

**Az olaparib kísérletes colitisre és intesztinális epitél
barrier integritásra kifejtett hatásának *in vivo* és *in vitro*
vizsgálata**

PhD tézis

Kovács Dominika



Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Molekuláris és Celluláris Biokémia Program

Doktori Iskola és Programvezető: Prof. Dr. Gallyas Ferenc

Témavezető: Dr. Radnai Balázs

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

2023

1. Bevezetés

1.1. A gyulladásoos bélbetegségek általános jellemzése

A gyulladásoos bélbetegségek (inflammatory bowel diseases, IBD) közé tartozó colitis ulcerosa (ulcerative colitis, UC) és Crohn-betegség (Crohn's disease, CD) a gasztrointesztinális traktus krónikus, gyulladásoos megbetegedései. A gyulladásoos bélbetegségek komplex, multifaktoriális kórképek. Etiológiájuk máig sem teljesen tisztázott, annyi azonban ismert, hogy genetikai és környezeti tényezők, a bélnyálkahártya barrier funkciójának csökkenése, valamint a bélflórával szembeni kóros immunválasz mind szerepet játszanak a betegség kialakulásában.

Mivel a kiváltó ok ismeretlen, így oki terápia sem létezik. Ma az IBD kezelésének legfőbb célja az endoszkópos és szövettani remisszió elérése. Ez egy rendkívül komplex folyamat, melyhez nélkülözhetetlen a gyulladás csökkentése, valamint az epitél barrier funkciójának javítása. A jelenleg alkalmazott legfontosabb gyógyszercsoportok az aminoszalicilátok, szteroidok, immunszuppresszánsok, monoklonális antitestek (biológiai terápia). Bár a kezelési lehetőségek tárháza folyamatosan bővül, a jelenlegi, illetve a vizsgálati fázisban lévő biológiai szerek és kismolekulájú hatóanyagok többsége az immunrendszer valamely elemére közvetlenül fejt ki a hatását, egy-egy immunfolyamat, gyulladásoos kaszkád bizonyos pontját célozza. Annak ellenére, hogy a terápia legfőbb célja a nyálkahártya gyógyulása lenne, nincs olyan engedélyezett hatóanyag, amely direkt módon az epitél barrieret célozná.

1.2. A mitokondrium szerepe a gyulladásoos bélbetegségek kialakulásában

Az intesztinális epitél sejtek kiemelkedő energiaigénye miatt a mitokondrium energiatermelését érintő zavarok erőteljesen befolyásolják a sejtek életképességét, veszélyeztetik az intesztinális barrier épségét. Roediger már 1980-ban leírta, hogy a colitis ulcerosa egy sejtszintű energiahiánnyal járó betegség. A kifejezés az akut colitis ulcerosás betegek bélhámsejtjeiben mért, csökkent butirát oxidáció miatt született, mely tápanyag a colonocyták fő energiaforrásának tekinthető. Mára Roediger feltételezését számos további kutatás igazolta. Schneider és munkatársai kimutatták IBD betegek vastagbél mintáiban, hogy a légzési lánc összes komplexének csökkent az expressziója. Colitis ulcerosában szenvedő betegek vastagbél mintáiban a Komplex II, III és IV enzimaktivitása is kisebb mértékű, továbbá a bélnyálkahártyát szignifikánsan alacsonyabb ATP szint jellemzi. IBD betegeknél a

mitokondriális elváltozások, mint a duzzadás, a külső és belső membrán integritásának elvesztése már a gyulladás kialakulása előtt megfigyelhetőek, ami arra enged következtetni, hogy a mitokondriális diszfunkció a betegség kialakulásának egyik korai esemény.

Az energiatermelésen túl a mitokondriumok a reaktív oxigén származékok (ROS) fő forrásai is. Abban az esetben, ha a légzési láncban az elektronok vándorlása zavart, azaz valamelyik komplexről rögtön egy oxigén molekulára kerülnek, részlegesen redukált oxigén származékok válnak szabaddá. Hozzávetőlegesen a légzési láncban felhasznált oxigén 1-2%-a alakul szuperoxid-anionná. Az eliminálást végző szuperoxid-dizmutáz által katalizált reakcióban hidrogén-peroxid (H_2O_2) képződik, ami egy membránpermeábilis oxigénszármazék és károsítja a fehérjéket, lipideket, valamint a DNS-t. A H_2O_2 colitis ulcerosa patogenezisében betöltött szerepét bizonyítja, hogy mind a gyulladt, mind az ép nyálkahártyában szignifikánsan magasabb a H_2O_2 szintje az egészséges bélből vett mintákhoz képest. A vastagbélhámsejtekben keletkezett H_2O_2 az extracelluláris térbe könnyedén kijutva károsítja a sejtek közötti szoros kapcsolat fenntartását biztosító tight junction fehérjéket. Ez a paracelluláris permeabilitás fokozódásához, a luminális baktériumok lamina propria-ba történő transzlokációjához, a bélszövet neutrofil infiltrációjához vezet.

1.3. A vastagbélhámsejtek metabolizmusa gyulladás során

A vastagbélhámsejtek metabolizmusában kiemelkedő szerepet játszanak az élelmi rostok bakteriális fermentációja során képződő rövid szénláncú zsírsavak. Az acetát, propionát és butirát közül a butirát tekinthető a colonocyták elsődleges energiaforrásának. Lebontását tekintve első lépésként a mitokondrium mátrixában zajló β -oxidáción keresztül acetyl-CoA-ig bomlik, aminek további oxidációja a citrátkörben zajlik, majd a terminális oxidációhoz kapcsolt oxidatív foszforiláción keresztül történik meg az ATP termelődés. Normál körülmények között tehát a colonocytákban döntően a β -oxidáción keresztül történik az energiatermelés, így a sejteket magas oxigénfogyasztás jellemzi. Ez fenntartja az epiteliális hipoxia állapotát, korlátozva ezzel a bél lumenbe jutó oxigén mennyiségét, ami a butirát termeléséért felelős anaerob baktériumoknak kedvez. A colonocyták metabolizmusát tekintve a fent említett homeosztatikus állapotot C2 fenotípusnak nevezzük. Proinflammatórikus szignálok hatására azonban megtörténik a sejtek C1 irányú polarizálódása, vagyis energiatermelésük az oxidatív foszforiláció felől az aerob glikolízis irányába tolódik. Ennek során bár a sejtek számára rendelkezésre áll elegendő oxigén, nem uralkodnak anaerob körülmények, a glükóznak mégsem történik meg a teljes oxidációja, sorsát nem az

