

37. TAVASZI OTDK FORDULÓ BIOLÓGIA SEKCIÓ

**Az AP39 és ATB-346 kénorganikus vegyületek
csökkentik a kísérleti nekrotizáló akut
hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságát**

**Kutatóhely: Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Kórélettani Intézet**

Készítette: Sándor Bálint
SZTE TTIK Biológia BSc III. évfolyam
hallgató

Témavezető: Dr. Kiss Lóránd
Tudományos főmunkatárs
SZTE-SZAOK Kórélettani Intézet

Társtémavezető: Orján Erik Márk
PhD hallgató
SZTE-SZAOK Kórélettani Intézet

Belsőkonzulens: Sótiné Dr. Bagyánszki Mária
Egyetemi docens
SZTE TTIK Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

**Szeged
2024**

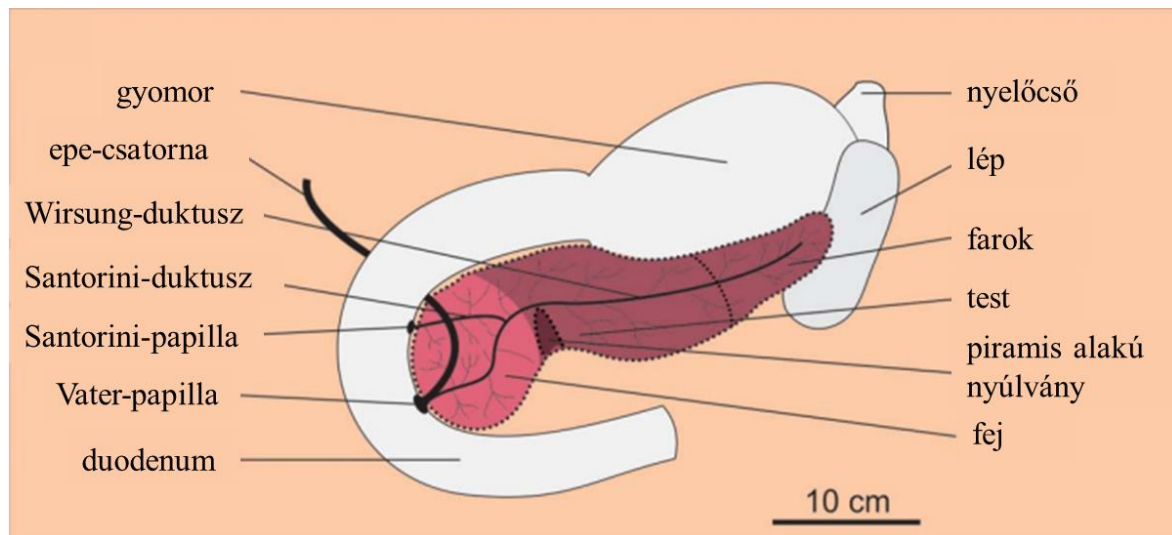
Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	3
1.1.	A pankreász anatómiai áttekintése	3
1.2.	A pankreász sejteinek áttekintése	4
1.2.1.	Endokrin sejtek általános jellemzése	4
1.2.2.	Exokrin sejtek általános jellemzése	5
1.3.	A pankreász exokrin sejteinek fő feladata	5
	A pankreász acinus sejteinek	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
1.4.	működése fiziológiai körülmények között	6
1.5.	A pankreász betegségei	8
1.5.1.	Az akut pankreatitisz	8
1.5.2.	Az AP pathomechanizmusa acinus sejtekben	9
1.5.3.	Krónikus pankreatitisz	11
1.6.	A hidrogén-szulfid hatása az élőszervezetekre	12
1.6.1.	Endogén módon felszabaduló H ₂ S	12
1.6.2.	Az organoszulfur vegyületek hatásai a gyulladásban	14
1.6.3.	Exogén módon felszabaduló H ₂ S	15
1.6.3.1.	A H ₂ S hatásai az AP-ban	15
1.6.3.2.	AP39 szerepe a gyulladásban	15
1.6.3.3.	ATB-346 szerepe a gyulladásban	16
2.	Célkitűzés	17
3.	Anyagok és módszerek	18
3.1.	Oldatok:	18
3.1.1.	Az acinus izoláláshoz használt oldatok	18
3.2.	Állatok	18
3.3.	In vivo egér kísérletek	19
3.4.	Az in vivo egér kísérleteket követő vizsgálatok	19
3.4.1.	Szöveti értékelés	20
3.4.2.	Pankreatikus mieloperoxidáz aktivitás mérés	20
3.4.3.	Pankreász víztartalom meghatározás	21
3.4.4.	Szérum amiláz aktivitás meghatározás	21
3.5.	Pankreász acinus sejtek izolálása	22
3.6.	Pankreász acinus sejtek életképességének vizsgálatai	23
3.6.1.	Propídium-jodid mérés	23
3.6.2.	MTT-teszt	24
3.6.3.	Statisztikai analízis	24
4.	Eredmények	25
4.1.	Az AP39 hatása a cerulein által kiváltott akut pankreatitisz súlyosságára egerekben	25
4.1.1.	A pankreász szövet ödémájának és víztartalmának meghatározása	25
4.1.2.	A szöveti leukocita infiltráció és MPO mennyiségének meghatározása	26
4.1.3.	A szöveti sejtkárosodás és szérum amiláz aktivitás	27
4.2.	Az ATB-346 hatása a cerulein által kiváltott akut pankreatitisz súlyosságára	28
4.2.1.	A pankreász ödémájának és víztartalmának meghatározása	28
4.2.2.	A szöveti leukocita infiltráció és MPO mennyiségének meghatározása	29
4.2.3.	A szöveti sejtkárosodás és szérum amiláz szintje	30
4.3.	Az AP39 és az ATB-346 hatása primer acinus sejtek életképességére	30
4.3.1.	Az AP39 és az ATB-346 hatása a CDC által indukált sejtkárosodásra	31
4.3.2.	Az ATB-346 és az AP39 hatása az L-arginin HCl által indukált sejtkárosodásra	32
4.3.3.	Az ATB-346 és az AP39 hatása a cerulein által indukált sejtkárosodásra	33
5.	Diszkusszió	35
6.	Összefoglalás	36
7.	Köszönetnyilvánítás	37
8.	Irodalomjegyzék	38

1. Bevezetés

1.1. A pankreász anatómiai áttekintése

A pankreász a gyomor-bélrendszer része és a has felsőrészénél található (Longnecker 2014). A humán pankreásznak 3 különböző részét különböztetjük meg: a fejét, a testét és a farkát (1. ábra). Feje C-alakú morfológiát mutat, ami illeszkedik a felette lévő duodenumhoz. A pankreász keskeny testi része a hasüregben a gyomor mögött horizontálisan, mediális irányban helyezkedik el és keresztezi az alsó mezenterikus vénát, artériát, abdominális aortát, véna cava inferiort és a portális vénát. A pankreász farki része pedig érintkezik a lép hílussal. A humán pankreász egy 14-23 cm hosszú, 2-9 cm széles, 2-3 cm vastag 100 g körüli tömegű szerv. A pankreáson belül szöveti válaszfalakat találhatunk, amelyek behálózva különálló lebenyeket majd tovább hálózva kisebb 1-10 mm átmérőjű lobulusokat alkotnak. A pankreász sejtek által szekretált enzimek az acinus lumenébe, majd az interkaláris duktuszba jutnak. Az interkaláris duktális csatornák kicsi intralobuláris, majd nagyobb átmérőjű interlobuláris csatornába szedődnek össze. Továbbá a nagyobb átmérőjű interlobuláris duktális csatornák a fő duktális csatornába a (Wirsung duktus) szájadzanak be, ami az egész pankreáson végig halad. A fő duktális csatorna beszájadzik a közös epecsatornába, ami a Vater-papillán keresztül csatlakozik a duodenumhoz. A humán pankreásban néha található egy másik duodenumba szájadzó csatorna is, amit Ductus Santorininek nevezünk. Ez a kivezető cső a közös epevezetéktől függetlenül a proximális duodenumba fog vezetni a pankreász dorzális részéből (Dolenšek, Rupnik, és Stožer 2015).



1. ábra: Pankreász anatómiája (Dolenšek, Rupnik, és Stožer 2015)

1.2. A pankreász sejtjeinek áttekintése

1.2.1. Endokrin sejtek általános jellemzése

A pankreászban megkülönböztetünk exokrin és endokrin elválasztású sejteket. Ezek a sejtek különböző funkciókat látnak el a szervezeten belül. Az exokrin része emésztőenzimeket választ ki a tápcsatornába, az endokrin része hormonokat szekretál a vérbe. A pankreász 1-4%-át az endokrin szekréciót végző Langerhans-szigetek teszik ki (Longnecker 2014). Ezek a sejtek ovális, kör vagy szabálytalan morfológiát mutatnak és egy Langerhans-szigetben több ezer is megtalálható (Dolenšek, Rupnik, és Stožer 2015). A szigetek legalább 5 féle polipeptid hormont képesek szekretálni endokrin módon: inzulint, glükagont, szomatosztatint, ghrelint és pankreász polipeptidet (Longnecker 2014). A legnagyobb számban a béta sejtek találhatók meg, melyek inzulint termelnek és a Langerhans-szigetek 50-70%-át teszik ki. Az alfa sejtek 20-40%-ban találhatók meg és glükagont, a delta sejtek és az F-sejtek kevesebb mint 10%-ban vannak jelen és szomatosztatint, illetve pankreász polipeptidet, az epsilon sejtek pedig ghrelint szintetizálnak és kevesebb mint 1%-ban találhatók meg a Langerhans-szigetekben (Dolenšek, Rupnik, és Stožer 2015). A glükagon és az inzulin a vércukorszintet szabályozza, míg a ghrelin a szervezet energia homeosztázisáért felel (Yanagi és mtsai. 2018; Zhou és Melton 2018). A szomatosztatint a gyomor-bél hormonok ürülését, a pankreász enzimek felszabadulását és a bélrendszer mozgását regulálja (Tulassay 1998). A pankreász polipeptid pedig fontos szerepet játszik a gyomorban táplálék ürülésének modulálásában, mivel gátolja az epe szekréciót és jelentős glükózsabályozó funkcióval is rendelkezik (Banerjee és Onyuksel 2012).

1.2.2. Exokrin sejtek általános jellemzése

A pankréaszt körülbelül 96%-át exokrin elválasztású mirigy sejtek teszik ki. A szövet exokrin állományának csoportjába tartozó fő sejtek az acinus és a dukális sejtek, melyek az idegrendszer és hormonok szabályozása alatt állnak (Longnecker 2014). Az acinus sejtek csonka piramis alakú morfológiát mutatnak és a pankréász funkcionális egységeiként proenzimeket szekretálnak, amik a duodenumban aktiválódnak (Leung és Ip 2006). A dukális sejtek fontos szerepet töltenek be az enzimek szekréciójában. Képesek alkalikus hidrogén-karbonátban gazdag folyadékot szekretálni, ami semlegesíti az erősen savas pH-t és megakadályozza a korai tripszinogén aktivációt a duodenumban. A dukális sejtek bikarbonát szekrécióját számos csatorna végzi, de az egyik legfontosabb az ATP-függő ABC-transzporter a CFTR-csatorna (Barreto és mtsai. 2021). Ennek a csatornának hiánya vagy kóros működése fontos szerepet játszik egyes betegségek kialakulásában és fokozottan tanulmányozzák az akut pankreatitist kiváltó okaiban (Pallagi, Hegyi, és Rakonczay 2015).

1.3. A pankréász exokrin sejtjeinek fő feladata

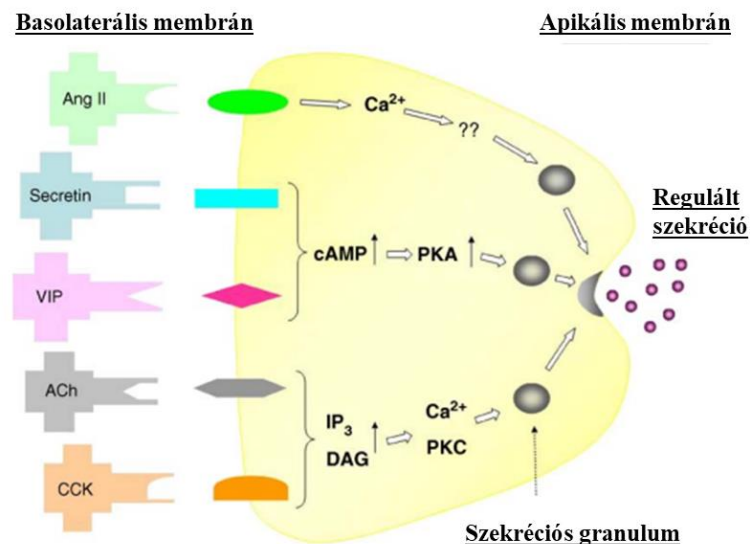
A pankréász exokrin sejtjeinek egyik fő feladata az emésztőenzimek kiválasztása a duodenumba és a bevitt táplálékok emésztése. A pankréász különböző tápanyagokra specifikus enzimeket tud elválasztani. A fehérjéket a proteázok hidrolizálják, a nukleinsavakat nukleázok és a szénhidrátokat glükózidázok. Megkülönböztetünk az enzimeken belül közvetlen módon aktiválódó emésztőenzimeket, melyek enzim hasítás nélkül képesek aktiválódni. Illetve vannak enzim dependens zimogén enzimek, melyek más enzimek segítségével aktiválódnak. Az utóbbiaknak két osztályát különböztetjük meg, a szerin proteázokat és a metalloproteináz típusú enteropeptidázokat. A szerin proteázok családjába tartoznak többek között a tripszinek, a kimotripszinek és elasztázok, melyek különböző specifikus aktív centrumot hordoznak. A tripszin központi szerepet játszik a többi emésztőenzim szabályozásában. A tripszin a legnagyobb mennyiségben található meg és az emésztőenzimek mintegy 19%-át teszi ki a hasnyálnak. Az aktiválódott tripszin bázikus helyen hidrolizálja a peptideket, amelynek hasítása történhet arginin és lizin mentén (Whitcomb és Lowe 2007). Az aktiválásában fontos szerepet játszik az enterokináz, ami az enzimet a hasítás során tripszinné alakítja. A duodenumban az aktivált tripszin további proenzimek (pl.: kimotripszinogén, prokarboxipeptidáz, proelasztáz) aktivációját eredményezi (Hoyle 1997). A kimotripszin a második leggyakoribb szerin proteáz,

9%-ban található meg a pankreász által szekretált enzimek között. A kimotripszin aromás aminosavak mentén hidrolizál, mint például a triptofán, fenil-alanin és tirozin. A harmadik fő enzim a már említett szerin proteázok fő osztályába tartozó elasztáz. Ezt az enzimet a tripszin aktiválja a duodenumba és a szerin, glicin, alanin elágazó aminosavaknál képes hasítani. A karboxipeptidázok a másik fő osztályba, a cinket tartalmazó metalloproteázok osztályába tartoznak. Ezen enzimeknek további alosztályait különböztethetjük meg, melyek között vannak, amelyek a fehérje utolsó savas, aromás, semleges aminosav oldalláncát támadják, ezeket a karboxipeptidáz A alosztályába soroljuk. Illetve vannak, amelyek bázikus oldalláncú aminosavak mentén hasítanak, őket a karboxipeptidáz B enzimek közé soroljuk. A zsírok emésztéséért a pankreász által termelt lipázok felelősek. A lipázok közül az egyik legismertebb a pankreatikus lipáz, ami egy karboxil-észteráz és acilglicerideket képes bontani (Whitcomb és Lowe 2007). A kolipáz koenzimként nélkülözhetetlen a pankreatikus lipáz megfelelő működéséhez (Lowe 1994). A legspecifikusabb lipáz a karboxil észter lipáz, ami képes triglicerideket, ceramidokat, foszfolipideket, vitaminésztereket és galaktolipideket bontani. A hasnyálat tartalmazó 4. zsírsav bontó enzim a foszfolipáz A2, amely döntő szerepet játszik a foszfolipidek emésztésében és metabolizmusában. A pankreásznak egyetlen szekretált szénhidrátokat bontó glükozidáz enzime van, az α -amiláz. Az enzim közvetlenül aktiválódik és képes a poliszacharidokat oligoszacharidokká és monoszacharidokká bontani, melynek fő hasítási helye a keményítő 1-4 α -D-glükóz glikozidos kötéseinek bontása (Whitcomb és Lowe 2007). Továbbá a pankreász nedvnek elkülönítünk DNS-t és RNS-t bontóenzimet, a DNáz 1-et és az RNáz A-t (Williams 2021; 2018). Az RNáz A katalizálja az egyes szálú RNS-ben lévő 3'-5'-foszfodiészter kötések hidrolízisét, ha a 3' végen pirimidin váz található (Williams 2018). A DNáz 1 egy kétértékű kation függő endonukleáz, amely képes a DNS 3' és 5' végén található foszfodiészter kötések bontani (Williams 2021).

