

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Kísérletes és Megelőző Orvostudományi Doktori Iskola



A KÉNORGANIKUS VEGYÜLETEK ENYHÍTIK A KÍSÉRLETES AKUT PANCREATITIS SÚLYOSSÁGÁT ÉS CITOPROTEKTÍV HATÁST FEJTENEK KI

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Orján Erik Márk, M.Sc.

Témavezető:
Kiss Lóránd Ph.D.

Szeged,
2026

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés tárgyát képező közlemények

Orján EM, Kormányos ES, Fűr GM, Dombi Á, Bálint ER, Balla Z, Balog BA, Dágó Á, Totonji A, Bátai ZI, Jurányi EP, Ditrói T, Al-Omari A, Pozsgai G, Kormos V, Nagy P, Pintér E, Rakoncay Z Jr, Kiss L. The anti-inflammatory effect of dimethyl trisulfide in experimental acute pancreatitis. *Sci Rep.* 2023; 13(1):16813. doi: 10.1038/s41598-023-43692-9. [IF₂₀₂₃: 3.8], **D1**

Orján EM, Dágó Á, Sándor B, Salamah O, Mihalekné Fűr G, Balog BA, Rakoncay Z Jr, Kiss L. Investigation of organosulfur molecules in experimental acute pancreatitis: Antioxidant and antiferroptotic actions of ATB-346. *Biomed Pharmacother.* 2026; 196:119089. doi: 10.1016/j.biopha.2026.119089. [IF₂₀₂₄: 7.5**], **D1**

*** Norvég listás folyóirat*

További közlemények, melyek nem kapcsolódnak az értekezés tárgyához

Bálint ER, Fűr G, Kui B, Balla Z, Kormányos ES, **Orján EM**, Tóth B, Horváth G, Szűcs E, Benyhe S, Ducza E, Pallagi P, Maléth J, Venglovecz V, Hegyi P, Kiss L, Rakoncay Z Jr. Fentanyl but Not Morphine or Buprenorphine Improves the Severity of Necrotizing Acute Pancreatitis in Rats. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(3):1192. doi: 10.3390/ijms23031192. [IF₂₀₂₂: 5.6], **Q1**

Balla Z, Kormányos ES, Kui B, Bálint ER, Fűr G, **Orján EM**, Iványi B, Vécsei L, Fülöp F, Varga G, Harazin A, Tubak V, Deli MA, Papp C, Gácsér A, Madácsy T, Venglovecz V, Maléth J, Hegyi P, Kiss L, Rakoncay Z Jr. Kynurenic Acid and Its Analogue SZR-72 Ameliorate the Severity of Experimental Acute Necrotizing Pancreatitis. *Front Immunol.* 2021; 12:702764. doi: 10.3389/fimmu.2021.702764. [IF₂₀₂₁: 8.787], **Q1**

Fűr G, Bálint ER, **Orján EM**, Balla Z, Kormányos ES, Czira B, Szűcs A, Kovács DP, Pallagi P, Maléth J, Venglovecz V, Hegyi P, Kiss L, Rakoncay Z Jr. Mislocalization of CFTR expression in acute pancreatitis and the beneficial effects of VX-661/VX-770 treatment on disease severity. *J Physiol.* 599, 4955-4971. doi: 10.1113/JP281765. [IF₂₀₂₁: 6.228], **Q1**

Tasi DA, **Orján EM**, Czakó G. Benchmark Ab Initio Mapping of the $F^- + CH_2ClI Sn_2$ and Proton-Abstraction Reactions. *J Phys Chem A.* 2024; 128(49):10568-10578. doi: 10.1021/acs.jpca.4c06716. [IF₂₀₂₄: 2.8], **Q2**

Orján EM, Nacsá AB, Czakó G. Conformers of dehydrogenated glycine isomers. *J Comput Chem.* 2020; 41(22):2001-2014. doi: 10.1002/jcc.26375. [IF₂₀₂₀: 3.376], **Q1**

Tudományometriai adatok

<https://m2.mtmt.hu/gui2/?type=authors&mode=browse&sel=10073212&view=pubTable>

Közlemények száma:	7
Első szerzős közlemények:	3
Összes impact faktor:	30.591
Rangsor (Sci Mago)	D1: 2, Q1: 4, Q2: 1
Független idézettség száma (MTMT2)	36
Hirsch index:	4

BEVEZETÉS

I. A hasnyálmirigy élettana

A hasnyálmirigy a gasztrointesztinális rendszer retroperitoneális mirigye, amely a has felső részén helyezkedik el, és mind exokrin, mind pedig endokrin funkciókat lát el. Az exokrin hasnyálmirigy elsősorban acinus- és dukális epitelsejtekből áll, és feladata emésztőenzimek és elektrolitokban gazdag folyadék termelése. Az acinussejtek szintetizálják, tárolják és kiválasztják az emésztőenzimeket inaktív prekursorok (zimogének) formájában, amelyek a duodenumban válnak aktívvá. A zimogének szekréciója izotóniás, NaCl-ban és H^+ -ban gazdag folyadékban történik, amelyből a dukális epitelsejtek a Cl^- -t HCO_3^- -ra cserélik. Az így kialakuló magas HCO_3^- -koncentráció biztosítja a szekrétrum lúgos pH-értékét, ezáltal semlegesítve a gyomorsavat és optimális pH-t biztosítva a bél lumenében az enzimaktivitáshoz. A duodenumban az enterokináz katalizálja a tripszinogén tripszinné történő átalakulását, elindítva ezzel egy aktivációs kaszkádot. A képződő tripszin ezután további tripszinogént, valamint más proenzimeket aktivál.

II. Akut pancreatitis

II.1. Definíció, epidemiológia, klasszifikáció, és etiológia

Az akut pancreatitis (AP) a hasnyálmirigy exokrin részének hirtelen fellépő gyulladásos betegsége és a nem malignus eredetű gasztrointesztinális panaszok miatti kórházi felvételek egyik vezető oka. A betegség éves incidenciája meghaladja a 30/100 000 lakost és a fejlett országokban emelkedő tendenciát mutat. Súlyossága széles spektrumon mozog és a Revised Atlanta Classification alapján enyhe, középsúlyos vagy súlyos formákba sorolható. Az AP diagnózisához a következő három kritérium közül legalább kettő teljesülése szükséges: (i) jellegzetes tünetek (epigasztrikus, felső hasi fájdalom); (ii) emelkedett szérum lipáz vagy amiláz aktivitás, amely legalább háromszorosa a normálérték felső határának; (iii) a diagnózissal összhangban álló képalkotó vizsgálat. A biliáris pancreatitis és az alkohol okozta AP az esetek körülbelül 60–80 %-át teszi ki, míg a 11,3 mM feletti szérumtrigliceridszinttel járó hipertrigliceridémia által kiváltott AP ritkábban fordul elő (körülbelül 9 %). Az AP ritkább kiváltó okai közé tartozik az endoszkópos retrográd kolangiopankreatográfia, a hiperkalcémia, toxinok és gyógyszerek.

II.2. Patogenezis

A betegség patomechanizmusa összetett és nem teljesen ismert. A normális intracelluláris Ca^{2+} -jelátvitel zavara az emésztőenzimek korai aktiválódását eredményezi azáltal, hogy gátolja a zimogének dukális térbe történő szekrécióját, valamint elősegíti a proenzimek lizoszomális enzimekkel (pl. katepszin B) történő kolokalizációját. A tripszinogén aktivációjától függetlenül a kóros Ca^{2+} -jelátvitel indukálja a nukleáris faktor κB (NF- κB) sejtmagba történő transzlokációját, és az NF- κB aktivációja citokinek (pl. interleukin-1 és -6, tumornekrózis-faktor α) felszabadulásához vezet, amelyek hozzájárulnak a leukociták toborzásához és fokozzák a gyulladásos választ. Emellett a reaktív oxigén gyökök (ROS) acinussejtekben történő képződése a szisztémás clearance csökkenésével párhuzamosan növekszik. Az AP során fellépő egyéb celluláris folyamatok közé tartozik a károsodott autofágia, az endoplazmatikus retikulum stressz, valamint a csökkent dukális HCO_3^- és folyadék szekréció. Bár az AP számos kulcsfontosságú mechanizmusa már ismert, a betegség kezelése sajnos továbbra is tüneti kezelésem alapul.

