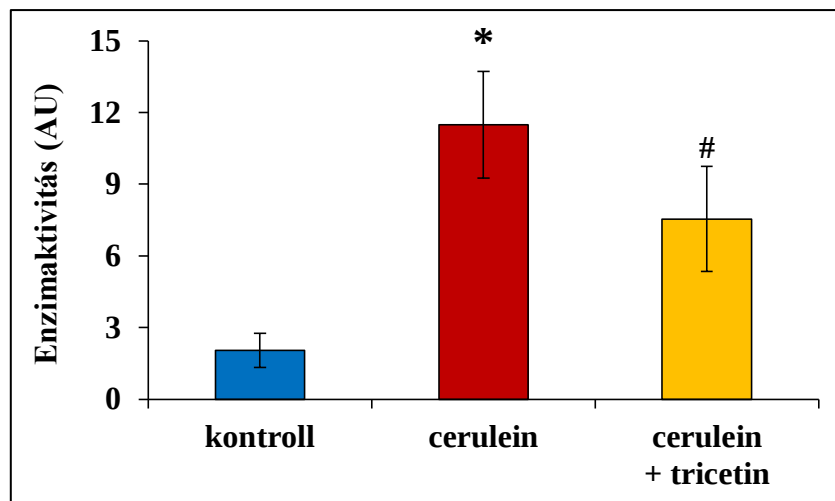
Az tricetin előkezelés pozitív eredményei után azt is meg szeretnénk volna vizsgálni, hogy a flavonoid utókezelésként alkalmazva is csökkenti-e az AP lefolyásának súlyosságát. A gyulladás kiváltására itt is a már korábban bemutatott metódust alkalmaztuk, de a tricetint a

negyedik és ötödik cerulein injekció között (30 mg/ttkg), illetve az utolsó cerulein injekció beadása után (10 mg/ttkg) jutattuk be az egerekbe.

Az utókezelési modellt alkalmazva is azt találtuk, hogy a tricetin kezelés jelentősen csökkentette az acinussejtek károsodását, amint azt az α -amiláz és lipáz enzimek szérumszintjének csökkenése mutatta (32. ábra). Ezen felül a tricetin utókezelésben alkalmazva is szignifikánsan csökkentette a szöveti MPO szintjét, ami ebben az esetben is a granulociták szövetbe történő migrációjának gátlására utal (33. ábra).



32. ábra: *Tricetin utókezelés hatása a szérum α -amiláz és lipáz aktivitására az AP in vivo modelljében* – A tricetin kezelésben is részesülő egerek a cerulein i.p. oltássorozat ($8 \times 50 \mu\text{g/ttkg}$) negyedik és ötödik oltása között, illetve az utolsó oltás után kaptak TCT i.p. injekciót (30 mg/ttkg és 10 mg/ttkg). Mindkét emésztőenzim-vizsgálat eredményének ábrázolásakor a kontroll állatok szérumában tapasztalt enzimszintet 1-nek vettük. – A csoportonkénti 6 hím egér átlaga tapasztalati szórással (SD) ábrázolva, ANOVA + Tukey post hoc próba, * a kontroll állatokhoz képest tapasztalt szignifikáns eltérés, # a ceruleinnel kezelt egerekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés –



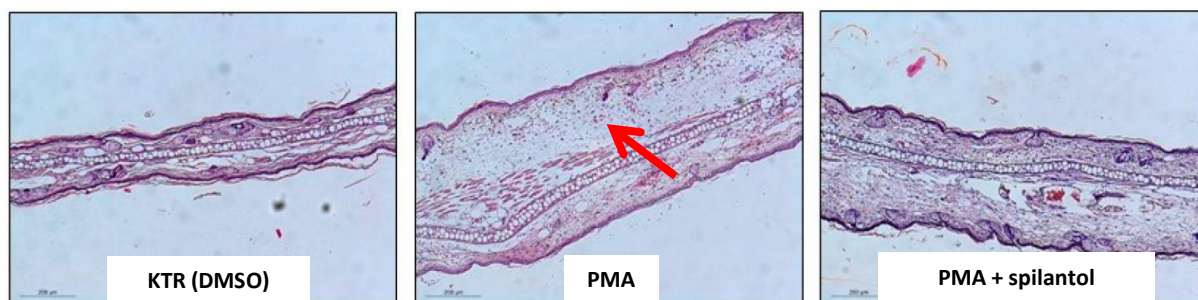
33. ábra: *A vizsgált egerek hasnyálmirigy szövetének MPO aktivitása (tricetin utókezelés) – A tricetin kezelésben is részesülő egerek a cerulein i.p. oltássorozat ($8 \times 50 \mu\text{g/ttkg}$) negyedik és ötödik oltása között, illetve az utolsó oltás után kaptak TCT i.p. injekciót (30 mg/ttkg és 10 mg/ttkg). – A csoportonkénti 6 hím egér átlaga tapasztalati szórással (SD) ábrázolva, ANOVA + Tukey post hoc próba, * a kontroll állatokhoz képest tapasztalt szignifikáns eltérés, # a ceruleinnel kezelt egerekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés –*

V.2. A spilantol hatása *in vivo* gyulladásos modellekben

V.2.1. A spilantol *in vivo* csökkentette a kontakt dermatitisz következtében kialakuló ödémát, és a neutrofil infiltráció mértékét.

Korábbi kísérleteink (Bakondi és mtsai., 2019) megállapították, hogy a spilantol 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. (Renert-Yuval és mtsai., 2019) BALB/c egerek fülére PMA felkenésével bőrirritációt idéztünk elő, a kontroll egereket csak az oldószerrel (DMSO) kezeltük.

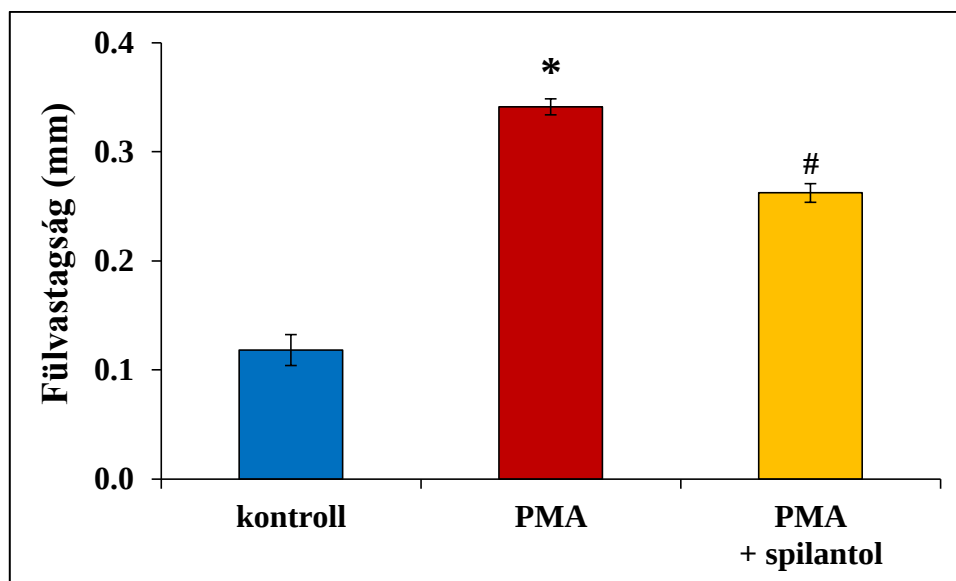
A gyulladás kialakulására utaló duzzanatot az irritálószer felvitelét követő 6. órában vizsgáltuk. A gyulladásos válasz követése érdekében mikrométeres mérőműszerrel megmértük a fülek vastagságát. A fülek hematoxin-eozinnal festett szövettani metszetei kimutatták, hogy a PMA masszív gyulladást idézett elő (34. ábra).



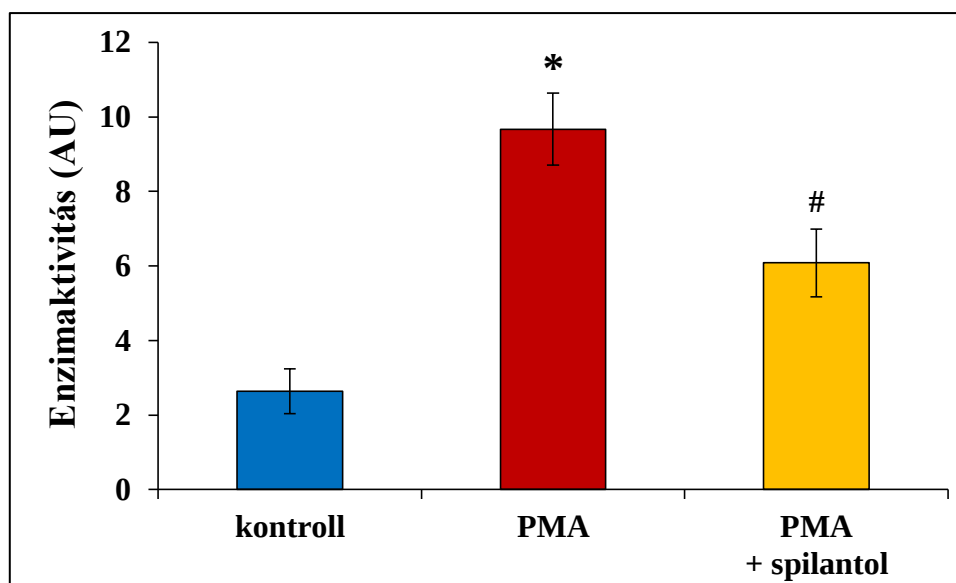
34. ábra: A kontakt dermatitisz *in vivo* modellje (spilantol utókezelés) H&E festett metszeteinek szöveti képe (100×-os nagyítás) – A spilantol kezelésben is részesülő egerek (6 hím és 6 nőstény egér/csoport) 1 órával a 0,05 v/v%-os PMA kezelés után részesültek a SLT kezelésben (10 μ M). Nyíl: kialakult ödéma, skála: 200 μ m. –

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 fül-duzzadást 40%-kal fogta vissza. Kijelenthetjük, hogy a spilantol gátolta az ödémás választ (35. ábra), mint ahogyan az a szöveti metszeteken is megfigyelhető (34. ábra). Amint az a 36. ábrán

látható a minták myeloperoxidáz (MPO) szintjének változásait vizsgálva, a PMA kezelés hatására kialakult leukocita infiltráció mértéke is jelentősen csökkent a spilantollal is kezelt csoportban.



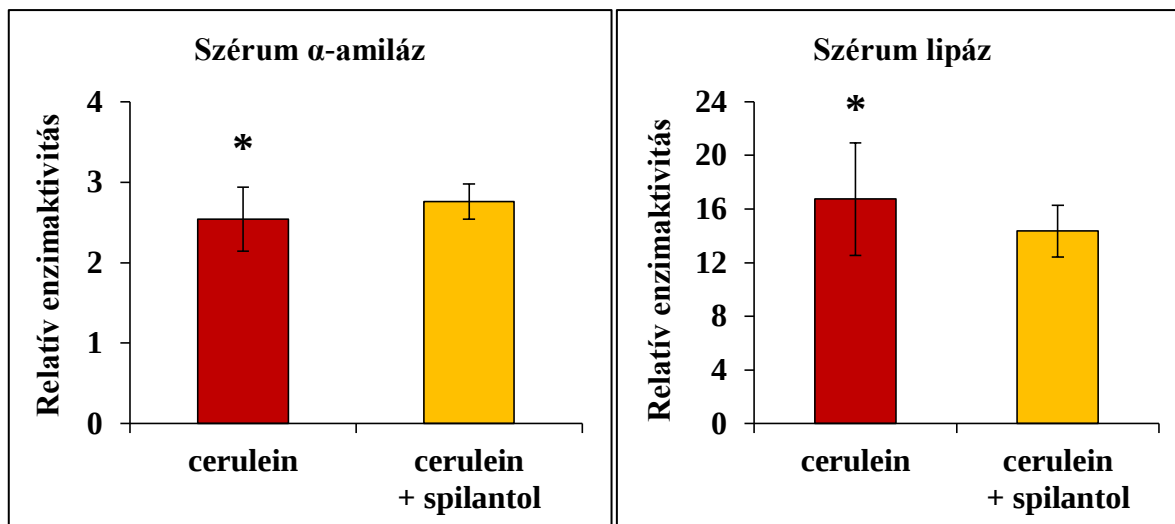
35. ábra: *A kontakt dermatitisz in vivo modelljében a spilantol utókezelés csökkenti a gyulladás által indukált ödémát* – A spilantol kezelésben is részesülő egerek (6 hím és 6 nőstény egér/csoport) 1 órával a 0,05 v/v%-os PMA kezelés után részesültek a SLT kezelésben (10 μ M). – A csoportok átlaga tapasztalati szórással (SD) ábrázolva, ANOVA + Tukey post hoc próba, * a kontroll állatokhoz képest tapasztalt szignifikáns eltérés, # a PMA-val kezelt egerekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés –



