

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

PhD értekezés

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

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
1. Bevezetés	6
1.1. A gyulladáshoz vezető tényezők általános jellemzése	6
1.2. Az intesztinális epitél barrier	7
1.3. A mitokondrium szerepe a gyulladáshoz vezető tényezők kialakulásában	9
1.4. A vastagbélhámsejtek metabolizmusa gyulladás során	11
1.5. A Crohn-betegség modellezése	14
1.6. Poli(ADP-ribóz)-polimeráz-1 enzim tulajdonságai	14
1.7. PARP-1 enzim aktivációja és akut metabolikus hatása	16
1.8. PARP-1 enzim szerepe a gyulladás folyamatában	18
1.9. PARP, mint terápiás célpont	19
1.10. Új generációs PARP gátlószer: olaparib	22
1.11. A PARP gátlás kísérletes colitisre gyakorolt hatása	22
2. Célkitűzések	24
3. Anyagok és módszerek	25
3.1. Kísérleti állatok	25
3.2. TNBS-indukált colitis modell	25
3.3. Bélnyálkahártya makroszkópos vizsgálata	26
3.4. Szöveti vizsgálat	27
3.5. Szöveti citokin szintek meghatározása	27
3.6. Hematológiai vizsgálat	27
3.7. Bélnyálkahártya permeabilitásának vizsgálata	28
3.8. Caco-2 sejtvonal	28
3.9. RNS kivonás és qPCR	28
3.10. Impedancia-alapú barrier integritás vizsgálat	29
3.11. FITC-dextrán permeabilitási vizsgálat	30
3.12. Sejtéletképesség vizsgálat flow citométerrel	30
3.13. Mitokondriális funkció vizsgálata az oxigén fogyasztás és pH-változás alapján	30
3.14. Fénymikroszkópos vizsgálat	32
3.15. Statisztikai analízis	32
4. Eredmények	33
4.1. Az olaparib hatásának vizsgálata TNBS által indukált colitis egérmódelben	33
4.1.1. Testsúlyváltozás	33

4.1.2.	Makroszkópos gyulladási paraméterek	33
4.1.3.	Bélnyálkahártya permeabilitás	35
4.1.4.	Szöveti vizsgálat	36
4.1.5.	Gyulladási citokinek szintje	37
4.1.6.	Hematológiai paraméterek	38
4.2.	Az olaparib hatásának vizsgálata Caco-2 sejtkultúrán	41
4.2.1.	PARP izoformák detektálása Caco-2 sejtekben	41
4.2.2.	Az olaparib epitel barrier integritásra gyakorolt hatása	42
4.2.3.	Az olaparib sejtleletképessegre gyakorolt hatása	46
4.2.4.	Az olaparib metabolikus hatásai	49
4.2.4.1.	Az olaparib glikolízisre gyakorolt hatása	49
4.2.4.2.	Az olaparib mitokondriális respirációra gyakorolt hatása	50
5.	Eredmények megvitatása	53
5.1.	<i>In vivo</i> eredmények	53
5.2.	<i>In vitro</i> eredmények	57
6.	Összefoglalás	63
7.	Irodalomjegyzék	64
8.	Publikációk listája	86
9.	Köszönetnyilvánítás	89

Rövidítések jegyzéke

1,5-DIQ	1,5-dihidroxiizokinolin
3-AB	3-aminobenzamid
5-AIQ	5-aminoizokinolin
7-AAD	7-aminoaktinomicin D
Acetil-CoA	acetil-koenzim-A
AIF	apoptózist-indukáló faktor
ARH3	ADP-ribozil hidroláz 3
BER	bázis excíziós repair
BRCA1	breast cancer type 1 susceptibility protein
BRCA2	breast cancer type 2 susceptibility protein
CD	Crohn-betegség (Crohn's disease)
CI	Sejt Index
DPQ	3,4-dihidro-5-(4-(1-piperidinil)butoxi)-1(2H)-izoklinolin
DSS	dextrán-nátrium-szulfát
ECAR	extracelluláris savasodási ráta
ERK2	extracelluláris szignál által regulált kináz 2
FADH₂	redukált flavin-adenin-dinukleotid
FCCP	karbonil-cianid-p-trifluormetoxi-fenil-hidrazon
FITC	fluoreszcein izotiocianát
GAPDH	gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GSH	redukált glutation
H₂O₂	hidrogén-peroxid
HKI	hexokináz I
HR	homológ rekombináció
IBD	gyulladásos bélbetegségek (inflammatory bowel diseases)

IFN-γ	interferon gamma
IgA	immunglobulin A
IL	interleukin
JNK	c-Jun N-terminális kináz
LMR	limfocita-monocita arány
LPS	lipopoliszacharid
MIP	makrofág gyulladásoos protein
MNNG	N-metil-N-nitro-N-nitrozoguanidin
MUC2	mucin 2
NAD⁺	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADH	redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADPH	redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NF-κB	nukleáris faktor-kappa B
NLR	neutrofil-limfocita arány
NMR	neutrofil-monocita arány
OCR	oxigénfogyasztási ráta
PAR	poli-ADP-ribóz
PARG	poli(ADP-ribóz)-glikohidroláz
PARiláció	poli-ADP-riboziláció
PARP-1	poli(ADP-ribóz)-polimeráz-1
PBMC	perifériás vér mononukleáris sejt
PKC	protein-kináz C
PLR	trombocita-limfocita arány
ROS	reaktív oxigén származék
Th	T helper sejt
TNBS	2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav
TNF-α	tumor nekrozis faktor alfa

Treg	regulatórikus T sejt
UC	colitis ulcerosa (ulcerative colitis)
VDAC	feszültségfüggő anioncsatorna

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 (Guan, 2019). A gyulladásoos bélbetegségek komplex, multifaktoriális kórképek (Loddo & Romano, 2015). 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 (Ramos & Papadakis, 2019). Mindkét kórképet relapszusok és remissziók jellemzik (Gajendran és mtsai., 2018, 2019).

A két betegség elkülönítése, a pontos diagnózis felállítása, illetve a betegség aktivitásának megállapítása a klinikai kép, az endoszkópos, hisztológiai és radiológiai vizsgálatok együttes értékelése alapján történik. A colitis ulcerosa a rectumot és a vastagbelet érinti, a gyulladás diffúz, tehát egybefüggő szakaszokon jelentkezik és a mucosára, esetleg a submucosára korlátozódik. Ezzel szemben a Crohn-betegség a gasztrointesztinális rendszer bármely szakaszán kialakulhat, a betegek 25%-ánál a vastagbél érintett (colitis), 25%-uknál a vékonybélben (terminális ileum) jelenik meg (ileitis), míg 50%-uknál a vékony- és vastagbél egyaránt érintett (ileocolitis). Megközelítőleg a betegek egyharmadánál fennáll a perianális érintettség, 5-15%-uknál pedig a szájüreg és a gyomor is érintett. Crohn-betegség esetében a gyulladás szegmentális kiterjedésű, azaz a bél több, egymástól elkülönült szakaszát érinti, így ép és gyulladt területeket váltják egymást, továbbá transzmurális jellegű, vagyis a bél összes rétege érintett lehet (Gajendran és mtsai., 2018; Villanacci és mtsai., 2020). Az IBD-ben szenvedők két leggyakoribb tünete a hasmenés és a fáradtság (Singh és mtsai., 2011), azonban Perler és munkatársai az egyes kórképek specifikus tüneteinek tanulmányozása során azt találták, hogy a colitis ulcerosa leggyakoribb tünete a véres, illetve vizes hasmenés, a Crohn-betegség esetében pedig a fáradtság és hasi fájdalom (Perler és mtsai., 2019).

Mindkét betegség során számolni kell intesztinális és extraintesztinális szövödményekkel. A bélrendszeri szövödmények specifikusak a két betegségre nézve, ami eltérő etiológiát és patogenetikai hátteret feltételez. Crohn-betegek körében a transzmurális gyulladás intra-abdominális tályogok, fisztulák kialakulásához vezethet, a colitis ulcerosa esetében súlyos colorectális vérzés, perforáció, toxikus megacolon alakulhat ki. Az extraintesztinális manifesztációk többsége nem specifikus az adott kórképre és szinte

bármelyik szervrendszert érinthetik (de Groof és mtsai., 2014; Gajendran és mtsai., 2019; Gasche, 2000).