II.3. A ferroptózis és annak szerepe AP-ben

A ferroptózis egy vasfüggő, nem-apoptotikus programozott sejthalálforma, amelyet a vas felhalmozódása, valamint a ROS és a lipidperoxidok fokozott termelődése jellemez. A vas a Fenton-reakció elindításával kiválthatja a ROS képződést és a lipid-peroxidáz enzimek kofaktoraként működik. Az antioxidáns rendszerek, mint például a glutation-peroxidáz 4 (GPX4) és kofaktora, a glutation (GSH), a foszfolipid-peroxidokat nem toxikus lipid-alkoholokká alakítják, ezáltal védelmet nyújtva a ferroptózissal szemben. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a vas felhalmozódása AP-ben fokozhatja a ferroptózissal kapcsolatos fehérjék expresszióját a hasnyálmirigyben, és hogy a korai tripszinaktiváció képes lebontani a GPX4-enzimet. A szabályozatlan autofágia szintén képes ferroptózist indukálni a ferritin, a fő vasraktározó fehérje lebontásán keresztül, ezáltal oxidatív károsodáshoz vezetve.

III. Endogén hidrogén-szulfid

A hidrogén-szulfid (H_2S) olyan jelátviteli molekulaként ismert, amely számos sejtfiziológiai folyamat szabályozásában vesz részt, és az endogén H_2S szintézis megváltozása többféle betegség kialakulásával hozható összefüggésbe. Emlős sejtekben a H_2S elsősorban L-ciszteinből és homociszteinből képződik a következő három enzim közreműködésével: cisztationin β -szintáz (CBS), cisztationin γ -liáz (CTH) és 3-merkaptopiruvát-szulfurtranszferáz. Az újabb kutatások arra utalnak, hogy a H_2S csökkenti az oxidatív stresszt és citoprotektív hatást fejt ki a ROS semlegesítésével, valamint az antioxidáns enzimek aktivitásának fokozásával. A lipidperoxidokkal való összetett kölcsönhatása, illetve a GPX4 expressziójának serkentése tovább hangsúlyozza szerepét a ferroptotikus folyamatok megelőzésében. Noha a H_2S szintézis fokozása vagy a H_2S adminisztrációja védő hatást mutat gyulladásos állapotokban, a H_2S termelésért felelős enzimek túlzott expressziója akár súlyosbíthatja is a gyulladást. Bár a H_2S élettani és kórélettani hatásait széles körben vizsgálták, még mindig számos kérdés és látszólagos ellentmondás tisztázatlan maradt azzal kapcsolatban, hogy miként fejt ki hatását az élő szervezetekben.

IV. Az organoszulfur molekulák

A kéntartalmú szerves vegyületek, az úgynevezett organoszulfurok, nagy mennyiségben fordulnak elő a természetben, de szintetikus formáik is léteznek. Számos közülük biológiailag aktív és különféle jelátviteli útvonalakra képes hatni (pl. NF- κ B, nukleáris faktor-eritroid 2-kapcsolt faktor 2 – Nrf2), aktiválni ioncsatornákat (K^+ , Ca^{2+} , tranziens receptor potenciál ankirin – TRPA), perszulfidáción keresztül módosítani fehérjék működését, valamint antioxidáns tulajdonságokkal is rendelkeznek. Számos organoszulfur vegyület potenciális H_2S donor és gyulladáscsökkentő hatásuk nagy valószínűséggel a H_2S felszabadulásával függ össze. Több organoszulfur, mint a dimetil-triszulfid (DMTS), a diallil-triszulfid (DATS), a GYY4137, az AP39 és az ATB-346, gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatást fejtenek ki különböző betegségek esetén, azonban az AP-re gyakorolt hatásokról jelenleg nincs információ.

IV.1. DMTS

A DMTS egy természetben előforduló organoszulfur vegyület és a legegyszerűbb szerves triszulfid. Reagál a hemoglobinnal, elősegítve a methemoglobin képződését, továbbá hatékonyan csökkentheti a ciánmérgezést. Kimutatták továbbá, hogy a DMTS aktiválja a TRPA1 ioncsatornát, modulálja a fájdalomérzetet, valamint csökkenti a gyulladást szérumtranszfer-arthritisben.

IV.2. DATS

A DATS egy természetes H₂S donor organoszulfur vegyület, amely gátolja az NF- κ B jelátviteli útvonal aktivációját és megakadályozza a lipopoliszacharid Toll-like receptor 4-hez való kötődését makrofágokban. Emellett antioxidáns hatást fejt ki az oxidatív stressz mérséklésével és az antioxidáns enzimek (pl. szuperoxid-dizmutáz) aktivitásának fokozásával.

IV.3. GYY4137

A GYY4137 egy szintetikus, vízzoldékony H₂S donor organoszulfur molekula, amelyet úgy terveztek, hogy a H₂S-t fokozatosan és tartósan szabadítsa fel. Korábbi kutatások kimutatták, hogy képes csökkenteni a proinflammatorikus citokinek (pl. interleukin-1 és -6, tumornekrózis-faktor α) szintjét, valamint mérsékelni a nitrogén-oxid és a prosztaglandin E₂ szekrécióját.

IV.4. AP39

Az AP39 egy szintetikus, lassú felszabadulását H₂S donor organoszulfur vegyület, amely képes a mitokondrium célzott elérésére. Kimutatták, hogy oxidatív stressz során védi az endotélsejteket és hozzájárul a mitokondriális DNS integritásának megőrzéséhez. Az AP39 továbbá mérsékelte a nyálkahártya károsodást és módosította a szöveti gyulladásos választ nekrotizáló enterocolitisben.

IV.5. ATB-346

Az ATB-346 egy hagyományos nem-szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszert (NSAID), a naproxent, valamint egy kovalensen kapcsolt H₂S donor kémiai csoportot, a 4-hidroxi-tiobenzamidot kombinálja. Számos gyulladásos betegségben gyulladáscsökkentő hatást mutatott azáltal, hogy mérsékelte több gyulladásos paraméter szintjét, beleértve a proinflammatorikus citokinek expresszióját, a leukocita infiltrációt és a ciklooxygenáz-aktivitást. Emellett csökkentette a gyulladást emberekben egy akut dermatitis modellben és jelentős védőhatást mutatott a gasztrointesztinális fekélyek kialakulásával szemben egy 2B fázisú klinikai vizsgálatban.

CÉLKITŰZÉSEK

Tekintettel az organoszulfur vegyületek jelentős gyulladáscsökkentő potenciáljára, célunk az volt, hogy átfogóan vizsgáljuk és összehasonlítsuk az öt legszélesebb körben tanulmányozott organoszulfur molekulát kísérletes AP-ben: ATB-346, DMTS, DATS, GYY4137 és AP39. Emellett célul tűztük ki, hogy mélyrehatóbban vizsgáljuk a DMTS és az ATB-346 hatásmechanizmusát mind *in vivo*, mind pedig *in vitro* kísérletekkel. Részletes célkitűzéseink a következők voltak:

- 1) az említett öt organoszulfur vegyület összehasonlítása, mint terápiás ágensek kísérletes AP-ben *in vivo* (egerek) és *in vitro* (hasnyálmirigy acinussejtek) kísérletekkel
- 2) vizsgálni, hogy a DMTS hogyan befolyásolja az AP súlyosságát az oxidatív stresszre, a sejtek életképességére, az intracelluláris Ca²⁺-jelátvitelre, valamint a szérumszulfid szintekre gyakorolt hatásának tesztelésével
- 3) vizsgálni, hogy az ATB-346 hogyan befolyásolja az AP súlyosságát az oxidatív stresszre, és a ferroptózisra gyakorolt hatásának tesztelésével

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

I. Anyagok és oldatok

Minden vegyszert a Merck Life Science Kft.-től (Budapest, Magyarország) szereztünk be, hacsak másként nem jeleztük. A ceruleint (Cer) (Glenthame Life Sciences, Corsham, Egyesült Királyság) dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk, majd fiziológiás sóoldattal (PS) hígítottuk. A palmitoleinsavat (POA) abszolút etanolban (EtOH) oldottuk. Az organoszulfur vegyületek oldatait a következő módon készítettük: az ATB-346-ot (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) és az AP39-et (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) DMSO-ban, a GYY4137-et (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) PS-ben oldottuk; a DATS-ot (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) és a DMTS-t poliszorbát 80-ban (Poly80) készítettük el. A Western blot-hoz használt antitesteket, a szövettenyésztő médiumot és a malondialdehid (MDA) kolorimetriás tesztkészletet a Thermo Fisher Scientific-től (Waltham, MA, USA) vásároltuk.