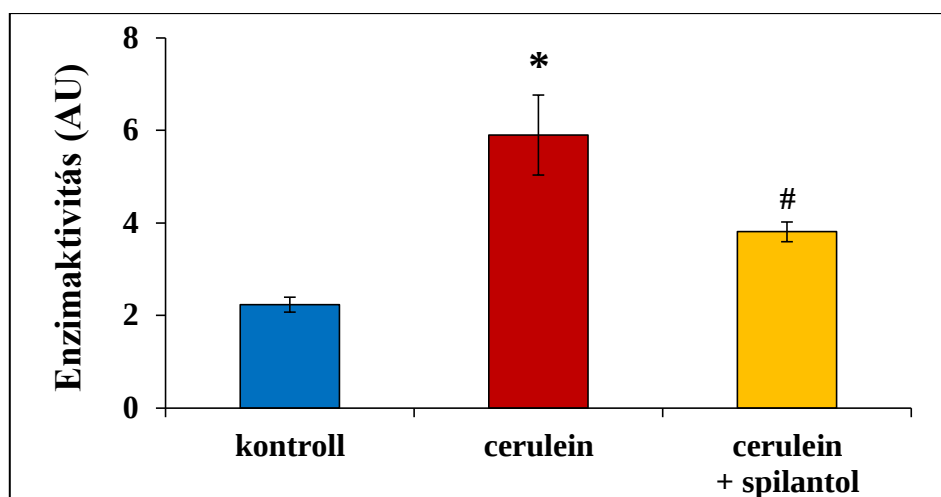
36. ábra: *A kontakt dermatitisz in vivo modelljében a spilantol utókezelés mérsékli a granulocita infiltrációt* – A spilantol kezelésben is részesülő egerek (6 hím és 6 nőstény egér/csoport) 1 órával a 0,05 v/v%-os PMA kezelés után részesültek a SLT kezelésben (10 μ M). – A csoportok átlaga tapasztalati szórással (SD) ábrázolva, ANOVA + Tukey post hoc próba, * a kontroll állatokhoz képest tapasztalt szignifikáns eltérés, # a PMA-val kezelt egerekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés –

V.2.2. A spilantol in vivo csökkentette a hasnyálmirigy-gyulladás következtében kialakuló neutrofil infiltráció mértékét, de a sejtkárosodást nem

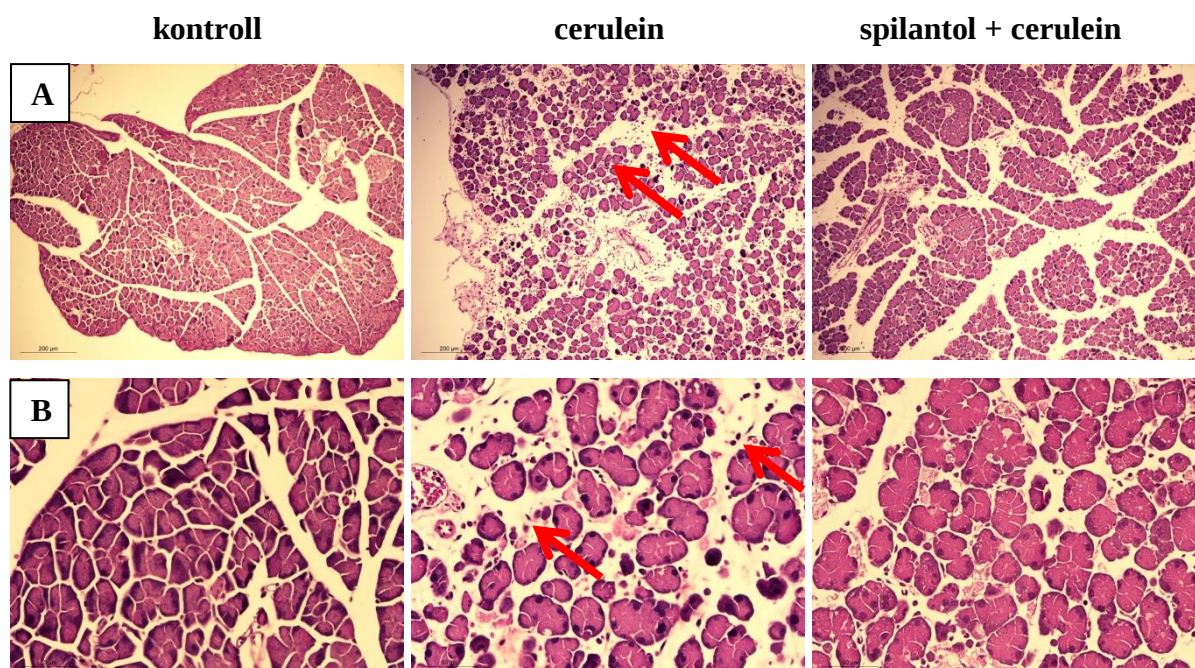
A kontakt dermatitisz vizsgálatainkban kapott pozitív eredményeket követően, szeretettük volna megvizsgálni a spilantol hatását egy jóval összetettebb gyulladásos folyamatban, mint a milyen a hasnyálmirigy-gyulladás is. A pankreatitisz cerulein kezeléssel kiváltott egérmodelljét az anyagok és módszerek 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 (Nomura és mtsai., 2013). A cerulein kezeléssel szignifikáns sejtkárosodást váltottunk ki, melyet az alkalmazott 30 mg/ttkg spilantol kezelés nem csökkentett a vizsgált α -amiláz és lipáz szérumszint alapján (37. ábra). Ezzel ellentétben a cerulein kezelés következtében megnövekedett neutrofil infiltráció mértékét a spilantol kezelés a szöveti mieloperoxidáz szint alapján szignifikánsan csökkentette (38. ábra). 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 illetve a kialakult ödéma mértékét csökkentette (39. ábra).



37. ábra: A spilantol előkezelés nem csökkenti a szérum α-amiláz és lipáz aktivitást az AP in vivo modelljében – A spilantol kezelésben részesülő egerek a cerulein i.p. oltássorozat ($8 \times 50 \mu\text{g/ttkg}$) megkezdése előtt egy órával kaptak SLT i.p. injekciót (30 mg/ttkg) Mindkét emésztőenzim-vizsgálat eredményének ábrázolásakor a kontroll állatok szérumában tapasztalt enzimszintet 1-nek vettük. – A csoportonkénti 14 hím egér eredménye tapasztalati szórással (SD) ábrázolva, ANOVA + Tukey post hoc próba, * a kontroll sejtekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés –



38. ábra: A spilantol előkezelés gátolja a granulociták infiltrációját az AP in vivo modelljében – A spilantol kezelésben is részesülő egerek a cerulein i.p. oltássorozat ($8 \times 50 \mu\text{g/ttkg}$) megkezdése előtt egy órával kaptak SLT i.p. injekciót (30 mg/ttkg). – A csoportonkénti 14 hím egér eredménye tapasztalati szórással (SD) ábrázolva, ANOVA + Tukey post hoc próba, * a kontroll sejtekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés, # a ceruleinnel kezelt egerekhez képest tapasztalt szignifikáns eltérés –



39. ábra: *A spilantol előkezelés védelmet nyújt a hasnyálmirigy szövetben tapasztalható leukocita infiltráció és ödéma kialakulásával szemben az AP in vivo modelljében – A spilantol kezelésben részesülő egerek (14 hím egér/csoport) 1 órával a cerulein i.p. oltássorozat ($8 \times 50 \mu\text{g/ttkg}$) megkezdése előtt kaptak SLT i.p. injekciót (30 mg/ttkg). H&E festett metszetek szöveti képe (A – $100\times$ -os nagyítás skála: $200 \mu\text{m}$; B – $400\times$ -os nagyítás, skála: $50 \mu\text{m}$)*

VI. 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 terápiájában 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 rendszer alkalmas az akut pankreatitisz kulcsfontosságú eseményeinek vizsgálatára mind primer acinussejt-kultúrában, mind pedig *in vivo* állatmodellben. Szuprafiziológias dózisban ez a kolecisztokinin (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 (Kim és mtsai., 2008). A sérült acináris sejtek *in vivo* kommunikálnak a szöveti makrofágokkal, amelyek gyulladásos citokinek és kemokinek termelésével hozzájárulnak az AP patogeneziséhez (Zhao és mtsai., 2016).

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 kaszpáz 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 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 (Gwozdz és mtsai., 1990). 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 gyökkfogó 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 (Forman és mtsai., 2013). 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 (Yu és mtsai., 2014; Dabrowski és mtsai., 1999), 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) (Virág és mtsai., 2013), ami összhangban van az acinussejtek általunk is kimutatott részlegesen nekrotikus halálával AP-ben. Egyes flavonoidokról kimutatták, hogy DNS-alkiláció hatására PARP-gátló hatást fejtenek ki (Geraets és mtsai., 2007). 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 patogeneziséhez (Berger és mtsai., 2017; Ahmad és mtsai., 2020). 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. (Williams és mtsai., 2004)

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 β , IL6, MMP2) aktiválódását. *In vivo* adataink kibővítették ezt a listát a TNF α -val, mint a cerulein által kiváltott gyulladás központi mediátorával (Malleo és mtsai., 2007), melynek expresszióját a TCT gátolta. A TNF α nem indukálódott az acinussejteken végzett kísérletekben, ami összhangban van jelenlegi ismereteinkkel, miszerint az AP-ben ennek a citokinnek a makrofágok a fő forrásai (Gea-Sorlí és mtsai., 2010).

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

A tricetin NF κ B-re gyakorolt hatása feltételezhetően a vegyület PARP-gátló hatásának is köszönhető, mivel a PARP1 az NF κ B koaktivátoraként működik, és a PARP-gátlás/PARP1 knockout az NF κ B aktiváció szuppresszióját okozta különböző modellrendszerekben. (El-Hamoly és mtsai., 2021; Bai és mtsai., 2012; Mabley és mtsai., 2001; Demény és mtsai., 2021)

Annak ellenére, hogy a hasnyálmirigy-gyulladás leginkább vizsgált oka az acinussejtek károsodása, és a mi tricetinnel kapcsolatos vizsgálataink során is őket tanulmányoztuk, nem hagyhatjuk figyelmen kívül azt a tényt, hogy a betegség nem csak ezeknek a sejteknek a sérülése miatt alakul ki. A korai proteáz-aktiváció és az NF κ B-aktiváció az AP alapvető jellemzői; mindkettő párhuzamosan zajlik a betegség manifesztációja során, és erősen befolyásolják egymást. Azonban nemcsak a proteáz és az NF κ B aktiváció játszik kritikus szerepet, hanem az is fontos, hogy milyen sejttípusban történik az aktivációjuk. (Mayerle és mtsai., 2019)

Bár e munka középpontjában a TCT antioxidáns és PARP-gátló hatása állt, meg kell jegyezni, hogy a TCT-nek további hatásai is hozzájárulhatnak a pankreatitisz elleni védelemhez. A hasnyálmirigy iszkémiája domináns szerepet játszik az AP kialakulásában, valamint a betegség súlyos formákba való progressziójában (Gullo és mtsai., 1996; Lonardo és mtsai., 1999; Dembiński és mtsai., 2001). Ezt az állítást alátámasztják azok a megfigyelések, amelyek szerint a hasnyálmirigy vérrellátásának csökkenése növeli az akut pancreatitis súlyosságát (Furukawa és mtsai., 1993), míg a hasnyálmirigy vérrellátásának javulása csökkenti az akut pancreatitis súlyosságát és gyorsítja a hasnyálmirigy regenerációját (Warzecha és mtsai., 2007; Maduzia és mtsai., 2020). Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a flavonoid kvercetin (Vovkun és mtsai., 1994; Datsyuk, 2016) 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 (ábécéfű, *A. oleracea*) legpotensebb sejtvédő hatású vegyülete, a **spilantol** (Rondanelli és mtsai., 2019) 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 poszttranszlációs 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 termelődés gátló hatásával összefüggésben – a PMA-val indukált kontakt dermatitisz egérmódeljében gyulladáscsökkentő szernek mutatkozott. A vegyület jelentősen csökkentette a fülödémát és a szöveti neutrofil granulocita infiltrációt. 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 spilantol gátolja az adhézións molekulák expresszióját (Huang CH és mtsai., 2018; Huang WC és mtsai., 2018) és többek között ezen események járulhatnak hozzá a gyulladásos sejt vándorlás csökkenéséhez a spilantollal kezelt egerekben.