1.4. A pankreász acinus sejtjeinek működése fiziológiai körülmények között

Az acinus sejteken belüli szignalizáció fiziológiai körülmények között fontos szerepet tölt be mind a proenzimek szekréciójában, az ATP-szintáz aktivitásában a mitokondriumban és a patológiás AP-t kiváltó tényezőkben (Maléth és Hegyi 2016). A pankreász enzimeinek szekréciója neuro-hormonális szabályozás alatt áll (2. ábra). A szekréció az acinus sejteken és duktális sejteken keresztül valósul meg. A Ca^{2+} megemelkedését a citoszolban a *nervus vagus*

és a kolecisztokinin (CCK) tudja serkenti (Petersen és mtsai. 2021). A *nervus vagus* acetilkolin felszabadulás által aktiválja a metabotropikus-acetil-kolin 3 receptorokat és elindítja a szignáltranszdukciós utat a sejtekben. A receptor G_q -proteinhez kapcsolt és aktiválja a foszfolipáz C-t, ami a foszfatidil-inozitol-4-5-biszfoszfátot hasítja diacil-glicerinné és inozitol-3-trifoszfáttá (IP_3). A magas IP_3 szint következménye, hogy a molekula a citoszolban hozzákötődik a simafelszínű-endoplazmatikus retikulum (ER) IP_3 -receptoraihoz (IP_3R) és Ca^{2+} kiáramlást okoz (Maléth és Hegyi 2016; Petersen és mtsai. 2021). A Ca^{2+} kiáramlás hat az ER-ben található Ryanodin-receptorokra és az IP_3R -ra, aminek eredményeként még több Ca^{2+} fog kiáramlani a citoszolba (Pandol és Gottlieb 2022). Ez a szignáltranszdukciós út endokrin módon is egyaránt létre tud jönni kolecisztokinin által CCK-1 receptorokhoz kötve (Biczó és mtsai. 2018).



2. ábra A pankréász acinus sejtek enzim szekrécióját indukáló ágensek. (Leung és Ip 2006)
Rövidítések: Ang II: Angiotenzin II, VIP: Vazointesztinális polipeptid, ACh: Acetil-kolin, CCK: Kolecisztokinin, cAMP: Ciklikus-adenozin-monofoszfát, PKA: Protein kináz A, DAG: Diacilglicerin IP_3 : Inozitol-3-trifoszfát, PKC: Protein kináz C

A magas Ca^{2+} jelek a sejtek apikális részére korlátozódnak, aminek oka a zimogének apikális részen történő szekréciója és az IP_3R érzékenysége citoszolba (Gerasimenko, Gerasimenko, és Petersen 2014; Saluja és mtsai. 2019). A Ca^{2+} homeosztázis fenntartásában fontos szerepet játszanak az ATP-függő "stored-operated" Ca^{2+} (SOCE) csatornák, mint például a tranzien receptor potenciál csatorna 3 (TRPC3), a „calcium release-activated calcium channel protein 1” (Orai1) és az ER-ben található „Stromal interaction molecule 1” (STIM1) (Maléth és Hegyi 2016). A citoszolból a Ca^{2+} visszatöltését az ER-ben található simafelszínű endoplazmatikus-retikulum Ca^{2+} (SERCA) csatorna biztosítja, illetve a citoplazma túlzott mértékű Ca^{2+}

koncentrációját a sejtmembránba lokalizálódó plazmamembrán Ca^{2+} pumpa (PMCA) tartja fent. Ha az ER-raktárak kezdenek kimerülni, akkor a plazmamembránban lévő STIM-1 Ca^{2+} szenzorok érzékelik és indukálják nyitásra a SOCE-csatornákat, amik a plazmamembránhoz közelebb lévő ER-ciszternákon helyezkednek el. Ennek következtében a csatornák kinyílnak és biztosítják a Ca^{2+} beáramlást az extracelluláris térből az ER-be (Pandol és Gottlieb 2022).

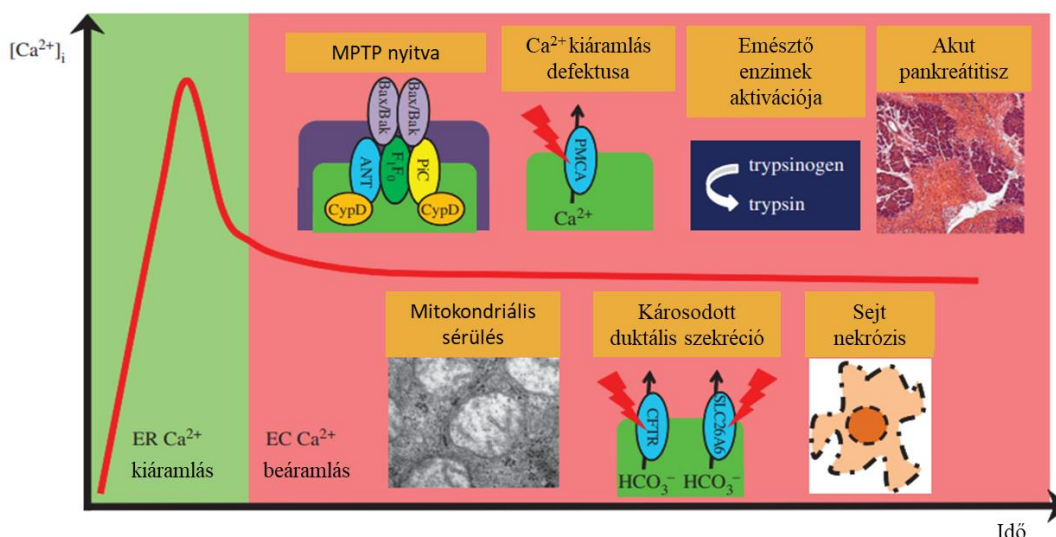
1.5. A pankreász betegségei

1.5.1. Az akut pankreatitisz

A pankreásznak számos betegsége ismert, ezek közül az egyik az akut pankreatitisz (AP), ami a szerv heveny gyulladásos állapotát jelenti (Saluja és mtsai. 2019). AP az egyik leggyakoribb kórházi kezelést igénylő gasztroenterológiai betegség, amely egyaránt érint fiatal gyermekeket, időseket, férfiakat és nőket (Szatmary és mtsai. 2022). Növeli a gyulladás kialakulásának kockázatát az alkohol fogyasztás, a dohányzás, illetve a magas zsírbeviteli étrend és az epekő okozta duktális csatorna elzáródás (Barreto és mtsai. 2021). A gyulladás diagnosztizálása 3 kritériumon alapszik: tartós, gyakran hátba sugárzó epigasztrikus fájdalom; az amiláz vagy lipáz 3-szoros szintje a normál értékhez képest; a képalkotó eljárások diagnózisa (Mágneses magrezonancia képalkotás-MRI, Ultrahang-UH, Kontrasztanyagok Computertomográfia-CECT). Ha a tünetek közül legalább kettő teljesül, akkor nagy valószínűséggel akut AP áll fenn. Az AP-nek a szöveti vizsgálatok alapján két típusa van, az interstitiális ödémás pankreatitisz és a nekrotizáló pankreatitisz. Az interstitiális AP-ra jellemző a pankreász diffúz megnagyobbodása, amely ödémában jelenik meg, és általában a klinikai tünetei egy héten belül elmúlnak. A nekrotizáló pankreatitisz sokkal súlyosabb az ödémásnál, mert a peripankreatikus tér és a pankreász szövete is sérül, ami szervi diszfunkciót is okoz. A súlyosságot a 2013-as felülvizsgált atlantai klasszifikáció alapján 3 csoportra osztották: enyhe AP, közepesen súlyos AP és súlyos AP. Az enyhe AP-re jellemző, hogy nincs szervi elégtelenség és lokális szövődmény. Ellenben a közepesen súlyos gyulladás szervi elégtelenséggel és szervi nekrozissal járhat. Hosszantartó beteg ellátást nem igényel, de vannak egyes esetek, amikor krónikus szövődmény alakul ki, mint például krónikus szívelégtelenség. A súlyos AP jellemzője a több mint 48 órán át tartó tartós szervi elégtelenség, amit kísérhet fokozott szisztémás gyulladásos válasz szindróma (SIRS), és akut légzési diszstressz szindróma (ARDS). Ebben a csoportban a mortalitása elérheti akár az 50%-ot is (Banks és mtsai. 2013).

1.5.2. Az AP pathomechanizmusa acinus sejtekben

Az AP pathomechanizmusában nagyon fontos szerepe van a patológiásan magas intracelluláris Ca^{2+} koncentrációnak. A gyulladást kiváltó egyik legfőbb tényező, hogy Ca^{2+} koncentráció felborul és patológiás Ca^{2+} szignálok alakulnak ki a citoszolban (3. ábra). A magas Ca^{2+} szint következménye, hogy a mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus (MPTP) miatt a mitokondrium membrán átjárása nagyobb lesz, így emelkedik a reaktív oxigén gyökök (ROS) szintje az intracelluláris térben. Az MPTP-n keresztül víz áramlik a mitokondrium mátrixába és feszülést indukál a belső membránra, ami kihat az intermembránban kialakuló elektrokémiai gradiensre (Maléth és Hegyi 2016). Ennek hatására a mitokondriumban található légzési lánc szétkapcsolódik és a feszülés hatására a mitokondrium kippukad, majd sérülés-asszociált molekuláris mintázatok (DAMP) szabadít fel a citoszolba (Pandol és Gottlieb 2022). Mivel a mitokondriumok működése lecsökken, így az ATP képzés is, ezért az ATP-dependens pumpák, amik az intracelluláris Ca^{2+} homeosztázis fenntartásában játszanak szerepet elvesztik aktivitásukat (Maléth és Hegyi 2016). Ezek a változások korai tripszinogén aktivációhoz vezethetnek az acinus sejtekben és a többi proenzim aktivációját fokozzák, majd a sejtek károsodását vonják maguk után. Az intracelluláris térben lévő lizoszómák és zimogén granulumok kolokalizációja az egyik főbb oka a korai tripszinogén aktivációnak. Az AP során az autofágiát végző lizoszómák is zavart szenvedhetnek, ami által csökken a lizoszómális membrán fehérjék (LAMP) mennyisége. Ezek a fehérjék erősen glikolizált molekula szerkezetük miatt védik a lizoszóma membránt és a citoplazmát a savas hidrolázoktól. Fontos szerepet töltenek be még fiziológiai körülmények között a proenzim aktivitásában a savas hidrolázok, ilyen például a katepszin L és a katepszin D. A katepszin L képes lebontani a tripszint és a tripszinogént, míg a katepszin D fontos szerepet tölt be a katepszin B aktivitásának mechanizmusában. Ha a LAMP fehérjék zavart szenvednek vagy mennyiségük csökken, illetve a katepszin L és a katepszin B egyensúlya felborul akkor károsodott korai autofágia történik az acinus sejtekben. Ennek eredménye, hogy a lizoszómák és az autofagolizoszómák fuzionálnak a zimogén granulumokkal és a bennük található savas hidrolázok (katepszin B) aktiválják a tripszinogént tripszinné. Ezáltal a tripszin működésbe hozza a többi granulumban található proenzimet, ami az acinus sejtek „önmésztésével” majd pusztulásával fog járni (Saluja és mtsai. 2019).



3. ábra A pathológiásan magas intracelluláris Ca^{2+} hatásai a pankréasz acinus és duktusz sejtekre, aminek a következménye az AP kialakulása. Az AP-t okozó toxikus stresszfaktorok hatására az intracelluláris Ca^{2+} felszabadulhat az endoplazmatikus retikulumból (ER) vagy savas organellekből. Azonban a toxinok állandó jelenléte több mechanizmuson keresztül megnyújtja a Ca^{2+} jeleket, ami az ER Ca^{2+} kimerülését és az extracelluláris Ca^{2+} beáramlását fogja eredményezni. A stresszfaktorok (például epesavak vagy nem oxidatív etanol-metabolitok) közvetlenül károsíthatják a mitokondriumokat, növelve a reaktív oxigénfajok termelését, ami hosszú távon az MPTP megnyitásához és a mitokondrium pusztulásához vezet. Az intracelluláris ATP hiánya zavarja a Ca^{2+} visszavételi pumpák, például a PMCA vagy a SERCA működését. Ezek a változások együttesen ördögi kört hoznak létre, ami az acinus sejtekben az emésztőenzimek gátolt szekréciójához és intracelluláris aktivációjához, valamint a duktális folyadék és HCO_3^- szekréció károsodásához vezet. Összességében ezek a változások sejtnekrózist és AP-t váltanak ki (Maléth és Hegyi 2016). Rövidítések: ER: Endoplazmatikus retikulum, MPTP: Mitochondriális permeabilitási tranzíciós pórus, PMCA: Plazma membrán Ca^{2+} , CypD: Ciklofillin-D, CFTR: Cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor, SLC26A6: Solute carrier family 26 member 6 anioncserélő csatorna.

Az acinus sejtek pusztulása során pro-apoptotikus és pro-inflammatorikus faktorok szabadulnak fel a citoszolban. A pro-apoptotikus fehérjék, mint például a kaspáz 3 és citokróm C a citoszolba apoptózist indukálnak. A pro-inflammatorikus faktorok, mint például mitokondriális DNS (mtDNS), heat shock protein 60 (HSP60) és a kardiolipin, gyulladást indukálnak és serkentik a veleszületett immunválaszt (Pandol és Gottlieb 2022). Ezek a mitokondriális molekulák hozzákötődnek a sejt citoplazmatikus „Nukleotid-oligomerization-domain-like” receptoraihoz (NLR), aminek során a sejt fokozza a gyulladásos mediátorok felszabadulását a nukleáris faktor-kappa B-n (NF- κ B) és a NLRP3 inflammoszómán keresztül. Az NLRP3 inflammoszóma az egyik legjobban tanulmányozott gyulladásos faktor, ami inaktív NLRP3-ból, „apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD”-ból (ASC), prokaspáz 1-ből és „NIMA-related kinase 7” (NEK-7) fehérjéből áll. Az NLRP3 inflammoszóma aktiválásához két aktiváló jelre van szükség. Az első aktiváló jelet általában a sejteken található citokin-receptorok (IL-1R, TNF- α R) vagy Toll-like receptorok (TLR) fogják

biztosítani, ami gyulladásos mediátorok expresszóját eredményezik az NF- κ B által. A receptorok egy szignáltranszdukción keresztül aktiválják az I κ -B kinázt a sejtben, ami foszforilálja az I κ -B-NF- κ B komplexet. Az I κ -B konformációja megváltozik, majd disszociál az NF- κ B-ről és az NF- κ B a citoplazmából transzlokálódik a sejtmagba. Ennek hatására az NF- κ B különböző gyulladásos mediátorokat fog expresszálni, mint például a pro-IL1- β , pro-IL-18 és az inaktív NLRP-3 fehérjét. A gyulladás második aktiváló jele az intracelluláris térben lévő mitokondriális és lizoszómális károsodások, melyek olyan intracelluláris DAMP-kat szabadítanak fel, amik aktiválják az NLRP3 inflammoszóma kialakulását. Az NLRP3 inflammoszóma képes lesz aktiválni pro-inflammatorikus mediátorokat, amik ezáltal elősegítik a kemotaxist és növelik a szövetek és a leukociták közötti adhéziót (Liu és mtsai. 2017). A leukociták a gyulladásos citokinek hatására jelátviteli útvonalakat nyitnak meg, ami további kemokin felszabadulással jár, ilyen például az IL-6, IL-1, és a TNF- α . Az első legfontosabb leukocita, ami megtalálható a gyulladás során a szövetek között az a neutrofil granulocita. A granulociták citokineket termelnek, amik tovább indukálják a makrofágok és dendritikus sejtek toborzását, továbbá növelik környező szöveti intercelluláris adhéziós molekula 1 (ICAM-1) expresszót. A toborzást követően a sejtek a sérült pankréász szövetet eliminálják és fokozzák a helyi ROS képződést a szövetben (Barreto és mtsai. 2021).