II. Állatok

Kísérleteinkhez 8–10 hetes 22–30 g súlyú hím FVB/n egereket használtunk fel. Az állatkísérletek az Európai Unió 2010/63/EU irányelvének és a 40/2013 (II.14.) Kormányrendeletnek megfelelően lettek végrehajtva. Az állatkísérleteket a helyi (Szegedi Tudományegyetem) és az országos etikai bizottságok is jóváhagyták (engedélyszám: X./1714/2020).

III. *In vivo* kísérletek: AP indukció, kezelések az organoszulfurokkal és szöveti mintavétel

A nekrotizáló AP-t intraperitoneális (i.p.) óránkénti 10 × 50 µg/kg Cer injekcióval indukáltuk. Az egyes organoszulfur kezelések dózisait, a beadás módját és időzítését a Táblázat 1. tartalmazza. A DMTS és az ATB-346 esetében egy másik nekrotizáló AP-modellt is alkalmaztunk, amelyben az AP-t az egerekben i.p. óránkénti 2 × 1,35 g/kg EtOH és 2 × 150 mg/kg POA injekcióval idéztük elő. A kontrollesoportok PS-t kaptak Cer vagy EtOH-POA helyett, illetve Poly80-at, DMSO-t, vagy a kettő kombinációját a megfelelő organoszulfur vegyület helyett. Az állatokat 12 órával az első Cer vagy 24 órával az első EtOH-POA injekció után áldoztuk fel.

Táblázat 1. Az organoszulfur kezelések dózisa, a beadás módja és időzítése.

Organoszulfur AP modellek	DMTS		DATS	GY4137	AP39	ATB-346	
	Cer AP	EtOH- POA AP	Cer AP	Cer AP	Cer AP	Cer AP	EtOH- POA AP
Beadás módja	s.c.	s.c.	i.p.	i.p.	i.p.	p.o.	p.o.
Dózisok (µmol/kg)	2 × 400	3 × 600	2 × 25	2 × 25	2 × 0,125	2 × 20	3 × 40
	2 × 600	3 × 800	2 × 50	2 × 50	2 × 0,25	2 × 40	3 × 80
	2 × 800		2 × 100	2 × 100	2 × 0,5	2 × 80	
A kezelések időzítése (órák az első Cer vagy EtOH-POA injekciótól)	2, 5 vagy 0, 3	1, 6, 12 vagy 0, 3 12	2, 5	2, 5	2, 5	2, 5	2, 6, 12

Rövidítések: AP, akut pancreatitis; DMTS, dimetil-triszulfid; DATS, diallil-triszulfid; Cer, cerulein; EtOH-POA, etanol és palmitoleinsav; s.c., szubkután; i.p., intraperitoneális; p.o., per os.

IV. Szövetteni vizsgálatok

A formalinban fixált hasnyálmirigy-mintákat paraffinba ágyazás és metszés előtt dehidratáltuk. A metszeteket hematoxilin-eozinnal festettük, majd két, egymástól független, a kísérleti protokollt nem ismerő szakértő értékelte. A sejtkárosodás, a leukocita-infiltráció és az ödéma mértékének kvantifikálásához szemikvantitatív pontozási rendszert alkalmaztunk.

V. Laboratóriumi vizsgálatok

A hasnyálmirigy víztartalmának meghatározásához a nedves/száraz tömeg arányt számítottuk ki. A szérum amiláz aktivitást egy kereskedelmi forgalomban kapható amiláz aktivitás-meghatározó kittel mértük (Diagnosticum Zrt., Budapest, Magyarország). A hasnyálmirigy mieloperoxidáz (MPO) enzim aktivitását 3,3',5,5'-tetrametil-benzidín-H₂O₂ segítségével határoztuk meg, az abszorbanciát pedig microplate reader-rel mértük. Az MPO aktivitást a Lowry-módszerrel meghatározott teljes fehérjetartalomra normalizáltuk.

VI. Western blot

A GPX4 fehérje expressziót a hasnyálmirigy szöveti homogenátumokból Western blot analízissel határoztuk meg. A minták fehérjekoncentrációját Bradford-módszer segítségével mértük, majd a mintákat denaturáltuk. A fehérjéket nátrium-dodecilszulfát poliakrilamid-gélen (15 %) választottuk szét, ezt követően pedig nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokat Pierce™ Clear Milk Blocking pufferrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) blokkoltuk, majd nyúl anti-GPX4 antitesttel inkubáltuk. Loading control-ként glyceraldehid-3-foszfát-dehidrogenázt (GAPDH) alkalmaztunk. Az immunreaktív fehérjéket tormaperoxidázzal konjugált anti-nyúl immunglobulin segítségével vizualizáltuk.

VII. mRNS extrakció és reverz transzkripció

A hasnyálmirigy egy kis darabját 1 mL TRI-reagensbe helyeztük, majd a mintákat homogenizáltuk, és a homogenátumokat felhasználásig -80°C-on tároltuk (legfeljebb 1 vagy 2 napig). A teljes RNS izolálását kloroform/izopropanol extrakcióval végeztük. A tisztaságot NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével ellenőriztük, az RNS integritását agaróz gél elektroforézissel határoztuk meg. A cDNS-re történő reverz transzkripcióhoz 2 mikrogramm teljes RNS-t használtunk.

VIII. Kvantitatív real-time PCR

A kvantitatív real-time PCR reakciókat a Luminaris Colour HiGreen qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) felhasználásával, a gyártó előírásai szerint, specifikus primerekkel végeztük. A relatív génexpresszió meghatározásához a következő primereket alkalmaztuk: *Cth*, *Cbs*, *Hmx1*, *Sod1*, *Sod2*, *Cat*, *Fth1*, *Txnrd1*. Az mRNS-vizsgálatok esetén a háztartási gén a *Gapdh* volt.

IX. Hasnyálmirigy acinussejt izolálás

Az egér hasnyálmirigy acinussejteket kollagenázos emésztéssel izoláltuk. Az acinusok életképességét tripánkéék festés segítségével gyorsan meghatároztuk, és az *in vitro* mérésekhez csak akkor használtuk fel őket, ha életképességük meghaladta a 90 %-ot.

X. Acinussejtek életképességének mérése

A sejtek életképességének meghatározásához 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid (MTT), calcein-AM és propídium-jodid (PI) módszereket alkalmaztunk. A hasnyálmirigy acinussejteket kezelőoldatokkal vagy azok meghatározott kombinációival inkubáltuk. Az MTT módszer esetén az abszorbanciát microplate reader segítségével mértük. A calcein-AM és PI módszereknél a hasnyálmirigy acinussejtekről képeket készítettünk (4 kép / lyuk) egy Axio Observer 7 (Carl Zeiss, Oberkochen, Németország) fluoreszcens mikroszkóppal. A calcein-AM, PI és H33342 festődések területének meghatározásához ImageJ szoftvert használtunk.