Mivel a gyulladáshoz vezető okokat nem ismerjük, 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 (Neurath & Travis, 2012). A jelenleg alkalmazott legfontosabb gyógyszercsoportok az aminoszalicilátok, szteroidok, immunszuppresszánsok, monoklonális antitestek (biológiai terápia). A kezelés során a terápia aktuális célja is változik, ebből fakadóan eltérő terápiás lehetőségek állnak rendelkezésre: frissen diagnosztizált, aktív fázisban lévő betegeknél indukciós terápia szükséges, míg a remisszió elérését követően fenntartó terápiát alkalmaznak (Gajendran és mtsai., 2018). A kezelés megválasztását colitis ulcerosa esetében elsősorban a gyulladás lokalizációja és kiterjedése befolyásolja, ez alapján választható helyi vagy szisztémás kezelés. Emellett természetesen figyelembe veszik a betegség súlyosságát, a relapszusok gyakoriságát, a beteg életkorát és nemét, az extraintesztinális manifesztációkat (Gajendran és mtsai., 2019). A Crohn-betegség kezelési stratégiáját legfőképpen az befolyásolja, hogy a gyomor-bélrendszer mely szakasza érintett, továbbá a betegség súlyossága, az extraintesztinális szövődmények és a betegek egyéni jellemzői. A kezelési protokoll tekintetében két út áll rendelkezésre: a hagyományosnak tekinthető „step up” stratégia, amikor a konvencionális hatóanyagokat lépcsőzetesen alkalmazzák, illetve a „top-down” stratégia, ami súlyos aktivitás esetében egy kezdeti, agresszív terápiát (biológiai terápia, immunszuppresszánsok), majd annak fokozatos leépítését jelenti (Tsui & Huynh, 2018). 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, gyulladáshoz vezető bizonyos pontját célozza. Bár a terápia legfőbb célja a nyálkahártya gyógyulása lenne, nincs olyan engedélyezett hatóanyag, amely direkt módon az epitél barrierre célozna (Odenwald & Turner, 2017).

1.2. Az intesztinális epitél barrier

A gyulladáshoz vezető okokat nem ismerjük, 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 (Neurath & Travis, 2012). A jelenleg alkalmazott legfontosabb gyógyszercsoportok az aminoszalicilátok, szteroidok, immunszuppresszánsok, monoklonális antitestek (biológiai terápia). A kezelés során a terápia aktuális célja is változik, ebből fakadóan eltérő terápiás lehetőségek állnak rendelkezésre: frissen diagnosztizált, aktív fázisban lévő betegeknél indukciós terápia szükséges, míg a remisszió elérését követően fenntartó terápiát alkalmaznak (Gajendran és mtsai., 2018). A kezelés megválasztását colitis ulcerosa esetében elsősorban a gyulladás lokalizációja és kiterjedése befolyásolja, ez alapján választható helyi vagy szisztémás kezelés. Emellett természetesen figyelembe veszik a betegség súlyosságát, a relapszusok gyakoriságát, a beteg életkorát és nemét, az extraintesztinális manifesztációkat (Gajendran és mtsai., 2019). A Crohn-betegség kezelési stratégiáját legfőképpen az befolyásolja, hogy a gyomor-bélrendszer mely szakasza érintett, továbbá a betegség súlyossága, az extraintesztinális szövődmények és a betegek egyéni jellemzői. A kezelési protokoll tekintetében két út áll rendelkezésre: a hagyományosnak tekinthető „step up” stratégia, amikor a konvencionális hatóanyagokat lépcsőzetesen alkalmazzák, illetve a „top-down” stratégia, ami súlyos aktivitás esetében egy kezdeti, agresszív terápiát (biológiai terápia, immunszuppresszánsok), majd annak fokozatos leépítését jelenti (Tsui & Huynh, 2018). 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, gyulladáshoz vezető bizonyos pontját célozza. Bár a terápia legfőbb célja a nyálkahártya gyógyulása lenne, nincs olyan engedélyezett hatóanyag, amely direkt módon az epitél barrierre célozna (Odenwald & Turner, 2017).

Az epitél barrier legfelső rétege a kehelysejtek által termelt mucus réteg, ami elsősorban fizikai és kémiai védelmet nyújt a patogénekkal szemben. Összetételét tekintve, legnagyobb mennyiségben a MUC2 gén által kódolt glikozilált mucin fehérjét tartalmazza, további konstitutív eleme a B-limfociták által termelt szekretoros immunglobulin A (IgA), trefoil peptidek, a Paneth sejtek és enterocyták által termelt antimikrobiális peptidek (defenzinek, katelicidinek) és proteáz gátlók, illetve foszfolipidek (McGuckin és mtsai., 2009). A colitis ulcerosát elvékonyodott mucus réteg, alacsonyabb kehelysejt szám és csökkent MUC2 expresszió jellemzi (Tytgat és mtsai., 1996). Bár Crohn-betegeknél pont a kehelysejtek hipertrófiája jelentkezik, ami fokozott nyáktermeléssel jár, azonban megfigyelhető a Paneth sejtek és enterocyták csökkent defenzin termelése (Wehkamp és mtsai., 2005). Ezek az elváltozások mind hozzájárulnak a barrier funkció gyengüléséhez.

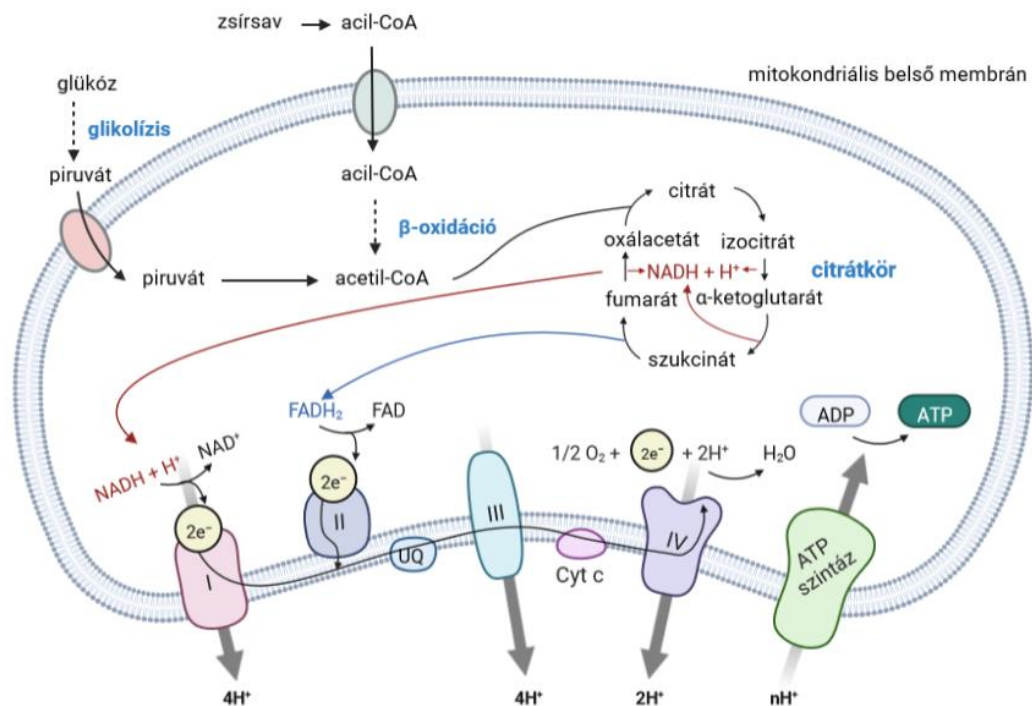
A barrier központi elemének tekinthető egyrétegű intesztinális epitél sejtréteget öt sejttípus alkotja: enterocyták, kehelysejtek, Paneth sejtek, enteroendokrin sejtek, továbbá a Peyer-plakkok felett elhelyezkedő M-sejtek. Funkciójuk sokrétű: megakadályozzák a lumenális antigének, mikroorganizmusok, toxinok bélnyálkahártyán történő átjutását, azonban transzcelluláris és paracelluláris transzport mechanizmusok segítségével biztosítják a tápanyag-, elektrolit- és víz felszívást (Groschwitz & Hogan, 2009). Az intesztinális epitél sejtek a mintázatfelismerő receptorok széles skáláját expresszálják, NOD-like receptorokat, Toll-like receptorokat, így a passzív védelmi funkción túl képesek detektálni a baktériumokat patogén-asszociált molekuláris mintázatuk alapján, ami a veleszületett és adaptív immunrendszer aktiválódásához vezet (Shao és mtsai., 2005). IBD betegek bélhámjában megfigyelhető a fokozott mértékű sejthalál (Nunes és mtsai., 2014). Az ennek következtében kialakuló barrier károsodás és az antimikrobiális funkciók csökkenése együtt diszbiózishoz, a baktériumok mélyebb szöveti rétegekbe történő transzlokációjához, gyulladáshoz és a nyálkahártya további károsodásához vezet (Blander, 2018).