Az AP-t kísérletesen állatokban is ki lehet váltani, például a CCK hormon analógjával (cerulein), epesavakkal (pl. kenodezoxi-kolát), L-argininnel és etanol nem-oxidatív metabolitjaival (pl. palmitoleinsav etil észter) (Maléth és Hegyi 2016; Petersen és mtsai. 2021; Biczó és mtsai. 2018). A kenodezoxikolsav az epekő elzáródás okozta pankréatitist tudja modellezni. A hosszantartó mechanikai nyomás előidézésével a Piezo1-csatornák aktiválódnak és ennek következtében Ca^{2+} áramlik be a citoplazmába (Pandol és Gottlieb 2022). A CCK analógok, mint például a cerulein képesek hiperstimulációt előidézni, amelynek során patológiásan magas Ca^{2+} jeleket okoznak a citoplazmába. Kimutatták, hogy az oxidatív etanol metabolizmus gátlása vagy a nem oxidatív etanol metabolizmus növelik az AP kialakulásának a kockázatát. A pankréász duktális sejtjei alacsony alkohol koncentráció (1 mM) esetén fokozzák a folyadék szekréciót, míg magasabb koncentrációnál a folyadékszekréció csökken (Maléth és Hegyi 2016).

1.5.3. Krónikus pankréatitisz

A pankréász másik súlyos megbetegsége a krónikus pankréatitisz (KP), ami egy multifaktoriális, fibroinflammatorikus szindróma, ami epizódikusan kialakuló gyulladást

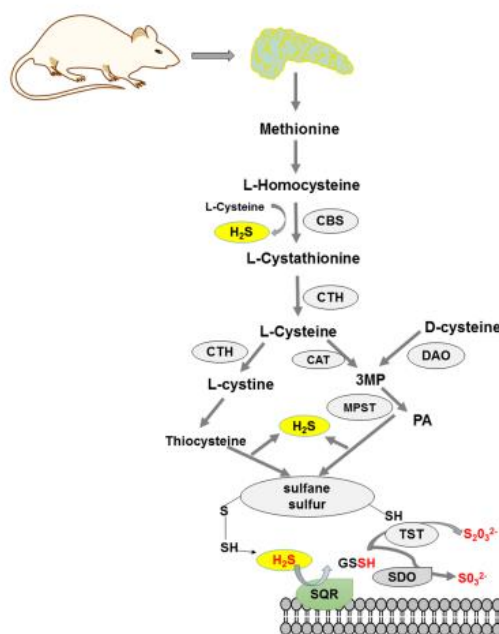
indukál a szövetben (Beyer és mtsai. 2020; Hart és Conwell 2020). A gyulladás következtében a pankreász parenchima helyét fibrotikus szövet fogja fokozatosan átvenni. Ennek következtében kialakulhat exokrin és endokrin pankreász elégtelenség, ami során nagy mértékben csökken az emésztőenzimek és a hormonok szekréciója. Végül a betegség csökkent életminőséget és rövidebb élettartamot eredményez páciensek számára. A KP klinikai megjelenése hasonló az AP-hez, ami epigasztikusán hátba sugárzó hasi fájdalmat és a pankreász anatómiai elváltozásait eredményezi, amit képalkotó eljárásokkal (CT, MRI, UH) diagnosztizálnak (Beyer és mtsai. 2020). A legfőbb kockázati tényezői, melyek hajlamosak a KP kialakulására a következők: 1. toxikus-anyagcsere, 2. idiopátia, 3. genetika, 4. autoimmunitás, 5. visszatérő súlyos vagy obstruktív AP (Etemad és Whitcomb 2001). A KP kezelése jelenleg kihívást jelent, és bár nincs olyan terápia, amely képes lenne teljesen megállítani vagy visszafordítani a betegség folyamatát, azonban már folynak kutatások a betegség mechanizmusainak jobb megértése és lefolyásának befolyásolása érdekében (Hart és Conwell 2020).

1.6. A hidrogén-szulfid hatása az élő szervezetekre

1.6.1. Endogén módon felszabaduló H₂S

Az emberiség a hidrogén-szulfid (H₂S) élő szervezetekre gyakorolt hatását már közel 300 éve ismeri (Bhatia és mtsai. 2005). Először környezeti, mérgező gázként tekintettek rá és toxikológiai hatásmechanizmusaira összpontosítottak. Az elmúlt két évtizedben azonban kiderült, hogy a H₂S endogén módon is termelődik és fontos hatásai vannak a sejtekre (Dilek és mtsai. 2020). A H₂S egy lipofil jellegű molekula, ami lehetővé teszi az akadálytalanul történő diffúziót a sejtekben. Számos emlős szövetben termelődik, mint például szívben, agyban, pankreászban, vesében és májban (Bronowicka-Adamska és mtsai. 2019). A H₂S a nitrogén-monoxid (NO) és szén-monoxid (CO) mellett egy endogén gázotranszmitter, amely szervezetben piridoxál-foszfát függő enzimek segítségével tud létrejönni a metionin és cisztein aminosavakból (4. ábra) (Magierowski és mtsai. 2017). A folyamat katalizálásában főként a következő enzimek vesznek részt: cisztationin-β-szintáz (CBS), 3-merkaptopiruvát-S-transzferáz (MPST), cisztationin-γ-liáz (CSE). Az L-homociszteinből L-cisztationinná való átalakulást a CBS biztosítja, melynek melléktermékeként H₂S szabadul fel. Ezt követően a CSE

katalizálja a cisztation átalakulást L-ciszteinné és végül az utolsó lépéseket az MPST fogja katalizálni, melynek végén H_2S fog termelődni (Bronowicka-Adamska és mtsai. 2019). A H_2S katalizálásában fontos szerepet játszanak a szulfid oxidációs egység (SOU) mitokondriális enzimeit, amik sorozatosan oxidálják a H_2S -t. A SOU enzimeit közé tartozik a szulfo-kinon-oxidoreduktáz (SQR), szulfid-dioxigenáz (SDO) és a tiosulfát-kéntranszferáz (TST). Az első reakcióban az SQR átalakítja a H_2S -t a glutation (GSH) segítségével glutation-perszulfiddá (GSST), majd a következő lépésben az „ethylmalonic encephalopathy protein 1” (ETHE1) katalizálja a GSST átalakulását szulfittá és GSH-vá. Az utolsó reakciót a TST és SDO katalizálja szulfáttá és tiosulfáttá, ami vissza alakulhat H_2S -é (Marutani és Ichinose 2020).



4. ábra A H_2S endogén bioszintézise. Az ábrán láthatjuk az emlős pankréászból endogén módon felszabaduló H_2S folyamatát (Bronowicka-Adamska és mtsai. 2019).

Rövidítések: CAT: Cisztin aminosztransferáz; CBS: Cisztation β -liáz; CTH: Cisztation γ -liáz; GSSG: Glutathion oxidált forma; DAO: D-aminosav oxidáz; MPST: 3-merkaptopiruvát kéntranszferáz; 3MP: 3-Merkaptopiruvát; PA: piruvát; SQR: Szulfid kinon oxidoreduktáz; SDO: Kén-dioxigenáz; TST: Rodanáz.

A H_2S egyik fontos tulajdonsága, hogy bimodális a hatásmechanizmusa. Általában alacsony H_2S koncentráció esetén fiziológiai körülmények között szabályozó, citoprotektikus és gyulladás csökkentő hatása van. Ezzel szemben magas koncentrációban prooxidáns, citosztatikus, valamint citotoxikus hatásokat válthat ki (Dilek és mtsai. 2020). A H_2S molekula elektrondonorként funkcionál a mitokondriumban és növeli az ATP-szintáz aktivitását (Szczesny és mtsai. 2014). Egyes kutatások szerint a H_2S fontos szerepe van a kardiovaszkuláris rendszerben a simaizomsejtekre (Drucker és mtsai. 2018). A H_2S kapcsolatban állhat a nitrogén-szintáz enzimmel, ami által serkentheti a NO termelést és így a vazodilatációt,

és ez csökkenti a vérnyomást és modulálja a bélrendszeri véráramlását. Nekrotizáló enterokolitisz egér modelljében kimutatták, hogy a H₂S segítette a súlygyarapodást, javította a bélperfúziót és szignifikánsan csökkentette egyes gyulladás keltő citokinek mennyiségét (Drucker és mtsai. 2018).

1.6.2. Az organoszulfur vegyületek hatásai a gyulladásban

Az organoszulfur vegyületek a ként tartalmazó szerves vegyületek alosztályába tartoznak, amelyek változatosan fordulnak elő. Előfordulhatnak az óceánok mélyén, vulkánok belsejében és akár Földön kívül, más bolygókon is. Ezeket a vegyületeket előszeretettel alkalmazzák a gyógyászatban antibiotikumként, iparban inert polimerként, a mezőgazdaságban növényvédő szerként és feltűntek háborúkban vegyifegyverként. Valójában a legfontosabb szerepük az élővilág felépítésében van és megtalálhatjuk őket fehérjék aminosavaiban (cisztein, metionin), vitaminokban (pl. biotin, tiamin), hormonokban (pl. inzulin, oxitocin) és energiatermelő folyamatokban (pl. acetyl-coenzim A). Ezeket a szerves kénvegyületeket rendkívül kis koncentrációban is fel lehet ismerni jellegzetes szaguk miatt. Számos zöldségben megtalálhatóak, így például a fokhagymában, póréhagymában, káposztában, brokkoliban és karfiolban (Eric Block 2023). Mivel ezek a fitonutriensek nagymértékben legfőképpen a (*Brassicaceae*, *Allium*) növényekben és gyümölcsben találhatóak meg, így alapvető táplálkozásból származó pozitív hatásokkal rendelkeznek és a különféle betegségek kialakulásának kockázatát is csökkentik (Ruhee és mtsai. 2020). A szerves kénvegyületeknek különféle csoportját különböztetjük meg szerkezetük alapján. Tartalmazhatnak heteroatomokat, amelyek a kén mellett oxigén és nitrogén atomot is magukba foglalnak. Különböző szerkezeteket és kötések tudnak kialakítani a szén atomokkal. A tiolokban -SH csoportok kapcsolódnak a C atomokhoz, és szerkezetileg hasonlóak az alkoholokhoz. A tioészterekben viszont C-S-CO-C kötés létesül, ilyen például az acetyl-coenzim, ami kiemelt szerepet játszik az energiatermelő folyamatokban. A funkciós csoport alapján a kénorganikus vegyületek közé tartoznak az izotiocianátok, az allil- és szulforafán-vegyületek (Eric Block 2023). Az allil-vegyületek, mint például a diallil-szulfid (DAS), diallil-diszulfid (DADS), diallil-triszulfid (DATS) legfőképpen az *allium* nemzetségben a hagymákban találhatóak meg. Ezek a vegyületek a hagymák jellegzetes ízét és aromáját adják, amik vízben nem, de olajban kiválóan oldódnak. Kutatások által bizonyították, hogy a fokhagyma szerves kénvegyületei számos krónikus betegség, szívelégtelenség, cukorbetegség és fertőzések ellen pozitív hatásai vannak. Kimutatták, hogy a hagymában található DATS csökkenti a gram-negatív baktériumok fala (lipopoliszaharid - LPS)

okozta makrofág aktivációt a gyulladás során. A kísérletekben bebizonyosodott, hogy csökkentette a nitrogén-monoxid szintáz és a ciklooxygenáz II aktivitást, aminek hatására lecsökkentek a főbb gyulladást keltő mediátorok, a nitrogén-monoxid (NO) és a prosztaglandin E₂. Az NF-κB sejtmagba történő transzlokációjának vizsgálata során úgy találták, hogy a DATS gátolja az NF-κB aktivációt és az Iκ-B degradációt a proteoszómában, ami az NF-κB transzlokáció blokkolásával jár (LEE és mtsai. 2015). Ezen molekuláris mechanizmusok összességében csökkenthetik a gyulladás mértékét a szövetekben. A fokhagymában a DATS mellett megtalálhatóak más organoszulfur vegyületek, mint például a dimetil-triszulfid (DMTS). Kimutatták, hogy a DMTS képes a tranziens receptor potenciál anikrin 1 (TRPA1) receptorokra hatni úgy, hogy az aktivált TRPA1 receptorokon keresztül Ca²⁺ áramot váltanak ki, ezáltal depolarizálódik az érző idegsejt és szomatosztatin szabadul fel a szinaptikus térbe. Ennek eredményeként kötődik a szomatosztatin 4-es típusú receptorokhoz, ami fájdalomcsillapítást idéz elő a szervezetben (Pozsgai és mtsai. 2017).

1.6.3. Exogén módon felszabaduló H₂S

1.6.3.1. A H₂S hatásai az AP-ban

A kén tartalmú szerves vegyületekből felszabaduló H₂S fontos szerepet játszhat az AP pathofiziológiájában. Számos vizsgálat kimutatta gyulladáscsökkentő és citoprotektív hatását pankréasz sejtekre nézve (Sidhapuriwala és mtsai. 2012; Orján és mtsai. 2023; Bronowicka-Adamska és mtsai. 2019; Rao és mtsai. 2015). Ellenben egyes kutatások alapján a H₂S felszabadulását katalizáló enzimek (pl.: CSE) génjeinek törlése vagy gátlása (propargilglicin PAG) enyhíti a gyulladásos megbetegedést. A H₂S biológiájának gyulladásban betöltött szerepe még nem nagyon tisztázott, mivel sok egymásnak ellentmondó adat áll rendelkezésre (Bhatia 2010).

1.6.3.2. AP39 szerepe a gyulladásban

A H₂S nem csupán endogén úton lehet jelen a szervezetben, hanem exogén úton bevitt organoszulfur (H₂S donor) vegyületekből is felszabadulhat. Az organoszulfur vegyületeken belül a H₂S felszabadulásának sebessége alapján megkülönböztetünk gyors (NaHS, Na₂S), és a lassú (GYY4137, DMTS, AP39, ATB-346) H₂S felszabadító vegyületeket (Dilek és mtsai. 2020). Az AP39 egy mitokondriumokat célzó és lassú H₂S-t felszabadító donor molekula. Szerkezetét tekintve trifenil-foszfóniumból (TPP⁺) áll, amely egy alifás linkerrel H₂S donor csoporthoz kapcsolódik. Ennek a szerkezetnek célja, hogy specifikusan a mitokondriumhoz

irányítsa a molekulát, mivel a TPP+ képes a mitokondriumban felhalmozódni. Kutatások által igazolták, hogy az oxidatív stressz hatására az AP39 antioxidáns hatást mutatott, fenntartotta a sejtek életképességét, a mitokondriális légzési láncot és a mtDNS integritását (Szczesny és mtsai. 2014).

1.6.3.3. ATB-346 szerepe a gyulladásban

Az exogén H₂S donorok közül a másik általunk vizsgált molekula az ATB-346. Ez a molekula egy naproxen analóg, ami egy H₂S-t felszabadító nem szteroid típusú gyulladás csökkentő molekula (NSAID) (De Cicco és mtsai. 2016). Az NSAID-ok gyulladáscsökkentő, fájdalomcsillapító és kemoprevenenciális hatást fejtenek ki, de az alkalmazásuk a klinikumban súlyos mellékhatásokat okozhat a gasztrointesztinális rendszerben (Magierowski és mtsai. 2017). Ugyanis gátolják a prosztaglandinok szintézisét, ezáltal csökkentve a gyulladás mértékét, de ez a bélbarrier meggyengülését okozza, mivel ott a prosztaglandinoknak protektív hatásai vannak (Van Dingenen és mtsai. 2019). Jelenleg az ATB-346 kutatási fázisban van, gyulladáscsökkentő, valamint gyomor- és nyombélfekéllyel szemben mutatott protektív hatásait vizsgálják (Campolo és mtsai. 2014).