XI. ROS mérés

Az intracelluláris ROS szintet mikrofluoreszcenciás módszerrel határoztuk meg. A hasnyálmirigy acinussejteket kezelőoldatokkal vagy azok meghatározott kombinációival inkubáltuk. A sejtekhez 6-karboxi-2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetátot (carboxy-H2DCFDA) és H33342-öt adtunk, majd a kísérlet végén FLUOstar OPTIMA plate reader-be helyeztük.

XII. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció valós idejű mérése

Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt ($\text{ic}[\text{Ca}^{2+}]$) valós időben követtük egy Axio Observer 7 fluoreszcens mikroszkóp segítségével. Az acinussejteket FURA-2-AM (Biotium, Fremont, CA, USA) festékkel töltöttük fel. A mérés során a sejteket kezelőoldatokkal vagy azok meghatározott kombinációival perfundáltuk. A 340/380 fluoreszcens excitációs arányt mértük, és másodpercenként egy $\text{ic}[\text{Ca}^{2+}]$ mérést rögzítettünk.

XIII. Kis molekulatömegű metabolitok LC-MS/MS mérése hasnyálmirigy szövet és szérum mintákból

A következő kis molekulatömegű metabolitokat határoztuk meg: cisztein, cisztein-perszulfid, glutation, glutation-perszulfid és szulfid. A fehérjetartalmat BCA-módszer segítségével mértük (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás (LC-MS/MS) méréseket egy Thermo Q-Exactive Focus Orbitrap tömegspektrométeren végeztük, amelyhez egy Thermo Vanquish UHPLC rendszer kapcsolódott, és a mintákat két különböző módszerrel elemeztük. Az MS/MS detektálás pozitív ionizációs módban történt, és az analitok kimutatásához nagy energiájú ütközéses disszociációt alkalmaztunk.

XIV. MDA mérés

Az oxigéngyökök indukált lipidperoxidáció markereként szolgáló MDA szintjét szövetmintákban határoztuk meg a gyártó előírása szerint, egy kereskedelmi forgalomban kapható MDA kolorimetriás kit segítségével.

XV. Statisztikai analízis

Az értékeket átlag $\pm$ szórással (SD) formájában adtuk meg. A kísérletek kiértékeléséhez egy- vagy kétutas ANOVA tesztet alkalmaztunk, amelyet Dunnett- vagy Tukey-féle post hoc teszt követett (GraphPad Prism, GraphPad Software LLC, verzió 10.5.0). Szükség esetén Kruskal-Wallis tesztet, majd Dunn-féle post hoc tesztet végeztünk. A $P < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

I. Az organoszulfur vegyületek összehasonlítása kísérletes AP-ben

I.1. Az organoszulfur molekulák dózis függően mérséklék a Cer által kiváltott AP súlyosságát egerekben

Mindegyik organoszulfur vegyületet (ATB-346, DMTS, DATS, GYY4137, AP39) három különböző dózisban alkalmaztuk, hogy felmérjük hatásukat a Cer által kiváltott AP-ben FVB/N egerekben. A Cer szupramaximális dózisával kiváltott AP fokozott szöveti víztartalmat, intenzív leukocita infiltrációt, MPO aktivitást, emelkedett szérum amiláz aktivitást és 40–50 %-os szöveti károsodást eredményezett. A 2×20 $\mu\text{mol/kg}$ ATB-346 nem befolyásolta a betegség súlyosságát. Ezzel szemben a 2×40 $\mu\text{mol/kg}$ dózis szignifikánsan csökkentette a hisztológiai (ödéma, leukocita infiltráció, sejtkárosodás) paramétereket, míg a legmagasabb ATB-346 dózis (2×80 $\mu\text{mol/kg}$) a hisztológiai és laborparamétereket (szöveti víztartalom, MPO, szérum amiláz) egyaránt jelentősen mérsékelte.

Hasonló eredményeket figyeltünk meg, amikor ugyanazon Cer indukálta AP modellben vizsgáltuk a DMTS és DATS különböző dózisainak hatását. Az AP súlyos károsodást okozott a hasnyálmirigy szövetben, míg a DMTS és DATS dóziszfüggő módon mérsékeltek ezt a károsodást. A 2×400 és 2×600 $\mu\text{mol/kg}$ DMTS dózisok hatástalanok voltak, míg a 2×800 $\mu\text{mol/kg}$ dózis szignifikánsan csökkentette az AP súlyosságát. A 2×25 $\mu\text{mol/kg}$ DATS dózis nem befolyásolta a betegség súlyosságát, azonban a 2×50 és 2×100 $\mu\text{mol/kg}$ dózisok szignifikánsan csökkentették az AP-hez társuló ödémát, leukocita infiltrációt, sejtkárosodást és szöveti víztartalmat. Csak a legmagasabb DATS dózis (2×100 $\mu\text{mol/kg}$) tudta csökkenteni a szöveti MPO és szérum amiláz aktivitást is.

A GYY4137 és AP39 hasnyálmirigy-károsodásra gyakorolt hatásának vizsgálatához különböző dózisokat alkalmaztunk Cer indukálta AP-ben. A hisztológiai metszetek súlyos szövetkárosodást mutattak, amelyet ödéma, gyulladásozó sejtek infiltrációja és acinussejtek nekrozisa jellemez. A legkisebb GYY4137 dózis (2×25 $\mu\text{mol/kg}$) szignifikánsan csökkentette a szövetkárosodást, de más vizsgált paramétereket nem befolyásolt. A 2×50 $\mu\text{mol/kg}$ dózis csökkentette a Cer indukálta sejtkárosodást és a szérum amiláz aktivitást, míg a 2×100 $\mu\text{mol/kg}$ GYY4137 dózis markánsan mérsékelt minden vizsgált paramétert, ezáltal csökkentve az AP súlyosságát. Az AP39 2×0.25 $\mu\text{mol/kg}$ dózisa szignifikánsan csökkentette az ödémát, a szövetkárosodást és a szérum amiláz aktivitást, míg a legalacsonyabb AP39 dózis (2×0.125 $\mu\text{mol/kg}$) hatástalan volt. A legmagasabb AP39 dózis (2×0.5 $\mu\text{mol/kg}$) markánsan mérsékelte az AP súlyosságát jellemző összes paramétert.

I.2. Az organoszulfur molekulák *in vitro* védőhatása AP-t kiváltó ágensekkel szemben

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk az organoszulfur molekulák citoprotektív tulajdonságait, életképesség méréseket végeztünk MTT- és PI-módszerekkel. A következő organoszulfur-koncentrációk bizonyultak biztonságosnak és lettek kiválasztva további kísérletekhez: 240 μM DMTS; 100 μM DATS; 10 μM GYY4137; 0,3 μM AP39; 30 μM ATB-346. A primer hasnyálmirigy acinussejteket a következő AP-t kiváltó vegyületekkel kezeltük: Cer, L-arginin-HCl (L-arg) és nátrium kenodeoxikolát (CDC). A 60 mM L-arg és 0,5 mM CDC kezelések szignifikánsan csökkentették a metabolikus aktivitást és toxikus hatást váltottak ki 8 óra elteltével. Ezzel szemben a 240 μM DMTS, 0,3 μM AP39 és 30 μM ATB-346 kezelések

hatékonyan visszaállították a metabolikus aktivitást az L-arg-kezelt csoporthoz képest, míg a CDC hatását csak a 240 μM DMTS tudta mérsékelni. Minden organoszulfur kezelés jelentősen csökkentette az L-arg és CDC által kiváltott toxicitást. Az 1 nM Cer kezelés 8 óránál $16,9 \pm 4,2$ % toxicitást okozott, amelyet minden organoszulfur kezelés szignifikánsan mérsékel, ezzel citoprotektív hatásra utalva.