Az epitél sejtréteg alatt húzódó lamina propria elszórt sejtekből, makrofágokból, dendritikus sejtekből, T- és B-sejtekből álló diffúz nyirokszövetet tartalmaz. Az adaptív immunrendszert tekintve a gyulladással járó bélbetegségek erősen T-sejt mediálta kórképek, mindkettő esetében eltérő T-sejt populációk kóros aktiválódása figyelhető meg. Colitis ulcerosában a T helper (Th) 2 típusú interleukin (IL)-4, IL-5 és IL-13 citokineket termelő T-sejtek irányába történik a polarizáció, míg Crohn-betegségben a tumor nekrozis faktor alfa (TNF- α), interferon gamma (IFN- γ) és IL-6 termelő Th1 fenotípusú sejtek dominálnak, továbbá a proinflammatorikus Th17 sejtek is nagy szerepet játszanak a betegség patogenezisében. Emellett Crohn-betegekben megfigyelhető az antiinflammatorikus IL-10

termelő regulatórikus T sejtek (Treg) számának csökkenése is, ami a citokin egyensúlyt szintén a gyulladás irányába tolja (S. Brand, 2009; Yamada és mtsai., 2016).

1.3. A mitokondrium szerepe a gyulladásos bélbetegségek kialakulásában

A kettős membránrendszerrel körülhatárolt, saját cirkuláris DNS-el rendelkező mitokondriumok a sejtek legfontosabb energiatermelő organelumai. Itt zajlik a glikolízis során képződő, majd mitokondriumba transzportált piruvát acetil-koenzim-A-vá (acetil-CoA) történő oxidációja. A zsírsavak aktiválódásukat követően a mitokondriumba jutnak, ahol a β -oxidáció enzimeit által szintén acetil-CoA-vá, majd a citrátkörben szén-dioxiddá oxidálódnak. Az oxidációs lépések során képződő NADH és FADH₂ a mitokondriális légzési láncban oxidálódnak és szolgáltat elektronokat az oxidatív foszforiláción keresztüli ATP termeléshez (Osellame és mtsai., 2012). A NADH által szállított elektronok a Komplex I-en (NADH-dehidrogenáz), a citrátköri FADH₂-ről származók a Komplex II-n (szukcinát-dehidrogenáz) keresztül jutnak be az elektrontranszfer-láncba. Ezután az elektronok az ubikinonról a Komplex III-ra (citokróm-c-oxidoreduktáz), majd citokróm-c-re, végül a Komplex IV-re (citokróm-oxidáz) vándorolnak, ahol megtörténik az oxigénmolekula vízzé redukálása. A mitokondrium mátrixából az intermembrán térbe történő, elektrontranszferhez kapcsolt protonkiáramlás következtében protonmotoros erő generálódik. A protonok az F₀-F₁-ATP-szintázon keresztül áramolnak vissza a mátrixba. Ezzel az exergonikus folyamattal kapcsoltan zajlik az oxidatív foszforiláció, vagyis az ADP foszforilációja ATP-vé (Mukherjee & Ghosh, 2020; Nolfi-Donagan és mtsai., 2020) (**1. ábra**).



1. ábra: A mitokondrium mátrixában zajló lebontó folyamatok vázlatos összefoglalója

Rövidítések: I: Komplex I, II: Komplex II, UQ: ubikinon, III: Komplex III, Cyt c: citokróm c, IV: Komplex IV (Forrás: Ádám, 2002. alapján saját szerkesztés).

Az intesztinális epitél sejtek kiemelkedő energiaigénye miatt a mitokondrium energiatermelését érintő zavarok erőteljesen befolyásolják a sejtek életképességét, veszélyeztetik az intesztinális barrier épségét (Özsoy és mtsai., 2022). 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 (Roediger, 1980). Mára Roediger feltételezését számos további kutatás igazolta. Schneider és munkatársai kimutatták IBD betegek vastagbél mintáiban, hogy a légzési lánc összes komplexének csökkent az expressziója. A mért elváltozás colitis ulcerosa esetében erőteljesebbnek bizonyult és kifejezettebb volt a felnőtt korú betegek körében (Schneider és mtsai., 2022). Colitis ulcerosában szenvedő betegek vastagbél mintáiban a Komplex II, III és IV enzimaktivitása is kisebb mértékű (Sifroni és mtsai., 2010), továbbá a bélnyálkahártyát szignifikánsan alacsonyabb ATP szint jellemzi (Kameyama és mtsai., 1984). 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 eseménye (Hsieh és

mtsai., 2006). Ezt támasztja alá a dextrán-nátrium-szulfáttal (DSS) kiváltott kísérletes colitis modellben tapasztalt jelenség is, miszerint már a kezelés kezdeti szakaszán erőteljesen lecsökken a Komplex II és IV aktivitása (Santhanam és mtsai., 2012). Szintén DSS által indukált colitis modellben mutatták ki, hogy a kezelés korai eseményei közé tartozik az epitél sejtek mitokondriumainak duzzadása és a csökkent mitokondriális ATP termelés (Xue és mtsai., 2017), hasonlóan a colitis ulcerosában leírtakhoz.

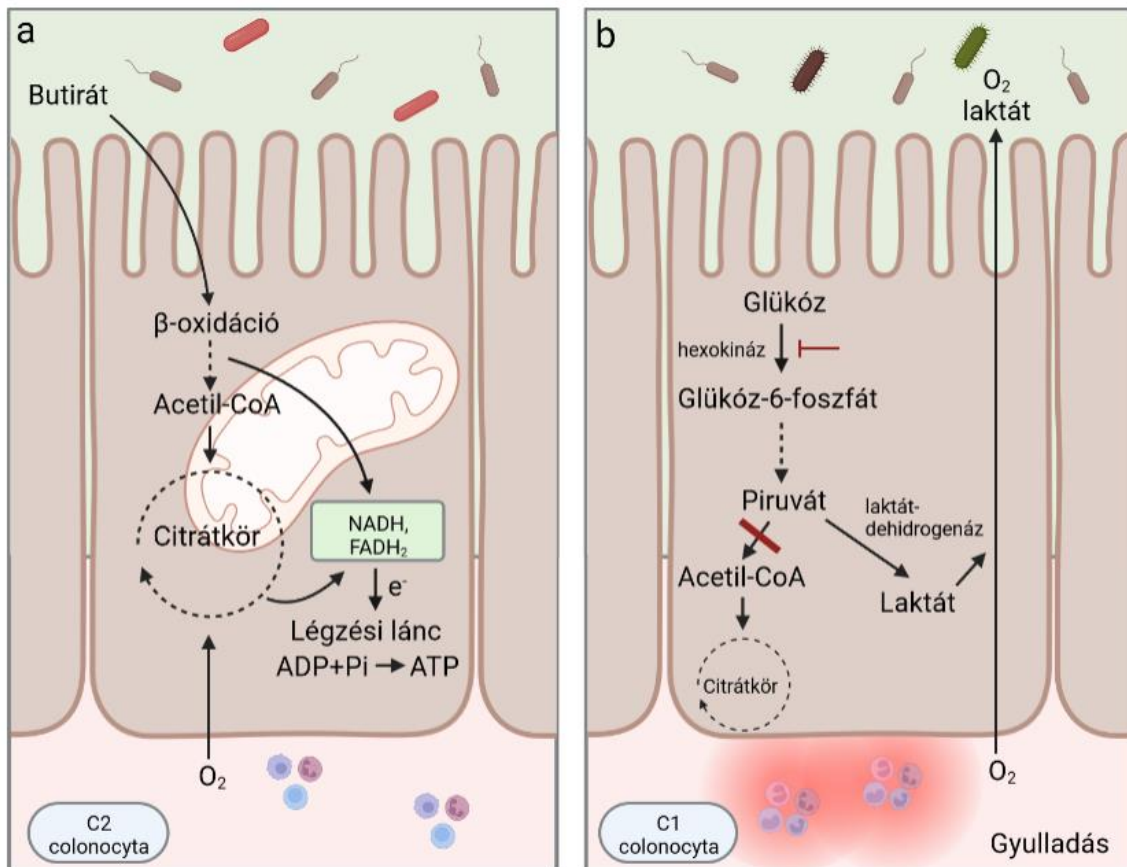
Az energiatermelésen túl a mitokondriumok a reaktív oxigén származékok (ROS) fő forrásai is. Abban az esetben, ha a légzési láncban az elektronok vándorlása zavart, azaz valamelyik komplexről rögtön egy oxigén molekulára kerülnek, részlegesen redukált oxigén származékok válnak szabaddá. Hozzávetőlegesen 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 membránpermeabilis oxigénszármazék és károsítja a fehérjéket, lipideket, valamint a DNS-t (Ho & Theiss, 2022). 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 (Santhanam és mtsai., 2007). 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 lumenális baktériumok lamina propria-ba történő transzlokációjához, a bélszövet neutrofil infiltrációjához vezet (Pravda, 2019). Több humán esettanulmány is bizonyítja, hogy a diagnosztikai vagy terápiás célból történő, H_2O_2 -dal végzett beöntés akut colitis kialakulásához vezet (Almalouf és mtsai., 2008; Meyer és mtsai., 1981). Továbbá glutation-peroxidáz knock-out egereknél, amelyek az enzim hiányában képtelenek a H_2O_2 semlegesítésére, már a korai életszakaszban spontán colitis alakult ki (Esworthy és mtsai., 2001).