Az ATB-346 molekulát tanulmányozták posztoperatív ileuszban, ami egy gyomor-bélrendszeri motilitási megbetegedés. Jellemzője, hogy a műtéteket követően jelentkezik és egy fokozott gyulladásos reakcióval jár a gasztrointesztinális rendszerben, ami a bélrendszer simaizmait érinti. Ebben a megbetegedésben kimutatták a kísérlet során, hogy az ATB-346 képes volt csökkenteni a gyulladásos mediátorokat és a leukociták infiltrációját. Az ATB-346 a naproxennel szemben csökkentette a nitrogén monoxid-szintáz aktivitását és csökkentette a bélnyálkahártya károsodást a posztoperatív ileusz betegségben szenvedő egerekben (Van Dingenen és mtsai. 2019). M. Magierowski és mtsai. is igazolták a gyomor nyálkahártyájának ATB-346-tal kezelt protektív hatását patkányokban. A kísérlet során kiváltottak egy akut gyomorsérülést az állatokban és vizsgálták a naproxent (NSAID típusú hatóanyag) és az ATB-346 szisztémás gyulladáscsökkentő hatását. A vizsgálatok alapján bebizonyosodott, hogy csökkenti egyes gyulladásos válasz markerek mennyiségét a vérben, illetve nem befolyásolta negatívan a mikrocirkulációt és nem váltott ki gyomor elváltozásokat a stressz által (Magierowski és mtsai. 2017). Az ATB-346 hibrid molekulát nem csak gasztrointesztinális megbetegedésekben vetették össze a naproxennel, hanem osteoarthritis modelljében is. Felfedezték, hogy az ATB-346 molekula kondroprotektív hatásokkal bír, míg a naproxen apoptózist indukál a porcsejtekben. A tanulmányban kimutatták, hogy az ATB-346 képes a

kondrociták sejtproliferációját növelni és fokozni az extracelluláris mátrixképződést a porcokban. A gyulladás közben az ATB-346 csökkentette a makrofágok által termelt TNF- α citokin mennyiségét a szövetben és ezáltal képes volt csillapítani az ízületi hipernocicepciót és fokozni a kondroprotektív hatást (Dief és mtsai. 2015). Az ATB-346 molekula hatását alkalmazták még humán melanoma sejtek osztódására és növekedésére is. A kísérlet során kimutatták, hogy ez az organoszulfur vegyület a kaszpáz-3 molekulán keresztül képes volt indukálni az apoptózist, aminek a hatásmechanizmusa az NF- κ B transzlókációjának gátlásán alapult és az anti-apoptikus faktorok expresszójának redukálásán keresztül valósult meg (De Cicco és mtsai. 2016).

2. Célkitűzés

Kutatásunk fő célja, hogy feltárjuk az AP39 és az ATB-346 hatását az experimentálisán kiváltott AP-re. Ezekből a vegyületekből különböző terápiás dózisokat és koncentrációkat használtunk *in vivo* és *in vitro* körülmények között. Az *in vivo* kísérletek során vizsgáltuk az AP39 és ATB-346 hatásait az AP súlyosságára egérmodellen azáltal, hogy meghatároztuk a pankreász ödémát, leukocita infiltrációt, mieloperoxidáz aktivitását, a szöveti sejtkárosodásának a mértékét és a szérum amiláz aktivitásokat. Az *in vitro* vizsgálataink során célunk volt izolált egér pankreász acinus sejten meghatározni az AP39 és ATB-346 citoprotektív hatásait az AP-t kiváltani képes vegyületek kezelése során.

3. Anyagok és módszerek

Az anyagokat a Merck Life Science Kft.-től (Budapest, Magyarország) vásároltuk. Amennyiben egy anyag máshonnan került beszerzésre, azt a szövegben külön feltüntettük.

3.1. Oldatok

AP39 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) oldat (fiziológiás sóoldatban): *in vitro* 300 nM, *in vivo* 20 μ M. ATB-346 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) oldat (Polysorbate 80 [Poly80] és dimetil szulfoxidban [DMSO] oldva): *in vitro* 30 μ M, *in vivo* 5 mM. Propídium-jodid törzsoldat (desztillált vízben) 1 mg/mL. H33342 törzsoldat (bis-benzimid/ Hoechst 33342; desztillált vízben) 1 mg/mL.

3.1.1. Az acinus izoláláshoz használt oldatok

Base Médium: DMEM/F12-ben (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) oldunk fel 0,25 mg/mL tripszin inhibitort (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY., USA) és 2 mM L-glutamint.

Digest Médium: Base Médiumban feloldunk 2,5 mg/mL borjú szérum albumint (BSA) és 4500 U_{enzim}/g_{pankreász} type IV kollagenázt (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA)

Rinse Médium: Base Médiumban feloldunk 5% magzati szérum albumint (FBS, Biosera, BioTech Hungary Kft)

Acinus Sejtkultúra Médium (ACCM): Medium-199-ben (Gibco, Thermo Fisher Scientific, oldunk fel 5% magzati szérum albumint (FBS), majd 2 mM L-glutamint és 0,25 mg/mL tripszin inhibitort.

3.2. Állatok

A kísérletekhez FVB/N típusú hím és nőstény egereket használtunk fel. Az állatok számára optimális körülményeket biztosítottunk (standard laboratóriumi tápanyag, állandó 23 °C-os hőmérséklet, megfelelő páratartalom, vízhez való szabad hozzáférés) és 12 órás mesterséges

szórt fényű megvilágítást kaptak. Kísérleteinket az Európai Unió 2010/63/EU irányelvének és a 40/2013 (II.14.) Kormányrendeletnek megfelelően végeztük. Emellett a kísérleteket a helyi (Szegedi Tudományegyetem) és az országos etikai bizottságok is jóváhagyták (X./1714/2020).

3.3. *In vivo* egér kísérletek

Az *in vivo* kísérletekhez hím FVB/N egereket használtunk. Az AP kiváltása óránkénti $10 \times 50 \mu\text{g/kg}$ intraperitoneális (ip.) cerulein injekcióval történt. A kezelési csoportok az AP39-cel végzett kísérletek során a következők voltak: (1) kontroll csoport (fiziológias sóoldat); (2) vehikulum; (3) ip. cerulein és vehikulum csoport; (4) ip. cerulein és $2 \times 0,125 \mu\text{mol/kg}$ ip. AP39 csoport; (5) ip. cerulein és $2 \times 0,25 \mu\text{mol/kg}$ ip. AP39 csoport; (6) ip. cerulein és $2 \times 0,5 \mu\text{mol/kg}$ ip. AP39 csoport. Az ATB-346 kezelőoldattal végzett *in vivo* egér kísérleteket külön végeztük, hasonlóan FVB/N típusú hím egereken. Az állatokat a következő csoportokra osztottuk: (1) kontroll csoport (fiziológias sóoldat); (2) vehikulum; (3) ip. cerulein és vehikulum csoport; (4) ip. cerulein és $2 \times 20 \mu\text{mol/kg}$ per os (po.) ATB-346-tal kezelt csoport; (5) ip. cerulein és $2 \times 40 \mu\text{mol/kg}$ po. ATB-346-tal kezelt csoport; (6) ip. cerulein és $2 \times 80 \mu\text{mol/kg}$ po. ATB-346-tal kezelt csoport. A vehikulum csoportok olyan kontrollcsoportok, amelyeknél az AP39 és ATB-346 oldószereit alkalmaztuk önmagukban. Az ATB-346 esetén ez a DMSO és Poly80 elegye volt, míg az AP39 esetén ez DMSO és fiziológias sóoldat volt. Az ATB-346 és az AP39 kezelések az első cerulein injekciót (0. óra) követően a 2. és 5. órákban lettek beadva.

Az egerek testsúlyát kezelés előtt és a kísérlet végén, a vágások előtt megmértük. Az esetleges súlyvesztés, amit így meg tudunk határozni a gyulladás jelenlétére utalhat. A kezelés és a testsúly lemerése után az állatok terminálása 12 órával az első cerulein injekció után történt túlaltatással (45 mg/kg ip. nátrium-pentobarbitál injekció). Ezt követően a pankréaszt kivettük az állatokból és transzkardiálisan vért gyűjtöttünk a további vizsgálatokhoz.

3.4. Az *in vivo* egér kísérleteket követő vizsgálatok

Az *in vivo* kísérleteket követően a gyulladás mértékét különböző paraméterek meghatározásával vizsgáltuk. Szöveti metszetek hematoxilin-eozin festését követően értékeltük a szövetkárosodást, a leukocita infiltrációt, és az ödémát. Mértük a pankréasz szöveti víztartalmát, ami az ödéma súlyosságára utal; valamint a szöveti mieloperoxidáz (MPO)

aktivitást, ami a leukociták mennyiségével jól korrelál. Továbbá a szérumból az amiláz aktivitást is mértük, ami a pankreász gyulladásának egyik markere.

3.4.1. Szövettani értékelés

A pankreász szövettani értékelése során a szövetkárosodást, leukocita infiltrációt és ödémát pontoztuk. A szöveteket a metszésig és a beágyazásig 8%-os formalinban tároltuk. A parafinba történő beágyazás után a szövetekből 3 µm-es metszeteket készítettünk és hematoxin-eozinnal festettük meg. A hematoxin egy bázikus festék, amely a sejtmagban lévő nukleinsavhoz való nagyobb affinitást és lilás színt mutat, míg az eozin savas kémhatása révén rózsaszínre festi a citoplazmát, extracelluláris mátrixot és a kollagént. Az eredmények szemikvantitatív pontok alapján és százalékban kifejezett értékek szerint lettek meghatározva. A leukocita infiltráció súlyosságának mértéke 0-4-es skálán lett bírálva (0 – nincs leukocita infiltráció; 1 – infiltráció néhol, interlobulárisan; 2 – diffúz mérsékelt infiltráció interlobulárisan; 3 – diffúz mérsékelt infiltráció inter- és intralobulárisan; 4 – diffúz súlyos infiltráció inter- és intralobulárisan). A pankreász ödéma súlyosságának pontozása 0-3-as skálán lett pontozva (0 – nem látható ödéma; 1 – ödéma néhol, interlobulárisan; 2 – diffúz és mérsékelt ödéma inter- és intralobulárisan; 3 – diffúz súlyos ödéma inter- és intralobulárisan). A szövetkárosodás mértéke százalékban kifejezett értékekben lett meghatározva.

3.4.2. Pankreatikus mieloperoxidáz aktivitás mérés

Az *in vivo* kísérlet során kivett és a mérésig –80 °C-on tárolt pankreász szöveteket használtuk az MPO aktivitásának vizsgálatához. Az eltett szöveteket felolvasztottuk, apró darabokra vágtuk, majd tömegnek megfelelően homogenizáló puffert (A oldat, 5 mM jódcetamid, 1 mM ditrioteitol, 4 mM benzamidin-hidroklorid, 1 mM fenilmetilszulfonil-fluorid) adtunk hozzá. A mintákat folyamatosan jégen tartva foszfátpufferben (KH₂PO₄ 20 mM és K₂HPO₄ 20 mM buffer, pH = 7,4) homogenizáltuk Micra D-9 Digitronic (Art-moderne Labortechnik, Müllheim, Germany) szonikáló eszközzel. A szonikálás után a mintákat lecentrifugáltuk (20000 RCF 4°C-on, 20 perc) és az üledéket foszfát pufferben (50 mM KH₂PO₄ és 50 mM K₂HPO₄ puffer, pH = 6.0) felfuszpendáltuk, ami 0,5% hexadecil trimetilammonium bromid detergenst (1 mL puffer/minta) is tartalmazott. Ezt követően a mintákat újra homogenizáltuk 3 körben 10 másodpercig és újra lecentrifugáltuk (20 perc, 4000 RCF, 4 °C-on). A felülúszót eppendorf csövekbe helyeztük és –80 °C-on tároltuk felhasználásig. A

kiolvasztást követően a minták MPO aktivitásának mérését 3,3',5,5'-tetrametil-benzidin-H₂O₂ szubsztráttal végeztük, amely színreakció által mutatta az MPO jelenlétét. A reakciókat 96 lyukú sejttenyésztő lemezekben végeztük szobahőmérsékleten és a minták 620 nm-en lettek leolvasva FLUOstar OPTIMA plate readerrel.

3.4.3. Pankréász víztartalom meghatározás

Az *in vivo* kísérleteket követően a szöveti víztartalom vizsgálatához mértük a minták nedves és száraz tömegét. A kivett és megtisztított pankréász szövetdarab nedves tömegét Ohaus Adventurer analitikai mérlegen (Parsoppany, NJ, USA) meghatároztuk, majd a mintákat 48 órára egy 100 °C-os Labnet Dry Bath blokktermosztátba (Labnet, Edison, NJ, USA) helyeztük. Ezt követően a kiszáradt szöveteket megmértük mérlegen, így tudtuk a nedves/száraz anyag tömegére következtetni a következő egyenlet segítségével:

$$\frac{\text{nedves tömeg} - \text{száraz tömeg}}{\text{nedves tömeg}} \times 100$$

3.4.4. Szérum amiláz aktivitás meghatározás

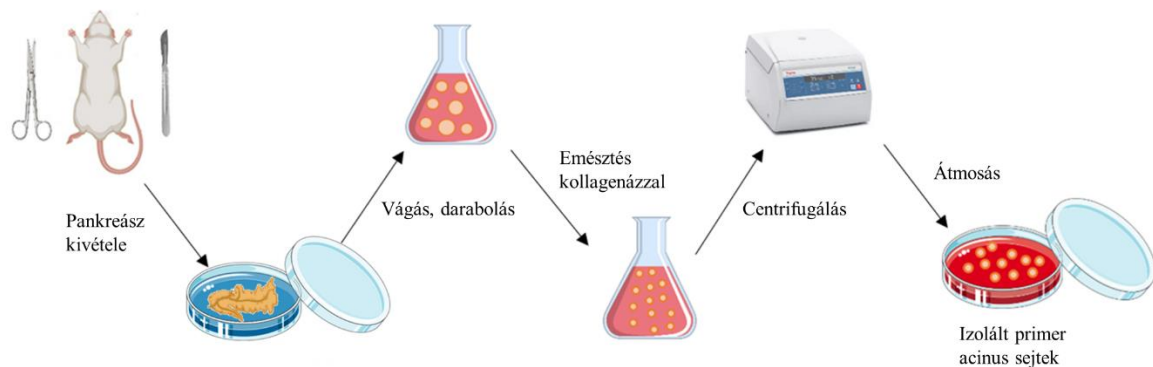
Az *in vivo* egér kísérlet után a koagulált vérből centrifugálással összegyűjtöttük a szérumot. A szérum amiláz aktivitás meghatározását Alfa-amiláz reagens kit (Diagnosticum Zrt. Budapest, Hungary) segítségével végeztük. A kit tartalmazott egy R1 reagenst (50 mM pH=7,15 HEPES puffer, 70 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, ≥4 kU/L α-glükozidáz) és egy R2 reagenst (3 mmol/L 4,6-etilidén-glükóz-7-nitrofenol (EPS), 50mM pH=7,15 HEPES puffer), amit 5:1 arányban kevertünk össze. A mérés 96 lyukú lemezben történt, amibe először 4 µL szérum mintát pipettáztunk, majd a FLUOstar OPTIMA plate reader hozzá adagolta az összeállított reagenst (300 µL/lyuk). A reagens hozzáadását követően a szérumban található alfa-amiláz hatására a 4,6-etilidén-Glükóz-7-nitrofenolból-ból különböző melléktermékek keletkeztek. Ennek következtében a köztes termékeket az alfa-glikozidáz bontotta tovább glükózzá és nitrofenollá. A wellekben keletkező elegy abszorbanciáját a FLUOstar OPTIMA plate reader segítségével mértük 405 nm-en. A kiértékelést a gyártó által javasolt módon végeztük egy előre, a gyártó által meghatározott faktor (7280) segítségével:

$$\text{amiláz aktivitás } (U/L) = \frac{\Delta \text{abszorbancia}}{\text{perc}} \times 7280$$