oxigénellátottság határozza meg. A glikolízis során képződő piruvát nem oxidálódik tovább acetyl-CoA-vá és lép be a citrátkörbe, majd történik meg az oxidatív foszforiláción keresztüli ATP termelés, hanem a laktát-dehidrogenáz enzim által katalizált reakcióban laktáttá redukálódik, miközben egy NADH NAD⁺-á oxidálódik. A gyulladás hatására bekövetkező metabolikus átállás tehát a colonocyták számára magas glükózfogyasztást és laktát termelést, továbbá alacsony oxigénfogyasztást jelent. Ennek egyik következménye az epiteliális hipoxia elvesztése, a bél lumenbe jutó oxigén mennyiségének növekedése, ami bakteriális diszbiózishoz és a colonocyták diszfunkciójához vezet. Az IBD patogenezisében szerepet játszó ROS elsődleges forrása maga a mitokondriális légzési lánc. Miután a colonocyták gyulladás idején elsősorban az aerob glikolízisen keresztül termelik az ATP-t, azaz a mitokondriális légzési lánc gátolt, ez egyfajta védelmet nyújt a fokozott ROS termelés ellen. IBD betegek colon biopsziájának vizsgálata során a glikolízis enzimjei közül az aldoláz-A, a foszfoglicerát-mutáz, az enoláz és a piruvát-kináz mRNS expressziója is szignifikánsan magasabbnak bizonyult a kontroll csoporthoz képest, míg a citrátköri malát-dehidrogenáz expressziója csökkenést mutatott, ami alátámasztja a vastagbélhámsejtek metabolikus eltolódását. A fokozott aerob glikolízist bizonyítja továbbá, hogy IBD betegek széklet laktát szintje, valamint az aktív fázisban lévő Crohn-betegek szérum laktát szintje is szignifikánsan emelkedett volt.

1.4. A poli(ADP-ribóz)-polimeráz-1 enzim

A poli(ADP-ribóz)-polimeráz enzimek (PARP-ok) bizonyos célfehérjék poszttranszlációs módosítását, poli-ADP-ribozilációját (PARiláció) katalizálják. A PARP egy 17 tagból álló enzimcsalád, melynek legtöbbet tanulmányozott tagja az elsőként felfedezett, egyben az eukarióta sejtek PARP aktivitásának döntő részéért felelős PARP-1 izoforma. Ez egy sejtmagban elhelyezkedő, DNS-törés által aktivált, 113 kDa nagyságú fehérje. Az enzim a NAD⁺-t nikotinamidra és ADP-ribózra hasítja, majd az így felszabadult ADP-ribóz monomerekből glikozidos kötések keresztül különböző hosszúságú, elágazó láncú PAR polimerek épülnek fel, amik a megfelelő akceptor fehérjékhez kötődnek. A negatív töltésű PAR polimerek képesek megváltoztatni a célfehérjék szerkezetét, befolyásolják az általuk kialakított kölcsönhatásokat. A PARiláció egyik fő célpontja maga a PARP-1 fehérje, ekkor automodifikációról beszélünk, ami az enzim inaktiválódásához vezet. Heteromodifikációnak nevezzük azt a folyamatot, amikor a PAR polimer egyéb fehérjékhez, például hisztonokhoz, transzkripciós faktorokhoz, DNS-hibajavításban, sejtciklus szabályozásban résztvevő

fehérjékhez kapcsolódik, mint például a DNS ligázok, DNS topoizomeráz I és II, p53 vagy nukleáris faktor-kappa B (NF- κ B). A célfehérjéket tekintve a PARP-1 szerepet játszik a DNS hibajavításban, replikációban, transzkripcióban, kromatin szerveződésben és ezeken a celluláris mechanizmusokon keresztül képes befolyásolni a sejtek proliferációját, differenciációját, metabolizmusát, valamint a sejthalált.

A PARP-1 klasszikusan egyszálú és kétszálú DNS törések hatására aktiválódik, ami bekövetkezhet szabadgyökök, egyéb reaktív oxigén és nitrogén származékok hatására, továbbá az ionizációs sugárzás és a DNS alkiláló szerek is károsítják a DNS-t. A PARP-1 aktiváció sejtekre gyakorolt hatását a DNS károsodás mértéke jelentősen befolyásolja. Egy kisebb mértékű stressz esetében a PARP-1 a különböző DNS repair mechanizmusokban betöltött szerepe révén hozzájárul a sérült DNS kijavításához és ez által a genom integritásának fenntartásához. Ezzel szemben egy jóval nagyobb mértékű stressz és az ebből fakadó kiterjedt DNS károsodás során a PARP-1 enzim túlzott mértékű aktivációja figyelhető meg, ami a sejt NAD^+ és ATP készletének kimerüléséhez, nekrozishoz vezet.

A NAD^+ a katabolikus folyamatokban résztvevő dehidrogenáz enzimek egyik legfontosabb proton és elektron akceptora. Miután a glikolízis és a citrát ciklus a két legfőbb NAD^+ felhasználó, a légzési lánc számára NADH -t szolgáltató és ezzel az ATP szintézist biztosító útvonal, így a PARP-1 hiperaktivációjából fakadó NAD^+ depléciónak ezeknek az útvonalaknak a lassulásához, az ATP szintjének drasztikus csökkenéséhez, végül sejthalálhoz vezet. A PARP-1 túlzott mértékű aktivációjából fakadó glikolitikus blokk nem pusztán a NAD^+ készlet fogyásából fakad, hanem a PARP-1 direkt módon képest gátolni a glikolízis első lépését, a glükóz foszforilációját katalizáló hexokináz I izoformát. Ez a mechanizmus a NAD^+ hiány mellett szintén hozzájárul a PARP-1 túlaktiválódásából fakadó mitokondriális diszfunkcióhoz, későbbi sejthalálhoz.