1.4. 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 acetil-CoA-ig bomlik, aminek további oxidációja a citrátkörben zajlik, majd a terminális oxidációhoz kapcsolt oxidatív foszforiláción keresztül történik meg az ATP termelődés

(Bultman, 2016) **(1. ábra)**. 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 homeosztatisztikus állapotot C2 fenotípusnak nevezzük. Proinflammatorikus szignálok hatására azonban megtörténik a sejtek C1 irányú polarizálódása, vagyis energiatermelésük az oxidatív foszforiláció felől az aerob glikolízis irányába tolódik (Litvak és mtsai., 2018) **(2. ábra)**. Az „aerob glikolízis” kifejezést elsősorban a daganatsejtek metabolikus változásával hozzák összefüggésbe. Otto Warburg ismerte fel, hogy daganatsejtekben normoxiás állapotban fokozott mértékű a glükózfelhasználás és a tejsavsintézis, amit Warburg-effektusnak is nevezünk (Jones & Bianchi, 2015; Vander Heiden és mtsai., 2009). Az aerob glikolízis 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 (Jones & Bianchi, 2015). Ez a lépés biztosítja a glikolitikus gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) enzim számára a NAD⁺-t és így válik fenntarthatóvá a glükózból történő energianyerés a mitokondriális légzési lánc működése nélkül is. Az energiatermelést tekintve a teljes oxidációval nyerhető maximális 30-32 ATP helyett így mindössze 2 ATP termelődik egy glükóz molekula lebontásából a szubsztrátszintű foszforiláción keresztül (Melkonian & Schury, 2019). 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 (Litvak és mtsai., 2018). Az IBD patogenezisében szerepet játszó ROS elsődleges forrása maga a mitokondriális légzési lánc (Bourgonje és mtsai., 2020; Hadrava Vanova és mtsai., 2020). 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 (K. A. Brand & Hermfisse, 1997). IBD betegek colon biopsziájának vizsgálata során a glikolízis enzimek 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 (Vermeulen és mtsai., 2011). A fokozott aerob glikolízist bizonyítja továbbá, hogy IBD betegek széklet laktát szintje (Kaczmarczyk és mtsai., 2021), valamint az aktív fázisban lévő Crohn-betegek szérumban laktát szintje is szignifikánsan emelkedett volt (Cai és mtsai., 2019; Kaczmarczyk és mtsai., 2021). Állatkísérletes bizonyítékként, egerekben *Citrobacter rodentium* baktérium által okozott bélfertőzés alatt is hasonló metabolikus eltolódást tapasztaltak az intesztinális epitel sejtek esetében. Megnövekedett az aerob glikolízis fokozott fenntartásához szükséges, bazolaterális oldalon elhelyezkedő nátrium-glükóz-kotranszporter-4, valamint a laktát transzportért felelős monokarboxilát transzporter-4 mennyisége, továbbá fokozódott a laktát-dehidrogenáz kódoló gén expressziója. Ezzel párhuzamosan a citrátkör és oxidatív foszforiláció fehérjéinek mennyisége lecsökkent (Carson és mtsai., 2020).



2.ábra: Vastagbélhámsejtek metabolizmusa normál (a) és gyulladós (b) állapotban

(a) Egyensúlyi állapotban a colonocyták a bakteriális fermentáció során képződő rövid szénláncú zsírsavakat használják fel, így a β -oxidáció és az oxidatív foszforiláción keresztüli energianyerés dominál. (b) Proinflammatorikus szignálok hatására a metabolizmus az aerob glikolízis irányába

tolódik, fokozódik tehát a glükózfelhasználás és a laktát termelés (Forrás: Litvak és mtsai., 2018. alapján saját szerkesztés).

1.5. A Crohn-betegség modellezése

A gyulladásos bélbetegségek patomechanizmusának megértéséhez, új terápiás szerek hatásosságának vizsgálatára számos akut és krónikus állatmodellt dolgoztak ki. Ezek különböző csoportokba sorolhatóak: vannak kémiai indukált modellek, génmódosítással is kiválthatóak a tünetek, illetve alkalmaznak immunológiai modelleket is. A hagyományosnak tekinthető, kémiai ágenssel kiváltott modellek közé tartozik a dextrán-nátrium-szulfát (DSS), oxazonon, vagy az általunk is alkalmazott 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav (TNBS) modell (Pizarro és mtsai., 2003). Az immunológiai és hisztológiai elváltozások alapján a DSS modell inkább a humán colitis ulcerosa modellezésére alkalmas, míg a TNBS modell a Crohn-betegségre jellemző megjelenési formát eredményezi (Catana és mtsai., 2018). Utóbbi módszer alkalmazásával a TNBS-t etanolban oldva, intrarektálisan injektálják. A TNBS egy haptén, mely önmagában nem képes immunválasz kiváltására, azonban szöveti fehérjékhez kapcsolódva immunogén tulajdonságúvá válik (Morampudi és mtsai., 2014). Az etanol közvetlenül károsítja a bélnyálkahártyát, ami lehetővé teszi, hogy a TNBS kölcsönhatásba lépjen a mucosa fehérjéivel. A TNBS egyszeri alkalmazása akut gyulladást okoz, jellemzően egy Th1 típusú, TNF- α , IL-12 felszabadulással járó immunválaszt indít be. Fő tünetként gyors és drasztikus testsúly csökkenés, hasmenés jelentkezik, további állapotromlásra utaló jel lehet a piloerekció és az állat mozgékonyosságának csökkenése. A TNBS kezelés a Crohn-betegekre is jellemző transzmurális, a bélfal minden rétegét érintő gyulladást idéz elő. Az ödémás nyálkahártya, a fekélyes sebek már 24 órával a kezelést követően megfigyelhetőek (Antoniou és mtsai., 2016).

1.6. Poli(ADP-ribóz)-polimeráz-1 enzim tulajdonságai

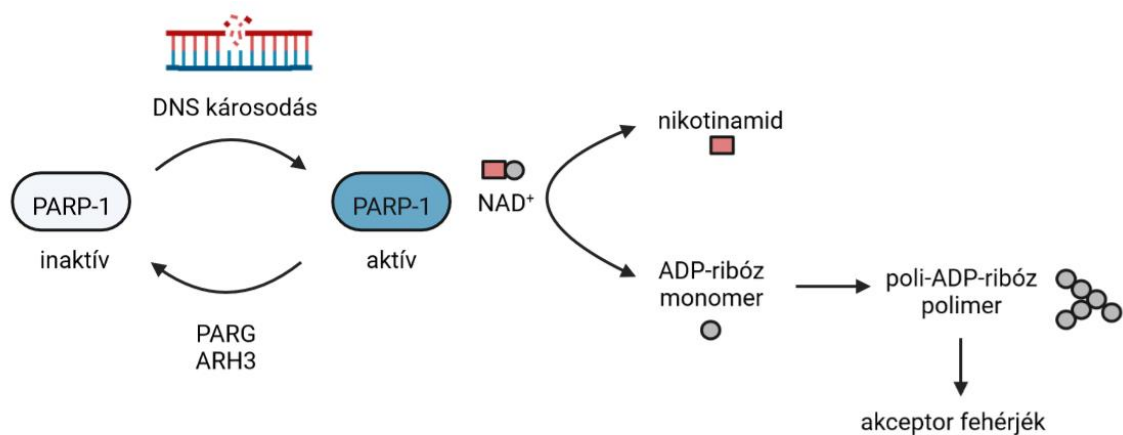
A poli(ADP-ribóz)-polimeráz enzimek (PARP-ok) bizonyos célfehérjék poszttranszlációs módosítását, poli-ADP-ribozilációját (PARiláció) katalizálják. A PARP egy 17 tagból álló enzimcsalád, melynek legtöbbet tanulmányozott tagja az elsőként felfedezett, egyben az eukarióta sejtek PARP aktivitásának döntő részéért felelős PARP-1 izoforma (Amé és mtsai., 2004; Shieh és mtsai., 1998). Ez egy sejtmagban elhelyezkedő, DNS-törés által aktivált, 113 kDa nagyságú fehérje. Szerkezetét tekintve 3 kitüntetett doménnel rendelkezik: DNS-kötő domén, automodifikációs domén, illetve katalitikus domén (D'Amours és mtsai.,

1999). A fehérje N-terminálisán található DNS-kötő domén a DNS törés felismeréséhez és hozzákötődéshez szükséges két zink ujj motívumot (Mazen és mtsai., 1989), a nukleáris elhelyezkedést biztosító nukleáris lokalizációs szignált (Schreiber és mtsai., 1992), továbbá egy kaszpáz-3 hasítóhelyet foglal magába (Decker és mtsai., 2000). A centrális régióban található automodifikációs domén egy BRCA1 C terminális domént tartalmaz, mely a fehérje-fehérje interakciók kialakításáért felelős (Bork és mtsai., 1997; Loeffler és mtsai., 2011). A C-terminális erősen konzervált katalitikus doménje felel a szubsztrát, vagyis a nikotinamid-adenin dinukleotid (NAD⁺) megkötéséért, majd a poli-ADP-ribóz (PAR) polimer szintéziséért (D'Amours és mtsai., 1999).