3.5. Pankreász acinus sejtek izolálása

Az *in vitro* kísérletekhez FVB/N hím és nőstény egerekből izolált pankreász primer acinus sejteket használtunk. Az egerek túllatása 45 mg/kg (ip.) nátrium-pentobarbitál (Bimeda MTC, Cambridge, Kanada) injekcióval történt, a szakmai és etikai szabályzatnak megfelelően. A pankreász kivételét követően a szövetet a tisztítási folyamat megkezdéséig hűtött foszfáttal pufferolt sóoldatban (PBS) tároltuk (5. ábra). A pankreászt megtisztítottuk a nyirokcsomóktól, léptől, zsírszövettől és az esetleges béldaraboktól, majd a tiszta szövet súlyát analitikai mérlegen lemértük. A kapott súly alapján megfelelő mennyiségű kollagenázt adtunk a Digest Médium oldathoz, ami a sejtek extracelluláris mátrixának (ECM) bontását és kisebb sejtsomókra történő szövetszétesést segíti elő. Az enzimátikus emésztés megkezdéséhez fecskendő segítségével a szövetbe több helyen Digest Médium oldatot juttattunk, majd szikével 2-3 mm-es darabokra vágtuk. A kapott szövetdarabokat szerológiai pipetta segítségével egy Erlenmeyer-lombikba helyeztük és előemésztettük a szövetet 10 percig 37 °C-os vízfürdőben 150 rpm rázás mellett. Az idő letelte után leszívtuk a felülúszót és a szövetdarabokra újabb kollagenáz enzimet tartalmazó Digest Médiumot mértünk. A lombikot újra 37 °C-os vízfürdőbe helyeztük és 50 percen keresztül 150 rpm-en ráztuk. A 30. perctől kezdődően az emésztés elősegítése érdekében 5 percenként szerológiai pipettával fel-le szívtuk a szövetdarabokat, hogy mechanikailag is segítsük a sejtek leválást a szövetről. A szétvált sejteket ezt követően 100 µm-es sejtszűrőn centrifugacsőbe átszűrtük és Rinse Médium segítségével mostuk a szűrőn fennakadt sejteket. Az átszűrt acinusokat ezt követően lecentrifugáltuk (Ohaus FC5718R, Parsippany, USA) 2 percig 4 °C-on 42 RCF-en, majd a felülúszót leszívtuk és új Rinse Médiumot mértünk a sejtekre. Második centrifugálást (2 perc, 4 °C, 42 RCF) követően a leülepedett sejtekről a felülúszót ismételtelen leszívtuk, megmértük a sejtek tömegét és annyi ACCM-et adtunk hozzá, hogy a sejtkoncentráció 15 mg sejt/mL ACCM legyen.

Az izolálás sikerességének ellenőrzésére életképesség mérést végeztünk Tripán-kék festékkel. A vizsgálat során 200 µL sejtmintához 100 µL 0,4%-os Tripán-kék festéket adtunk, majd 2 perces inkubáció után a sejteket 1500 µL PBS hozzáadásával 1 percig, 21 °C-on, 100 RCF-en centrifugáltuk. A leülepedett sejtekről a felülúszót óvatosan leszívtuk és 100 µL PBS-t adtunk a sejtekhez. Ezt követően pipetta segítségével mintát vettünk a sejtszuspenzióból, rácsepegtettük egy tárgylemezre és mikroszkóp alá helyeztük. A Tripán-kék festék a már elpusztult sejtek membránján képes áthatolni, ezért a nem élő sejteket kék színnel láthattuk a fénymikroszkóp alatt. Az *in vitro* kísérletekhez akkor használtuk fel a sejteket, ha az izolálás után a sejtek 90%-a élő volt.



5. ábra A primer acinus sejtizolálás folyamata. A kivett pankréaszt megtisztítottuk majd apróbb darabokra vágtuk. A nagyobb pankréász darabokat kollagenázt tartalmazó Digest Médium segítségével kisebb sejtsomókra emésztettük. Az emésztés után az emésztőenzimet centrifugálással kimostuk és a felülúszót leszívtuk.

3.6. Pankréász acinus sejtek életképességének vizsgálatai

3.6.1. Propídium-jodid mérés

A kísérlet végrehajtásához egy 8 lyukú sejttenyésztő lemez (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA) minden zsebébe azonos mennyiségű sejtszuszpenziót raktunk. A sejtekhez a következő kezelőoldatokat vagy ezek különböző kombinációit adtuk: 60 mM L-arginin-HCl (L-arg); 1 nM cerulein; 0,5 mM nátrium-kenodezoxikolát (CDC); 30, 100, 300, és 1000 nM AP39; 10, 30, 100, és 300 μ M ATB-346. Pozitív kontrollként 10 mg/mL Triton-X 100-at alkalmaztunk, amely a sejtek lízisét és nekrotikus halálát okozta. A negatív kontrollcsoportokhoz csak ACCM-et használtunk, hogy következtetéseket vonjunk le a terápiás oldatok hatásosságáról. Az életképességet propídium-jodid és H33342 DNS festékek hozzáadásával vizsgáltuk. A H33342 az összes sejt magját megfesti (élő és elpusztult sejteket egyaránt), míg a propídium-jodid csak membrán károsodott és nekrotizáló sejtek membránján képes átjutni és megfesteni a nukleuszt. A festések vizsgálatához Axio Observer 7 (Carl Zeiss, Németország) fluoreszcens mikroszkópot használtunk, miután hozzáadtuk a megfelelő kezelőoldatokat a sejtszuszpenziókhoz. A mikroszkóp irányítása és a fényképezés Zen 2.6 Pro programmal történt, csoportonként 4 fényképet készítettünk különböző időpontokban. Az első fotózás a sejtek kirakása után 4 órával, a második 6 órával, az utolsó pedig 8 órával történt. A

PI interkaláló festéket 533-558 nm hullámhosszúságú fénnel világítottuk meg és 570-645 nm tartományba eső emissziót mértünk. A H33342-t 365 nm-en világítottuk meg és a 420-470 nm-es tartományban detektáltuk az emissziót. A mintákat a mérések között 37 °C-os inkubátorban tároltuk, hogy biztosítsuk a sejtek számára az optimális hőmérsékletet.

3.6.2. MTT-teszt

Az izolált primer acinus sejteket 96 lyukú sejtenyésző lemezre (Corning, Glendale, AZ, USA) raktuk. A sejtuszuspenzióhoz hozzáadtuk a kezelőoldatokat, melyekkel sejtkárosodást idéztünk elő (60 mM L-arg; 0,1, 0,3 és 0,5 mM CDC, valamint 1 nM cerulein) és a vizsgált organoszulfur vegyületeinket, melyek végkoncentrációi ezek voltak: 30, 100, 300, és 1000 nM AP39; valamint 10, 30, 100, és 300 µM ATB-346. A pozitív kontrollcsoporthoz 10 mg/mL Triton X-100 adtunk, amely a sejtek lízise által azok nekrotikus halálát okozta. Negatív kontroll esetén ACCM-et alkalmaztunk, amely biztosítja a sejtek számára az optimális körülményeket. Az elkészített mintákat 37 °C-on inkubáltuk 5 órán keresztül a kezelésekkkel. Az inkubációs idő letelte után 0,5 mg/mL MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5 diphenyl tetrazolium bromide) oldatot adtunk a sejtekhez, amit a sejtekben található NADPH dependens oxidoreduktázok formázán kristályokká redukálnak, vagyis a sejtek metabolikus aktivitását méri. Ezt követően inkubátorba helyeztük a sejteket és további 3 órát inkubáltuk 37 °C-on. A kísérlet végén a képződött kék formázán kristályokat DMSO-ban (Fisher scientific, Loughborough, UK) oldottuk fel folyamatos, 20-25 perces rázatás mellett. Végezetül a minták abszorbanciáját FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Ortenberg, Németország) plate readerrel mértük le 595 nm-es hullámhosszon.

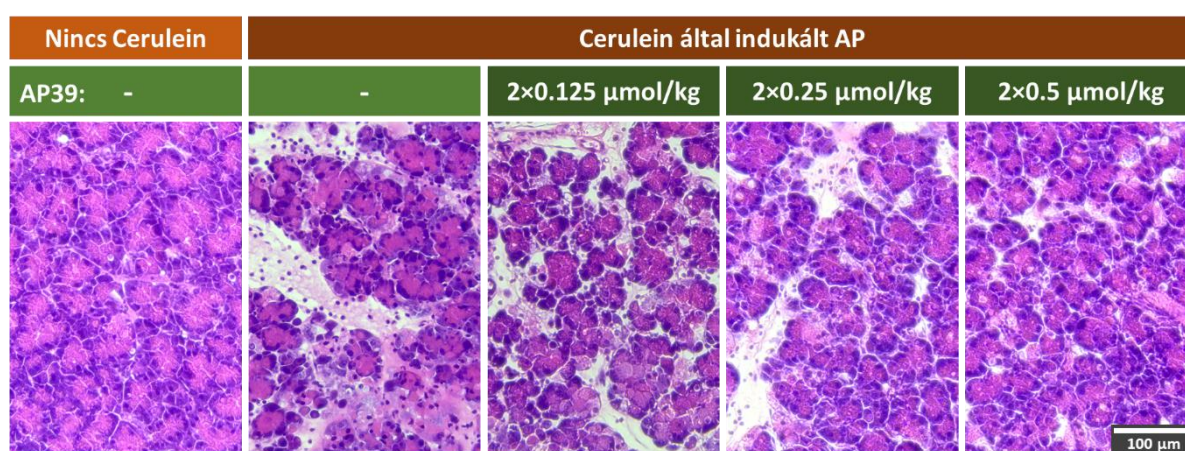
3.6.3. Statisztikai analízis

Az eredményeket átlag $\pm$ SD (standard deviáció) ábrázoltuk. A kísérleti eredmények statisztikai elemzése egy-utas ANOVA-val történt, amit Dunnett post-hoc teszt követett. Azon esetekben, amikor nem-paraméteres módszer használata volt szükséges, a statisztikai elemzést Kruskal Wallis teszttel végeztük, amelyet Dunn post-hoc teszt követett. Szignifikáns eltérésnek tekintettük azokat a különbségeket, ahol a p érték kisebb volt mint 0,05 ($p < 0,05$).

4. Eredmények

4.1. Az AP39 hatása a cerulein által kiváltott akut pankreáitisz súlyosságára egerekben

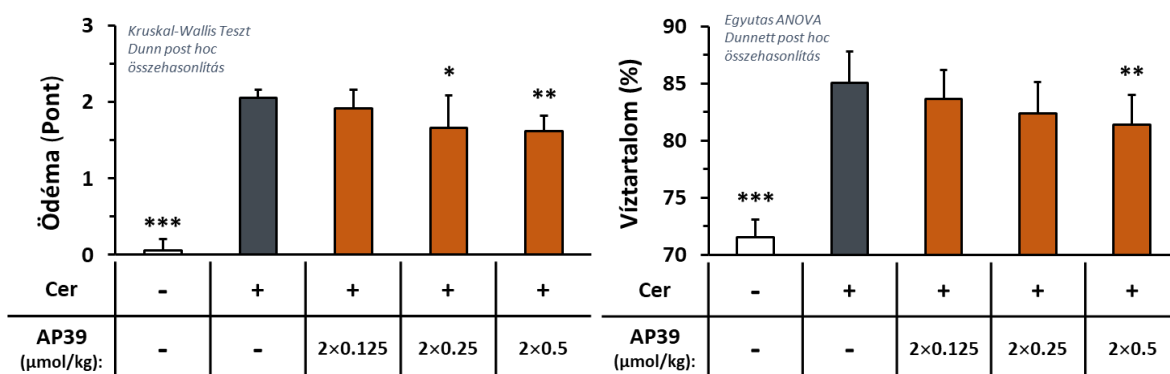
A reprezentatív szövettani metszetek alapján a kontroll csoport morfológiája normális, míg AP-ben a pankréasz szövet károsodott, amely hatást az ip. AP39 kezelések dóziszfüggő módon enyhíteni tudtak (6. ábra).



6. ábra Reprezentatív hematoxilin-eozin festett pankréasz szövettani képek. *In vivo* kísérleteink során az AP-t ceruleinnel indukáltuk, majd 2×0,125; 2×0,25; 2×0,5 μmol/kg AP39 dózisokkal kezeltük az állatokat. Az ábrán a kezelt állatokból származó szövettani metszetek hematoxilin és eozin festései láthatóak. Rövidítések: AP: akut pankreáitisz.

4.1.1. A pankréasz szövet ödémájának és víztartalmának meghatározása

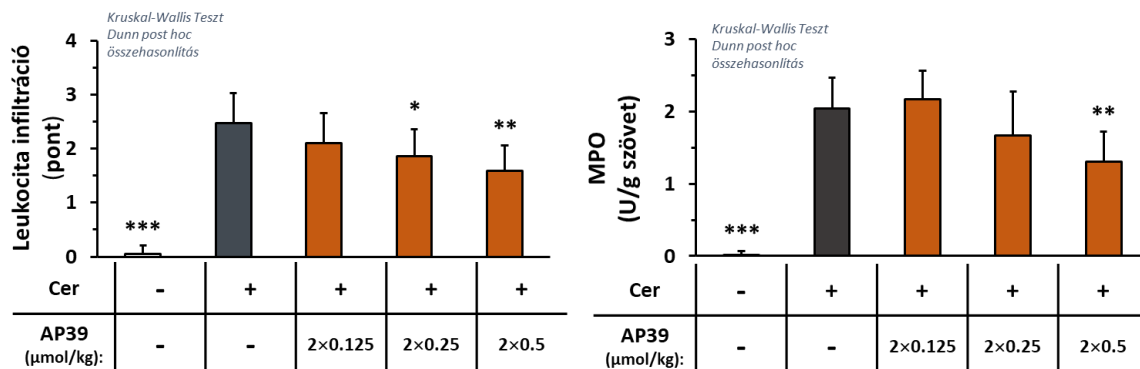
Ceruleinnel kiváltott AP-ben szignifikánsan megemelkedett az ödéma és a szöveti víztartalom mértéke a kontroll csoporthoz képest (7. ábra). Az AP39 2×0,25 μmol/kg és 2×0,5 μmol/kg dózisokban képes volt szignifikánsan csökkenteni az AP okozta ödémát a pankréaszban. Az ödéma mértéke szorosan összefügg a szöveti víztartalom mennyiségével. Megfigyelhető, hogy a kizárólag ceruleinnel kiváltott AP csoportban a szöveti víztartalom elérte a $85 \pm 2,7\%$ -ot, míg a kontroll csoport $72 \pm 1,5\%$ -os víztartalmat mutatott a kísérlet során. A legnagyobb AP39 dózis (2×0,5 μmol/kg) képes volt szignifikánsan csökkenteni a szöveti víztartalmat az AP során.



7. ábra A pankréász szövet ödémájának és víztartalmának meghatározása. Az AP-t intraperitoneális cerulein injekcióval váltottuk ki. Az AP39 kezelési dózisa a következők voltak: 2x0,125 μmol/kg, 2x0,25 μmol/kg, 2x0,5 μmol/kg. Az adatok ábrázolása: átlag ± SD. A statisztikai vizsgálat során Kruskal-Wallis vagy egyutas ANOVA tesztet végeztünk, amit Dunn vagy Dunnett post hoc teszt követett. Mindegyik csoportot a csak ceruleinnel kezelt csoporthoz viszonyítottunk, a $p < 0,05$ alatti értékeket tekintettük szignifikáns különbségeknek és a következő módon jelöltük őket: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Rövidítések: Cer: cerulein, AP: akut pankreatitisz.