A cerulein indukálta akut pankreatitisz modellben már vizsgálták az iNOS aktiválódását (Choi és mtsai., 2016; Qui és mtsai., 2001; Pan és mtsai., 2018), és azt találták, hogy az acináris sejtekből induló gyulladásos folyamatokban is jellemző az enzim emelkedett szintje. A spilantol – habár kísérletileg nem igazoltan, de valószínűsíthetően 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 sejt károsodás kialakulásában az iNOS emelkedett szintje és így a NO képződése nem játszik kardinális szerepet. A gyulladásos sejt vándorlás csökkenésének hátterében egyebek között itt is a spilantol adhézións molekulák expresszióját gátló képessége állhat.

Összegzőképpen elmondható, hogy míg a megvizsgált két növényi hatóanyag közül a spilantol csupán a neutrofil infiltrációt és a kialakult ödéma mértékét csökkentette, addig a tricetin a sejtkárosodás mértékét is egyértelműen visszafogta, s így 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 e flavonoid akut pankreatitiszben kifejtett védő hatásában.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

Az akut hasnyálmirigy-gyulladás (AP) növekvő gyakorisága, potenciálisan életveszélyes lefolyása és szövödményei miatt világszerte nagy kihívást jelent az egészségügyi rendszerek számára. Speciális célzott kezelési módok 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 beszámolók 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 H₂O₂ által kiváltott acináris sejthalállal szemben. Az IL1 β , 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 β , IL6 és TNF α 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 adjuváns kezelési lehetőségként érdemes lehet figyelembe venni az AP terápiájában.

VIII. SUMMARY

With its growing incidence and potentially life-threatening course and complications, acute pancreatitis (AP) poses a great challenge to the health systems worldwide. Specific targeted therapies are not available prompting efforts to identify new pathways and novel therapeutic approaches.

Alkylamides and flavonoids comprise several groups of biologically active compounds with wide ranging effects. Spilanthol (an alkylamide) and tricetin (a flavonoid) have not yet been investigated in pancreatitis, but reports in the literature have demonstrated a wide range of biological activities, including anti-inflammatory effects. In the present study, we evaluated the potential therapeutic effects of spilanthol (SLT) and tricetin (TCT) in acute pancreatitis.

Tricetin protected isolated primary acinar cells against the cytotoxic effect of the CCK-analogue cerulein. The compound significantly reduced PARylation in the cells exposed to oxidative stress. The effects of TCT were probably not related to its potential antioxidant activity, as it did not protect against H₂O₂-induced acinar cell death despite its radical scavenging activity. The cerulein-induced expression of IL1 β , IL6 and matrix metalloproteinase 2 (MMP2) was also significantly reduced by TCT treatment.

In vivo tricetin suppressed pancreatic edema formation, and protected pancreatic acinar cells from death. In addition, TCT inhibited the expression of IL1 β , IL6 and TNF α in pancreatic tissue and restrained oxidative DNA damage, as indicated by a decrease in the level of PAR, a product of the enzyme poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1). *In vivo* spilanthol didn't protect the pancreatic cells of cerulein-treated mice from cell death, but significantly attenuated inflammatory edema and neutrophil granulocyte infiltration.

Our data suggest that tricetin can be considered as a potential adjuvant treatment option for AP.

IX. TÁRGYSZAVAK / KEY WORDS

hasnyálmirigy

akut hasnyálmirigy-gyulladás

cerulein

spilantol

tricetin

gyulladás

sejthalál

nekrózis

citoprotektivitás

oxidatív stressz

antioxidáns hatás

poli(ADP-ribóz) polimeráz

PARiláció

pancreas

acute pancreatitis

cerulein

spilanthol

tricetin

inflammation

cell death

necrosis

cytoprotection

oxidative stress

antioxidant effect

poly(ADP-ribose) polymerase

PARylation

X. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek és egyben a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézete igazgatójának, Prof. Dr. Virág Lászlónak, aki lehetővé tette, hogy kutatásomat az intézetnél, a munkacsoportja tagjaként folytathassam, továbbá nagyon köszönöm a munkámban nyújtott szakmai segítségét és támogatását.

Kiemelt köszönetemet szeretném kifejezni munkatársamnak és barátomnak Hajnádý Zoltánnak, akivel a kutatás kezdete óta közösen viseltük annak fáradalmait, és aki nélkül nem jöhetett volna létre ez a dolgozat.

Köszönettel tartozom dr. Regdon Zsoltnak és dr. Hegedűs Csabának a HCA kísérletek elvégzésében, illetve a kaszpáz aktivitás mérésében nyújtott segítségükért és a kísérletek során adott tanácsaikért, továbbá dr. Demény Máté Ágostonnak, aki meglátásaival szintén hozzájárult a kísérletek megtervezéséhez és kivitelezéséhez.

Külön köszönettel tartozom Herbály Mihálynénak a szövettani munkákban nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért, dr. Balázs Lídiának a szövettani metszetek kiértékeléséért és Tankáné Farkas Andreának a szövettani munkákban illetve laborban nyújtott állhatatos segítségéért és támogatásáért.

Ezen felül hálás vagyok a „Virág labor” minden munkatársának, akik a kutatásom során segítséget nyújtottak és az Orvosi Vegytani Intézet valamennyi dolgozójának, akik bármilyen módon, akár csak egy jó szóval is hozzájárultak a dolgozat létrejöttéhez.

Nem utolsó sorban pedig hálásan mondok köszönetet Családomnak, kiemelten szeretett Feleségemnek és Szüleimnek, hogy támogattak és bíztattak a mögöttem álló években.

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.

XI. IRODALOMJEGYZÉK

Abdin AA, El-Hamid MA, El-Seoud SH, Balaha MF. Effect of pentoxifylline and/or alpha lipoic acid on experimentally induced acute pancreatitis. *Eur J Pharmacol.* 2010 Sep 25;643(2-3):289-96. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.06.020. Epub 2010 Jun 21. PMID: 20599924.

Abeyesiri G.R.P.I., Dharmadasa R.M., Abeysinghe D.C., Samarasinghe K., Screening of phytochemical, physico-chemical and bioactivity of different parts of *Acemella oleraceae* Murr. (Asteraceae), a natural remedy for toothache, *Ind. Crops Prod.* 50 (2013) 852–856. doi:10.1016/J.INDCROP.2013.08.043.

Abu-El-Haija M, Gukovskaya AS, Andersen DK, Gardner TB, Hegyi P, Pandol SJ, Papachristou GI, Saluja AK, Singh VK, Uc A, Wu BU. Accelerating the Drug Delivery Pipeline for Acute and Chronic Pancreatitis: Summary of the Working Group on Drug Development and Trials in Acute Pancreatitis at the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Workshop. *Pancreas.* 2018 Nov/Dec;47(10):1185-1192. doi: 10.1097/MPA.0000000000001175. PMID: 30325856; PMCID: PMC6692135.

Agah S, Akbari A, Sadeghi E, Morvaridzadeh M, Basharat Z, Palmowski A, Heshmati J. Resveratrol supplementation and acute pancreatitis: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother.* 2021 May;137:111268. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111268. Epub 2021 Jan 22. PMID: 33493966.

Aghdassi, Ali A.(2016).Pathogenesis of Chronic Pancreatitis. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2016.16

Aghani, Elham.(2014). Acute Pancreatitis. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2014.14

Aghani, Elham.(2015). Introduction to Pancreatic Disease: Chronic Pancreatitis. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2015.3

Ahmad A, Haas De Mello A, Szczesny B, Törö G, Marcatti M, Druzhyna N, Liaudet L, Tarantini S, Salomao R, Garcia Soriano F, Szabo C. Effects of the Poly(ADP-Ribose)

Polymerase Inhibitor Olaparib in Cerulein-Induced Pancreatitis. *Shock*. 2020 May;53(5):653-665. doi: 10.1097/SHK.0000000000001402. PMID: 31274831; PMCID: PMC6944774.

Alan F. Barbosa, Mário G. de Carvalho, Robert E. Smith, Armando U.O. Sabaa-Srur, Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Volume 26, Issue 1, 2016, Pages 128-133, ISSN 0102-695X, <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.024>.

Albers T, and Sabbatini Maria E. (2020). Cyclic Nucleotides as Mediators of Acinar and Ductal Function. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2020.13

Alcón S, Rosado JA, García LJ, Pariente JA, Salido GM, Pozo MJ. Secretin potentiates guinea pig pancreatic response to cholecystokinin by a cholinergic mechanism. *Can J Physiol Pharmacol*. 1996 Dec;74(12):1342-50. PMID: 9047045.

Anagnostides A, Chadwick VS, Selden AC, Maton PN. Sham feeding and pancreatic secretion. Evidence for direct vagal stimulation of enzyme output. *Gastroenterology*. 1984 Jul;87(1):109-14. PMID: 6724252.

Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*. 2005 Jan;81(1 Suppl):317S-325S. doi: 10.1093/ajcn/81.1.317S. PMID: 15640497.

Arunachalam K, Yang X, San TT. *Tinospora cordifolia* (Willd.) Miers: Protection mechanisms and strategies against oxidative stress-related diseases. *J Ethnopharmacol*. 2022 Jan 30;283:114540. doi: 10.1016/j.jep.2021.114540. Epub 2021 Sep 9. PMID: 34509604.

Apte, Minotti V. Pirola, Romano C. Wilson, Jeremy S. (2016). Alcohol and the Pancreas. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2016.17

Aziz N, Kim MY, Cho JY. Anti-inflammatory effects of luteolin: A review of in vitro, in vivo, and in silico studies. *J Ethnopharmacol*. 2018 Oct 28;225:342-358. doi: 10.1016/j.jep.2018.05.019. Epub 2018 May 22. PMID: 29801717.

Aziz NM, Kamel MY, Rifaai RA. Effects of hemin, a heme oxygenase-1 inducer in L-arginine-induced acute pancreatitis and associated lung injury in adult male albino rats. *Endocr Regul.* 2017 Jan 1;51(1):20-30. doi: 10.1515/enr-2017-0003. PMID: 28222024.

Babic, Tanja and Travagli, R. Alberto. (2016). Neural Control of the Pancreas. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2016.27

Bača I, Feurle GE, Haas M, Mernitz T. Interaction of neurotensin, cholecystokinin, and secretin in the stimulation of the exocrine pancreas in the dog. *Gastroenterology.* 1983 Mar;84(3):556-61. PMID: 6295872.

Badalov N, Baradarian R, Iswara K, Li J, Steinberg W, Tenner S. Drug-induced acute pancreatitis: an evidence-based review. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007 Jun;5(6):648-61; quiz 644. doi: 10.1016/j.cgh.2006.11.023. Epub 2007 Mar 28. PMID: 17395548.

Bai P, Hegedus C, Szabó E, Gyüre L, Bakondi E, Brunyánszki A, Gergely S, Szabó C, Virág L. Poly(ADP-ribose) polymerase mediates inflammation in a mouse model of contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol.* 2009 Jan;129(1):234-8. doi: 10.1038/jid.2008.196. Epub 2008 Jul 17. PMID: 18633442.

Bai P, Virág L. Role of poly(ADP-ribose) polymerases in the regulation of inflammatory processes. *FEBS Lett.* 2012 Nov 2;586(21):3771-7. doi: 10.1016/j.febslet.2012.09.026. Epub 2012 Sep 26. PMID: 23022557.

Bakondi E, Singh SB, Hajnády Z, Nagy-Pénzes M, Regdon Z, Kovács K, Hegedűs C, Madácsy T, Maléth J, Hegyi P, Demény MÁ, 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.* 2019 Sep 3;20(17):4308. doi: 10.3390/ijms20174308. PMID: 31484391; PMCID: PMC6747447.

Becker S, Niebel W, Singer MV. Nervous control of gastric and pancreatic secretory response to 2-deoxy-D-glucose in the dog. *Digestion.* 1988;39(3):187-96. doi: 10.1159/000199624. PMID: 3209002.