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 (Alemasova & Lavrik, 2019; Schreiber és mtsai., 2006) (**3. ábra**). A negatív töltésű PAR polimerek képesek megváltoztatni a célfehérjék szerkezetét, befolyásolják az általuk kialakított kölcsönhatásokat (Bai, 2015). A PARiláció egyik fő célpontja maga a PARP-1 fehérje, ekkor automodifikációról vagy autoPARilációról beszélünk, ami az enzim inaktiválódásához vezet. Heteromodifikációnak vagy transzPARilációnak 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) (Krietsch és mtsai., 2013; Schreiber és mtsai., 2006). A PAR polimer kijuthat a sejtmagból, így extranukleáris fehérjék módosítására is képes. Többek között a mitokondriális lokalizációjú apoptózist-indukáló faktor (AIF) is rendelkezik PAR-kötő motívummal. Ha a PARP-1 túlzott mértékű aktivációja miatt a PAR polimer mennyisége toxikus szintre emelkedik, kijut a citoplazmába és elősegíti az AIF mitokondriumból a sejtmagba történő transzlokációját, ami egy kaszpáz-független, PARP-1 aktivációhoz köthető sejthalálhoz vezet, mely a parthanatos elnevezést kapta (Bai, 2015; Fatokun és mtsai., 2014; Y. Wang és mtsai., 2011). 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 (Hegedűs & Virág, 2014).

A PARiláció egy reverzibilis, dinamikus folyamat, a PAR polimer degradációjáért többek között a poli(ADP-ribóz)-glikohidroláz (PARG) enzim felel (**3. ábra**). Elsősorban exoglikozidázként funkcionál és a láncvégi monomereket hasítja, azonban az akceptor

fehérjéhez észter kötéssel kapcsolódó utolsó monomer lehasítására képtelen. Endoglikozidáz aktivitással is rendelkezik, melynek köszönhetően rövidebb fragmentekre képes darabolni a polimert. Ennek a folyamatnak elsősorban nagymértékű stressz esetén van jelentősége, ilyenkor a felszaporodott PAR polimerekből képződő fragmentek apoptotikus szignálként szolgálnak (Barkauskaite és mtsai., 2013; Slade és mtsai., 2011). A PAR polimerek lebontásában szerepet játszik még az ADP-ribózil hidroláz 3 (ARH3) enzim is (Mueller-Dieckmann és mtsai., 2006), míg a fehérjéken található utolsó ADP-ribóz monomer lehasításáért az ADP-ribózil protein liáz (Oka és mtsai., 1984), a MacroD1 és MacroD2 makrodomén enzimek felelnek (Rosenthal és mtsai., 2013).



3. ábra: A PARiláció folyamata

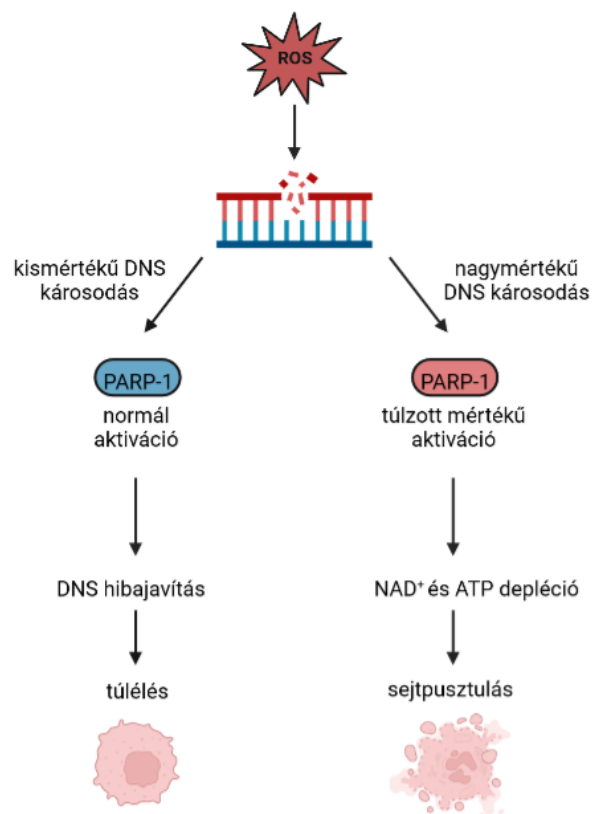
A DNS törés következtében aktiválódó PARP-1 enzim a NAD⁺-t nikotinamidra és ADP-ribózra hasítja, majd az utóbbiból szintetizálódott polimerek különböző célfehérjékhez kapcsolódnak. A PARP-1 általi poszttranszlációs módosítás reverzibilis, a polimerek degradációját elsősorban a PARG és ARH3 enzimek végzik (Forrás: Sousa és mtsai., 2012. alapján saját szerkesztés).

1.7. PARP-1 enzim aktivációja és akut metabolikus hatása

A PARP-1 klasszikusan egyszálú és kétszálú DNS törések hatására aktiválódik, ami bekövetkezhet szabadgyökök, egyéb reaktív oxigén és nitrogén származékok, mint a hidrogén-peroxid (Nosseri és mtsai., 1994) és peroxinitrit (Szabó és mtsai., 1996) hatására, továbbá az ionizációs sugárzás (Collins, 1987) és a DNS alkiláló szerek is károsítják a DNS-t (Juarez-Salinas és mtsai., 1979). PARP-1 aktiváció azonban megfigyelhető DNS törések hiányában is. Alternatív módon a nem B-DNS konformációjú struktúrák, mint a DNS-hurok vagy hajtúkanyar is kiválthat PARP-1 aktivációt (Lonskaya és mtsai., 2005), illetve a foszforilált extracelluláris szignál által regulált kináz 2 (ERK2) és PARP-1 direkt interakciója

is stimuláló hatású (Cohen-Armon, 2007). A PARP-1 aktivitása poszttranszlációs módosítások által szabályozott. A c-Jun N-terminális kináz (JNK1) általi foszforiláció elősegíti a tartós PARP-1 aktivációt H₂O₂ kezelt sejtekben (S. Zhang és mtsai., 2007), míg a protein-kináz C (PKC) csökkenti a PARP-1 DNS-hez történő kötődését és polimeráz aktivitását (Bauer és mtsai., 1992). A metiláció és acetiláció szintén befolyásolja a PARP-1 aktivitását, például bizonyos lizin aminosavak acetilációja nélkülözhetetlen az NF- κ B és PARP-1 interakciójához (P. O. Hassa és mtsai., 2005).

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 (Berger, 1985; Sims és mtsai., 1983; Virág & Szabó, 2002) (4. ábra).



4. ábra: A PARP-1 aktiváció lehetséges következményei
(Forrás: Ke és mtsai., 2019. alapján saját szerkesztés)

A NAD^+ a katabolikus folyamatokban résztvevő dehidrogenáz enzimek egyik legfontosabb proton és elektron akceptora. A glikolízisben a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) enzim által katalizált reakcióban történik a NAD^+ redukciója NADH -vá. Az általa szállított elektronok különböző ingamechanizmusokkal jutnak a mitokondrium mátrixába és érik el a légzési láncot. Szintén NAD^+ specifikus dehidrogenáz enzim a glükóz lebontása során képződő piruvátot acetil-CoA-vá oxidáló, mitokondriális lokalizációjú piruvát-dehidrogenáz komplex. A mitokondriumban zajló citrátkör is rendelkezik három NAD^+ koenzimmel működő oxidoreduktáz enzimmal: izocitrát-dehidrogenáz, α -ketoglutarát-dehidrogenáz komplex és malát-dehidrogenáz (Xie és mtsai., 2020). A fent említett reakciókban keletkezett NADH visszaoxidálása a mitokondrium belső membránjában található légzési láncban, a Komplex I által történik (Cantó és mtsai., 2015) (**1. ábra**). 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^+ depléció ezeknek az útvonalaknak a lassulásához, az ATP szintjének drasztikus csökkenéséhez, végül sejthalálhoz vezet (Fouquerel és mtsai., 2014; Ying és mtsai., 2003) (**4. ábra**).