1.5. PARP, mint terápiás célpont

A PARP-1 enzim DNS hibajavításban betöltött szerepének alaposabb megismerése vetette fel a PARP gátlás daganat ellenes terápiában való alkalmazásának lehetőségét. Ez lendítette fel az új generációs inhibitorok fejlesztését, ami több tucatnyi klinikai vizsgálatot és mára egyre több PARP inhibitor törzskönyvezését hozta magával. E folyamatok kiinduló pontjaként szolgált az a felfedezés, miszerint a BRCA1 és BRCA2 mutációt hordozó, azaz homológ rekombináció (HR)-deficiens sejtek sokkal érzékenyebbek a PARP gátlószerekkel szemben, mint a HR-normál sejtek. A HR defektusával rendelkező sejtek egyszálú DNS

töréseinek javítása a bázis excíziós repair (BER) mechanizmusával történne, azonban a PARP enzim gátlásával a BER nem működik kellő hatékonysággal. Ebből adódóan a PARP gátlószerekkel kezelt, BRCA1/2 mutáns sejtek, ahol sem a HR, sem a BER nem működik megfelelően, a DNS károsodások elégtelen javítása sejthalálhoz vezet. Normál sejtekben, működőképes HR mechanizmus mellett a PARP gátlás nem okoz károsodást. Az említett szintetikus letalitás jelensége hozta meg az áttörést, hiszen engedélyezték az első PARP inhibitor, az olaparib (Lynparza) alkalmazását BRCA-mutáció-pozitív petefészekrák kezelésében. Azóta több daganat típus esetében is jóváhagyták az alkalmazását, továbbá újabb PARP inhibitorok is törzskönyvezésre kerültek, mint a veliparib, rukaparib, niraparib és talazoparib, melyekkel számos klinikai vizsgálat folyik.

Bár a jelenlegi klinikai vizsgálatok szinte kizárólag onkológiai betegségekre fókuszálnak, a kutatókban felmerült az igény a nem-onkológiai indikációkban történő kipróbálásra, hiszen a preklinikai kutatások eredményei alapján a PARP gátlás számos olyan betegség modellben hatékonynak bizonyult, melyek patomechanizmusában az oxidatív stressz, a DNS károsodás, a gyulladás szerepet játszik.

1.6. Új generációs PARP gátlószerek: olaparib

Az olaparib a PARP-1, PARP-2 és PARP-3 izoformák kompetitív inhibitora, NAD^+ analóg révén az aktív centrumot blokkolva képes gátolni az enzimek működését. Az elmúlt években az Egyesült Államok Élelmiszer és Gyógyszerügyi Hivatala (FDA) több daganat típus esetében is jóváhagyta az olaparib (Lynparza) használatát: BRCA mutációt hordozó petefészek-, petevezeték-, hashártya-, emlő-, hasnyálmirigy- és prosztatadaganat. A monoterápiaként alkalmazott olaparib jól tolerálhatóan bizonyul, a mellékhatásai az enyhe és közepes súlyos kategóriába sorolhatóak, ami általában nem teszi szükségessé a terápia felfüggesztését. Leggyakoribb mellékhatásként ($\geq 10\%$) jelentkezik a fáradtság, hányinger, hányás, hasmenés, fejfájás, csökkent étvágy, anémia, neutropenia, thrombocytopenia, lymphopenia. A preklinikai biztonságossági vizsgálatok során, emlős sejteken *in vitro* az olaparib klasztogén hatásának bizonyult, patkányoknál *in vivo* mikronukleuszokat indukált a csontvelőben. Fontos megjegyezni azonban, hogy a DNS integritásra, valamint kromoszóma stabilitásra gyakorolt hatását humán tekintetben eddig nem vizsgálták, a genotoxicitási potenciáljáról tehát nem áll rendelkezésre adat.

1.7. A PARP gátlás kísérletes colitisre gyakorolt hatása

A PARP gátlók alkalmazásának, illetve a PARP-1 gén kiütésének kísérletes colitisre gyakorolt protektív hatását többféle állatkísérletes modellben bizonyították. Patkányokon végzett 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav (TNBS)-indukálta colitis modellben a 3-aminobenzamid (3-AB) és 1,5-dihidroxiizokinolin (1,5-DIQ) PARP gátlók csökkentették a súlyos tüneteket (fogyás, véres hasmenés), a szövetkárosodást, a mieloperoxidáz aktivitást, valamint az apoptotikus vastagbél epitél sejtek arányát, melynek hátterében az NF- κ B és az aktivációs fehérje-1 (AP-1) DNS-kötésének gátlását feltételezik. Egy másik munkacsoport által végzett TNBS-el kiváltott colitis kísérletben a 3-AB és 1,5-DIQ gyulladáscsökkentő hatását a neutrofil infiltráció mérséklésének, illetve a ciklooxygenáz-2 és prosztaglandin E2 expresszió csökkentésének tulajdonítják. A fent említett állatkísérletekben gyakran alkalmazott inhibitorok az első és második generációs PARP gátlók csoportjába tartoznak. Hátrányuk, hogy csak magasabb koncentrációban hatékonyak, kevésbé specifikusak és klinikai tesztelésükre sem onkológiai, sem egyéb betegségek esetében nem került sor. Az intenzív fejlesztéseknek köszönhető harmadik generációs, kismolekulájú PARP gátlók (olaparib, veliparib, rukaparib, niraparib, talazoparib) hatása jóval alacsonyabb, akár már nanomólos koncentrációban is érvényesül, kompetitív inhibitorok, nagy specificitást mutatnak a PARP-1,-2,-3 izoformák iránt, különböző daganat típusok esetében pedig a klinikai alkalmazás fázisába kerültek. Bár az olaparibot *in vivo* és *in vitro* számos nem-onkológiai betegség modellben (szeptikus sokk, asztma, akut veseelégtelenség, öregedés) tesztelték, kísérletes colitisre gyakorolt hatását eddig nem vizsgálták.