II. A DMTS gyulladáscsökkentő hatása kísérletes AP-ben

II.1. A DMTS csökkenti az AP súlyosságát egerekben

A tesztelt öt organoszulfur molekula közül a DMTS-t és az ATB-346-ot vizsgáltuk tovább. Egy alternatív, EtOH-POA által kiváltott nekrotizáló AP modellt is alkalmaztunk FVB/N egerekben. A DMTS dózisa (3 $\times$ 600 és 3 $\times$ 800 $\mu\text{mol/kg}$) a gyulladás kiváltását követő 1., 6. és 12. órában kerültek beadásra. Az EtOH-POA AP modellben szignifikánsan megnőtt az ödéma és leukocita infiltráció mértéke. A DMTS mindkét dózisban jelentősen csökkentette a leukocita infiltrációt és az MPO aktivitást. A sejtkárosodás az EtOH-POA AP modellben ~35 % volt, amit a DMTS 3 $\times$ 600 és 3 $\times$ 800 $\mu\text{mol/kg}$ dózisa szignifikánsan mérsékeltek.

II.2. A DMTS modulálja a fiziológiás, de nem a patofiziológiás intracelluláris Ca^{2+} jelátvitelt acinussejtekben

Az $\text{ic}[\text{Ca}^{2+}]$ -t valós időben követtük izolált hasnyálmirigy acinussejtekben. A Cer $\text{ic}[\text{Ca}^{2+}]$ -ra gyakorolt hatásának vizsgálatához a sejteket maximális (0,1 nM) és szupramaximális (1 nM) Cer koncentrációkkal perfundáltuk. A 0,1 nM Cer kezelés globális, oszcilláló emelkedést váltott ki az $\text{ic}[\text{Ca}^{2+}]$ -ban. A Ca^{2+} raktárak ezt követően kimerültek, és néhány perccel később a karbakol, egy acetilkolin (ACh) receptor agonista, nem volt képes releváns Ca^{2+} -jelet kiváltani. A DMTS előkezelés nem befolyásolta a Cer által kiváltott oszcilláció frekvenciáját a Ca^{2+} -nak, azonban a Ca^{2+} -jelek átlagos magasságában szignifikáns növekedés volt megfigyelhető, amikor a Cer kezelést a Cer + DMTS kezeléssel hasonlítottuk össze. Továbbá a Cer + DMTS csoportban a kísérlet végén a karbakolra adott válaszként az $\text{ic}[\text{Ca}^{2+}]$ jelentős emelkedését tapasztaltuk. A Cer szupramaximális koncentrációja (1 nM) egy kezdeti Ca^{2+} -csúcsot váltott ki, majd a jel visszatért a bazális szintre és a stimuláció során nem mutatott további növekedést vagy oszcillációt. A DMTS-sel történő előkezelés nem befolyásolta a Cer által kiváltott patológias Ca^{2+} -jeleket.

II.3. A DMTS csökkenti az oxidatív stresszt egér hasnyálmirigy acinussejtekben

Az intracelluláris ROS szintet karboxi-H2DCFDA segítségével mértük 8 óra kezelés után. A menadion egy fokozott redox-ciklus révén emeli az intracelluláris ROS termelést. Minden alkalmazott menadion koncentráció (10, 30, 50 μM) jelentősen növelte a ROS szintet, míg a 240 μM DMTS szignifikánsan csökkentette a menadion hatását.

II.4. A DMTS növeli a szérum szulfid- és perszulfid szintet

A DMTS AP-vel szembeni védőhatásának további feltáráshoz HPLC-MS/MS alapú kén-metabolomikai vizsgálatokat végeztünk. A hasnyálmirigy szövet- és szérumminták a Cer AP modellből származtak (12 óránál történő feláldozás), amelyenél 2 $\times$ 600 és 2 $\times$ 800 $\mu\text{mol/kg}$ DMTS dózissal kezeltük az állatokat. A 2 $\times$ 600 és 2 $\times$ 800 $\mu\text{mol/kg}$ DMTS dózisok növelték a perszulfid arányt (Cys-SSH/Cys-SH) AP-ben a csak Cer kezelt csoporthoz képest. Emellett mindkét DMTS dózis szignifikánsan

növelte a GSSH/GSH arányt. A szérumban a szulfid (H_2S) szintje is emelkedett mindkét DMTS dózis hatására AP-ben a csak Cer kezelt csoporthoz képest. A hasnyálmirigy szövetben azonban egyik vizsgált metabolit szintjében sem találtunk szignifikáns különbséget a Cer és a Cer + DMTS csoportok között. Összességében eredményeink azt mutatják, hogy a DMTS növeli a szérum szulfid- és kis molekulatömegű perszulfid szintjét, valamint ellensúlyozza a Cer hatását a GSH szintre, de nem változtatja meg egyik mért metabolit szintjét sem a hasnyálmirigy szövetben.

III. Az ATB-346 antioxidáns és antiferroptotikus hatásai kísérletes AP-ben

III.1. Az ATB-346 csökkenti az EtOH-POA által kiváltott AP súlyosságát

Az ATB-346 hasnyálmirigy károsodásra gyakorolt hatásának mélyrehatóbb vizsgálata érdekében teszteltük az ATB-346-ot az EtOH-POA által kiváltott AP modellben FVB/N egerekben. Az ATB-346 dózisa (3×40 és $3 \times 80 \mu\text{mol/kg}$) a gyulladás kiváltását követő 2., 6. és 12. órában kerültek beadásra. Az EtOH-POA indukálta AP fokozta az ödémát, a leukocita infiltrációt és a sejtkárosodást a kontrollcsoporthoz képest. Mindkét ATB-346 dózis (3×40 és $3 \times 80 \mu\text{mol/kg}$) szignifikánsan csökkentette a hisztológiai paramétereket, míg a legmagasabb ATB-346 dózis ($3 \times 80 \mu\text{mol/kg}$) a szöveti víztartalmat is mérsékelte AP során. Mindkét ATB-346 dózis csökkentette a szöveti MPO és a szérum amiláz aktivitást is.

III.2. Az ATB-346 csökkenti a sejteket érő oxidatív stresszt és citoprotektív hatást fejt ki

Az ATB-346 antioxidáns tulajdonságainak vizsgálatához az oxidatív stressz elleni védekezésben résztvevő gének mRNS-expresszióját határoztuk meg. A *Hmox1* mRNS relatív génexpressziója markánsan megemelkedett mind Cer, mind pedig EtOH-POA indukálta AP-ben. Minden vizsgált ATB-346 dózis (2×20 , 2×40 , és $2 \times 80 \mu\text{mol/kg}$) tovább növelte a *Hmox1* mRNS expressziót a csak Cer kezelt csoporthoz képest, míg csak a legnagyobb ATB-346 dózis ($3 \times 80 \mu\text{mol/kg}$) emelte meg a *Hmox1* mRNS mennyiségét az EtOH-POA AP modellben. A *Sod1* génexpresszió mindkét AP modellben szignifikánsan lecsökkent, és egyik ATB-346 kezelés sem tudta hatékonyan visszaállítani a *Sod1* mRNS-t kontrollszintre. A *Sod2* mRNS expresszió markánsan lecsökkent a Cer indukálta AP-ben, míg az EtOH-POA AP modellben nem volt tapasztalható változás a *Sod2* mRNS szintjében a kontrollcsoporthoz képest. Mindkét AP modellben a legnagyobb ATB-346 dózisok ($2 \times 80 \mu\text{mol/kg}$ és $3 \times 80 \mu\text{mol/kg}$) szignifikánsan növelték a *Sod2* mRNS expressziót. A *Cat* mRNS relatív génexpressziója lecsökkent mind a Cer, mind pedig az EtOH-POA indukálta AP-ben. Az ATB-346 kezelések (3×40 és $3 \times 80 \mu\text{mol/kg}$) csak az EtOH-POA AP modellben növelték a *Cat* mRNS mennyiségét.