Berger NA, Besson VC, Boulares AH, Bürkle A, Chiarugi A, Clark RS, Curtin NJ, Cuzzocrea S, Dawson TM, Dawson VL, Haskó G, Liaudet L, Moroni F, Pacher P, Radermacher P, Salzman AL, Snyder SH, Soriano FG, Strosznajder RP, Sümegi B, Swanson RA, Szabo C. Opportunities for the repurposing of PARP inhibitors for the therapy of non-oncological diseases. *Br J Pharmacol*. 2018 Jan;175(2):192-222. doi: 10.1111/bph.13748. Epub 2017 Mar 26. PMID: 28213892; PMCID: PMC5758399.

Bilski J, Konturek PK, Krzyzek E, Konturek SJ. Feedback control of pancreatic secretion in rats. Role of gastric acid secretion. *J Physiol Pharmacol*. 1992 Sep;43(3):237-57. PMID: 1493255.

Bísaro de Lorenc L, Ramos AM, Sánchez MC, Montenegro R, Chiabrando GA. Structural evaluation of plasma alpha2-macroglobulin in acute pancreatitis. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43(11):1183-9. doi: 10.1515/CCLM.2005.205. PMID: 16232083.

Booth V, Keizer DW, Kamphuis MB, Clark-Lewis I, Sykes BD. The CXCR3 binding chemokine IP-10/CXCL10: structure and receptor interactions. *Biochemistry*. 2002 Aug 20;41(33):10418-25. doi: 10.1021/bi026020q. PMID: 12173928.

Brock C, Nielsen LM, Lelic D, Drewes AM. Pathophysiology of chronic pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2013 Nov 14;19(42):7231-40. doi: 10.3748/wjg.v19.i42.7231. PMID: 24259953; PMCID: PMC3831204.

Brouillard R, Cheminat A. Flavonoids and plant color. *Prog Clin Biol Res*. 1988;280:93-106. PMID: 3174709.

Cai L, Zhang X, Hou M, Gao F. Natural flavone tricetin suppresses oxidized LDL-induced endothelial inflammation mediated by Egr-1. *Int Immunopharmacol*. 2020 Mar;80:106224. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106224. Epub 2020 Jan 25. PMID: 31991371.

Campos MG, Webby RF, Markham KR. The unique occurrence of the flavone aglycone tricetin in Myrtaceae pollen. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2002 Sep-Oct;57(9-10):944-6. doi: 10.1515/znc-2002-9-1031. PMID: 12440738.

Cargill JM, Wormsley KG. Effect of gastric distension on human pancreatic secretion. *Acta Hepatogastroenterol (Stuttg)*. 1979 Jun;26(3):235-8. PMID: 484173.

Cavaillon JM. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2001 Jun;47(4):695-702. PMID: 11502077.

Chakraborty A, Devi BR, Sanjebam R, Khumbong S, Thokchom IS. Preliminary studies on local anesthetic and antipyretic activities of *Spilanthes acmella* Murr. in experimental animal models. *Indian J Pharmacol*. 2010 Oct;42(5):277-9. doi: 10.4103/0253-7613.70106. PMID: 21206617; PMCID: PMC2959208.

Chandra, Rashmi and Liddle, Rodger A. (2018). Cholecystokinin. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2018.18

Chandra, Rashmi, and Liddle, Rodger A. (2020). Regulation of Pancreatic Secretion. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2020.14

Chang PY, Hsieh MJ, Hsieh YS, Chen PN, Yang JS, Lo FC, Yang SF, Lu KH. Tricetin inhibits human osteosarcoma cells metastasis by transcriptionally repressing MMP-9 via p38 and Akt pathways. *Environ Toxicol*. 2017 Aug;32(8):2032-2040. doi: 10.1002/tox.22380. Epub 2016 Nov 8. PMID: 27860196.

Chao R, Chow JM, Hsieh YH, Chen CK, Lee WJ, Hsieh FK, Yu NY, Chou MC, Cheng CW, Yang SF, Chien MH. Tricetin suppresses the migration/invasion of human glioblastoma multiforme cells by inhibiting matrix metalloproteinase-2 through modulation of the expression and transcriptional activity of specificity protein 1. *Expert Opin Ther Targets*. 2015;19(10):1293-306. doi: 10.1517/14728222.2015.1075509. Epub 2015 Aug 6. PMID: 26245494.

Chen, Xuequn. (2021). Protein Composition and Biogenesis of the Pancreatic Zymogen Granules. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2021.03

Chien MH, Chow JM, Lee WJ, Chen HY, Tan P, Wen YC, Lin YW, Hsiao PC, Yang SF. Tricetin Induces Apoptosis of Human Leukemic HL-60 Cells through a Reactive Oxygen

Species-Mediated c-Jun N-Terminal Kinase Activation Pathway. *Int J Mol Sci.* 2017 Jul 31;18(8):1667. doi: 10.3390/ijms18081667. PMID: 28758971; PMCID: PMC5578057.

Choi SB, Bae GS, Jo IJ, Wang S, Song HJ, Park SJ. Berberine inhibits inflammatory mediators and attenuates acute pancreatitis through deactivation of JNK signaling pathways. *Mol Immunol.* 2016 Jun;74:27-38. doi: 10.1016/j.molimm.2016.04.011. Epub 2016 May 2. PMID: 27148818.

Clemens DL, Wells MA, Schneider KJ, Singh S. Molecular mechanisms of alcohol associated pancreatitis. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2014 Aug 15;5(3):147-57. doi: 10.4291/wjgp.v5.i3.147. PMID: 25133017; PMCID: PMC4133514.

Cook N.C., Samman S., Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, Volume 7, Issue 2, 1996, Pages 66-76, ISSN 0955-2863, [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(95\)00168-9](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(95)00168-9).

Cooley, Michele M, Jones, Elaina K, Gorelick, Fred S, and Groblewski, Guy E. (2020). Pancreatic Acinar Cell Protein Synthesis, Intracellular Transport, and Export. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2020.15

Criddle DN. The role of fat and alcohol in acute pancreatitis: A dangerous liaison. *Pancreatology.* 2015 Jul;15(4 Suppl):S6-S12. doi: 10.1016/j.pan.2015.02.009. Epub 2015 Mar 28. PMID: 25845855.

Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;147:1-73. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.02.005. Epub 2017 Mar 22. PMID: 28413025; PMCID: PMC5430303.

Cuzzocrea S. Shock, inflammation and PARP. *Pharmacol Res.* 2005 Jul;52(1):72-82. doi: 10.1016/j.phrs.2005.02.016. PMID: 15911335.

Czakó L, Hegyi P, Rakonczay Z Jr, Wittmann T, Otsuki M. Interactions between the endocrine and exocrine pancreas and their clinical relevance. *Pancreatology*. 2009;9(4):351-9. doi: 10.1159/000181169. Epub 2009 May 18. PMID: 19454837.

Dabrowski A, Konturek SJ, Konturek JW, Gabryelewicz A. Role of oxidative stress in the pathogenesis of caerulein-induced acute pancreatitis. *Eur J Pharmacol*. 1999 Jul 14;377(1):1-11. doi: 10.1016/s0014-2999(99)00421-5. PMID: 10448919.

Dale WE, Turkelson CM, Solomon TE. Role of cholecystokinin in intestinal phase and meal-induced pancreatic secretion. *Am J Physiol*. 1989 Nov;257(5 Pt 1):G782-90. doi: 10.1152/ajpgi.1989.257.5.G782. PMID: 2480719.

Dallazen JL, Maria-Ferreira D, da Luz BB, Nascimento AM, Cipriani TR, de Souza LM, Glugoski LP, Silva BJG, Geppetti P, de Paula Werner MF. Distinct mechanisms underlying local antinociceptive and pronociceptive effects of natural alkylamides from *Acmella oleracea* compared to synthetic isobutylalkyl amide. *Fitoterapia*. 2018 Nov;131:225-235. doi: 10.1016/j.fitote.2018.11.001. Epub 2018 Nov 7. PMID: 30414462.

Datsyuk OI. [IMPACT OF QUERCETIN ON SYSTEMIC AND SPLANCHNIC BLOOD CIRCULATION IN A COMPLEX OF PREOPERATIVE PREPARATION IN PATIENTS, SUFFERING AN ACUTE PANCREATITIS]. *Klin Khir*. 2016 Jan;(1):13-5. Ukrainian. PMID: 27249917.

David KK, Andrabi SA, Dawson TM, Dawson VL. Parthanatos, a messenger of death. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009 Jan 1;14:1116-28. doi: 10.2741/3297. PMID: 19273119; PMCID: PMC4450718.

De Spiegeleer B, Boonen J, Malysheva SV, Mavungu JD, De Saeger S, Roche N, Blondeel P, Taevernier L, Veryser L. Skin penetration enhancing properties of the plant N-alkylamide spilanthol. *J Ethnopharmacol*. 2013 Jun 21;148(1):117-25. doi: 10.1016/j.jep.2013.03.076. Epub 2013 Apr 9. PMID: 23583736.

Dembiński A, Warzecha Z, Ceranowicz P, Stachura J, Tomaszewska R, Konturek SJ, Sendur R, Dembiński M, Pawlik WW. Pancreatic damage and regeneration in the course of ischemia-

reperfusion induced pancreatitis in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2001 Jun;52(2):221-35. PMID: 11453102.

Demcsák A, Soós A, Kincses L, Capunge I, Minkov G, Kovacheva-Slavova M, Nakov R, Wu D, Huang W, Xia Q, Deng L, Hollenbach M, Schneider A, Hirth M, Ioannidis O, Vincze Á, Bajor J, Sarlós P, Czakó L, Illés D, Izbéki F, Gajdán L, Papp M, Hamvas J, Varga M, Kanizsai P, Bóna E, Mikó A, Váncsa S, Juhász MF, Ocskay K, Darvasi E, Miklós E, Erőss B, Szentesi A, Párniczky A, Casadei R, Ricci C, Ingaldi C, Mastrangelo L, Jovine E, Cennamo V, Marino MV, Barauskas G, Ignatavicius P, Pelaez-Luna M, Rios AS, Turcan S, Tcaciuc E, Małecká-Panas E, Zatorski H, Nunes V, Gomes A, Gonçalves TC, Freitas M, Constantino J, Sá M, Pereira J, Mateescu B, Constantinescu G, Sandru V, Negoî I, Ciubotaru C, Negoita V, Bunduc S, Gheorghe C, Barbu S, Tantau A, Tantau M, Dumitru E, Suceveanu AI, Tocia C, Gherbon A, Litvin A, Shirinskaya N, Rabotyagova Y, Bezmarevic M, Hegyi PJ, Han J, Rodriguez-Oballe JA, Salas IM, Comas EP, Garcia DI, Cuadrado AJ, Castiñeira AQ, Chang YT, Chang MC, Kchaou A, Tlili A, Kacar S, Gökbulut V, Duman D, Kani HT, Altintas E, Chooklin S, Chuklin S, Gougol A, Papachristou G, Hegyi P. Acid suppression therapy, gastrointestinal bleeding and infection in acute pancreatitis - An international cohort study. *Pancreatology.* 2020 Oct;20(7):1323-1331. doi: 10.1016/j.pan.2020.08.009. Epub 2020 Aug 22. PMID: 32948430.

Demény MA, Virág L. The PARP Enzyme Family and the Hallmarks of Cancer Part 2: Hallmarks Related to Cancer Host Interactions. *Cancers (Basel).* 2021 Apr 24;13(9):2057. doi: 10.3390/cancers13092057. PMID: 33923319; PMCID: PMC8123211.

Dermane F., Passaro G., Use of an *Acmella oleracea* extract for the botulinum toxin-like effect thereof in an anti-wrinkle cosmetic composition, 2009. doi:10.1016/j.(73).

Dixit, Ajay. Dawra, Rajinder K. Dudeja, Vikas. Saluja, Ashok K. (2016). Role of trypsinogen activation in genesis of pancreatitis. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2016.25

Dubey S, Maity S, Singh M, Saraf SA, Saha S. Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology of *Spilanthes acmella*: A Review. *Adv Pharmacol Sci.* 2013;2013:423750. doi: 10.1155/2013/423750. Epub 2013 Nov 26. PMID: 24371437; PMCID: PMC3858870.

Dmitrieva OS, Shilovskiy IP, Khaitov MR, Grivennikov SI. Interleukins 1 and 6 as Main Mediators of Inflammation and Cancer. *Biochemistry (Mosc)*. 2016 Feb;81(2):80-90. doi: 10.1134/S0006297916020024. PMID: 27260388.