2. Célkitűzések

A harmadik generációs PARP gátlók megjelenése, azok onkológiai betegségekben történő alkalmazása miatt felmerült az igény a hatóanyagok nem-onkológiai betegségekben, többek között a gyulladással járó bélbetegségekben történő használatára. Bár a PARP gátlás kísérletes colitisre gyakorolt hatásáról rendelkezésünkre állnak szakirodalmi adatok, ezekben a kutatásokban kizárólag olyan PARP inhibitorokat tesztelték, melyek a klinikai vizsgálatokig nem jutottak el. Ebből kifolyólag elsőként vizsgáltuk az olaparib hatását a Crohn-betegség állatmodelljében. Doktori munkám első felében a következő kérdésekre kerestem a választ:

1. Csökkenti-e az olaparib kezelés a TNBS által kiváltott tüneteket a Crohn-betegség egérmodelljében?
2. Milyen hatással van az olaparib a vastagbélben kialakuló fekélyes sebekre, valamint a bélnyálkahártya integritására?
3. Hogyan befolyásolja az olaparib a pro- és antiinflammatorikus citokinek termelését, továbbá a Crohn-betegség aktivitásának monitorozására alkalmas szérumbiomarkerek szintjét?

Munkánk során különös figyelmet fordítottunk a Crohn-betegség kialakulásában kulcsszerepet játszó epitelbarrierre, az intesztinális epitel sejtek energiatermelésére. *In vivo* bélnyálkahártya permeabilitási vizsgálatainkat további *in vitro* kísérletekkel egészítettük ki. Dolgozatom második részében az alábbi kérdésekre kerestem a választ:

4. Befolyásolja-e az olaparib közvetlenül az intesztinális barrier modellezésére használt Caco-2 egysejtréteg integritását? Csökkenti-e az oxidatív stressz által indukált barrierkárosodást?
5. Kifejt-e protektív hatást az olaparib a bélhámsejtek életképességére?
6. Hogyan befolyásolja oxidatív stressz során az olaparib a bélhámsejtek energiatermelését?

Dolgozatom fő célja tehát, hogy állatkísérletes és sejtkultúrási eredményekkel járuljak hozzá az olaparib PARP gátló szer humán terápiában történő felhasználásának kiszélesítéséhez.

3. Eredmények

3.1. Az olaparib hatásának vizsgálata TNBS által indukált colitis egérmódelben

3.1.1. Testsúlyváltozás

A TNBS-sel kiváltott colitis egyik fő tünete a hasmenés és a drasztikus fogyás. A TNBS kezelés hatására a kiindulási értékhez képest 12%-kal csökkent az állatok testsúlya, míg a 20 mg-os olaparib kezelés esetében 10%-os, az 50 mg-os olaparib hatására pedig csupán 5%-os csökkenést tapasztaltunk, tehát az olaparib dózisfüggően csökkentette a fogyást, azonban a különbség nem bizonyult szignifikánsnak.

3.1.2. Makroszkópos gyulladási paraméterek

A TNBS kezelés által okozott makroszkóposan értékelhető szövettani elváltozások pontozása során figyelembe vettük a fekélyes sebek kiterjedését, az adhéziók számát, a vastagbél rövidülést és bélfal vastagodást, valamint a széklet állagát és vértartalmát. A TNBS kezelés szignifikáns mértékű károsodást okozott a kontroll csoporthoz képest. Döntően a vastagbél középső szakaszán eredményezett több, nagy kiterjedésű fekélyes elváltozást, emellett a bélfal ödémás megvastagodása, valamint hiperémia volt megfigyelhető. Az olaparib dózisfüggően csökkentette a tünetek súlyosságát. A két alkalmazott dózis közül a magasabb, 50 mg-os kezelés esetében a különbség szignifikánsnak bizonyult. Ebben az esetben olyan jelentősen csökkent a károsodás mértéke, hogy a kontroll csoporthoz képest nem tapasztaltunk statisztikailag kimutatható különbséget a makroszkópos elváltozásokban.

A pontozás során figyelembe vett paraméterek közül kiemelendő a fekélyek számának és azok kiterjedésének változása. A magasabb dózisban alkalmazott olaparib hatására szignifikánsan csökkent az ulcerek száma és mérete is.

3.1.3. Bélnyálkahártya permeabilitás

A bélnyálkahártya barrier funkciójának károsodását az intracolónálisan beadott, majd vérkeringésbe jutott fluoreszcein izotiocianáttal jelölt dextrans (FITC-dextrans) koncentrációjának mérésével vizsgáltuk. A TNBS-sel kezelt egerek esetében a bélnyálkahártya nagyobb permeabilitást mutatott a kontroll csoporthoz képest. Az 50 mg-os olaparib kezelés jelentősen csökkentette a TNBS bélfal permeabilitást fokozó hatását, tehát a

bélnyálkahártya barrier funkcióját javította. A kontroll és az olaparibbal kezelt csoport között a FITC-dextrán koncentráció tekintetében nem tapasztaltunk különbséget.

3.1.4. Szöveti vizsgálat

A TNBS-el kezelt állatok vastagbelének főbb hisztológiai jellemzői közé tartozik az ulceráció, az immunsejtek intenzív infiltrációja, kiterjedt fibrózis, valamint a submucosa ödémás megvastagodása. Az általunk végzett szövettani vizsgálat alapján a TNBS kezelés hatására a vastagbél submucosa rétege valóban erőteljesen megvastagodott, melyet az 50 mg-os olaparib kezelés nagymértékben csökkentett.

3.1.5. Gyulladásos citokinek szintje

Az olaparib esetleges gyulladáscsökkentő hatásának megismerése céljából pro- és antiinflammatorikus hatású citokinek szintjét mértük vastagbélmintákból.