A PARP-1 túlzott mértékű aktivációjából fakadó glikolítikus blokk nem pusztán a NAD^+ készlet fogyásából fakad, hanem a PARP-1 direkt szabályozó hatással is rendelkezik. Célpontja a glikolízis első lépését, a glükóz foszforilációját katalizáló hexokináz I (HKI) izoforma. A HKI aktivitása akkor a legnagyobb, ha a mitokondrium külső membránjában lokalizálódó feszültségfüggő anioncsatornával (VDAC) kölcsönhatásba lép. Az N-metil-N-nitro-N-nitrozoguanidin (MNNG) által kiváltott PARP-1 aktiváció két úton csökkenti a HKI aktivitását: egyrészt csökkenti a VDAC-hoz való affinitást, ami a HKI citoplazmába történő migrációját eredményezi, másrészt a PAR polimer kötődése allosztérikusan is gátolja a HKI enzimet. Ez a mechanizmus a NAD^+ hiány mellett szintén hozzájárul a PARP-1 túlaktiválódásából fakadó mitokondriális diszfunkcióhoz, későbbi sejthalálhoz (Fouquerel és mtsai., 2014).

1.8. PARP-1 enzim szerepe a gyulladás folyamatában

A PARP-1 enzim többféle ponton szabályozza az immunválaszt. Jelentős proinflammatorikus hatással rendelkezik, melyet a gyulladásban szerepet játszó transzkripciós faktorok, például $\text{NF-}\kappa\text{B}$, aktivációs fehérje-1 (AP-1) és aktivált T-sejtek nukleáris faktora (NFAT) aktiválásán keresztül fejt ki. Képes fokozni a gyulladáskeltő citokinek ($\text{TNF-}\alpha$, IL-6,

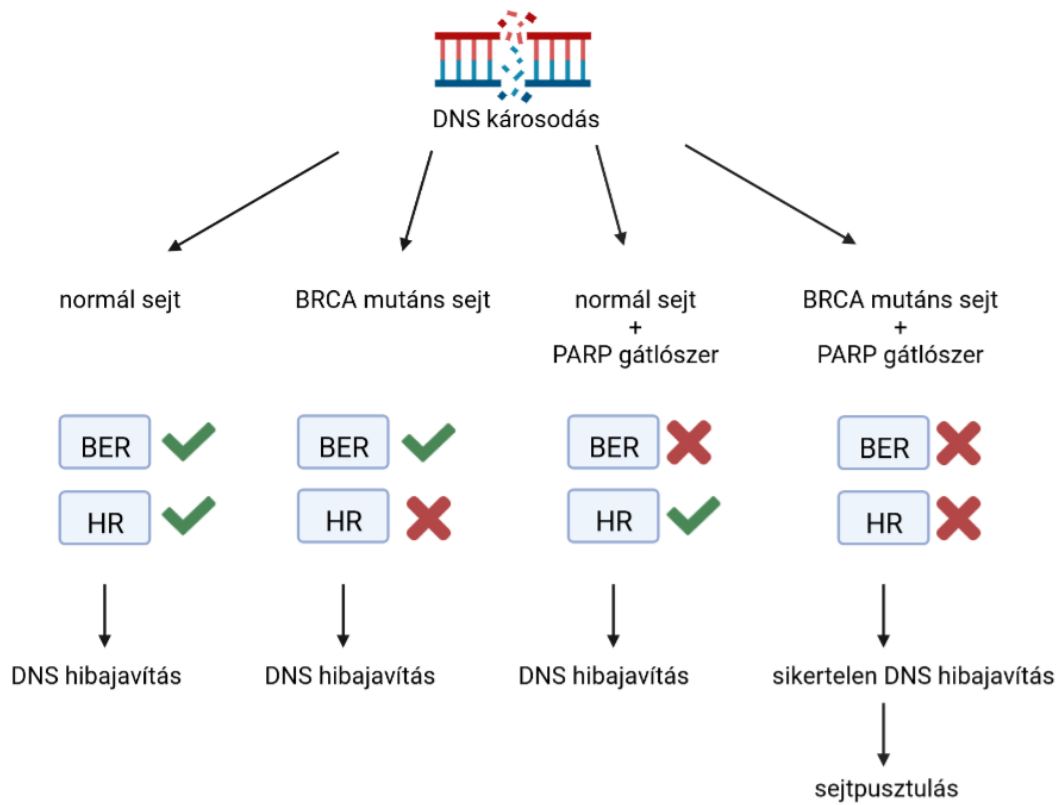
IL-1, IFN- γ), kemokinek (IL-8, makrofág gyulladáshoz asszociált protein (MIP)-1, MIP-2) szintjét, növeli bizonyos adhéziós molekulák (intercelluláris-, vaszkuláris-sejtheadhéziós molekula, E-szelektin, P-szelektin), mátrix metalloproteinázok (MMP-9) és az indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) expresszióját (Bai & Virág, 2012; Rosado és mtsai., 2013). A PARP-1 célpontja továbbá a high mobility group box protein 1 (HMGB1) fehérje, mely fokozza a proinflammatorikus mediátorok felszabadulását, a neutrofilek felhalmozódását, valamint csökkenti az apoptotikus sejtek fagocitózist. Davis és munkatársai kimutatták, hogy a PARP-1 HMGB1 erősebben csökkenti az apoptotikus sejtek eltakarítását, mint a módosítatlan HMGB1 (Davis és mtsai., 2012). A PARP-1 az NFAT aktiváción keresztül szerepet játszik a T-sejtek Th1 és Th2 irányú differenciálódásában is. Egér T-sejtekben a PARP-1 gén kiütése fokozta a Th1 citokin IFN- γ expresszióját, míg csökkentette a Th2 citokin IL-4 expressziót, ami egy Th1 irányú differenciálódásnak kedvez (Saenz és mtsai., 2008).

A PARP-1 enzim farmakológiai gátlása, valamint a PARP-1 gén kiütése számos akut és krónikus gyulladáshoz asszociált betegség kísérletes modelljében, köztük colitisben is protektívnek bizonyult (Bai & Virág, 2012).

1.9. 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 (Bryant és mtsai., 2005; Farmer és mtsai., 2005). 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 (**5. ábra**). Az említett szintetikus letalitás jelensége hozta meg az áttörést, hiszen engedélyezték az első PARP inhibitor, az olaparib (Lynparza) alkalmazását BRCA-mutáció-pozitív petefészekrák kezelésében (Berger és mtsai., 2018; Deeks, 2015). 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 (Mateo és mtsai., 2019).



5. ábra: A BRCA mutációt hordozó sejtek PARP inhibitorokkal szembeni érzékenysége

(Forrás: Aly & Ganesan, 2011. alapján saját szerkesztés)

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. A PARP inhibitorok protektív hatása összetett: csökkentik a PARP-1 általi NAD^+ fogyasztást, ami az energiakészlet megőrzését, a sejthalál elkerülését eredményezi; hatásukra csökken az AIF mitokondriumból történő kijutása, ezzel a parthanatos megelőzhető; kisebb mértékű lesz az $\text{NF-}\kappa\text{B}$ aktiváció, tehát csökken a gyulladáscsökkentő citokinek, adhéziós molekulák expressziója, a sérülés-asszociált molekuláris mintázatok felszabadulása; illetve mérséklék a gyulladás/oxidatív stressz-indukálta genotoxicitást is (Pazzaglia & Pioli, 2020). A rendelkezésre álló állatkísérletes eredmények alapján Berger és munkatársai az alábbi esetekben tartja elképzelhetőnek a PARP

inhibitorok alkalmazását: ha a betegség súlyossága magas, ha az elérhető kezelések korlátozottak, ha a betegség akut fázisában elegendő lehet a gyógyszer rövid távú alkalmazása (szeptikus sokk, akut pancreatitis), vagy éppen olyan krónikus betegségek esetében, ahol az alkalmazott terápiával nem állítható meg az állapotromlás (Berger és mtsai., 2018).