Elias RJ, Kellerby SS, Decker EA. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2008 May;48(5):430-41. doi: 10.1080/10408390701425615. PMID: 18464032.

Elufioye TO, Habtemariam S, Adejare A. Chemistry and Pharmacology of Alkylamides from Natural Origin. *Rev Bras Farmacogn*. 2020 Oct 9:1-19. doi: 10.1007/s43450-020-00095-5. Epub ahead of print. PMID: 33071385; PMCID: PMC7546144.

El-Hamoly T, Hajnády Z, Nagy-Pénzes M, Bakondi E, Regdon Z, Demény MA, Kovács K, Hegedűs C, Abd El-Rahman SS, Szabó É, Maléth J, Hegyi P, Virág L. Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Promotes Inflammation and Fibrosis in a Mouse Model of Chronic Pancreatitis. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 30;22(7):3593. doi: 10.3390/ijms22073593. PMID: 33808340; PMCID: PMC8037143.

Forman HJ, Davies KJ, Ursini F. How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2014 Jan;66:24-35. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.045. Epub 2013 Jun 6. Erratum in: *Free Radic Biol Med*. 2014 Sep;74:307. PMID: 23747930; PMCID: PMC3852196.

Furukawa M, Kimura T, Sumii T, Yamaguchi H, Nawata H. Role of local pancreatic blood flow in development of hemorrhagic pancreatitis induced by stress in rats. *Pancreas*. 1993 Jul;8(4):499-505. doi: 10.1097/00006676-199307000-00015. PMID: 7689731.

Gašić U, Ćirić I, Pejčić T, Radenković D, Djordjević V, Radulović S, Tešić Ž. Polyphenols as Possible Agents for Pancreatic Diseases. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Jun 23;9(6):547. doi: 10.3390/antiox9060547. PMID: 32585831; PMCID: PMC7346180.

Ge Q, Chen L, Tang M, Zhang S, Liu L, Gao L, Ma S, Kong M, Yao Q, Feng F, Chen K. Analysis of mulberry leaf components in the treatment of diabetes using network

pharmacology. *Eur J Pharmacol.* 2018 Aug 15;833:50-62. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.05.021. Epub 2018 May 18. PMID: 29782863.

Gea-Sorlí S, Closa D. Role of macrophages in the progression of acute pancreatitis. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 2010 Oct 6;1(5):107-11. doi: 10.4292/wjgpt.v1.i5.107. PMID: 21577304; PMCID: PMC3091151.

Geraets L, Haegens A, Brauers K, Haydock JA, Vernooy JH, Wouters EF, Bast A, Hageman GJ. Inhibition of LPS-induced pulmonary inflammation by specific flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 May 8;382(3):598-603. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.03.071. Epub 2009 Mar 16. PMID: 19292976.

Geraets L, Moonen HJ, Brauers K, Wouters EF, Bast A, Hageman GJ. Dietary flavones and flavonoles are inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase-1 in pulmonary epithelial cells. *J Nutr.* 2007 Oct;137(10):2190-5. doi: 10.1093/jn/137.10.2190. PMID: 17884996.

Gerbino A, Schena G, Milano S, Milella L, Barbosa AF, Armentano F, Procino G, Svelto M, Carmosino M. Spilanthol from *Acmella Oleracea* Lowers the Intracellular Levels of cAMP Impairing NKCC2 Phosphorylation and Water Channel AQP2 Membrane Expression in Mouse Kidney. *PLoS One.* 2016 May 23;11(5):e0156021. doi: 10.1371/journal.pone.0156021. PMID: 27213818; PMCID: PMC4877099.

Gonoi W, Akai H, Hagiwara K, Akahane M, Hayashi N, Maeda E, Yoshikawa T, Tada M, Uno K, Ohtsu H, Koike K, Ohtomo K. Pancreas divisum as a predisposing factor for chronic and recurrent idiopathic pancreatitis: initial in vivo survey. *Gut.* 2011 Aug;60(8):1103-8. doi: 10.1136/gut.2010.230011. Epub 2011 Feb 15. PMID: 21325173.

Goral V. Pancreatic Cancer: Pathogenesis and Diagnosis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(14):5619-24. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.14.5619. PMID: 26320426.

Gorelick FS, Thrower E. The acinar cell and early pancreatitis responses. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009 Nov;7(11 Suppl):S10-4. doi: 10.1016/j.cgh.2009.07.036. PMID: 19896090; PMCID: PMC3073378.

Gout J, Pommier RM, Vincent DF, Kaniewski B, Martel S, Valcourt U, Bartholin L. Isolation and culture of mouse primary pancreatic acinar cells. *J Vis Exp*. 2013 Aug 13;(78):50514. doi: 10.3791/50514. PMID: 23979477; PMCID: PMC3855917.

Guda, Nalini M. Nøjgaard, Camilla. (2015). Recurrent acute pancreatitis and progression to chronic pancreatitis. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2015.39

Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol*. 2020 Mar;94(3):651-715. doi: 10.1007/s00204-020-02689-3. Epub 2020 Mar 16. PMID: 32180036.

Gullo L, Cavicchi L, Tomassetti P, Spagnolo C, Freyrie A, D'Addato M. Effects of ischemia on the human pancreas. *Gastroenterology*. 1996 Oct;111(4):1033-8. doi: 10.1016/s0016-5085(96)70072-0. PMID: 8831599.

Gullo L, Migliori M, Oláh A, Farkas G, Levy P, Arvanitakis C, Lankisch P, Beger H. Acute pancreatitis in five European countries: etiology and mortality. *Pancreas*. 2002 Apr;24(3):223-7. doi: 10.1097/00006676-200204000-00003. PMID: 11893928.

Gwozdz GP, Steinberg WM, Werner M, Henry JP, Pauley C. Comparative evaluation of the diagnosis of acute pancreatitis based on serum and urine enzyme assays. *Clin Chim Acta*. 1990 Mar 15;187(3):243-54. doi: 10.1016/0009-8981(90)90109-6. PMID: 2323064.

Hagiwara S, Iwasaka H, Shingu C, Matsumoto S, Uchida T, Noguchi T. Antithrombin III prevents cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Pancreas*. 2009 Oct;38(7):746-51. doi: 10.1097/MPA.0b013e3181aba9fa. PMID: 19546838.

Hamada, Shin. Masamune, Atsushi. Shimosegawa, Tooru. (2015). Pancreatic fibrosis. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2015.42

Hart PA, Bellin MD, Andersen DK, Bradley D, Cruz-Monserrate Z, Forsmark CE, Goodarzi MO, Habtezion A, Korc M, Kudva YC, Pandol SJ, Yadav D, Chari ST; Consortium for the Study of Chronic Pancreatitis, Diabetes, and Pancreatic Cancer(CPDPC). Type 3c (pancreatogenic) diabetes mellitus secondary to chronic pancreatitis and pancreatic cancer.

Lancet Gastroenterol Hepatol. 2016 Nov;1(3):226-237. doi: 10.1016/S2468-1253(16)30106-6. Epub 2016 Oct 12. PMID: 28404095; PMCID: PMC5495015.

Hart, PA., and Conwell, Darwin L. 2021. Secretion of the Human Exocrine Pancreas in Health and Disease. Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base, DOI: 10.3998/panc.2021.02

Hegyi P, Perides G, Steer ML., Rakonczay JrZ. (2013). Commonly Employed Rodent Models of Experimental Acute Pancreatitis: Their Strengths and Weaknesses, Relevance to Human Disease, Selection, and Appropriate Use. Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base, DOI: 10.3998/panc.2013.4

Hegyi P, Petersen OH. The exocrine pancreas: the acinar-ductal tango in physiology and pathophysiology. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 2013;165:1-30. doi: 10.1007/112_2013_14. PMID: 23881310.

Hernández-Aquino E, Muriel P. Beneficial effects of naringenin in liver diseases: Molecular mechanisms. World J Gastroenterol. 2018 Apr 28;24(16):1679-1707. doi: 10.3748/wjg.v24.i16.1679. PMID: 29713125; PMCID: PMC5922990.

Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. Nutr Cancer. 1993;20(1):21-9. doi: 10.1080/01635589309514267. PMID: 8415127.

Hritz I, Czakó L, Dubravcsik Z, Farkas G, Kelemen D, Lásztity N, Morvay Z, Oláh A, Pap Á, Párniczky A, Sahin-Tóth M, Szentkereszti Z, Szmola R, Szücs Á, Takács T, Tiszlavicz L, Hegyi P; Magyar Hasnyálmirigy Munkacsoport, Hungarian Pancreatic Study Group. Akut pancreatitis. A Magyar Hasnyálmirigy Munkacsoport bizonyítékon alapuló kezelési irányelvei [Acute pancreatitis. Evidence-based practice guidelines, prepared by the Hungarian Pancreatic Study Group]. Orv Hetil. 2015 Feb 15;156(7):244-61. Hungarian. doi: 10.1556/OH.2015.30059. PMID: 25661970.

Hsu YL, Uen YH, Chen Y, Liang HL, Kuo PL. Tricetin, a dietary flavonoid, inhibits proliferation of human breast adenocarcinoma mcf-7 cells by blocking cell cycle progression

and inducing apoptosis. *J Agric Food Chem.* 2009 Sep 23;57(18):8688-95. doi: 10.1021/jf901053x. PMID: 19705844.

Huang CH, Chang LC, Hu S, Hsiao CY, Wu SJ. Spilanthol inhibits TNF- α -induced ICAM-1 expression and pro-inflammatory responses by inducing heme oxygenase-1 expression and suppressing pJNK in HaCaT keratinocytes. *Mol Med Rep.* 2018 Sep;18(3):2987-2994. doi: 10.3892/mmr.2018.9245. Epub 2018 Jul 3. PMID: 30015902.

Huang WC, Wu LY, Hu S, Wu SJ. Spilanthol Inhibits COX-2 and ICAM-1 Expression via Suppression of NF- κ B and MAPK Signaling in Interleukin-1 β -Stimulated Human Lung Epithelial Cells. *Inflammation.* 2018 Oct;41(5):1934-1944. doi: 10.1007/s10753-018-0837-0. PMID: 29959625.

Hung JY, Chang WA, Tsai YM, Hsu YL, Chiang HH, Chou SH, Huang MS, Kuo PL. Tricetin, a dietary flavonoid, suppresses benzo(a)pyrene-induced human non-small cell lung cancer bone metastasis. *Int J Oncol.* 2015 May;46(5):1985-93. doi: 10.3892/ijo.2015.2915. Epub 2015 Mar 4. PMID: 25738754.

Ishiguro H, Yamamoto A, Nakakuki M, Yi L, Ishiguro M, Yamaguchi M, Kondo S, Mochimaru Y. Physiology and pathophysiology of bicarbonate secretion by pancreatic duct epithelium. *Nagoya J Med Sci.* 2012 Feb;74(1-2):1-18. PMID: 22515107; PMCID: PMC4831246.

Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol.* 2012;32(1):23-63. doi: 10.1615/critrevimmunol.v32.i1.30. PMID: 22428854; PMCID: PMC3410706.

Jo IJ, Bae GS, Choi SB, Kim DG, Shin JY, Seo SH, Choi MO, Kim TH, Song HJ, Park SJ. Fisetin attenuates cerulein-induced acute pancreatitis through down regulation of JNK and NF- κ B signaling pathways. *Eur J Pharmacol.* 2014 Aug 15;737:149-58. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.05.018. Epub 2014 May 24. PMID: 24861022.

Kiernan, J.A. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice.* 5th edition, Scion Publishing, 2015, 571 pp.

Kim H. Cerulein pancreatitis: oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Gut Liver*. 2008 Sep;2(2):74-80. doi: 10.5009/gnl.2008.2.2.74. Epub 2008 Sep 30. PMID: 20485614; PMCID: PMC2871591.

Kim MY, Mauro S, Gévry N, Lis JT, Kraus WL. NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell*. 2004 Dec 17;119(6):803-14. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.002. PMID: 15607977.

Kleeff J, Whitcomb DC, Shimosegawa T, Esposito I, Lerch MM, Gress T, Mayerle J, Drewes AM, Rebours V, Akisik F, Muñoz JED, Neoptolemos JP. Chronic pancreatitis. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Sep 7;3:17060. doi: 10.1038/nrdp.2017.60. PMID: 28880010.