Az interleukin-1 β (IL-1 β) szintje a TNBS kezelést követően 62%-kal emelkedett a kontroll csoporthoz képest. Az olaparib kezelés esetében csupán 11%-os volt az emelkedés, a kontroll csoporthoz képest pedig nem tapasztaltunk szignifikáns változást. A TNBS kezelés hatására az IL-6 szintje 136%-kal növekedett a kontroll csoporthoz képest. Ezt a jelentős mértékű citokin termelést az olaparib kezelés hatékonyan, 111%-kal csökkentette. Ismert, hogy a bélszövet megnövekedett tumor nekrozis faktor alfa (TNF- α) szintje összefüggésben áll a gyulladásos bélbetegségek aktivitásával, súlyosságával. Ennek ellenére a TNBS kezelés hatására nem tapasztaltunk szignifikáns változást a TNF- α szintjében. Az általunk vizsgált gyulladáscsökkentő hatású IL-10 szintje a TNBS kezelt csoportban 12%-kal csökkent a kontroll csoporthoz viszonyítva, ezzel szemben az olaparib szignifikáns emelkedést eredményezett.

3.1.6. Hematológiai paraméterek

A vérkép analízis során vizsgált húsz érték közül az általunk alkalmazott TNBS kezeléssel kettő paraméter esetében okozott szignifikáns eltérést a kontroll csoporthoz képest. Lecsökkent a limfocita szám, míg az olaparib adása mellett ez a csökkenés szignifikánsan kisebb mértékűnek bizonyult. A monociták száma megemelkedett a TNBS hatására, amit az olaparib kezelés hatékonyan csökkentett.

A vérvizsgálat során kapott abszolút sejtszámok alapján négy, a gyulladásos

bélbetegségek diagnosztikájában és a betegségaktivitás monitorozásában alkalmazható szerológiai marker vizsgálatát végeztük: limfocita-monocita arány (LMR), neutrofil-monocita arány (NMR), trombocita-limfocita arány (PLR) és neutrofil-limfocita arány (NLR). A TNBS kezelés hatására az egyes markerek esetében a Crohn betegekre jellemző eltéréseket tapasztaltunk. A TNBS kezelés következtében a kontroll csoporthoz képest 6-szorosára emelkedett az NLR és 2-szeresére a PLR értéke, amit az olaparib kezelés mindkét esetben hatékonyan csökkentett. A PLR esetében az olaparib és kontroll csoport között nem tapasztaltunk különbséget. Az LMR értékét a TNBS kezelés a kontroll szint hatodára csökkentette, míg az olaparib kezelés képes volt enyhíteni ezt a csökkenést. A TNBS kezelés hatására bekövetkező NMR csökkenés nem bizonyult szignifikánsnak, azonban az olaparib javulást eredményezett az NMR értékében.

3.2. Az olaparib hatásának vizsgálata Caco-2 sejt kultúrán

3.2.1. PARP izoformák detektálása Caco-2 sejtekben

Mivel az olaparib a PARP-1 ($IC_{50} = 5 \text{ nM}$), PARP-2 ($IC_{50} = 1 \text{ nM}$) és PARP-3 ($IC_{50} = 4 \text{ nM}$) izoformák potens gátlószere, ezért első lépésként kezeletlen Caco-2 sejtekben vizsgáltuk mindhárom izoforma alap mRNS expresszióját valós idejű PCR-rel. A minták közötti esetleges mennyiségi eltérések kiküszöbölésére a β -aktin génexpresszióját is mértük, az eredményeket erre normalizáltuk. A Caco-2 sejtekben mindhárom PARP izoformát detektáltuk, azonban expressziójuk mértéke lényegesen eltérőnek mutatkozott. A PARP-1 mRNS mennyisége volt a legmagasabb a sejtekben, ezt követte a PARP-2, majd PARP-3 izoforma.

3.2.2. Az olaparib epítél barrier integritásra gyakorolt hatása

Miután az állatkísérleteink során az olaparib hatására látványosan javult a vastagbél makroszkópos megjelenése, illetve a bélnyálkahártya barrier funkcióját is megőrizte, így *in vitro* kísérleteink során először az olaparib intesztinális epítél barrierre kifejtett hatását vizsgáltuk. Ehhez a széles körben elfogadott és alkalmazott konfluens Caco-2 egysejtréteget használtuk. Az IBD patomechanizmusában fontos szerepet tulajdonítanak a fokozott bélpermeabilitásnak, melynek hátterében nagy részben az epítél sejtek oxidatív károsodása áll. A reaktív oxigén származékok, többek között a H_2O_2 DNS törést, ennél fogva PARP aktivációt eredményeznek.

Ebből kiindulva, kísérleteink során először különböző H_2O_2 koncentrációk (100, 200, 500 és 1000 μM) barrier károsító hatását vizsgáltuk az impedancia alapú xCelligence készülékkel. Az eszköz által mért Sejt Index érték jól korrelál az életképes, kitapadt sejtek számával. Az alacsonyabb koncentrációk, mint a 100, 200 és 500 μM nem eredményeztek látványos csökkenést a Sejt Index értékben a kezeletlen csoporthoz képest, tehát nem befolyásolták a sejtréteg integritását. Ugyanakkor az 1 mM H_2O_2 nagymértékben csökkentette a Sejt Indexet, vagyis alkalmasnak bizonyult a barrier integritásának károsítására, így további kísérleteinket ezzel a koncentrációval végeztük.

Következő lépésként megvizsgáltuk, hogy az olaparib képes-e mérsékelni a H_2O_2 károsító hatását. A 30 perces olaparib előkezelés mellett jóval kisebb mértékűnek bizonyult az 1 mM H_2O_2 hatására kialakuló Sejt Index csökkenés, azaz mérsékelte a barrier integritásának csökkenését.