4.1.2. A szöveti leukocita infiltráció és MPO mennyiségének meghatározása

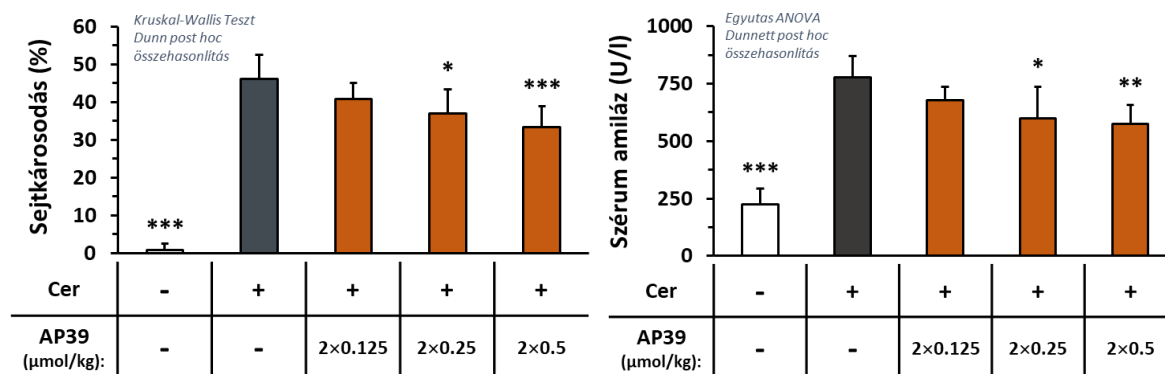
A cerulein kezelés következtében a leukocita infiltráció mértéke és a pankreatikus MPO aktivitás szignifikáns emelkedést mutatott (8. ábra). Alacsony dózisban (2x0,125 μmol/kg) az AP39 nem csökkentette szignifikánsan a leukocita infiltrációt, azonban a 2x0,25 μmol/kg és 2x0,5 μmol/kg dózisok esetén szignifikáns az eltérés a csak ceruleines csoporthoz képest. Akut gyulladásban a sérülés helyére vándorló neutrofil granulocitákból többek között MPO szabadul fel, amely ezáltal a leukocita infiltráció egyik markere. Az AP során megemelkedett MPO aktivitást az AP39 legnagyobb, 2x0,5 μmol/kg dózisa szignifikánsan csökkentette, míg az alacsonyabb dózisok (2x0,25 μmol/kg és 2x0,125 μmol/kg) nem bizonyultak hatásosnak.



8. ábra A szöveti leukocita infiltráció és MPO aktivitás vizsgálata. Az AP-t intraperitoneális cerulein injekcióval váltottuk ki. Az AP39 kezelési dózisa a következők voltak: 2×0,125 μmol/kg, 2×0,25 μmol/kg, 2×0,5 μmol/kg. Az adatok ábrázolása: átlag ± SD. A statisztikai vizsgálat során Kruskal-Wallis tesztet végeztünk, amit Dunn post hoc teszt követett. Mindegyik csoportot a csak ceruleinnel kezelt csoporthoz viszonyítottunk a $p < 0,05$ alatti értékeket tekintettük szignifikáns különbségeknek és a következő módon jelöltük őket: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Rövidítések: Cer: cerulein, AP: akut pankreatitisz.

4.1.3. A szöveti sejtkárosodás és szérum amiláz aktivitás

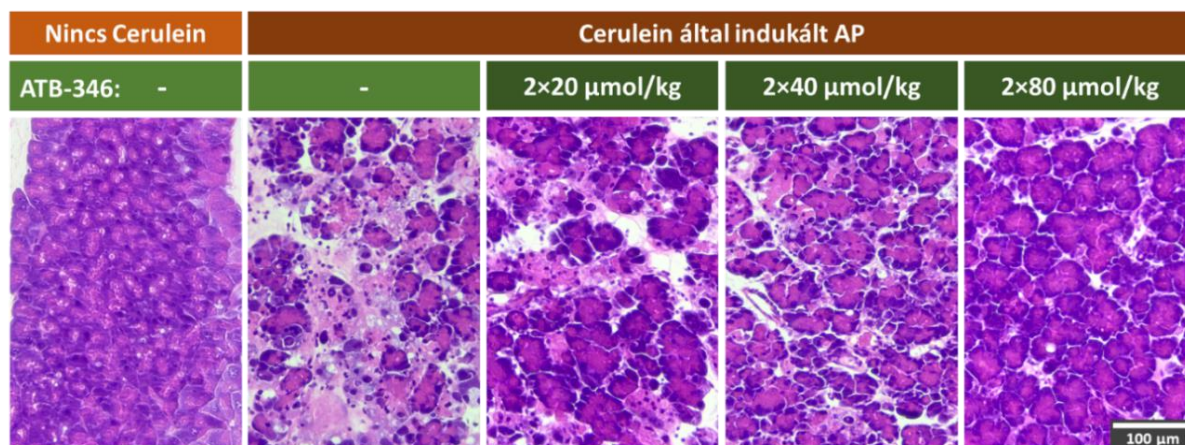
AP-ben szignifikánsan megemelkedett a sejtkárosodás és szérum amiláz aktivitás mértéke (9. ábra). 2×0,25 μmol/kg és 2×0,5 μmol/kg dózisokban az AP39 szignifikánsan csökkentette ezeket a paramétereket a csak ceruleinnel kezelt csoporthoz képest. Az AP39 legkisebb alkalmazott dózisa (2×0,125 μmol/kg) nem volt hatással egyik mért értékre sem.



9. ábra A szöveti sejtkárosodás és szérum amiláz aktivitás mértékének meghatározása. Az AP-t intraperitoneális cerulein injekcióval váltottuk ki. Az AP39 kezelési dózisa a következők voltak: 2×0,125 μmol/kg, 2×0,25 μmol/kg, 2×0,5 μmol/kg. Az adatok ábrázolása: átlag ± SD. A statisztikai vizsgálat során Kruskal-Wallis vagy egyutas ANOVA tesztet végeztünk, amit Dunn vagy Dunnett post hoc teszt követett. Mindegyik csoportot a csak ceruleinnel kezelt csoporthoz viszonyítottunk a $p < 0,05$ alatti értékeket tekintettük szignifikáns különbségeknek és a következő módon jelöltük őket: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Rövidítések: Cer: cerulein, AP: akut pankreatitisz.

4.2. Az ATB-346 hatása a cerulein által kiváltott akut pankreáritisz súlyosságára

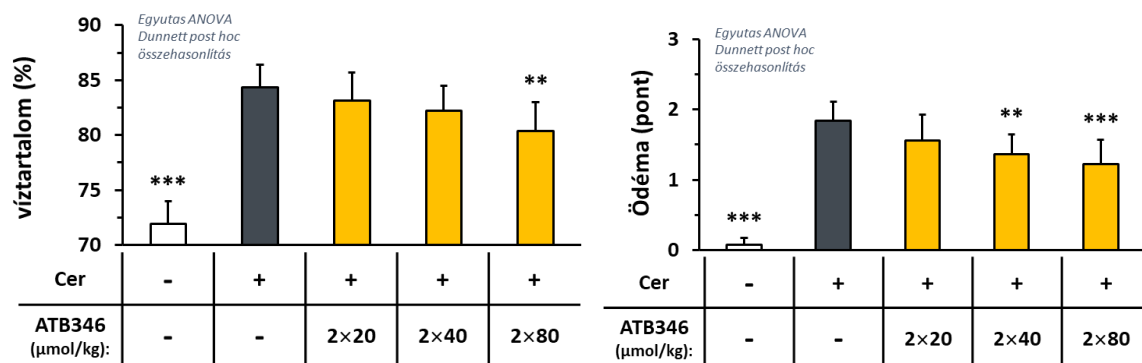
A reprezentatív szövettani metszetek alapján a kontroll csoport morfológiája normális, míg AP-ben a pankreász szövet károsodott, amely hatást a po. ATB-346 kezelések dóziszfüggő módon enyhíteni tudtak (10. ábra).



10. ábra Reprezentatív hematoxinil-eozin festett pankreász szövettani képek. *In vivo* kísérleteink során az AP-t ceruleinnel indukáltuk, majd 2×20; 2×40; 2×80 $\mu\text{mol/kg}$ ATB-346 dózisokkal kezeltük az állatokat. Az ábrán a kezelet állatokból származó szövettani metszetek hematoxinil és eozin festései láthatóak. Rövidítések: AP: akut pankreáritisz.

4.2.1. A pankreász ödémájának és víztartalmának meghatározása

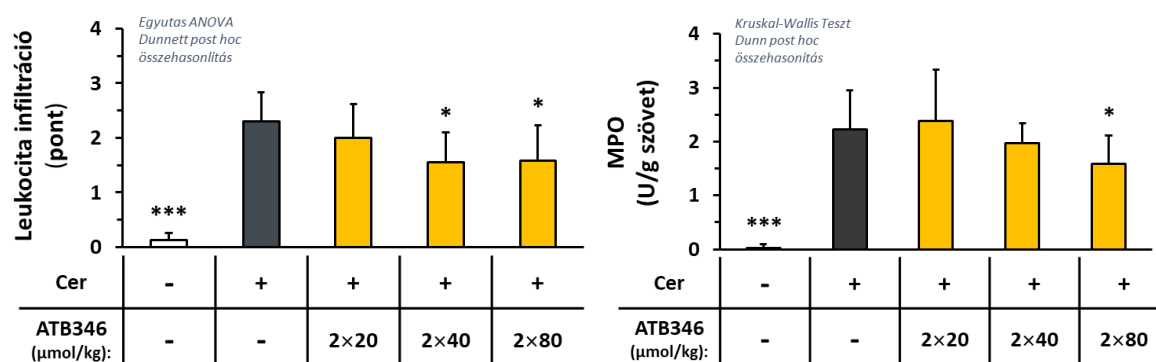
A cerulein adminisztráció AP-t váltott ki, amely az ödéma és a szöveti víztartalom mértékének megemelkedését eredményezte (11. ábra). Az ATB-346 legmagasabb alkalmazott dózisa (2×80 $\mu\text{mol/kg}$) szignifikánsan csökkentette mindkét mért paramétert a csak ceruleinnel kezelt csoporthoz képest. A 2×40 $\mu\text{mol/kg}$ ATB-346 dózis szintén szignifikánsan mérsékelte az ödéma mértékét, míg a 2×20 $\mu\text{mol/kg}$ dózis esetén nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést.



11. ábra A pankréász ödémájának és víztartalmának meghatározása. Az AP-t intraperitoneális cerulein injekcióval váltottuk ki. Az ATB-346 kezelési dózisa a következők voltak: 2×20 µmol/kg, 2×40 µmol/kg, 2×80 µmol/kg. Az adatok ábrázolása: átlag ± SD. A statisztikai vizsgálat során egyutas ANOVA tesztet végeztünk, amit Dunnett post hoc teszt követett. Mindegyik csoportot a csak ceruleinnel kezelt csoporthoz viszonyítottunk, a $p < 0,05$ alatti értékeket tekintettük szignifikáns különbségeknek és a következő módon jelöltük őket: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Rövidítések: Cer: cerulein, AP: akut pankreatitisz.

4.2.2. A szöveti leukocita infiltráció és MPO mennyiségének meghatározása

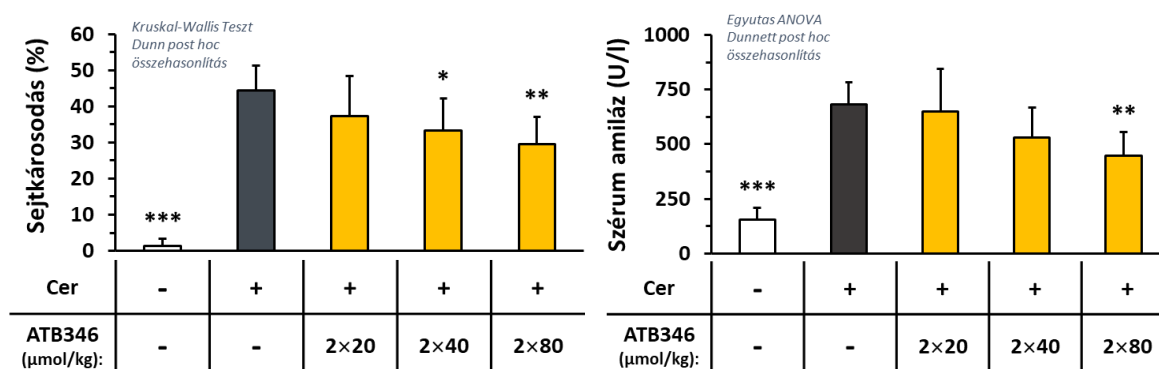
AP-ben mind a leukocita infiltráció mértéke, mind pedig a pankreatikus MPO aktivitás megnövekedett, amely értékeket az ATB-346 2×80 µmol/kg dózisban történő alkalmazása szignifikánsan lecsökkentett (12. ábra). A leukocita infiltrációt tekintve a 2×40 µmol/kg ATB-346 dózis szintén szignifikáns különbséget eredményezett a csak ceruleines csoporthoz képest, míg a legkisebb adminisztrált dózis (2×20 µmol/kg) esetén nem találtunk szignifikáns eltérést egyik mért értéknél sem.



12. ábra A szöveti leukocita infiltráció és MPO aktivitás meghatározása. Az AP-t intraperitoneális cerulein injekcióval váltottuk ki. Az ATB-346 kezelési dózisa a következők voltak 2×20 µmol/kg, 2×40 µmol/kg, 2×80 µmol/kg. Az adatok ábrázolása: átlag ± SD. A statisztikai vizsgálat során Kruskal-Wallis vagy egyutas ANOVA tesztet végeztünk, amit Dunn vagy Dunnett post hoc teszt követett. Mindegyik csoportot a csak ceruleinnel kezelt csoporthoz viszonyítottunk, a $p < 0,05$ alatti értékeket tekintettük szignifikáns különbségeknek és a következő módon jelöltük őket: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Rövidítések: Cer: cerulein, AP: akut pankreatitisz.

4.2.3. A szöveti sejtkárosodás és szérumban az amiláz szintje

Ceruleinnel kiváltott AP-ben megemelkedett a sejtkárosodás mértéke, amit az ATB-346 kezelések $2 \times 40 \mu\text{mol/kg}$ és $2 \times 80 \mu\text{mol/kg}$ dózisokban szignifikánsan mérsékeltek (13. ábra). A legkisebb dózis ($2 \times 20 \mu\text{mol/kg}$) nem befolyásolta szignifikánsan ezt az értéket a ceruleines csoporthoz képest. A szérumban az amiláz aktivitást a legnagyobb alkalmazott ATB-346 dózis ($2 \times 80 \mu\text{mol/kg}$) csökkentette szignifikánsan, míg a kisebb dózisok ($2 \times 20 \mu\text{mol/kg}$ és $2 \times 40 \mu\text{mol/kg}$) esetén nem tapasztaltunk eltérést a mért paraméterben a ceruleinnel kezelt csoporthoz viszonyítva.