A PARP gátlók nem-onkológiai betegségekben javasolt alkalmazásával kapcsolatban elsődlegesen felmerülő aggály az, hogy a DNS károsodást elszenvedett, pusztulásra ítélt sejt életének megőrzése milyen hosszútávú következményekkel jár, esetlegesen növeli-e a malignus transzformáció esélyét. A PARP-1 enzim a repair enzimek sérült DNS szakaszhoz való toborzásában, azok aktivitásának fokozásában vesz részt, tehát önmagában nem DNS hibajavító enzim. A PARP-1 génkiütött egerek életképesek, szaporodóképesek, bár sejtjeikben a genotoxikus ágensek fokozott genetikai instabilitást indukálnak (Shall & de Murcia, 2000). Ito és munkatársai által végzett kísérletekben az olaparib primér T sejteken, valamint tumorigén és nem-tumorigén epitél sejtvonalakon is genotoxikus elváltozásokat eredményezett, fokozta a testvérkromatidák kicserélődését (Ito és mtsai., 2016). A PARP gátlók, illetve a PARP gén hiányának daganatképződésre gyakorolt hatásával kapcsolatos eredmények ellentmondásosak (Masutani & Fujimori, 2013). A vastagbélben és a májban az azoximetán által indukált daganatképződés fokozottabb volt a PARP-1 gén hiányában (Nozaki és mtsai., 2003), míg más modellekben, például a nitrozamin által indukált szájüregi és nyelőcső daganatok kialakulását nem befolyásolta (Gunji és mtsai., 2006). Születtek olyan eredmények is, ahol a PARP-1 gén hiánya előnyösnek bizonyult. Hasnyálmirigy daganat esetében csökkentette a tumorsejtek proliferációját és apoptózisát, miközben fokozta a nekrozist (Martínez-Bosch és mtsai., 2014), míg egy másik tanulmány szerint a 3,4-dihidro-5-(4-(1-piperidinil)butoxi)-1(2H)-izoklinolin (DPQ) PARP-1 inhibitor alkalmazása késleltette a bőrtumorok kialakulását és jelentősen csökkentette azok méretét (Martin-Oliva és mtsai., 2006). Egy hosszabbtávú kísérlet során az olaparib 18 héten keresztül, magas dózisban történő alkalmazása egerekben nem indukált tumoros elváltozást, azonban fontos kiemelni, hogy ez a kutatás nem a PARP gátlók tumorigén hatásának vizsgálatára fókuszált (Gariani és mtsai., 2017).

A genotoxicitási kockázatot figyelembe véve Berger és munkatársai krónikus, nem-onkológiai indikációkban is javasolják az olaparib humán felhasználásának kiszélesítését. Ilyen esetekben egy alacsonyabb dózis, továbbá a kezelés bizonyos időszakonkénti átmeneti felfüggesztése lenne célszerű (Berger és mtsai., 2018). A genotoxicitás tekintetében érdemes összehasonlítani a PARP gátlókat egyéb krónikus, gyulladásszerű betegségekben alkalmazott gyógyszerekkel. Az IBD terápiája során használt immunszuppresszáns

methotrexát *in vitro* az olaparibhoz és veliparibhoz hasonlóan növelte a kromoszóma instabilitást (Lee és mtsai., 2016).

1.10. Új generációs PARP gátlószer: olaparib

Az olaparib a PARP-1, PARP-2 és PARP-3 izoformák kompetitív inhibitora (O'Connor és mtsai., 2016), NAD⁺ analóg révén az aktív centrumot blokkolva képes gátolni az enzimek működését (Mateo és mtsai., 2019; Zheng és mtsai., 2020). 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 daganat típusától függően a szájon át történő olaparib kezelés monoterápiaként, illetve bevacizumabbal vagy endokrin terápiával kombinációban történik, javasolt napi adagja 600 mg. A monoterápiaként alkalmazott olaparib jól tolerálhatónak 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 (Gouloze és mtsai., 2016). 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 (Berger és mtsai., 2018).

1.11. A PARP gátlás kísérletes colitisre gyakorolt hatása

A gyulladásszerű bélbetegségek patomechanizmusában szerepet játszó oxidatív és nitrozatív stressz által indukált DNS károsodás PARP aktivációt eredményez, mely a sejtek energiahányárhoz, sejthalálhoz, az intesztinális barrier funkcióvesztéséhez vezet (Zingarelli és mtsai., 2003). A PARP gátlószer alkalmazásának, illetve a PARP-1 gén kiütésének kísérletes colitisre gyakorolt protektív hatását többféle állatkísérletes modellben bizonyították (Virág & Szabó, 2002). Patkányokon végzett TNBS-indukálta colitis modellben a 3-aminobenzamid (3-AB) és 1,5-dihidroxiizokinolin (1,5-DIQ) PARP gátlószer 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 AP-1 DNS-kötésének gátlását feltételezik (Zingarelli és mtsai., 2003). 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 (Sánchez-Fidalgo és mtsai., 2007). A PJ-34 általi PARP gátlás szintén védő hatásúnak bizonyult DSS által indukált egér colitis modellben, hiszen csökkentette a fogyás mértékét, a vastagbél megrövidülését, valamint mérsékelte a mortalitást (Mabley és mtsai., 2001). Az 5-aminoizokinolin (5-AIQ) PARP gátlószer DSS modellben csökkentette az IL-1 β és TNF- α expressziót, továbbá növelte a Treg és csökkentette a Th17 sejtek arányát a lépben, ami egy hatékony stratégia lehetne a colitis ulcerosa kezelésében (Peng és mtsai., 2021).

A fent említett állatkísérletekben gyakran alkalmazott inhibitorok az első és második generációs PARP gátlószerke 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 gátlószerke (olaparib, veliparib, rukaparib, niraparib, talazoparib) hatása jóval alacsonyabb, akár már nanomólos koncentrációban is érvényesül, kompetitív inhibitorok, nagy specifitást mutatnak a PARP-1,-2,-3 izoformák iránt, különböző daganat típusok esetében pedig a klinikai alkalmazás fázisába kerültek (Berger és mtsai., 2018; Curtin & Szabo, 2013; Southan & Szab, 2003). Bár az olaparibot *in vivo* és *in vitro* számos nem-onkológiai betegség modellben (szeptikus sokk, asztma, akut veseelégtelenség, öregedés) tesztelték (Berger és mtsai., 2018), 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. Anyagok és módszerek

3.1. Kísérleti állatok

A kísérleteink során felhasznált 6-8 hetes, hím CD-1-es egerek a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Immunológiai és Biotechnológiai Intézet SPF állatházának (BA05/2013) tenyészetéből származtak. A kísérleteket megelőzően az egereket átszállítottuk a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet konvencionális állatházába (ZOHU0104L 15), ahol egy 2 hetes akklimatizációs időszakon estek át. Az állatokat standard körülmények között, állandó 22°C-on, 12 órás sötét és világos ciklus mellett, ad libitum víz és rágcsálótáp (LT/N) fogyasztást biztosítva tartottuk. Projektünk során felmentést kaptunk az állatok csoportos tartása alól, mivel korábbi kísérleteinkben az egyedek agresszív magatartásából fakadó sérülések nagyban befolyásolták az eredményt. A külön ketrecben történő elhelyezéssel kivédhetőek voltak a társas viselkedésből fakadó eltérések, ez pedig hozzájárult a felhasznált állatok számának minimalizálásához is. Kísérleteinket a Pécsi Tudományegyetem Állatkísérletes etikai kódex előírásai alapján, a Munkahelyi Állatjóléti Bizottság és az Állatkísérletes Tudományos Etikai Tanács engedélyével végeztük (BA02/2000-4/2017).

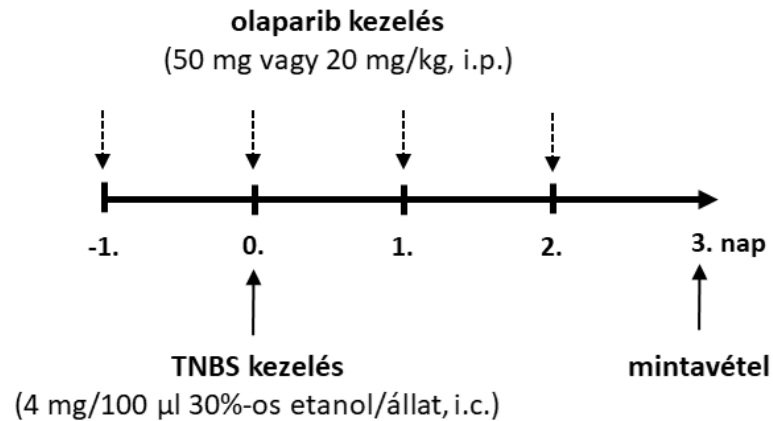
3.2. TNBS-indukálta colitis modell

A kísérletes colitis indukálása során CD-1-es egereket izoflurán narkózisban 100 µl TNBS-sel (4 mg/100 µl 30%-os etanol; Sigma-Aldrich) kezeltünk intracolónálisan (i.c.), egyszeri alkalommal a kísérlet 0. napján, 12 óra éhezést követően **(6. ábra)**. A kontroll csoportot 100 µl 30%-os etanollal kezeltük. A TNBS injektálása során egy gömb végű, fém katétert helyeztünk fel 3 cm-re a vastagbélbe, majd a beadást követően 1 percig fejjel lefelé megdöntve tartottuk az állatokat az esetleges szivárgás elkerülése végett.