Az epitél barrier gátfunkciójának vizsgálatára egy másik módszert is alkalmaztunk, ahol a sejtréteg permeabilitását mértük 4 kDa FITC-dextrán marker segítségével. A kontroll csoport esetében rendkívül alacsony permeabilitást mértünk a jelölőmolekulára nézve, amit az 1 mM H_2O_2 kezelés körülbelül 27-szeresére emelt. Az olaparib kezelés figyelemre méltóan, kontroll szintre csökkentette a sejtréteg permeabilitását, ami megerősítette az impedancia alapú méréseink során tapasztalt eredményt. A permeabilitási vizsgálat során a kontroll csoport és az olaparibbal előkezelt csoport között nem tapasztaltunk különbséget.

Eredményeink további megerősítésének céljából fénymikroszkópos felvételeket készítettünk a sejtrégekről 24 órás kezelést követően. Az 1 mM H_2O_2 hatására a sejtréteg morfológiája erőteljesen megváltozott. A sejtek között megszűnt a szoros kapcsolódás, a sejtek lekerekedtek, nagy részük felúszott. Ezzel szemben az olaparibbal előkezelt sejtréteg a kontroll tenyésztéssel megegyező képet mutatott, vagyis az olaparib megőrizte a sejtréteg barrier funkcióját.

3.2.3. Az olaparib sejtleletképessegre gyakorolt hatása

Annak megállapítására, hogy a barrier integritás és permeabilitás vizsgálatok során alkalmazott kezelés hatással van-e a monolayert alkotó Caco-2 sejtek életképességére, flow citometriás vizsgálatot végeztünk annexin V/7-aminoaktinomicin D (7-AAD) jelöléssel. E kettős jelölés lehetővé teszi az élő, a korai és késői apoptotikus/nekrotikus sejtek elkülönítését.

A 24 órás H_2O_2 kezelés 37%-kal csökkentette az élő sejtek arányát, míg a totál

apoptotikus sejtek mennyiségét 32%-kal növelte. Az apoptotikus sejtek arányát tekintve korai apoptotikus sejt populációt alig detektáltunk, a kezelés elsősorban a késői apoptotikus sejtek arányát növelte, illetve ebbe a populációba tartoznak a nekrozison átesett sejtek is, hiszen az annexin V/7-AAD festés nem teszi lehetővé a késői apoptotikus és nekrotikus sejtek elkülönítését. Az olaparib előkezeléssel kombinált H_2O_2 kezelés esetében csupán 11%-kal csökkent az élő sejtek mennyisége és a késői apoptotikus/nekrotikus sejtek aránya csak 6%-kal növekedett. Az olaparib önmagában alkalmazva egyik sejtpopulációra nézve sem okozott szignifikáns különbséget a kontroll csoporthoz képest.

Eredményeink alapján elmondható, hogy az általunk alkalmazott 1 mM-os H_2O_2 kezelés nagymértékű sejtpusztulást eredményezett, ami ellen az olaparib védő hatásának bizonyult.

3.2.4. Az olaparib metabolikus hatásai

3.2.4.1. Az olaparib glikolízisre gyakorolt hatása

Gyulladás során, a proinflammatorikus szignálok hatására a vastagbél hámsejtek metabolizmusa megváltozik. Az eddig főként butirátot oxidáló sejtek energianyerése a laktát termeléssel járó glikolízis irányába tolódik. Colitis ulcerosa-ban szenvedő betegek colonocytáinak vizsgálata során valóban megfigyelhető a butirát oxidációjának csökkenése, míg a sejtek glükózfelhasználása, valamint laktáttermelése fokozottá válik. Ebből fakadóan, az extracelluláris savasodás mérésén keresztül vizsgáltuk H_2O_2 -dal kezelt Caco-2 sejtekben az olaparib glikolízisre gyakorolt hatását.

A H_2O_2 drasztikusan csökkentette az alap savasodási rátát, míg az olaparib szignifikáns mértékű emelkedést eredményezett. A glikolítikus aktivitás vizsgálatát az oligomycin injektálás teszi lehetővé. A mitokondriális ATP szintézis gátlásával a sejtek metabolizmusa a laktát termeléssel járó anaerob glikolízis irányába tolódik, mely a sejten kívüli pH csökkenésében mutatkozik meg. Az oligomycin hatására mind a kontroll, mind a H_2O_2 + olaparib kezelt csoportokban erőteljesen megnőtt a savasodás sebessége, vagyis a sejtek képesek voltak a metabolikus átállásra. Az oligomycin hatására bekövetkező extracelluláris savasodási ráta növekedés mindkét csoport esetében szignifikánsnak bizonyult. Ezzel szemben a kizárólag H_2O_2 -dal kezelt sejtek esetében az oligomycin hatására a savasodás nem következett be, azaz a sejt nem tudta glikolízissel kompenzálni a mitokondriális energianyerés kiesését.

3.2.4.2. Az olaparib mitokondriális respirációra gyakorolt hatása

A colonocyták elsődleges energiaforrása a bakteriális fermentáció során termelt butírá, amely nélkülözhetetlen a barrier funkció fenntartásához. A butírából történő ATP termeléshez a mitokondriális légzési lánc és oxidatív foszforiláció intenzív működésére van szükség. Ismert, hogy a túlzott mértékű oxidatív stressz általi PARP-1 aktiváció csökkenti a mitokondriális membránpotenciált, a Komplex I működését, a mitokondriális oxidációt és ATP termelést, az IBD-ben szenvedő betegeknél pedig megfigyelték a mitokondriális ROS emelkedett szintjét, valamint az elektronszállító lánc sérült szabályozását. Ebből adódóan vizsgáltuk az olaparib általi PARP gátlás mitokondriális működésre gyakorolt hatását H_2O_2 -dal kezelt Caco-2 sejtekben, az oxigénfogyasztás mérésén keresztül.