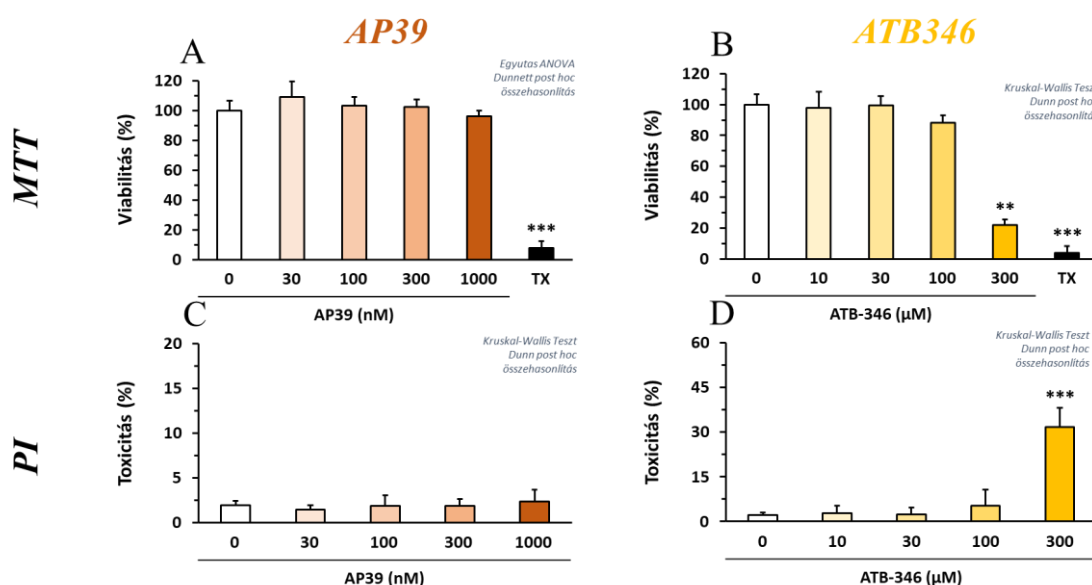


13. ábra A szöveti sejtkárosodás és szérumban az amiláz aktivitás mértékének meghatározása. Az AP-t intraperitoneális cerulein injekcióval váltottuk ki. Az ATB-346 kezelési dózisa a következők voltak: $2 \times 20 \mu\text{mol/kg}$, $2 \times 40 \mu\text{mol/kg}$, $2 \times 80 \mu\text{mol/kg}$. Az adatok ábrázolása: átlag $\pm$ SD. A statisztikai vizsgálat során Kruskal-Wallis vagy egyutas ANOVA tesztet végeztünk, amit Dunn vagy Dunnett post hoc teszt követett. Mindegyik csoportot a csak ceruleinnel kezelt csoporthoz viszonyítottunk, a $p < 0,05$ alatti értékeket tekintettük szignifikáns különbségeknek és a következő módon jelöltük őket: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Rövidítések: Cer: cerulein, AP: akut pankreatitisz.

4.3. Az AP39 és az ATB-346 hatása primer acinus sejtek életképességére

A frissen izolált primer acinus sejtek életképességét propídium-jodid és MTT technikákkal mértük. Az MTT-tesztel a sejtek metabolikus aktivitását, a propídium-jodid méréssel pedig a sejtnekrózist tudtuk nyomon követni különböző időpontokban. Először megvizsgáltuk az AP39 és ATB-346 különböző koncentrációinak acinus sejtek életképességére gyakorolt hatását 8 óra kezelést követően. A kísérletekhez a következő AP39 és ATB-346 koncentrációkat alkalmaztuk: 30, 100, 300 és 1000 nM AP39; valamint 10, 30, 100 és 300 μM ATB-346. Az MTT-tesztek során a viszonyítási alap, amelyből következtettünk, a kezeletlen negatív kontroll csoport volt, amelynek az életképességét 100%-nak tekintettük. Pozitív kontrollként mindkét módszernél

Triton X-100 oldatot használtunk, ami teljesen elpusztította a sejteket. Az ATB-346 esetén, annak legmagasabb általunk alkalmazott koncentrációja (300 μM) szignifikánsan csökkentette az acinus sejtek életképességét és toxikus hatást fejtett ki, így a későbbiekben ezt a koncentrációt már nem használtuk (14. B és D ábra). Az AP39 azonban egyik használt koncentrációban sem bizonyult toxikusnak és a sejtek metabolikus aktivitását sem befolyásolta (14. A és C ábra). Az eredmények alapján a további *in vitro* vizsgálatokhoz az ATB-346 esetén 30 μM , az AP39 esetén pedig 300 nM koncentrációkat választottuk.

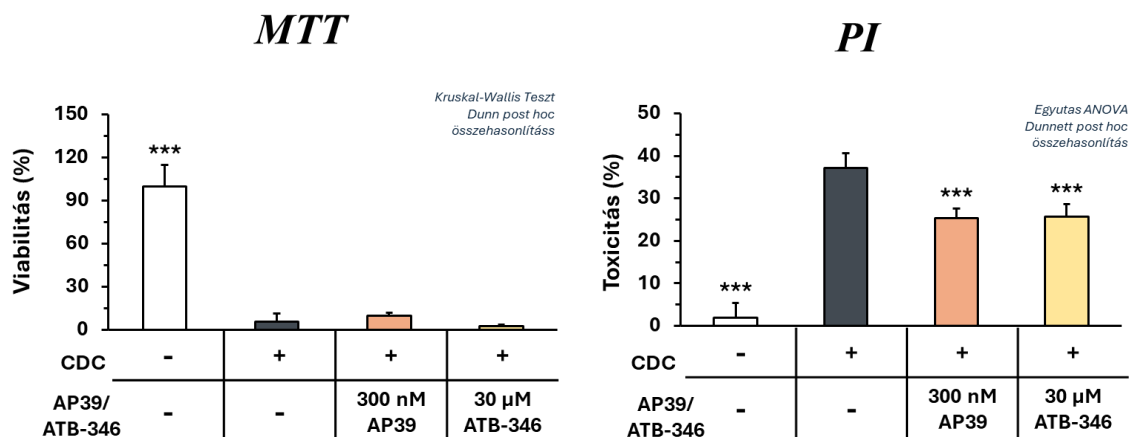


14. ábra Az ATB-346 és AP39 hatása különböző koncentrációkban a primer acinus sejtek életképességére. (A, B) Az ATB-346 és az AP39 hatásának vizsgálata a sejtek életképességére különböző koncentrációkban MTT-tesztel, 8 órás kezelést követően. (C, D) Az ATB-346 és az AP39 különböző koncentráció okozta toxicitás vizsgálata propídium-jodid mérésel, 8 órás kezelést követően. Az ATB-346 koncentrációi a következők: 10 μM , 30 μM , 100 μM , 300 μM . Az AP39 koncentrációi a következők: 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1000 nM. Pozitív kontrollként 1%-os Triton-X oldatot alkalmaztunk, amely a sejtek pusztulását eredményezte. Az adatok ábrázolása: átlag $\pm$ SD. A statisztikai vizsgálat során Kruskal-Wallis vagy egyutas ANOVA tesztet végeztünk, amit Dunn vagy Dunnett post hoc teszt követett. Mindegyik csoportot a kezeletlen kontroll csoporthoz viszonyítottunk, a $p < 0,05$ alatti értékeket tekintettük szignifikáns különbségeknek és a következő módon jelöltük őket: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Rövidítések: TX: Triton-X, PI: propídium-jodid.

4.3.1. Az AP39 és az ATB-346 hatása a CDC által indukált sejtkárosodásra

Az AP indukálására alkalmas CDC szignifikánsan csökkentette az acinus sejtek metabolikus aktivitását és sejtnekrózist okozott (15. ábra). Az MTT-teszt alapján a CDC toxikus hatását egyik kénorganikus vegyület sem tudta befolyásolni az alkalmazott koncentrációkban. Ezzel

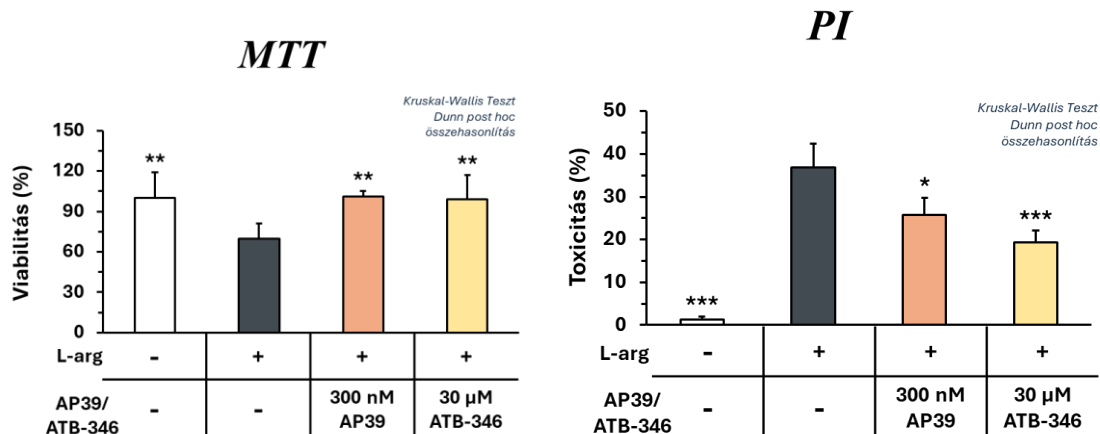
szemben a propídium-jodid mérés esetén mind az AP39, mind pedig az ATB-346 szignifikánsan csökkentette a CDC által kiváltott nekrozis mértékét.



15. ábra Az AP39 és az ATB-346 hatása a CDC által indukált sejtkárosodásra. A CDC, valamint a CDC meg az ATB-346 vagy az AP39 kombinációk acinus sejtekre gyakorolt hatását MTT és propídium-jodid módszerekkel vizsgáltuk. A kénorganikus vegyületek koncentrációi a következők: 30 µM ATB-346; 300 nM AP39. Pozitív kontrollként 1%-os Triton-X oldatot alkalmaztunk, amely a sejtek pusztulását eredményezte. Az adatok ábrázolása: átlag ± SD. A statisztikai vizsgálat során Kruskal-Wallis vagy egyutas ANOVA tesztet végeztünk, amit Dunn vagy Dunnett post hoc teszt követett. Mindegyik csoportot a csak CDC-vel kezelt csoporthoz viszonyítottunk, a $p < 0,05$ alatti értékeket tekintettük szignifikáns különbségeknek és a következő módon jelöltük őket: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Rövidítések: CDC: nátrium-kenodezoxikolát, PI: propídium-jodid.

4.3.2. Az ATB-346 és az AP39 hatása az L-arginin HCl által indukált sejtkárosodásra

Sejtkárosodást indukáltunk AP kiváltására is használt L-arg segítségével, ami az acinus sejtek életképességének a csökkenését eredményezte (16. ábra). Mindkét kénorganikus vegyület növelte a sejtek metabolikus aktivitását és csökkentették az L-arg toxikus hatását az alkalmazott koncentrációkban.

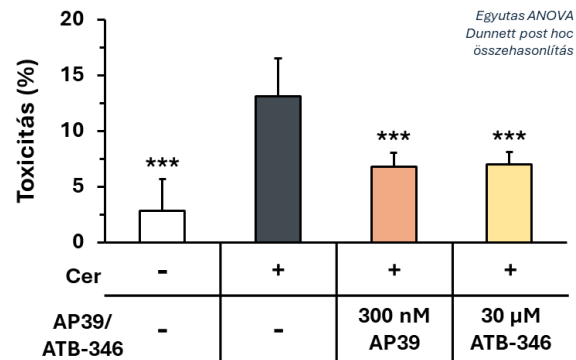


16. ábra Az ATB-346 és AP39 hatása az L-arginin által indukált sejtkárosodásra. Az L-arg, valamint az L-arg meg ATB-346 vagy AP39 kombinációinak acinus sejtekre gyakorolt hatását MTT és propídium-jodid módszerekkel vizsgáltuk. A kénorganikus vegyületek koncentrációi a következők: 30 µM ATB-346; 300 nM AP39. Pozitív kontrollként 1%-os Triton-X oldatot alkalmaztunk, amely a sejtek pusztulását eredményezte. Az adatok ábrázolása: átlag ± SD. A statisztikai vizsgálat során Kruskal-Wallis tesztet végeztünk, amit Dunn post hoc teszt követett. Mindegyik csoportot a csak L-argininnel kezelt csoporthoz viszonyítottunk, a $p < 0,05$ alatti értékeket tekintettük szignifikáns különbségeknek és a következő módon jelöltük őket: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Rövidítések: L-arg: L-arginin, PI: propídium-jodid.

4.3.3. Az ATB-346 és az AP39 hatása a cerulein által indukált sejtkárosodásra

A primer acinus sejtek károsodását AP indukálásra alkalmas ceruleinnel is kiváltottuk (17. ábra). Mivel a cerulein fokozza a sejtek metabolikus aktivitását, ezért ezesetben csak propídium-jodid mérést végeztünk. A cerulein által kiváltott sejtnekrózist mind az AP39, mind pedig az ATB-346 szignifikánsan csökkentette az acinus sejtekben.

PI



17. ábra Az ATB-346 és az AP39 hatása a cerulein által indukált sejtkárosodásra. A toxicitás vizsgálat propídium-jodid méréssel történt. A kénorganikus vegyületek koncentrációi a következők: 30 µM ATB-346; 300 nM AP39. Pozitív kontrollként 1%-os Triton-X oldatot alkalmaztunk, amely a sejtek pusztulását eredményezte. Az adatok ábrázolása: átlag ± SD. A statisztikai vizsgálat során ANOVA tesztet végeztünk, amit Dunnett post hoc teszt követett. Mindegyik csoportot a csak ceruleinnel kezelt csoporthoz viszonyítottunk a $p < 0,05$ alatti értékeket tekintettük szignifikáns különbségeknek és a következő módon jelöltük őket: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Rövidítések: Cer: cerulein, PI: propídium-jodid.

5. Diszkusszió

A kísérleteinkben megvizsgáltuk az ATB-346 és az AP39 hatásait az experimentálisan kialakított AP súlyosságára. Az *in vivo* és *in vitro* vizsgálatok alapján következtettünk a terápiás oldatok hatékonyságára. *In vivo* körülmények között megvizsgáltuk a szöveti ödéma súlyosságát, szöveti víztartalmat, leukocita infiltrációt, MPO mennyiségét, szöveti sejtkárosodást, illetve a szérum amiláz szintet. *In vitro* vizsgálatokat MTT és propídium-jodid életképesség méréssel végeztünk, melyből megbizonyosodtunk, hogy az ATB-346 és AP39 milyen protektív hatást fejtenek ki az izolált primer acinus sejtekre.

In vivo kísérleteink által bizonyítottuk, hogy az ATB-346 és az AP39 egyaránt képes volt a maximális dózisban $2 \times 0,5 \mu\text{mol/kg}$, $2 \times 80 \mu\text{mol/kg}$ csökkenteni a cerulein által kiváltott AP súlyosságainak paramétereit. Ennek hatásmechanizmusai még tisztázatlanok, de egyes irodalmakból következtethetünk az ATB-346 és AP39 folyamataira. Valószínűsíthető, hogy az ATB-346 képes a szervezetben disszociálódni, ami H_2S felszabadulást és naproxen analógot eredményez. A hatásaik potenciálisan elkülönülnek, a naproxen egy ciklooxygenáz-inhibitor mely gátolja a sejtek prosztaglandin szintézisét és csökkenti a lokális gyulladást. A H_2S fontos szerepet játszik az NF- κB transzlokációjának gátlásában, ami a gyulladást keltő mediátorok TNF- α és IL- 1β proinflammatorikus faktor expresszióját csökkenti. Gyulladásban a H_2S képes lehet nitrogén-monoxid szintáz expresszójára hatni, ami a NO szintézisét serkenti, majd a simaizom elernyedését okozza (Campolo és mtsai. 2014). A gyulladásban növelheti az NRF-2 expresszióját, ami fokozza a sejtek oxidatív stresszre adott protektív válaszát és egyensúlyban tartja a ROS képződést, a redox potenciált, illetve mérsékli a gyulladást és növeli az apoptózist (Magierowski és mtsai. 2017). Az AP39 szerkezete TPP+ csoportból és dition-etionból áll, amit egy alifás linker kapcsol össze. Az AP39 a TPP+ csoport szerkezete miatt képes a mitokondrium mátrixában felhalmozódni és ott a ditio-etion csoportból H_2S -t felszabadítani. Bartos Szczeny és mtsai. megvizsgálták, hogy oxidatív stresszt indukálva, hogyan változik a mitokondrium redox potenciálja az AP39 hozzáadását követően. Kimutatták, hogy az AP39 csökkentette az mitokondriumokban az oxidatív stresszt, fenntartotta a sejtek életképességét, és a mitokondrium DNS integritását (Szczeny és mtsai. 2014). A kutatásunk során feltételezhető, hogy az AP-t kiváltott egerekben az AP39 mitokondriumokban felhalmozódva, fenntartotta a légzésiláncot, csökkentette az oxidatív stresszt és az mtDNS károsodását. Azonban ezeket a feltételezéseket a későbbi vizsgálatok során még szükséges igazolni.