Életképesség méréseket végeztünk az ATB-346 oxidatív stresszt kiváltó anyagokkal szembeni védő hatásának vizsgálatára a calcein-AM és PI módszerek alkalmazásával. A 0,5 mM hidrogén-peroxid (H_2O_2) kezelés szignifikánsan csökkentette az acinussejtek életképességét és 2 órát követően toxikus hatást váltott ki. Ezzel szemben a 30 μM ATB-346 kezelés csökkentette a H_2O_2 indukálta toxicitást, de nem tudta növelni a celluláris metabolikus aktivitást. Az 50 μM menadion kezelés markánsan csökkentette az acinussejtek metabolikus aktivitását és 30 ± 6 % toxicitást okozott 2 óra kezelést követően. A 30 μM ATB-346 kezelés hatékonyan visszaállította a metabolikus aktivitást a csak menadion kezelt csoporthoz képest. Az intracelluláris ROS koncentrációt karboxi-H2DCFDA alkalmazásával mértük 8 órát követően. Az

1 nM Cer, 50 mM EtOH+POA, 60 mM L-arg, 0.5 mM CDC, és 50 μ M menadion kezelések mind fokozták a ROS termelést, míg a 30 μ M ATB-346 kezelés szignifikánsan csökkentette az előbb említett kezelések hatását a ROS képződésre. Az 1 μ M CCT137690 (CCT) kezelés nem változtatta meg a ROS szintet a kontrollcsoporthoz képest. A 30 μ M ATB-346 kezelés markánsan csökkentette az intracelluláris ROS szintet, megerősítve ROS semlegesítő képességét.

A *Cth* és a *Cbs* gének a transzszulfurációs útvonalban vesznek részt, és a három esszenciális H_2S -szintetizáló enzim közül kettőt kódolnak. Mindkét alkalmazott AP modell csökkentette a *Cth* és a *Cbs* mRNS expressziója. Cer által kiváltott AP-ben a legmagasabb ATB-346 dózis ($2 \times 80 \mu\text{mol/kg}$) markánsan megemelte a *Cbs* mRNS relatív expresszióját; azonban minden más esetben hatástalannak bizonyult.

Az antioxidáns molekulák segíthetnek az oxidatív stressz elleni védekezésben és a lipidperoxidáció megakadályozásában, ezáltal védelmet nyújthatnak a ferroptózissal szemben. Ezért vizsgáltuk az ATB-346 ferroptózisra gyakorolt hatását azért, hogy megmérjük az *Fth1* és *Txnrd1* mRNS expresszióját, az MDA és GPX4 jelenlétét, valamint az ATB-346 azon képességét, hogy képes-e csökkenteni a ferroptózist indukáló vegyületek (erastin, 1S,3R-RSL 3 – RSL 3) hatását. Az *Fth1* mRNS relatív génexpressziója csökkent mind Cer, mind pedig EtOH-POA indukálta AP-ben, míg a legmagasabb ATB-346 dózisok ($2 \times 80 \mu\text{mol/kg}$ és $3 \times 80 \mu\text{mol/kg}$) szignifikánsan növelték az *Fth1* mRNS mennyiségét. A *Txnrd1* egy antioxidáns fehérjét kódoló gén, amelynek mRNS expressziója markánsan megemelkedett a Cer AP modellben, míg az EtOH-POA által kiváltott AP-ben nem volt szignifikáns változás a *Txnrd1* mRNS-ben a kontrollcsoporthoz képest. A $2 \times 80 \mu\text{mol/kg}$ és $3 \times 80 \mu\text{mol/kg}$ ATB-346 dózisok szignifikánsan növelték a *Txnrd1* mRNS expresszióját. Az *Fth1* és a *Txnrd1* mRNS-ek megemelkedett expressziói az ATB-346 kezelések hatására a ferroptózis elleni fokozott védelmet jelzik.

Az MDA az oxidatív stressz és a lipidperoxidáció biomarkere, és az MDA detektálása tükrözheti a ferroptózis által okozott sejtkárosodás mértékét. A hasnyálmirigy MDA szintjének markáns megemelkedését figyeltük meg mind Cer, mind pedig EtOH-POA indukálta AP-ben, és a legmagasabb ATB-346 dózisok ($2 \times 80 \mu\text{mol/kg}$ és $3 \times 80 \mu\text{mol/kg}$) hatékonyan csökkentették az MDA koncentrációt. A GPX4 a ferroptózis egyik alapvető szabályozó faktora, és kulcsfontosságú célpont a ferroptózis elleni védekezésben. A GPX4 fehérjeexpressziója mindkét alkalmazott AP modellben csökkent, azonban az ATB-346 $2 \times 80 \mu\text{mol/kg}$ és $3 \times 80 \mu\text{mol/kg}$ dózisa szignifikánsan növelték a GPX4 szintjét az AP-es csoporthoz képest.

Az életképesség vizsgálatok alapján az 5 μ M erastin és 0,5 μ M RSL 3 kezelések, két ferroptózis-indukáló szer, szignifikánsan csökkentették az acinussejtek metabolikus aktivitását, és $54 \pm 16 \%$, illetve $33 \pm 11 \%$ toxicitást okoztak 8 órát követően. A 30 μ M ATB-346 kezelés helyreállította a metabolikus aktivitást és szignifikánsan csökkentette az erastin és RSL 3 indukálta toxicitást. Az 5 μ M erastin és 0,5 μ M RSL 3 kezelések továbbá növelték az intracelluláris ROS koncentrációt, míg a 30 μ M ATB-346 markánsan csökkentette az erastin vagy RSL 3 által kiváltott ROS termelést.

MEGBESZÉLÉS

I. Az organoszulfurok összehasonlítása kísérletes AP-vel szemben

Az AP továbbra is egy életveszélyes gyulladásos megbetegedés specifikus terápia nélkül, ezért kiemelten fontos a kezelési lehetőségek keresése. Az organoszulfur vegyületek gyógyszerjelöltként jelentős potenciállal rendelkeznek különböző betegségek, különösen a gyulladással összefüggő állapotok kezelésében. Kutatásunkban mind az öt organoszulfur vegyület (ATB-346, DMTS, DATS, GYY4137 és AP39) dózisfüggő módon csökkentette a Cer által kiváltott AP súlyosságát mind a hisztológiai (ödéma, leukocita infiltráció, sejtkárosodás), mind a laboratóriumi (szöveti víztartalom, MPO, szérum amiláz) paraméterek mérséklésével. Azt is kimutattuk, hogy az AP-t kiváltó vegyületek (L-arg, CDC és Cer) sejtkárosodást okoztak, és az organoszulfurok alkalmazása jelentősen csökkentette a kialakuló citotoxikus hatásokat. Az általunk vizsgált valamennyi organoszulfur vegyület citoprotektív hatást mutatott, amely több folyamatnak tulajdonítható. Ezek közé tartozik a fehérjefunkciók védelme fehérje perszulfidáció révén, bizonyos jelátviteli útvonalak modulálása az oxidatív stressz hatásának mérséklésére, valamint a Kelch-szerű ECH-asszociált fehérje 1/Nrf2-rendszer aktiválása. Az életképesség és toxicitás vizsgálatok alapján a GYY4137 és a DATS kevésbé erős citoprotektív hatást mutatott az ATB-346-tal, a DMTS-sel és AP39-cel szemben. Továbbá kimutattuk, hogy az ATB-346 és a DMTS kedvezőbb hatást fejt ki a betegség súlyosságára, mint a DATS, a GYY4137 és az AP39. Összességében a DMTS és az ATB-346 mutatták a legerősebb citoprotektív hatást és hasonló módon befolyásolták a betegség lefolyását. Az *in vivo* és *in vitro* eredményeink, valamint a szakirodalmi adatok megerősítik az organoszulfur vegyületek gyulladáscsökkentő potenciálját és alátámasztják alkalmazhatóságukat gyógyszerjelöltként AP-ben.

II. A DMTS hatása a kísérletes AP súlyosságára

A DMTS gyulladáscsökkentő hatásának igazolására egy másik, EtOH-POA által kiváltott AP modellt is alkalmaztunk. A DMTS kezelés csökkentette a hasnyálmirigy leukocita infiltrációját, az MPO aktivitását és a sejtkárosodást, ezáltal mérsékelve az AP súlyosságát.