Klein AP. Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021 Jul;18(7):493-502. doi: 10.1038/s41575-021-00457-x. Epub 2021 May 17. PMID: 34002083; PMCID: PMC9265847.

Konturek SJ, Tasler J, Cieszkowski M, Jaworek J, Konturek J. Intravenous amino acids and fat stimulate pancreatic secretion. *Am J Physiol*. 1979 Jun;236(6):E678-84. doi: 10.1152/ajpendo.1979.236.6.E678. PMID: 443422.

Köksoy FN, Yankol Y, Şen Oran E, Özkan Gürdal S, Yüksel M, Akyildiz İğdem A, Yildirim Yazgan N, Soybir GR. Preventive effects of enoxaparin and hesperidin in cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Turk J Gastroenterol*. 2013;24(6):495-501. doi: 10.4318/tjg.2013.0585. PMID: 24623288.

Kubiczkova L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. TGF- β - an excellent servant but a bad master. *J Transl Med*. 2012 Sep 3;10:183. doi: 10.1186/1479-5876-10-183. PMID: 22943793; PMCID: PMC3494542.

Kuppusamy A, Arumugam M, George S. Combining in silico and in vitro approaches to evaluate the acetylcholinesterase inhibitory profile of some commercially available flavonoids in the management of Alzheimer's disease. *Int J Biol Macromol*. 2017 Feb;95:199-203. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.11.062. Epub 2016 Nov 18. PMID: 27871793.

Kurzepa J, Mądro A, Czechowska G, Kurzepa J, Celiński K, Kazmierak W, Slomka M. Role of MMP-2 and MMP-9 and their natural inhibitors in liver fibrosis, chronic pancreatitis and non-specific inflammatory bowel diseases. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2014 Dec;13(6):570-9. doi: 10.1016/s1499-3872(14)60261-7. PMID: 25475858.

Logsdon CD, Ji B. The role of protein synthesis and digestive enzymes in acinar cell injury. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013 Jun;10(6):362-70. doi: 10.1038/nrgastro.2013.36. Epub 2013 Mar 19. PMID: 23507798; PMCID: PMC3902846.

Lee, M.G., Kim, Y., Jun, I., Aoun, J., and Muallem S. (2020). Molecular Mechanisms of Pancreatic Bicarbonate Secretion. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2020.06

Lei Z, Sumner BW, Bhatia A, Sarma SJ, Sumner LW. UHPLC-MS Analyses of Plant Flavonoids. *Curr Protoc Plant Biol.* 2019 Mar;4(1):e20085. doi: 10.1002/cppb.20085. Epub 2018 Nov 29. PMID: 30489018.

Lerch, M.M. Aghdassi, Ali. (2016). Gallstone-related pathogenesis of acute pancreatitis. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2016.24

Lerch MM, Gorelick FS. Models of acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology.* 2013 Jun;144(6):1180-93. doi: 10.1053/j.gastro.2012.12.043. PMID: 23622127.

Li H, Hung A, Yang AWH. A Classic Herbal Formula Danggui Beimu Kushen Wan for Chronic Prostatitis: From Traditional Knowledge to Scientific Exploration. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2018 Nov 13;2018:1612948. doi: 10.1155/2018/1612948. PMID: 30538755; PMCID: PMC6257895.

Liddle RA. Regulation of cholecystokinin secretion by intraluminal releasing factors. *Am J Physiol.* 1995 Sep;269(3 Pt 1):G319-27. doi: 10.1152/ajpgi.1995.269.3.G319. PMID: 7573441.

Lin Z, Wu H, Fu Y, Dai S. Application of Herbaceous Medications for Inflammatory Bowel Disease as a Complementary and Alternative Therapy. *Inflamm Bowel Dis*. 2019 Nov 14;25(12):1886-1895. doi: 10.1093/ibd/izz190. PMID: 31504527.

Lonardo A, Grisendi A, Bonilauri S, Rambaldi M, Selmi I, Tondelli E. Ischaemic necrotizing pancreatitis after cardiac surgery. A case report and review of the literature. *Ital J Gastroenterol Hepatol*. 1999 Dec;31(9):872-5. PMID: 10669996.

Longnecker, Daniel S. 2021. Anatomy and Histology of the Pancreas. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2021.01

Lugea A, Gerloff A, Su HY, Xu Z, Go A, Hu C, French SW, Wilson JS, Apte MV, Waldron RT, Pandol SJ. The Combination of Alcohol and Cigarette Smoke Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Cell Death in Pancreatic Acinar Cells. *Gastroenterology*. 2017 Dec;153(6):1674-1686. doi: 10.1053/j.gastro.2017.08.036. Epub 2017 Aug 25. PMID: 28847752; PMCID: PMC5705421.

Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature*. 1985 Jun 20-26;315(6021):672-6. doi: 10.1038/315672a0. PMID: 3925348.

Lutgens E, Gijbels M, Smook M, Heeringa P, Gotwals P, Koteliensky VE, Daemen MJ. Transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Jun 1;22(6):975-82. doi: 10.1161/01.atv.0000019729.39500.2f. PMID: 12067907.

Mabley JG, Jagtap P, Perretti M, Getting SJ, Salzman AL, Virág L, Szabó E, Soriano FG, Liaudet L, Abdelkarim GE, Haskó G, Marton A, Southan GJ, Szabó C. Anti-inflammatory effects of a novel, potent inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase. *Inflamm Res*. 2001 Nov;50(11):561-9. doi: 10.1007/PL00000234. PMID: 11766996.

Maduzia D, Ceranowicz P, Cieszkowski J, Chmura A, Galazka K, Kusnierz-Cabala B, Warzecha Z. Administration of warfarin accelerates the recovery in ischemia/reperfusion-

induced acute pancreatitis. *J Physiol Pharmacol*. 2020 Jun;71(3). doi: 10.26402/jpp.2020.3.13. Epub 2020 Oct 15. PMID: 33077694.

Maléth, József. Rakonczay, Zoltán. Venglovecz, Viktória. Hegyi, Péter. (2016). Effects of alcohol on pancreatic ductal function. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2016.7

Malla SR, Kärrman Mårdh C, Günther A, Mahajan UM, Sendler M, D'Haese J, Weiss FU, Lerch MM, Hansen MB, Mayerle J. Effect of oral administration of AZD8309, a CXCR2 antagonist, on the severity of experimental pancreatitis. *Pancreatology*. 2016 Sep-Oct;16(5):761-9. doi: 10.1016/j.pan.2016.07.005. Epub 2016 Jul 14. PMID: 27450968.

Malleo G, Mazzon E, Siriwardena AK, Cuzzocrea S. Role of tumor necrosis factor-alpha in acute pancreatitis: from biological basis to clinical evidence. *Shock*. 2007 Aug;28(2):130-40. doi: 10.1097/shk.0b013e3180487ba1. PMID: 17529903.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004 May;79(5):727-47. doi: 10.1093/ajcn/79.5.727. PMID: 15113710.

Mareninova, Olga A. Orabi, Abraham I. Husain, Sohail Z. (2015). Experimental acute pancreatitis: In vitro models. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2015.27

Marques RE, Guabiraba R, Russo RC, Teixeira MM. Targeting CCL5 in inflammation. *Expert Opin Ther Targets*. 2013 Dec;17(12):1439-60. doi: 10.1517/14728222.2013.837886. Epub 2013 Oct 3. PMID: 24090198; PMCID: PMC7103722.

Márta K, Farkas N, Szabó I, Illés A, Vincze Á, Pár G, Sarlós P, Bajor J, Szűcs Á, Czimmer J, Mosztbacher D, Párnitzky A, Szemes K, Pécsi D, Hegyi P. Meta-Analysis of Early Nutrition: The Benefits of Enteral Feeding Compared to a Nil Per Os Diet Not Only in Severe, but Also in Mild and Moderate Acute Pancreatitis. *Int J Mol Sci*. 2016 Oct 20;17(10):1691. doi: 10.3390/ijms17101691. PMID: 27775609; PMCID: PMC5085723.

Martínez-Bosch N, Fernández-Zapico ME, Navarro P, Yélamos J. Poly(ADP-Ribose) Polymerases: New Players in the Pathogenesis of Exocrine Pancreatic Diseases. *Am J Pathol.* 2016 Feb;186(2):234-41. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.09.021. Epub 2015 Dec 10. PMID: 26687988.

Martínez-Morcillo FJ, Cantón-Sandoval J, Martínez-Menchón T, Corbalán-Vélez R, Mesa-Del-Castillo P, Pérez-Oliva AB, García-Moreno D, Mulero V. Non-canonical roles of NAMPT and PARP in inflammation. *Dev Comp Immunol.* 2021 Feb;115:103881. doi: 10.1016/j.dci.2020.103881. Epub 2020 Oct 7. PMID: 33038343.

Mayerle J, Sendler M, Hegyi E, Beyer G, Lerch MM, Sahin-Tóth M. Genetics, Cell Biology, and Pathophysiology of Pancreatitis. *Gastroenterology.* 2019 May;156(7):1951-1968.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2018.11.081. Epub 2019 Jan 18. PMID: 30660731; PMCID: PMC6903413.

Meczker Á, Hanák L, Párniczky A, Szentesi A, Erőss B, Hegyi P; Hungarian Pancreatic Study Group. Analysis of 1060 Cases of Drug-Induced Acute Pancreatitis. *Gastroenterology.* 2020 Nov;159(5):1958-1961.e8. doi: 10.1053/j.gastro.2020.07.016. Epub 2020 Jul 17. PMID: 32687926.

Mekapogu, Alpha R, Pothula, Srinivasa P, Pirola, Romano C, Wilson, Jeremy S, and Apte, Minote V. Pancreatic Stellate Cells in Health and Disease. 2020. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2020.08

Mercurio F, Manning AM. Multiple signals converging on NF-kappaB. *Curr Opin Cell Biol.* 1999 Apr;11(2):226-32. doi: 10.1016/s0955-0674(99)80030-1. PMID: 10209157.

Meyer JH, Jones RS. Canine pancreatic responses to intestinally perfused fat and products of fat digestion. *Am J Physiol.* 1974 May;226(5):1178-87. doi: 10.1152/ajplegacy.1974.226.5.1178. PMID: 4824870.

Michael H. Ros, Gordon I. Kaye, Wojciech Pawlina: *Szövettan – Kézikönyv és atlasz*. Bp.: Medicina Könyvkiadó Zrt., 2007. pp. 551-559.

Min A, Im SA. PARP Inhibitors as Therapeutics: Beyond Modulation of PARylation. *Cancers* (Basel). 2020 Feb 8;12(2):394. doi: 10.3390/cancers12020394. PMID: 32046300; PMCID: PMC7072193.

Mishra, A., S. Roy, S. Maity, R. K. Yadav, A. K. Keshari, and S. Saha. "ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF FLOWER EXTRACTS OF SPILANTHES PANICULATA ON HEPATIC CARCINOMA CELLS". *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 7, no. 1, Jan. 2015, pp. 130-4, <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/article/view/3512>.

Moffatt DC, Côté GA, Avula H, Watkins JL, McHenry L, Sherman S, Lehman GA, Fogel EL. Risk factors for ERCP-related complications in patients with pancreas divisum: a retrospective study. *Gastrointest Endosc*. 2011 May;73(5):963-70. doi: 10.1016/j.gie.2010.12.035. Epub 2011 Mar 9. PMID: 21392753.

Moggia E, Koti R, Belgaumkar AP, Fazio F, Pereira SP, Davidson BR, Gurusamy KS. Pharmacological interventions for acute pancreatitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Apr 21;4(4):CD011384. doi: 10.1002/14651858.CD011384.pub2. PMID: 28431202; PMCID: PMC6478067.

Mosztbacher D, Hanák L, Farkas N, Szentesi A, Mikó A, Bajor J, Sarlós P, Czimmer J, Vincze Á, Hegyi PJ, Erőss B, Takács T, Czako L, Németh BC, Izbéki F, Halász A, Gajdán L, Hamvas J, Papp M, Földi I, Fehér KE, Varga M, Csefkó K, Török I, Farkas HP, Mickevicius A, Maldonado ER, Sallinen V, Novák J, Ince AT, Galeev S, Bod B, Sümegi J, Pencik P, Dubravcsik Z, Illés D, Gódi S, Kui B, Márta K, Pécsi D, Varjú P, Szakács Z, Darvasi E, Párniczky A, Hegyi P; Hungarian Pancreatic Study Group. Hypertriglyceridemia-induced acute pancreatitis: A prospective, multicenter, international cohort analysis of 716 acute pancreatitis cases. *Pancreatology*. 2020 Jun;20(4):608-616. doi: 10.1016/j.pan.2020.03.018. Epub 2020 Apr 10. PMID: 32402696.