In vitro kísérleteinkben először megvizsgáltuk MTT és propídium-jodid méréssel az acinus sejtek életképességét. Meghatároztuk, hogy az ATB-346 30 μ M-os, míg az AP39 300 nM-os koncentrációban nem csökkenti szignifikánsan a sejtek viabilitását. Ezen koncentrációkat, különböző AP-t kiváltó toxikus oldatokkal kezeltük (L-arginin, CDC, cerulein). Kísérleteink által bizonyítottuk, hogy az ATB-346 és az AP39 citoprotektív hatásokat fejtenek ki az AP indukcióra alkalmas toxikus vegyületekkel szemben.

Összességében az AP39 és az ATB-346 kísérleti AP-ben kimutatható gyulladáscsökkentő hatással rendelkeznek, ami indokolja további vizsgálatainkat az organoszulfur vegyületek valódi hatásmechanizmusának feltárása érdekében.

6. Összefoglalás

Az akut pankreatitisz (AP) az exokrin pankréász akut gyulladásos állapota. A betegségnek még nincs specifikus kezelése és viszonylag magas a halálozási aránya. Korábbi vizsgálatok leírták, hogy egyes kénorganikus vegyületek, melyekből H_2S szabadulhat fel, gyulladáscsökkentő hatással bírnak számos betegségben. A munkánk során célunk volt két kénorganikus vegyület, az AP39 és az ATB-346, *in vivo* és *in vitro* hatásainak vizsgálata kísérletes AP-ben és izolált pankréász acinus sejteken. Az AP-t FVB/n egerekben 10 $\times$ 50 μ g/kg cerulein óránkénti intraperitoneális injekcióval váltottuk ki. Az AP39 kezelést intraperitoneálisan (2 $\times$ 0,125, 2 $\times$ 0,25, 2 $\times$ 0,5 μ mol/kg); míg az ATB-346-ot per os (2 $\times$ 20, 2 $\times$ 40, 2 $\times$ 80 μ mol/kg) adtuk. A kontroll állatok vehikulumot kaptak. Az AP súlyosságának becslése a szövetek hisztológiai kiértékelésével (ödéma, leukocita infiltráció, sejtkárosodás), a szöveti víztartalom, valamint a pankreatikus mieloperoxidáz és a szérum amiláz aktivitásának meghatározásával történt. A primer pankréász acinus sejteket *in vitro* vizsgálatokhoz használtuk (Tripán-kék, MTT és propídium-jodid [PI]) a sejtek életképességének meghatározására. Mindkét kénorganikus vegyület dózisfüggően enyhítette a cerulein által kiváltott AP súlyosságát azáltal, hogy csökkentette a szöveti víztartalmat, a leukocita infiltrációt, a sejtkárosodást, a pankreatikus mieloperoxidáz és a szérum amiláz aktivitást. *In vitro* az AP39 ($\leq$ 300 nM) és ATB-346 ($\leq$ 30 μ M) kezelések önmagukban nem befolyásolták a primer acinus sejtek életképességét. Az AP-t indukáló toxikus vegyületek (cerulein, kenodezoxikolát, L-arginin-HCl) az acinus sejtek nekrozisát (PI-teszt) és a sejtek metabolikus aktivitásának csökkenését (MTT-teszt) okozták. A kénorganikus molekulákkal történő kezelések (300 nM AP39 vagy 30 μ M ATB-346) azonban szignifikánsan csökkentették a cerulein,

kenodezoxikolát, vagy az L-arginin-HCl okozta toxikus hatásokat. Mind az AP39, mind pedig az ATB-346 szignifikánsan enyhítette az AP súlyosságát és védte a primer acinus sejteket az AP kiváltására képes kezelésekkel szemben. Eredményeink azt mutatják, hogy ezek a molekulák gyulladáscsökkentő és citoprotektív hatással rendelkeznek, és érdemes további, a pontos hatásmechanizmus feltárására irányuló vizsgálatokat végezni.

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a témavezetőmnek Dr. Kiss Lórándnak, illetve társtémavezetőmnek Orján Eriknek a rengeteg segítséget, amit nyújtottak nekem a munkám során. Továbbá megszeretném köszönni Prof. Dr. Rakonczay Zoltánnak a lehetőséget a munka végzésre és a támogató szakmai háttérrel, melyet az Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar Kórélettani Intézet laborjában végezhettem el. Köszönöm Takácsné Mihalik Boglárkának és Márkus Máténak a kísérleteim során végzett technikai segítséget. De nem utolsó sorban szeretném megköszönni a családomnak, barátaimnak, szeretteimnek, hogy szeretettel és megértéssel támogattak a céljaim elérésében.

8. Irodalomjegyzék

- Banerjee, Amrita, és Hayat Onyuksel. 2012. „Human pancreatic polypeptide in a phospholipid-based micellar formulation.” *Pharmaceutical research* 29 (6): 1698–1711. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0718-4>.
- Banks, Peter A, Thomas L Bollen, Christos Dervenis, Hein G Gooszen, Colin D Johnson, Michael G Sarr, Gregory G Tsiotos, és Santhi Swaroop Vege. 2013. „Classification of acute pancreatitis—2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus”. *Gut* 62 (1): 102–11. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302779>.
- Barreto, Savio George, Aida Habtezion, Anna Gukovskaya, Aurelia Lugea, Christie Jeon, Dhiraj Yadav, Peter Hegyi, Viktória Venglovecz, Robert Sutton, és Stephen J Pandol. 2021. „Critical thresholds: key to unlocking the door to the prevention and specific treatments for acute pancreatitis.” *Gut* 70 (1): 194–203. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322163>.
- Beyer, Georg, Aida Habtezion, Jens Werner, Markus M Lerch, és Julia Mayerle. 2020. „Chronic pancreatitis”. *The Lancet* 396 (10249): 499–512. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31318-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31318-0).
- Bhatia, Madhav. 2010. „Hydrogen Sulfide and Substance P in Inflammation”. *Antioxidants & Redox Signaling* 12 (10): 1191–1202. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2927>.
- Bhatia, Madhav, Fei Ling Wong, Di Fu, Hon Yen Lau, Shabbir M. Moochhala, és Philip K. Moore. 2005. „Role of hydrogen sulfide in acute pancreatitis and associated lung injury”. *The FASEB Journal* 19 (6): 1–17. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3023fje>.
- Biczo, Gyorgy, Eszter T. Vegh, Natalia Shalbueva, Olga A. Mareninova, Jason Elperin, Ethan Lotshaw, Sophie Gretler, és mtsai. 2018. „Mitochondrial Dysfunction, Through Impaired Autophagy, Leads to Endoplasmic Reticulum Stress, Dereglated Lipid Metabolism, and Pancreatitis in Animal Models”. *Gastroenterology* 154 (3): 689–703. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.10.012>.
- Bronowicka-Adamska, Patrycja, Tomasz Hutsch, Marta Gawryś-Kopczyńska, Klaudia Maksymiuk, és Maria Wróbel. 2019. „Hydrogen sulfide formation in experimental model of acute pancreatitis.” *Acta biochimica Polonica* 66 (4): 611–18. https://doi.org/10.18388/abp.2019_2900.
- Campolo, Michela, Emanuela Esposito, Akbar Ahmad, Rosanna Di Paola, Irene Paterniti, Marika Cordaro, Giuseppe Bruschetta, John L Wallace, és Salvatore Cuzzocrea. 2014. „Hydrogen sulfide-releasing cyclooxygenase inhibitor ATB-346 enhances motor function and reduces cortical lesion volume following traumatic brain injury in mice”. *Journal of Neuroinflammation* 11 (1): 196. <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0196-1>.
- Cicco, Paola De, Elisabetta Panza, Giuseppe Ercolano, Chiara Armogida, Giuseppe Sessa, Giuseppe Pirozzi, Giuseppe Cirino, John L. Wallace, és Angela Ianaro. 2016. „ATB-346, a novel hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drug, induces apoptosis of human melanoma cells and inhibits melanoma development in vivo”. *Pharmacological Research* 114 (december): 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.10.019>.
- Dief, A E, D K Mostafa, G M Sharara, és T H Zeitoun. 2015. „Hydrogen sulfide releasing naproxen offers better anti-inflammatory and chondroprotective effect relative to naproxen in a rat model of zymosan induced arthritis.” *European review for medical and pharmacological sciences* 19 (8): 1537–46.
- Dilek, Nahzli, Andreas Papapetropoulos, Tracy Toliver-Kinsky, és Csaba Szabo. 2020. „Hydrogen sulfide: An endogenous regulator of the immune system”. *Pharmacological Research* 161 (november): 105119. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105119>.
- Dingenen, Jonas Van, Leen Pieters, Anne Vral, és Romain A Lefebvre. 2019. „The H2S-Releasing Naproxen Derivative ATB-346 and the Slow-Release H2S Donor GYY4137 Reduce Intestinal Inflammation and Restore Transit in Postoperative Ileus.” *Frontiers in pharmacology* 10: 116. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00116>.

- Dolenšek, Jurij, Marjan Slak Rupnik, és Andraž Stožer. 2015a. „Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas.” *Islets* 7 (1): e1024405. <https://doi.org/10.1080/19382014.2015.1024405>.
- . 2015b. „Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas”. *Islets* 7 (1): e1024405. <https://doi.org/10.1080/19382014.2015.1024405>.
- Drucker, Natalie A., Amanda R. Jensen, Michael Ferkowicz, és Troy A. Markel. 2018. „Hydrogen sulfide provides intestinal protection during a murine model of experimental necrotizing enterocolitis”. *Journal of Pediatric Surgery* 53 (9): 1692–98. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2017.12.003>.
- Eric Block. 2023. „organosulfur compound”. In *Encyclopedia Britannica*, szerkesztette Eric Block, 1–17. 2023. <https://www.britannica.com/science/organosulfur-compound>.
- Etemad, B, és D C Whitcomb. 2001. „Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments.” *Gastroenterology* 120 (3): 682–707. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.22586>.
- Hart, Phil A., és Darwin L. Conwell. 2020. „Chronic Pancreatitis: Managing a Difficult Disease”. *American Journal of Gastroenterology* 115 (1): 49–55. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000421>.
- Hoyle, T. 1997. „The digestive system: linking theory and practice.” *British journal of nursing (Mark Allen Publishing)* 6 (22): 1285–91. <https://doi.org/10.12968/bjon.1997.6.22.1285>.
- LEE, HYE HYEON, MIN HO HAN, HYE JIN HWANG, GI-YOUNG KIM, SUNG-KWON MOON, JIN-WON HYUN, WUN-JAE KIM, és YUNG HYUN CHOI. 2015. „Diallyl trisulfide exerts anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages by suppressing the Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B pathway”. *International Journal of Molecular Medicine* 35 (2): 487–95. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.2036>.
- Leung, Po Sing, és Siu Po Ip. 2006. „Pancreatic acinar cell: its role in acute pancreatitis.” *The international journal of biochemistry & cell biology* 38 (7): 1024–30. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.12.001>.
- Liu, Ting, Lingyun Zhang, Donghyun Joo, és Shao-Cong Sun. 2017. „NF- κ B signaling in inflammation”. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2 (1): 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>.
- Longnecker, Daniel. 2014. „Anatomy and Histology of the Pancreas”. <https://doi.org/10.3998/panc.2014.3>.
- Lowe, M E. 1994. „Pancreatic triglyceride lipase and colipase: insights into dietary fat digestion.” *Gastroenterology* 107 (5): 1524–36. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(94\)90559-2](https://doi.org/10.1016/0016-5085(94)90559-2).
- Magierowski, M, K Magierowska, M Surmiak, M Hubalewska-Mazgaj, S Kwiecien, J L Wallace, és T Brzozowski. 2017. „The effect of hydrogen sulfide-releasing naproxen (ATB-346) versus naproxen on formation of stress-induced gastric lesions, the regulation of systemic inflammation, hypoxia and alterations in gastric microcirculation.” *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society* 68 (5): 749–56.
- Maléth, József, és Péter Hegyi. 2016. „Ca²⁺ toxicity and mitochondrial damage in acute pancreatitis: translational overview.” *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 371 (1700). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0425>.
- Marutani, Eizo, és Fumito Ichinose. 2020. „Emerging pharmacological tools to control hydrogen sulfide signaling in critical illness.” *Intensive care medicine experimental* 8 (1): 5. <https://doi.org/10.1186/s40635-020-0296-4>.
- Pallagi, Petra, Péter Hegyi, és Zoltán Rakonczay. 2015. „The Physiology and Pathophysiology of Pancreatic Ductal Secretion: The Background for Clinicians.” *Pancreas* 44 (8): 1211–33. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000421>.
- Pandol, Stephen J, és Roberta A Gottlieb. 2022. „Calcium, mitochondria and the initiation of acute pancreatitis.” *Pancreatology: official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]* 22 (7): 838–45. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2022.07.011>.
- Petersen, Ole H, Julia V Gerasimenko, Oleg V Gerasimenko, Oleksiy Gryshchenko, és Shuang Peng. 2021. „The roles of calcium and ATP in the physiology and pathology of the exocrine

- pancreas.” *Physiological reviews* 101 (4): 1691–1744.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2021>.
- Pozsgai, Gábor, Maja Payrits, Éva Sághy, Réka Sebestyén-Bátai, Elise Steen, Éva Szőke, Zoltán Sándor, és mtsai. 2017. „Analgesic effect of dimethyl trisulfide in mice is mediated by TRPA1 and sst 4 receptors”. *Nitric Oxide* 65 (május): 10–21.
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.01.012>.
- Ruhee, Ruheea Taskin, Llion Arwyn Roberts, Sihui Ma, és Katsuhiko Suzuki. 2020. „Organosulfur Compounds: A Review of Their Anti-inflammatory Effects in Human Health”. *Frontiers in Nutrition* 7 (június). <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00064>.
- Saluja, Ashok, Vikas Dudeja, Rajinder Dawra, és Raghuwansh P. Sah. 2019. „Early Intra-Acinar Events in Pathogenesis of Pancreatitis”. *Gastroenterology* 156 (7): 1979–93.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.01.268>.
- Szatmary, Peter, Tassos Grammatikopoulos, Wenhao Cai, Wei Huang, Rajarshi Mukherjee, Chris Halloran, Georg Beyer, és Robert Sutton. 2022. „Acute Pancreatitis: Diagnosis and Treatment.” *Drugs* 82 (12): 1251–76. <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01766-4>.
- Szczesny, Bartosz, Katalin Módos, Kazunori Yanagi, Ciro Coletta, Sophie Le Trionnaire, Alexis Perry, Mark E. Wood, Matthew Whiteman, és Csaba Szabo. 2014. „AP39, a novel mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor, stimulates cellular bioenergetics, exerts cytoprotective effects and protects against the loss of mitochondrial DNA integrity in oxidatively stressed endothelial cells in vitro”. *Nitric Oxide* 41 (szeptember): 120–30.
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.04.008>.
- Tulassay, Z. 1998. „Somatostatin and the gastrointestinal tract.” *Scandinavian journal of gastroenterology. Supplement* 228: 115–21. <https://doi.org/10.1080/003655298750026642>.
- Whitcomb, David C, és Mark E Lowe. 2007. „Human pancreatic digestive enzymes.” *Digestive diseases and sciences* 52 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9589-z>.
- Williams, John A. 2018. „Pancreatic Ribonuclease”. <https://doi.org/10.3998/panc.2018.20>.
- . 2021. „Pancreatic DNase”. <https://doi.org/10.3998/panc.2021.14>.
- Yanagi, Shigehisa, Takahiro Sato, Kenji Kangawa, és Masamitsu Nakazato. 2018. „The Homeostatic Force of Ghrelin.” *Cell metabolism* 27 (4): 786–804.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.02.008>.
- Zhou, Qiao, és Douglas A Melton. 2018. „Pancreas regeneration.” *Nature* 557 (7705): 351–58.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0088-0>.

8. ábra ábra ikonok:

<https://www.ddbiolab.com/article/262668?language=en>

<https://pixabay.com/hu/vectors/erlenmeyer-lombik-lombik-k%C3%A9mia-309689/>

https://smart.servier.com/smart_image/petri-dish-blue/

<https://www.biorender.com/icon/mouse-pancreas>

https://smart.servier.com/smart_image/petri-dish/

<https://www.biorender.com/icon/rat-swollen-paw-dorsal>