A magas, de fiziológiás koncentrációjú Cer (0,1 nM) globális $ic[Ca^{2+}]$ oszcillációkat váltott ki, azonban ezek az oszcillációk 5–7 percen belül megszűntek, és ezt követően az ACh-receptor agonista karbakol nem tudott további Ca^{2+} felszabadulást kiváltani az intracelluláris raktárakból. Ennek ellenére, amikor DMTS előkezelést alkalmaztunk, a 0,1 nM Cer által kiváltott Ca^{2+} oszcillációk hosszabb ideig fennmaradtak, és a karbakol jelentős $ic[Ca^{2+}]$ emelkedést tudott kiváltani. Feltételezzük, hogy az intracelluláris Ca^{2+} raktárak kimerülnek a maximális Cer (0,1 nM) stimuláció hatására, és a DMTS képes ezt megakadályozni. Ugyanakkor a DMTS kezelés nem befolyásolta a sejtek $ic[Ca^{2+}]$ válaszát, amikor a szupramaximális és patológias Cer (1 nM) koncentrációt alkalmaztuk. Ezen megfigyelések alapján arra következtethetünk, hogy a DMTS képes mérsékelni a fiziológiás, de nem a patofiziológiás $ic[Ca^{2+}]$ -t.

A H_2S donor molekulák, például a poliszulfidok, hatékony antioxidánsok és ez a tulajdonság hozzájárulhat kedvező hatásaikhoz különböző betegségekben. AP során jelentős mennyiségű ROS képződik, és a túlzott ROS termelés, valamint az ATP hiány inkább a nekrozissal történő sejthalált, mint az apoptózist segíti elő. A DMTS védő hatást mutatott, amikor az acinussejteket az oxidatív stresszt kiváltó menadionnal kezeltük, megerősítve ezzel antioxidáns képességét. Transzperszulfidáció révén a DMTS

képes szulfán-kén (S^0) donorként működni, kis molekulatömegű perszulfidokat létrehozva vagy fehérje cisztein oldalláncokat perszulfidálva, ezáltal megőrizve azok aktivitását a tioredoxin rendszer felhasználásával. Közvetlen hatásán túl a DMTS, a DATS-hoz hasonló molekulaként, az Nrf2 útvonalon keresztül antioxidáns enzimeket is indukálhat, de ennek igazolása további vizsgálatokat igényel.

Feltehetően a H_2S jelátvitel cisztein oldalláncok oxidatív poszttranszlációs módosításán keresztül, perszulfidokká alakulva valósul meg. A szakirodalmi adatok arra utalnak, hogy gyulladásos betegségekben általában a H_2S termelés és a perszulfidációs szint emelkedése védő szerepet tölt be, azonban ezek szintézise károsodik és csökken. Kén metabolomikai elemzésünk azt mutatta, hogy kísérletes AP-ben a szérum és a hasnyálmirigy szövet szulfid és fehérje perszulfidációs szintje változatlan maradt. Érdemes megjegyezni, hogy a szulfid és perszulfidáció kimutatásának módszerei jelentősen befolyásolják az eredményeket, és a különböző publikációkban eltérőek, ami magyarázhatja az ellentmondó adatokat. Kísérleteinkben a DMTS növelte a szérum szulfid- és kis molekulatömegű perszulfid-szintjét, és a perszulfidok emelkedése a H_2S termelés fokozódását is jelezheti. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy a DMTS H_2S/S^0 donorként működik, amit a szérum H_2S -szintjének emelkedése és a fehérje perszulfidáció fokozódása is alátámaszt, és ez hozzájárulhat az oxidatív vagy gyulladásos folyamatokkal szembeni védő hatásaihoz.

III. Az ATB-346 hatása a kísérletes AP súlyosságára

Az ATB-346 egy naproxen származék, amelyhez kovalens kötéssel kapcsolódik egy H_2S donor csoport, és már számos gyulladásos betegség esetén bizonyította gyulladáscsökkentő hatását. Az ATB-346 AP-re gyakorolt erőteljes gyulladáscsökkentő hatásának megerősítésére egy második, EtOH-POA által kiváltott nekrotizáló AP modellt is alkalmaztunk egerekben. A Cer által kiváltott AP-ben kapott eredményekkel összhangban az ATB-346 csökkentette a betegség súlyosságát az összes hisztológiai és laboratóriumi paraméter mérséklésével.

A szakirodalmi adatok alapján az exogén H_2S gyulladáscsökkentő hatását az antioxidáns Nrf2 aktiválásán, a proinflammatorikus NF- κ B gátlásán és a mitogén aktivált protein kináz jelátviteli útvonalak elnyomásán keresztül fejtí ki. Tekintettel az ATB-346 H_2S donor tulajdonságára, vizsgálatunkban meghatároztuk az oxidatív stressz elleni védekezésben szerepet játszó gének mRNS expresszióját. Az *HMOX1*, *SOD1*, *SOD2* és *CAT* expressziója a hasnyálmirigy antioxidáns védekező képességét tükrözi. Az ATB-346 kezelések dózisfüggő módon markánsan növelték a *Hmox1*, *Sod2* és *Cat* relatív génexpresszióját, ami hozzájárulhat az ATB-346 védő hatásához. A transzszulfurációs útvonal aktiválása, amelyet például a *CBS* gén indukál, fokozhatja a sejtek GSH szintjét, ezáltal csökkentve az oxidatív stresszt. Az ATB-346 szignifikánsan növelte a *Cbs* mRNS relatív génexpresszióját Cer által kiváltott AP-ben, valószínűleg az exogén H_2S felszabadulásának következtében. Az életképesség vizsgálatok kimutatták, hogy az ATB-346 védi az acinussejteket a H_2O_2 és a menadion által okozott citotoxicitással szemben, ami megerősíti antioxidáns tulajdonságait. AP során a megemelkedett $[Ca^{2+}]$ hatására az acinus és gyulladásos sejtek jelentős mennyiségű ROS-t termelnek. Ezért megvizsgáltuk, hogy az ATB-346 csökkenti-e az intracelluláris ROS termelést, és nyújt-e citoprotekciót mind az exogén, mind pedig az endogén ROS-sal szemben primer acinussejtekben. Az AP-t kiváltó ágensek (Cer, EtOH+POA, L-arg és CDC) és a menadion növelték az intracelluláris ROS képződést, míg a nekroptózist kiváltó aurora kináz

inhibitor CCT alkalmazása nem változtatta meg az acinussejtek ROS koncentrációját. Az ATB-346 markánsan csökkentette a ROS termelést, amikor a fent említett kezelésekkel együtt alkalmaztuk, ami megerősíti, hogy az ATB-346 valószínűleg a H₂S felszabadításával semlegesíti a szabad és indukált ROS-t, ezáltal csökkentve az oxidatív károsodást.

Antioxidánsként az ATB-346 védelmet nyújthat a ferroptózissal szemben az oxidatív stressz ellensúlyozásával és a lipidperoxidáció megelőzésével, feltehetően H₂S donor tulajdonsága és a gyulladáscsökkentő hatásai miatt. Ezért vizsgáltuk az ATB-346 hatását a ferroptózisban szerepet játszó gének mRNS expressziójára. Az *FTH1* kulcsszerepet játszik az intracelluláris vaskoncentráció fenntartásában ferroptózis során és részt vesz a ferritinofágiában, az autofágia egy szelektív formájában. Az ATB-346 alkalmazása szignifikánsan növelte az *Fth1* mRNS relatív génexpresszióját, ezáltal valószínűleg korlátozva a szabad vas mennyiségét és gátolva a lipidperoxidok képződését. A *TXNRD1* fenntartja a sejtek redox egyensúlyát a tioredoxin redukcióján keresztül és számos antioxidáns útvonal kulcsfontosságú szabályozója. Az ATB-346 markánsan növelte a *Txnrd1* relatív expresszióját, amelyen keresztül az ATB-346 csökkentheti a lipidperoxidok felhalmozódását. A lipidperoxidációs termékek ferroptózis során emelkednek, és az olyan katabolitok, mint az MDA, értékes markerei az oxidatív stressznek. Az MDA koncentrációja jelentősen megnövekedett mind Cer, mind pedig EtOH-POA indukálta AP-ben, és az ATB-346 hatékonyan csökkentette az MDA szintjét, ami arra utal, hogy az ATB-346 mérsékelte a ferroptózis által okozott sejtkárosodást. GPX4 semlegesíti a lipidperoxidokat, és védi a sejteket és membránokat a peroxidációtól. Kimutatták, hogy a NaHS-ból felszabaduló exogén H₂S aktiválja az Nrf2/GPX4/GSH útvonalat és gátolja a ferroptózist. Az ATB-346 szignifikánsan növelte a GPX4 fehérje expresszióját, valószínűleg az Nrf2 útvonal aktiválásán keresztül, amelyet az ATB-346 H₂S felszabadító képessége vált ki. A GPX4/GSH antioxidáns rendszer gátlása a ferroptózist indukáló erastinnal (GSH kimerítése) vagy RSL 3-mal (GPX4 gátlása) sejthalálhoz és az intracelluláris ROS képződés növekedéséhez vezetett. Az ATB-346 alkalmazása hatékonyan védte az acinussejteket, ami arra utal, hogy képes támogatni az antioxidáns védelmet a GSH szint és a GPX4 aktivitás fokozásával, valamint ettől független mechanizmusokon keresztül is.