Mota R, Sánchez-Bueno F, Berenguer-Pina JJ, Hernández-Espinosa D, Parrilla P, Yélamos J. Therapeutic treatment with poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors attenuates the severity of acute pancreatitis and associated liver and lung injury. *Br J Pharmacol*. 2007 Aug;151(7):998-

1005. doi: 10.1038/sj.bjp.0707310. Epub 2007 May 29. PMID: 17533414; PMCID: PMC2042921.

Nakamura T, Lipton SA. Nitrosative Stress in the Nervous System: Guidelines for Designing Experimental Strategies to Study Protein S-Nitrosylation. *Neurochem Res.* 2016 Mar;41(3):510-4. doi: 10.1007/s11064-015-1640-z. Epub 2015 Jun 29. PMID: 26118537; PMCID: PMC4695327.

Nomura EC, Rodrigues MR, da Silva CF, Hamm LA, Nascimento AM, de Souza LM, Cipriani TR, Baggio CH, Werner MF. Antinociceptive effects of ethanolic extract from the flowers of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen in mice. *J Ethnopharmacol.* 2013 Nov 25;150(2):583-9. doi: 10.1016/j.jep.2013.09.007. Epub 2013 Sep 16. PMID: 24051025.

Oliver FJ, Ménissier-de Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de la Rubia G, Stoclet JC, de Murcia G. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J.* 1999 Aug 16;18(16):4446-54. doi: 10.1093/emboj/18.16.4446. PMID: 10449410; PMCID: PMC1171519.

Pallagi P, Hegyi P, Rakonczay Z Jr. The Physiology and Pathophysiology of Pancreatic Ductal Secretion: The Background for Clinicians. *Pancreas.* 2015 Nov;44(8):1211-33. doi: 10.1097/MPA.0000000000000421. PMID: 26465950.

Pan LF, Yu L, Wang LM, He JT, Sun JL, Wang XB, Wang H, Bai ZH, Feng H, Pei HH. Augmenter of liver regeneration (ALR) regulates acute pancreatitis via inhibiting HMGB1/TLR4/NF-κB signaling pathway. *Am J Transl Res.* 2018 Feb 15;10(2):402-410. PMID: 29511434; PMCID: PMC5835805.

Pandol, Stephen J. (2015). Normal Pancreatic Function. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2015.17

Párniczky A, Kui B, Szentesi A, Balázs A, Szűcs Á, Mosztbacher D, Czimmer J, Sarlós P, Bajor J, Gódi S, Vincze Á, Illés A, Szabó I, Pár G, Takács T, Czakó L, Szepes Z, Rakonczay Z, Izbéki F, Gervain J, Halász A, Novák J, Crai S, Hritz I, Góg C, Sümegi J, Golovics P,

Varga M, Bod B, Hamvas J, Varga-Müller M, Papp Z, Sahin-Tóth M, Hegyi P; Hungarian Pancreatic Study Group. Prospective, Multicentre, Nationwide Clinical Data from 600 Cases of Acute Pancreatitis. *PLoS One*. 2016 Oct 31;11(10):e0165309. doi: 10.1371/journal.pone.0165309. PMID: 27798670; PMCID: PMC5087847.

Párniczky A, Lantos T, Tóth EM, Szakács Z, Gódi S, Hágendorn R, Illés D, Koncz B, Márta K, Mikó A, Mosztbacher D, Németh BC, Pécsi D, Szabó A, Szücs Á, Varjú P, Szentesi A, Darvasi E, Erőss B, Izbéki F, Gajdán L, Halász A, Vincze Á, Szabó I, Pár G, Bajor J, Sarlós P, Czimmer J, Hamvas J, Takács T, Szepes Z, Czakó L, Varga M, Novák J, Bod B, Szepes A, Sümegi J, Papp M, Góg C, Török I, Huang W, Xia Q, Xue P, Li W, Chen W, Shirinskaya NV, Poluektov VL, Shirinskaya AV, Hegyi PJ, Bátovský M, Rodriguez-Oballe JA, Salas IM, Lopez-Diaz J, Dominguez-Munoz JE, Molero X, Pando E, Ruiz-Rebollo ML, Burgueño-Gómez B, Chang YT, Chang MC, Sud A, Moore D, Sutton R, Gougol A, Papachristou GI, Susak YM, Tiuliukin IO, Gomes AP, Oliveira MJ, Aparício DJ, Tantau M, Kurti F, Kovacheva-Slavova M, Stecher SS, Mayerle J, Poropat G, Das K, Marino MV, Capurso G, Małecka-Panas E, Zatorski H, Gasiorowska A, Fabisiak N, Ceranowicz P, Kuśnierz-Cabala B, Carvalho JR, Fernandes SR, Chang JH, Choi EK, Han J, Bertilsson S, Jumaa H, Sandblom G, Kacar S, Baltatzis M, Varabei AV, Yesly V, Chooklin S, Kozachenko A, Veligotsky N, Hegyi P; Hungarian Pancreatic Study Group. Antibiotic therapy in acute pancreatitis: From global overuse to evidence based recommendations. *Pancreatology*. 2019 Jun;19(4):488-499. doi: 10.1016/j.pan.2019.04.003. Epub 2019 Apr 19. PMID: 31068256.

Patai Á, Solymosi N, Mohácsi L, Patai ÁV. Indomethacin and diclofenac in the prevention of post-ERCP pancreatitis: a systematic review and meta-analysis of prospective controlled trials. *Gastrointest Endosc*. 2017 Jun;85(6):1144-1156.e1. doi: 10.1016/j.gie.2017.01.033. Epub 2017 Feb 4. PMID: 28167118.

Peluso I, Miglio C, Morabito G, Ioannone F, Serafini M. Flavonoids and immune function in human: a systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2015;55(3):383-95. doi: 10.1080/10408398.2012.656770. PMID: 24915384.

Pin, Christopher L, and Fenech, Melissa. 2020. Development of the Pancreas. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2020.11

Pistelli L, Bertoli A, Noccioli C, Mendez J, Musmanno RA, Di Maggio T, Coratza G. Antimicrobial activity of *Inga fendleriana* extracts and isolated flavonoids. *Nat Prod Commun.* 2009 Dec;4(12):1679-83. PMID: 20120106.

Prachayasittikul V, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. High therapeutic potential of *Spilanthes acmella*: A review. *EXCLI J.* 2013 Apr 4;12:291-312. PMID: 27092032; PMCID: PMC4827075.

pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Spilanthol

Qui B, Mei QB, Ma JJ, Korsten MA. Susceptibility to cerulein-induced pancreatitis in inducible nitric oxide synthase-deficient mice. *Pancreas.* 2001 Jul;23(1):89-93. doi: 10.1097/00006676-200107000-00013. PMID: 11451153.

Raphael KL, Willingham FF. Hereditary pancreatitis: current perspectives. *Clin Exp Gastroenterol.* 2016 Jul 26;9:197-207. doi: 10.2147/CEG.S84358. PMID: 27555793; PMCID: PMC4968666.

Rasineni K, Srinivasan MP, Balamurugan AN, Kaphalia BS, Wang S, Ding WX, Pandol SJ, Lugea A, Simon L, Molina PE, Gao P, Casey CA, Osna NA, Kharbanda KK. Recent Advances in Understanding the Complexity of Alcohol-Induced Pancreatic Dysfunction and Pancreatitis Development. *Biomolecules.* 2020 Apr 27;10(5):669. doi: 10.3390/biom10050669. PMID: 32349207; PMCID: PMC7277520.

Raskin I, Ribnicky DM, Komarnytsky S, Ilic N, Poulev A, Borisjuk N, Brinker A, Moreno DA, Ripoll C, Yakoby N, O'Neal JM, Cornwell T, Pastor I, Fridlender B. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol.* 2002 Dec;20(12):522-31. doi: 10.1016/s0167-7799(02)02080-2. PMID: 12443874.

Rates SM. Plants as source of drugs. *Toxicon.* 2001 May;39(5):603-13. doi: 10.1016/s0041-0101(00)00154-9. PMID: 11072038.

Ratnasooriya WD, Pieris KP, Samaratunga U, Jayakody JR. Diuretic activity of *Spilanthes acmella* flowers in rats. *J Ethnopharmacol.* 2004 Apr;91(2-3):317-20. doi: 10.1016/j.jep.2004.01.006. PMID: 15120455.

Regdon Z, Demény MA, 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 Mar;178(5):1095-1113. doi: 10.1111/bph.15344. Epub 2021 Jan 26. PMID: 33332573.

Ren J, Yuan L, Wang W, Zhang M, Wang Q, Li S, Zhang L, Hu K. Tricetin protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity in Parkinson's disease model by activating Nrf2/HO-1 signaling pathway and preventing mitochondria-dependent apoptosis pathway. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2019 Sep 1;378:114617. doi: 10.1016/j.taap.2019.114617. Epub 2019 Jun 6. PMID: 31176653.

Ren Q, Guo F, Tao S, Huang R, Ma L, Fu P. Flavonoid fisetin alleviates kidney inflammation and apoptosis via inhibiting Src-mediated NF- κ B p65 and MAPK signaling pathways in septic AKI mice. *Biomed Pharmacother.* 2020 Feb;122:109772. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109772. Epub 2019 Dec 30. PMID: 31918290.

Renert-Yuval Y, Guttman-Yassky E. What's New in Atopic Dermatitis. *Dermatol Clin.* 2019 Apr;37(2):205-213. doi: 10.1016/j.det.2018.12.007. Epub 2019 Feb 16. PMID: 30850043.

Rios, María Yolanda, Olivo, Horacio F. Chapter 3 - Natural and Synthetic Alkamides: Applications in Pain Therapy, Editor(s): Atta-ur-Rahman, *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier, Volume 43, 2014, Pages 79-121, ISSN 1572-5995, ISBN 9780444634306, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63430-6.00003-5>.

Roberts SE, Morrison-Rees S, John A, Williams JG, Brown TH, Samuel DG. The incidence and aetiology of acute pancreatitis across Europe. *Pancreatology.* 2017 Mar-Apr;17(2):155-165. doi: 10.1016/j.pan.2017.01.005. Epub 2017 Jan 19. PMID: 28159463.

Rodeiro I, Donato MT, Jimenez N, Garrido G, Molina-Torres J, Menendez R, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Inhibition of human P450 enzymes by natural extracts used in traditional medicine. *Phytother Res.* 2009 Feb;23(2):279-82. doi: 10.1002/ptr.2613. PMID: 18844254.

Romagnolo DF, Selmin OI. Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence. *J Nutr Gerontol Geriatr.* 2012;31(3):206-38. doi: 10.1080/21551197.2012.702534. PMID: 22888839.

Rondanelli, M., Fossari, F., Vecchio, V., et al., *Acmella oleracea* for pain management, *Fitoterapia* (2019), <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104419>

Samokhvalov AV, Rehm J, Roerecke M. Alcohol Consumption as a Risk Factor for Acute and Chronic Pancreatitis: A Systematic Review and a Series of Meta-analyses. *EBioMedicine.* 2015 Nov 14;2(12):1996-2002. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.11.023. PMID: 26844279; PMCID: PMC4703772.

Sans, MD. (2021). Pancreatic Digestive Enzyme Synthesis and its Translational Control. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2021.09

Sapra A, Bhandari P. Diabetes Mellitus. 2021 Sep 18. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–. PMID: 31855345.

Savic S, Petrovic S, Savic S, Cekic N. Identification and photostability of N-alkylamides from *Acmella oleracea* extract. *J Pharm Biomed Anal.* 2021 Feb 20;195:113819. doi: 10.1016/j.jpba.2020.113819. Epub 2020 Dec 2. PMID: 33317914.

Schneider L, Jabrailova B, Soliman H, Hofer S, Strobel O, Hackert T, Büchler MW, Werner J. Pharmacological cholinergic stimulation as a therapeutic tool in experimental necrotizing pancreatitis. *Pancreas.* 2014 Jan;43(1):41-6. doi: 10.1097/MPA.0b013e3182a85c21. PMID: 24212240.

Serafini M, Peluso I, Raguzzini A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc Nutr Soc.* 2010 Aug;69(3):273-8. doi: 10.1017/S002966511000162X. Epub 2010 Jun 23. PMID: 20569521.