A H_2O_2 kezelés 44%-ra csökkentette a sejtek bazális respirációját, amire az olaparib kezelés nem volt hatással. Az oligomycin általi F_0-F_1 -ATP-szintáz gátlást követően kalkulálható a sejtek ATP szintézisre fordított oxigénfogyasztása, mely a H_2O_2 kezelés hatására 61%-kal csökkent a kontroll csoporthoz képest. Az olaparib kezelés esetében ez a csökkenés 54%-os volt, azonban a különbség nem bizonyult szignifikánsnak. H_2O_2 hatására 13,5%-kal romlott a mitokondriumok kapcsoltsági hatékonysága, olaparib kezelés esetében ez a csökkenés alacsonyabb, csupán 2,5%-os volt. A kontroll és a H_2O_2 + olaparib kezelt csoport között nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget. A következő lépés során alkalmazott karbonil-cianid-p-trifluormetoxi-fenil-hidrazon (FCCP) hatására megszűnt a protonmotoros erő, a mitokondriális oxigénfogyasztás fokozódott, ezáltal mérhetővé vált a sejtek maximális oxigénfogyasztása. H_2O_2 kezelés hatására ez az érték 73,5%-kal csökkent a kontroll csoporthoz képest, míg olaparib jelenlétében ez a csökkenés jelentősen kisebb mértékű volt (52%). A mérés utolsó lépéseként rotenon és antimycin A keverékével gátoltuk a légzési láncot, ami a sejtek oxigénfogyasztását a minimálisra csökkentette. Ezzel a lépéssel nyílik lehetőség a sejtek tartalék respirációs kapacitásának vizsgálatára. A H_2O_2 kezelés esetében rendkívül alacsony, 7%-os volt a sejtek tartalék légzési kapacitása, míg az olaparib kezelés mellett ez az érték jóval magasabb, 49,5%-os volt. Ha az oligomycin általi F_0-F_1 -ATP-szintáz gátlás után mért oxigénfogyasztásból levonjuk a rotenon és antimycin A hozzáadását követően mérhető nem mitokondriális oxigénfogyasztást, megkapjuk a protonszivárgás értékét. Kísérleteink során a H_2O_2 kezelés hatására a kontrollhoz képest kisebb mértékű protonszivárgást tapasztaltunk, amit az olaparib kezelés tovább csökkentett.

4. Összefoglalás

Munkám során a klinikumban elsőként alkalmazott, új generációs PARP inhibitornak, az olaparibnak a hatását vizsgáltam TNBS-indukálta colitis modellben, továbbá a gyulladásos bélbetegségek kialakulásában kulcsszerepet játszó epitél barrier integritásra, valamint a vastagbélhámsejtek metabolizmusára gyakorolt hatását *in vitro* körülmények között.

A kutatás első részében végzett állatkísérletek során sikerült bizonyítanunk az olaparib általi PARP gátlás védő hatását TNBS-indukálta kísérletes colitisben. Az olaparib hatékonyan csökkentette a vastagbél makroszkópos elváltozásait, az ulcerek számát és kiterjedését, a submucosa megvastagodását, valamint a vastagbél permeabilitását. Hatására lecsökkent a bélszöveti IL-6 és IL-1 β proinflammatorikus citokinek szintje, megemelkedett az antiinflammatorikus IL-10 szint. Továbbá pozitív irányba befolyásolta a Crohn-betegekre is jellemző eltérő NLR, PLR és LMR szérumbiomarkerek szintjét.

A bélpermeabilitás vizsgálata során tapasztalt protektív hatást követően az olaparib esetleges célpontjának tekinthető intesztinális barrierre fókuszálva végeztünk *in vitro* vizsgálatokat Caco-2 egysejtrétegen. Megállapítottuk, hogy az olaparib oxidatív stressz során fenntartja az intesztinális epitél sejtek glikolitikus energiatermelését, ami a gyulladás során bekövetkező metabolikus polarizáció során a sejtek legfőbb ATP forrása. Az olaparib védelmet nyújt a H₂O₂ által indukált sejthalál ellen és megőrzi a barrier integritását. Mindezek alapján feltételezzük, hogy az olaparib a bélhámsejtek védelmében, a nyálkahártya barrier funkciójának fenntartásán keresztül volt képes csökkenteni a kísérletes colitis súlyos tüneteit.

Ezen eredményekkel kívánunk rávilágítani az olaparib általi PARP gátlás adta lehetőségekre a Crohn-betegség gyógyításában és hozzájárulni az olaparib humán terápiában történő felhasználásának felülvizsgálatához.

5. Publikációk listája

Az értekezés alapjául szolgáló publikáció

Kovács, D., Vántus, V. B., Vámos, E., Kálmán, N., Schicho, R., Gallyas, F., & Radnai, B. (2021). Olaparib: A clinically applied PARP inhibitor protects from experimental Crohn's disease and maintains barrier integrity by improving bioenergetics through rescuing glycolysis in colonic epithelial cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021.

IF: 7,310

További publikációk

Garai, J., Radnai, B., Vámos, E., Kovács, D., Vántus, V. B., Rumbus, Z., Pákai, E., Garami, A., Gulyás-Fekete, G., & Agócs, A. (2023). Synthesis and evaluation of a new class of MIF-inhibitors in activated macrophage cells and in experimental septic shock in mice. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 247, 115050. **IF: 7,088**

Andreidesz, K., Koszegi, B., Kovacs, D., Bagone Vantus, V., Gallyas, F., & Kovacs, K. (2021). Effect of Oxaliplatin, Olaparib and LY294002 in Combination on Triple-Negative Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 2056. **IF: 6,208**

Andreidesz, K., Szabo, A., Kovacs, D., Koszegi, B., Bagone Vantus, V., Vámos, E., Isbera, M., Kalai, T., Bogнар, Z., & Kovacs, K. (2021). Cytostatic Effect of a Novel Mitochondria-Targeted Pyrroline Nitroxide in Human Breast Cancer Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 9016. **IF: 6,208**

Horvath, O., Ordog, K., Bruszt, K., Kalman, N., Kovacs, D., Radnai, B., Gallyas, F., Toth, K., Halmosi, R., & Deres, L. (2021). Modulation of Mitochondrial Quality Control Processes by BGP-15 in Oxidative Stress Scenarios: From Cell Culture to Heart Failure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. **IF: 7,310**