IV. Következtetés

Kísérleteink bebizonyították, hogy az öt vizsgált organoszulfur vegyület mindegyike gyulladáscsökkentő és citoprotektív hatást fejt ki. Az öt közül a DMTS és az ATB-346 jelentős védelmet biztosított a kísérletes AP-vel szemben, ezért ezeket választottuk további vizsgálatra annak érdekében, hogy betekintést nyerjünk hatásmechanizmusukba. A DMTS hatékonyan mérsékelte két nekrotizáló AP modell súlyosságát, és kimutattuk, hogy a DMTS modulálja a fiziológiás Ca²⁺-jelátvitelt, csökkenti a ROS szinteket, valamint növeli a szérum szulfid és perszulfid szinteket. Ezek a hatások antioxidáns tulajdonságainak, H₂S donor szerepének és/vagy annak tulajdoníthatók, hogy képes csökkenteni a leukocita infiltrációt és gátolni az MPO aktivitást. Az ATB-346 csökkentette két kísérletes AP modell súlyosságát és antioxidáns hatást fejtett ki áltál, hogy növelte az antioxidáns enzimek expresszióját és csökkentette az intracelluláris ROS koncentrációkat. Emellett növelte a ferroptózisban részt vevő gének expresszióját, csökkentette az MDA szinteket és védelmet nyújtott az acinussejteknek a ferroptózist kiváltó kezelésekkel szemben. Az ATB-346 ezt a hatást a GPX4/GSH antioxidáns rendszer fokozásán keresztül,

valamint ettől függetlenül is kifejtette. Az ATB-346 donor csoportjából felszabaduló H_2S és a ciklooxigenáz gátlás együttesen magyarázatot adhat az említett hatásokra.

Eredményeink azt mutatják, hogy az organoszulfurok gyulladáscsökkentő és citoprotektív hatásokkal rendelkeznek, így ígéretes terápiás vegyületek lehetnek az AP kezelésében. Összességében elmondható, hogy az organoszulfur vegyületek további vizsgálatot érdemelnek ebben a potenciálisan halálos betegségben.

ÖSSZEGZÉSEK

Az új eredmények összegzése

- Mind az öt organoszulfur (ATB-346, DMTS, DATS, GYY4137, AP39) csökkentette a kísérletes AP súlyosságát és citoprotektív hatást fejtett ki
- A DMTS és az ATB-346 bizonyult a leghatékonyabbnak, ezért ezeket választottuk további vizsgálatokra
- A DMTS modulálta a fiziológias Ca^{2+} -jelátvitelt, és csökkentette a menadion által kiváltott ROS szinteket
- A DMTS növelte a szérum H_2S szintet és a fehérje perszulfidációt, ami H_2S donor tulajdonságra utal
- Az ATB-346 fokozta a hasnyálmirigy antioxidáns génjeinek (*Hmox1*, *Sod2*) expresszióját, és semlegesítette a képződött ROS-t
- Az ATB-346 gátolta a ferroptózist a GPX4/GSH rendszer révén, valamint az *Fth1* and *Txnrd1* expressziójának növelésével

TÁMOGATÓK

Ez a munka nem jöhetett volna létre az Emberi Erőforrások Minisztériuma (EFOP-3.6.2–16–2017–00006), a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (GINOP-2.3.2–15–2016–00034, NKFIH FK143566, NKFIH K135874), valamint a Bólyai János Kutatási Ösztöndíj (BO/00866/20/5) támogatása nélkül.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném kifejezni legőszintébb köszönetemet témavezetőmnek, **Dr. Kiss Lórándnak**, valamint mentoromnak, **Prof. Dr. Rakonczay Zoltánnak**. Hálás vagyok a tudásukért, útmutatásukért és támogatásukért; nélkülük ez a munka nem jöhetett volna létre.

Nagyon hálás vagyok továbbá együttműködő partnereinknek, **Prof. Dr. Pintér Erikának**, **Prof. Dr. Nagy Péternek**, **Prof. Dr. Hegyi Péternek**, **Dr. Maléth Józsefnek**, **Dr. Pallagi Petrának**, **Dr. Venglovecz Viktóriának**, **Dr. Kormos Viktóriának**, **Dr. Pozsgai Gábornak**, **Dr. Batai Zóárd Istvánnak**, **Dr. Dombi Ágnesnek**, **Dr. Ammar Al-Omarinak**, **Dr. Ditrói Tamásnak** és **Jurányi Eszter Petrának**, a kísérletek elvégzésében nyújtott kivételes segítségükért és támogatásukért.

Köszönetet szeretnék mondani kollégáimnak, **Dágó Ágnesnek**, **Ola Salamahnak**, **Sándor Bálintnak**, **Dr. Mihalekné Fűr Gabriellának**, **Dr. Bálint Emese Rékának**, **Dr. Kormányos Eszter Sárának**, **Balog Beáta Adélnak**, **Dr. Csabafi Krisztinának**, **Dr. Szakács Júliának**, **Dr. Ibos Katalinnak**, **Dr. Sárközy Márta Juliannának**, **Dr. Bagosi Zsoltnak**, **Dr. Balla Zsoltnak**, **Dr. Losonczy Rékának**, **Dr. Kis Mersének**, **Dr. Volford Dávidnak**, **Lilian Azarnak**, **Dr. Koncz Istvánnak** és **Dr. Jászberényi Miklósnak**, az évek során nyújtott segítségükért, bátorításukért és tanácsaikért. Külön köszönet illeti csapatunkat azért, hogy a munkahelyet felejtethetetlen pillanatokkal töltötték meg.

Ez a disszertáció nem valósulhatott volna meg **Bódai Zsófia**, **Márkus Máté**, **Takácsné Mihalik Boglárka**, **Gémes-Horváth Boglárka**, **Börcsökne Püspök Tímea**, **Vass Nóra Ildikó**, **Kiss Gusztáv** és **Fráter Zsuzsanna** értékes segítsége és támogatása nélkül.

Végül, de nem utolsósorban, külön köszönettel tartozom családom minden tagjának és valamennyi barátomnak rendíthetetlen támogatásukért, bizalmukért és végtelen türelmükért. Végtelenül hálás vagyok szüleimnek, **Istvánnak** és **Bernadettnek**, valamint testvéremnek, **Máténak**, minden szeretetért és örömteli pillanatért, amelyet megosztottak velem. Külön köszönet illeti **Balázst** és **Nórát**, kedves barátaimat, akik az elmúlt években rengeteg segítséget, hálás vagyok **Zsófiának** is minden tanácsáért, bátorításáért és a számtalan örömteli pillanatért, amelyek átsegítettek az elmúlt néhány nehéz hónapon. Támogatásuk minden nap inspirál, és ezt a disszertációt nekik szeretném ajánlani.

“Semmitől sem kell félni az életben; csak meg kell érteni. Most jött el az idő, hogy többet értsünk, hogy kevesebbet féljünk.” — Marie Curie