Siriviriyakul P, Werawatganon D, Phetnoo N, Somanawat K, Chatsuwan T, Klaikeaw N, Chayanupatkul M. Genistein attenuated gastric inflammation and apoptosis in *Helicobacter pylori*-induced gastropathy in rats. *BMC Gastroenterol.* 2020 Dec 9;20(1):410. doi: 10.1186/s12876-020-01555-x. PMID: 33297977; PMCID: PMC7724785.

Solomon TE. Regulation of pancreatic secretion. *Clin Gastroenterol.* 1984 Sep;13(3):657-78. PMID: 6386236.

Stanley Robbins, Vinay Kumar, Abbas Abul K Abbas., Jon C. Aster: *Patológia Bp.: Medicina Könyvkiadó Rt., 2019, 10. kiadás*

Stark, Alexander. Eibl, Guido. (2015). Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2015.14

Stolfi C, Troncone E, Marafini I, Monteleone G. Role of TGF-Beta and Smad7 in Gut Inflammation, Fibrosis and Cancer. *Biomolecules.* 2020 Dec 27;11(1):17. doi: 10.3390/biom11010017. PMID: 33375423; PMCID: PMC7823508.

Sun FF, Hu PF, Xiong Y, Bao JP, Qian J, Wu LD. Tricetin Protects Rat Chondrocytes against IL-1 β -Induced Inflammation and Apoptosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Apr 28;2019:4695381. doi: 10.1155/2019/4695381. PMID: 31231454; PMCID: PMC6512055.

Szentágothai János, Réthelyi Miklós, Antal Miklós, Liposits Miklós, Ángyánné Vincze Judit (szerk.): *Funkcionális anatómia II. Bp.: Medicina Könyvkiadó Rt., 2002. pp. 208.212.*

Tasci S, Senocak R, Lapsekili E, Kaymak S, Yigit T. The effects of a TNF-alpha inhibitor and HBO combination on the severity of pancreatitis and oxidative response in an experimental model of acute pancreatitis. *Bratisl Lek Listy.* 2019;120(6):417-422. doi: 10.4149/BLL_2019_067. PMID: 31223021.

Tekin SO, Teksoz S, Terzioglu D, Arikan AE, Ozcevik H, Uslu E. Use of infliximab in treatment of acute pancreatitis. *Bratisl Lek Listy.* 2015;116(3):167-72. doi: 10.4149/bll_2015_034. PMID: 25869565.

Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional Regulation by Nrf2. Antioxid Redox Signal. 2018 Dec 10;29(17):1727-1745. doi: 10.1089/ars.2017.7342. Epub 2017 Oct 20. PMID: 28899199; PMCID: PMC6208165.

Tryliskyy Y, Bryce GJ. Post-ERCP pancreatitis: Pathophysiology, early identification and risk stratification. Adv Clin Exp Med. 2018 Jan;27(1):149-154. doi: 10.17219/acem/66773. PMID: 29521055.

van Baal MC, Besselink MG, Bakker OJ, van Santvoort HC, Schaapherder AF, Nieuwenhuijs VB, Gooszen HG, van Ramshorst B, Boerma D; Dutch Pancreatitis Study Group. Timing of cholecystectomy after mild biliary pancreatitis: a systematic review. Ann Surg. 2012 May;255(5):860-6. doi: 10.1097/SLA.0b013e3182507646. PMID: 22470079.

van Brummelen SE, Venneman NG, van Erpecum KJ, VanBerge-Henegouwen GP. Acute idiopathic pancreatitis: does it really exist or is it a myth? Scand J Gastroenterol Suppl. 2003;(239):117-22. doi: 10.1080/008559203100027. PMID: 14743894.

Venglovecz, Viktoria, Hegyi, Péter, Gray, Michael A. (2021). Ion Channels in Pancreatic Duct Physiology. Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base, DOI: 10.3998/panc.2021.08

Venglovecz, Viktória, Rakonczay, Zoltán Jr. and Hegyi, Péter. (2016). The effects of bile acids on pancreatic ductal cells. Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base, DOI: 10.3998/panc.2016.5

Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. Lancet. 2011 Aug 13;378(9791):607-20. doi: 10.1016/S0140-6736(10)62307-0. Epub 2011 May 26. PMID: 21620466; PMCID: PMC3062508.

Virág L, Robaszkiewicz A, Rodriguez-Vargas JM, Oliver FJ. Poly(ADP-ribose) signaling in cell death. Mol Aspects Med. 2013 Dec;34(6):1153-67. doi: 10.1016/j.mam.2013.01.007. Epub 2013 Feb 15. PMID: 23416893.

Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev.* 2002 Sep;54(3):375-429. doi: 10.1124/pr.54.3.375. PMID: 12223530.

<https://vizhub.healthdata.org/gbd-results> -> adatkinyerés ideje: 2022. november

Vovkun TV, Yanchuk PI, Shtanova LY, Shalamay AS. [TISSUE BLOOD FLOW IN THE DIGESTIVE ORGANS OF RATS WITH ACUTE PANCREATITIS AFTER CORVITIN ADMINISTRATION]. *Fiziol Zh* (1994). 2015;61(6):53-9. Ukrainian. doi: 10.15407/fz61.06.053. PMID: 27025045.

Waldron RT, Chen Y, Pham H, Go A, Su HY, Hu C, Wen L, Husain SZ, Sugar CA, Roos J, Ramos S, Lugea A, Dunn M, Stauderman K, Pandol SJ. The Orai Ca²⁺ channel inhibitor CM4620 targets both parenchymal and immune cells to reduce inflammation in experimental acute pancreatitis. *J Physiol.* 2019 Jun;597(12):3085-3105. doi: 10.1113/JP277856. Epub 2019 May 22. PMID: 31050811; PMCID: PMC6582954

Waldron RT, Pandol, Stephen. Lugea, Aurelia. Groblewski, Guy. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress and the Unfolded Protein Response in Exocrine Pancreas Physiology and Pancreatitis. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2015.41

Wang G, Liu Y, Zhou SF, Qiu P, Xu L, Wen P, Wen J, Xiao X. Effect of Somatostatin, Ulinastatin and Gabexate on the Treatment of Severe Acute Pancreatitis. *Am J Med Sci.* 2016 May;351(5):506-12. doi: 10.1016/j.amjms.2016.03.013. Epub 2016 Mar 31. PMID: 27140710.

Wang N, Zhu F, Shen M, Qiu L, Tang M, Xia H, Chen L, Yuan Y, Ma S, Chen K. Network pharmacology-based analysis on bioactive anti-diabetic compounds in *Potentilla discolor bunge*. *J Ethnopharmacol.* 2019 Sep 15;241:111905. doi: 10.1016/j.jep.2019.111905. Epub 2019 Apr 22. PMID: 31022565.

Warzecha Z, Dembiński A, Ceranowicz P, Dembiński M, Cieszkowski J, Kuśnierz-Cabala B, Naskalski JW, Jaworek J, Konturek SJ, Pawlik WW, Tomaszewska R. Influence of ischemic preconditioning on blood coagulation, fibrinolytic activity and pancreatic repair in the course

of caerulein-induced acute pancreatitis in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2007 Jun;58(2):303-19. PMID: 17622699.

Wen, Li. Mukherjee, Rajarshi. Huang, Wei. Sutton, Robert.(2016). Calcium signaling, mitochondria and acute pancreatitis: avenues for therapy. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2016.15

Werge M, Novovic S, Schmidt PN, Gluud LL. Infection increases mortality in necrotizing pancreatitis: A systematic review and meta-analysis. *Pancreatology.* 2016 Sep-Oct;16(5):698-707. doi: 10.1016/j.pan.2016.07.004. Epub 2016 Jul 9. PMID: 27449605.

Williams JA. Regulation of acinar cell function in the pancreas. *Curr Opin Gastroenterol.* 2010 Sep;26(5):478-83. doi: 10.1097/MOG.0b013e32833d11c6. PMID: 20625287; PMCID: PMC3235437.

Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med.* 2004 Apr 1;36(7):838-49. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001. PMID: 15019969.

Wongsawatkul O, Prachayasittikul S, Isarankura-Na-Ayudhya C, Satayavivad J, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. Vasorelaxant and antioxidant activities of *Spilanthes acmella* Murr. *Int J Mol Sci.* 2008 Dec;9(12):2724-44. doi: 10.3390/ijms9122724. Epub 2008 Dec 18. PMID: 19330100; PMCID: PMC2635640.

Wu LC, Fan NC, Lin MH, Chu IR, Huang SJ, Hu CY, Han SY. Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. *J Agric Food Chem.* 2008 Apr 9;56(7):2341-9. doi: 10.1021/jf073057e. Epub 2008 Mar 6. PMID: 18321049.

Xiong J, Wang K, Yuan C, Xing R, Ni J, Hu G, Chen F, Wang X. Luteolin protects mice from severe acute pancreatitis by exerting HO-1-mediated anti-inflammatory and antioxidant effects. *Int J Mol Med.* 2017 Jan;39(1):113-125. doi: 10.3892/ijmm.2016.2809. Epub 2016 Nov 22. PMID: 27878246; PMCID: PMC5179180.

Yadav D, Hawes RH, Brand RE, Anderson MA, Money ME, Banks PA, Bishop MD, Baillie J, Sherman S, DiSario J, Burton FR, Gardner TB, Amann ST, Gelrud A, Lawrence C, Elinoff B, Greer JB, O'Connell M, Barmada MM, Slivka A, Whitcomb DC; North American Pancreatic Study Group. Alcohol consumption, cigarette smoking, and the risk of recurrent acute and chronic pancreatitis. *Arch Intern Med.* 2009 Jun 8;169(11):1035-45. doi: 10.1001/archinternmed.2009.125. Erratum in: *Arch Intern Med.* 2011 Apr 11;171(7):710. PMID: 19506173; PMCID: PMC6785300.

Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 2013 Jun;144(6):1252-61. doi: 10.1053/j.gastro.2013.01.068. PMID: 23622135; PMCID: PMC3662544.

Yu JH, Kim H. Oxidative stress and inflammatory signaling in cerulein pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2014 Dec 14;20(46):17324-9. doi: 10.3748/wjg.v20.i46.17324. PMID: 25516643; PMCID: PMC4265590.

Yuhara H, Ogawa M, Kawaguchi Y, Igarashi M, Mine T. Smoking and risk for acute pancreatitis: a systematic review and meta-analysis. *Pancreas.* 2014 Nov;43(8):1201-7. doi: 10.1097/MPA.0000000000000176. PMID: 25333404.

Yule, David I. (2020). Ca²⁺ Signaling in Pancreatic Acinar Cells. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2020.12

Zhang J. Yin and yang interplay of IFN-gamma in inflammation and autoimmune disease. *J Clin Invest.* 2007 Apr;117(4):871-3. doi: 10.1172/JCI31860. PMID: 17404615; PMCID: PMC1838954.

Zhao Y, Wang H, Lu M, Qiao X, Sun B, Zhang W, Xue D. Pancreatic Acinar Cells Employ miRNAs as Mediators of Intercellular Communication to Participate in the Regulation of Pancreatitis-Associated Macrophage Activation. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:6340457. doi: 10.1155/2016/6340457. Epub 2016 Jul 28. PMID: 27546996; PMCID: PMC4980583

Zelová H, Hošek J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflamm Res*. 2013 Jul;62(7):641-51. doi: 10.1007/s00011-013-0633-0. Epub 2013 May 18. PMID: 23685857.

Zeng X, Xi Y, Jiang W. Protective roles of flavonoids and flavonoid-rich plant extracts against urolithiasis: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019;59(13):2125-2135. doi: 10.1080/10408398.2018.1439880. Epub 2018 May 31. PMID: 29432040.

Zeng Z, Lan T, Wei Y, Wei X. CCL5/CCR5 axis in human diseases and related treatments. *Genes Dis*. 2022 Jan;9(1):12-27. doi: 10.1016/j.gendis.2021.08.004. Epub 2021 Aug 26. PMID: 34514075; PMCID: PMC8423937.

Zhou JM, Gold ND, Martin VJ, Wollenweber E, Ibrahim RK. Sequential O-methylation of tricetin by a single gene product in wheat. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Jul;1760(7):1115-24. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.02.008. Epub 2006 Mar 10. PMID: 16730127.

XII. PUBLIKÁCIÓS LISTA



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/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.: Spilanthal 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 tudásmetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.01.17.



XIII. FÜGGELÉK

A PhD értekezés alapjául szolgáló in extenso közlemények különlenyomata.