Garai, J., Krekó, M., Órfi, L., Jakus, P. B., Rumbus, Z., Kéring, P., Garami, A., Vámos, E., Kovács, D., & Bagóné Vántus, V. (2021). Tetralone derivatives are MIF tautomerase inhibitors and attenuate macrophage activation and amplify the hypothermic response in endotoxemic mice. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 36(1), 1356–1368. **IF: 5,756**

Ordog, K., Horvath, O., Eros, K., Bruszt, K., Toth, S., Kovacs, D., Kalman, N., Radnai, B., Deres, L., & Gallyas Jr, F. (2021). Mitochondrial protective effects of PARP-inhibition in hypertension-induced myocardial remodeling and in stressed cardiomyocytes. *Life Sciences*, 268, 118936. **IF: 6,780**

Ramadan, F. H., Szabo, A., Kovacs, D., Takatsy, A., Bognar, R., Gallyas Jr, F., & Bognar, Z. (2020). Involvement of Mitochondrial Mechanisms in the Cytostatic Effect of Desethylamidarone in B16F10 Melanoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7346. **IF: 5,924**

Szabo, A., Sumegi, K., Fekete, K., Hocsak, E., Debreceni, B., Setalo Jr, G., Kovacs, K., Deres, L., Kengyel, A., Kovacs, D., Mandl, J., Nyitrai, M., Febbraio, M.A., Gallyas, F., Sumegi, B. (2018). Activation of mitochondrial fusion provides a new treatment for mitochondria-related diseases. *Biochemical Pharmacology*, 150, 86–96. **IF: 4,825**

Összesített Impakt Faktor: 57,409

Elsőszerzős konferencia posztterek

Kovács, D., Bagóné Vántus, V., Sümegi, B., Gallyas, F., Radnai, B. Effect of clinically used PARP inhibitor olaparib on oxidative stress-induced epithelial barrier dysfunction *in vitro*. International Student Congress (ISC) of the Medical University of Graz, Graz, 2019.

Kovács, D., Bagóné Vántus, V., Sümegi, B., Gallyas, F., Radnai, B. Clinically used PARP inhibitor olaparib protects against oxidative stress-induced epithelial barrier dysfunction *in vitro*. Hungarian Molecular Life Sciences, Eger, 2019.

Kovács, D., Bagóné Vántus, V., Sümegi, B., Gallyas, F., Radnai, B. A PARP inhibitor olaparib védő hatása kísérletes Crohn modellben és mesterséges epitheliális határrétegen: célpont a mitokondrium. 49. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2019.

Kovács, D., Vámos, E., Sümegi, B., Gallyas, F., Radnai, B. The Effect of PARP Inhibitor Olaparib on Oxidative Stress-induced Epithelial Barrier Disruption and Mitochondrial Dysfunction. Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Science, Pécs, 2018.

Kovács, D., Vámos, E., Sümegi, B., Gallyas, F., Radnai, B. PARP Inhibitor Olaparib Protects Against Oxidative Stress-Induced Epithelial Barrier Dysfunction and Inhibits

Proinflammatory Macrophage Activation. 7th Interdisciplinary Doctoral Conference, Pécs, 2018.

Kovács, D., Vámos, E., Sümegi, B., Gallyas, F., Radnai, B. Az olaparib (PARP inhibitor) véd az oxidatív stressz indukálta epithel barrier diszfunkció ellen és gátolja a gyulladásoos makrofág aktivációt. 48. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2018.

Kovács, D., Vámos, E., Götzer, M., Balogh, P., Radnai, B. A mitokondriális ciklofilin D szerepe kísérletes ulceratív kólitiszben. Doktoranduszok a Klinikai Kutatásban Konferencia, Pécs, 2018.

Társszerzős konferencia poszterek

Bagóné Vántus, V., Kovács, D., Vámos, E., Deák, P., Vass, I., Gallyas, F., Radnai, B. A PARP inhibitor talazoparib hatásának vizsgálata TNBS indukálta kísérletes Crohn betegség modellben és mesterséges epitheliális barrieren. 51. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2023.

Vámos, E., Bagóné Vántus, V., Kovács, D., Deák, P., Kőszegi, B., Kálmán, N., Vass, I., Gallyas, F., Radnai, B. A MIF tautomeráz inhibitor KRP 6 gátolja a gyulladásoos makrofág aktivációt és védi a mitokondriális energiatermelést. 51. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2023.

Bagóné Vántus, V., Kovács, D., Vámos, E., Deák, P., Vass, I., Gallyas, F., Radnai, B. Investigation the effects of the PARP inhibitor Talazoparib in a TNBS induced Inflammatory Bowel Disease Mice Model. Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, Pécs, 2022.

Vámos, E., Bagóné Vántus, V., Kovács, D., Deák, P., Kőszegi, B., Kálmán, N., Vass, I., Gallyas, F., Radnai, B. Effect of KRP 6, a novel MIF tautomerase inhibitor on macrophage activation and mitochondrial function. Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, Pécs, 2022.

6. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Gallyas Ferenc Professzor Úrnak, hogy az intézetünk vezetőjeként lehetővé tette számomra a doktori képzésben való részvételt és biztosította a kutatáshoz szükséges feltételeket. Dr. Radnai Balázs témavezetőmnek köszönöm, hogy az IBD team tagjaként elsajátíthattam az állatkísérletes és sejtkultúrás módszereket, köszönöm a szakmai irányítását, valamint a publikációk és disszertáció elkészítésében nyújtott segítségét. Hálás köszönettel tartozom Bagóné Dr. Vántus Violának az állatkísérletekben való segítségéért és aktív részvételéért, a szakmai meglátásaiért és barátságáért. Köszönet illeti a Laboratóriumi Medicina Intézet munkatársait a vérkép vizsgálat elvégzéséért. Köszönöm Dr. Kálmán Nikolettának a génexpressziós vizsgálatok során végzett munkáját, valamint köszönetet szeretnék mondani minden munkatársamnak, aki bármilyen módon segítette a munkámat.

Itt is szeretném szüleimnek megköszönni a támogatásukat, segítségüket, s azt, hogy bármiben számíthatok rájuk. Végül pedig a férjemnek és kisfiamnak köszönök mindent, különösen a motiválást.