A TNBS modellben az olaparib hatását teszteltük, így az egereket négy csoportra osztottuk: kontroll, TNBS, TNBS + olaparib (20 mg/kg) és TNBS + olaparib (50 mg/kg). Olaparib (AZD2281; MedChemExpress) kezelést 4 napon keresztül, a TNBS kezelést megelőző -1. naptól, naponta egyszer, intraperitoneálisan (i.p.) alkalmaztunk, 20 mg/kg és 50 mg/kg koncentrációkban **(6. ábra)**. A kontroll csoportok esetében az oldószert és vivőanyagot azonos mennyiségben alkalmaztuk (4% dimetil-szulfoxid + 30% polietilén-glikol 300 + dH₂O).

A TNBS kezelést követően, 72 óra elteltével az állatok életének kioltása izoflurán

narkózisban, lefejezéssel történt. Vérmintát gyűjtöttünk, majd ezt követően az állatok hasfalát felnyitva a teljes vastagbelet kimetszettük. Először lemértük a vastagbél hosszát és tömegét, majd hideg fiziológiás sóoldattal történő átmosás után, hosszirányban felvagtuk, előkészítve ezzel a szövetet a további vizsgálatokhoz.



6. ábra: TNBS modell során alkalmazott kezelések protokollja

3.3. Bélnyálkahártya makroszkópos vizsgálata

A vastagbél felvágását és kiterítését követően a gyulladással elváltozások mértékének szemikvantitatív pontozását Schicho és munkatársai 2011-es közleménye alapján végeztük (Schicho és mtsai., 2011). A pontozásnál a fekélyek kiterjedését, a hasüregi összenövések számát, a vastagbél hosszának rövidülését, a bélfal vastagságát, továbbá a széklet konzisztenciáját és vértartalmát vettük figyelembe (1. táblázat). A hosszmerések digitális tolómérő segítségével történtek.

Fekélyek kiterjedése	Adhézió	Vastagbél rövidülés (kontroll csoport átlag bélhosszához képest)	Bélfal vastagság	+ 1 pont
0,5 pont = 0,5 cm	0 pont = nincs adhézió	0 pont <15%	0,1 pont = 0,1 mm	Vérzés
	1 pont = 1 adhézió	1 pont >15%		Véres széklet
	2 pont = 2 vagy több adhézió	2 pont >25%		Hasmenés

1. táblázat: Makroszkópos vizsgálat pontozási rendszere

3.4. Szövetteni vizsgálat

A végbéltől számított 3-4 cm közötti vastagbél szakaszokat 10%-os semleges pufferelt formalin oldatban fixáltuk 4°C-on. A minták ezt követően szállításra kerültek, további előkészítésük, illetve vizsgálatuk a Grazi Orvostudományi Egyetemen zajlott. A mintákat dehidratálták, paraffinba ágyazták, majd 5 µm vastagságú metszeteket készítettek. A deparaffinálást és rehidratálást követően a metszeteket hematoxilinnal festették, majd csapvízben öblítették. A képek mikroszkóphoz kapcsolt OlympusD50 kamerával készültek, a szövettani fotók elemzése CellSens szoftverrel történt.

3.5. Szöveti citokin szintek meghatározása

Az IL-1β, IL-6, TNF-α és IL-10 citokinek meghatározásához a vastagbél mintákat lemértük, majd proteáz inhibitor (Sigma-Aldrich) tartalmazó extrakciós pufferben (50 mmol/l Tris, 10 mmol/l EDTA, 1% Triton X) kézi homogenizátorral homogenizáltuk (20 mg colon/100 µl puffer). A mintákat 10000 rpm-en 10 percig centrifugáltuk, a pontos fehérjekoncentrációkat Bradford reagenssel (Bio-Rad Laboratories) határoztuk meg. A minták fehérjetartalmának kiegyenlítése után, a citokinek meghatározását Ready-Set-Go ELISA kitékkel (eBioscience) végeztük a gyártó utasításai alapján.

3.6. Hematológiai vizsgálat

A TNBS modell harmadik napján, az állatok életének kioltását követően vérmintát gyűjtöttünk EDTA antikoagulánst tartalmazó vérvételi csövekbe (Becton Dickinson). A hematológiai paraméterek vizsgálata a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Laboratóriumi Medicina Intézetében, egy Sysmex XN-1000-V Multispecies Hematology Analyzer (Sysmex) segítségével történt. A vérkép vizsgálat elvégzéséig a mintákat szobahőmérsékleten tároltuk, a mérések minden esetben a mintavételtől számított 2 órán belül elkezdődtek.

A vérkép automata által mért neutrofil granulocita, limfocita, trombocita, monocita számból az alábbi paramétereket kalkuláltuk minden állat esetében: limfocita-monocita arány (LMR), neutrofil-monocita arány (NMR), trombocita-limfocita arány (PLR) és neutrofil-limfocita arány (NLR). Az LMR esetében az abszolút limfocita számot osztottuk az abszolút monocita számmal, az NMR számításánál az abszolút neutrofil számot osztottuk az abszolút

monocita számmal, míg a PLR és NLR esetében az abszolút trombocita vagy neutrofil számot osztottuk az abszolút limfocita számmal.

3.7. Bélnyálkahártya permeabilitásának vizsgálata

Az intesztinális barrier károsodását egy intracolónálisan alkalmazott fluoreszcens festék vérkeringésben való megjelenése alapján jellemeztük. A TNBS kísérlet 3. napjának reggelén, 12 órás éhezést követően, izolfurán narkózisban, 100 µl 60 mg/ml-es fluoreszcein izotiocianáttal jelölt dextránnal (FITC-dextrán; 4 kDa; Sigma-Aldrich) kezeltük (i.c.) az egereket. A festék beadásának idejét minden egyed esetében rögzítettük, majd ettől számított 1 óra múlva, az állatok életének kioltása után, szérumszeparáló csövekbe (Becton Dickinson) vért vettünk. A mintákat 15 perc után lecentrifugáltuk és a szérumszeparátumok fluoreszcencia intenzitását 490 nm excitációs és 510–570 nm emissziós hullámhosszon Promega GloMax plate reader-el detektáltuk. A bél permeabilitás meghatározása a szérumszeparátum FITC-dextrán koncentrációja alapján történt.

3.8. Caco-2 sejtvonal

A Caco-2 humán colon adenocarcinoma eredetű sejtvonalat (ATCC) 20% főtájis marhaszérumszeparátumot (Corning) és 1% nem esszenciális aminosavat (Sigma-Aldrich) tartalmazó MEM (Minimum Essential Medium; Sigma-Aldrich) médiumban tartottuk fenn, 37°C-on, 5% CO₂ és 95% páratartalom mellett. Az intesztinális epitel barrier modellezésére Caco-2 egysejtréteget használtunk.

3.9. RNS kivonás és qPCR

A Caco-2 sejtekből történő totál RNS izolálás a NucleoSpin RNA Plus kit (Macherey-Nagel) segítségével történt a gyártó utasításai szerint, melynek mennyiségét Nanodrop spektrofotométerrel és Qubit 2.0 fluoriméterrel (ThermoFisher Scientific) határoztuk meg. Ezt követően 1 µg RNS-t írtunk át cDNS-sé Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV) eredetű reverz transzkriptáz enzimmel (Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit, ThermoFisher Scientific). Az mRNS mennyiségével azonos cDNS mennyiségének meghatározására egy CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) készüléket használtunk. Az amplifikáció során Xceed qPCR SG 2× Mixet (Institute of Applied Biotechnologies) alkalmaztunk, melynek során a 20 µl reakció elegy 100 ng cDNS-t tartalmazott. 40 ciklust követően a termék elválasztása 1,5%-os agaróz gélen, méretének

meghatározása 20 bp-os molekulásúly markerrel (Lonza) történt. Eredményeink kiértékeléséhez a ΔC_t -módszert használtuk, referencia gének a β -aktint választottuk. A PCR-t az alábbi primerekkel végeztük:

Gén	Szekvencia
β-aktin (121 bp)	forward 5'-GCATGGGTCAGAAGGATTCC-3'
	reverse 5'-CAGATTTTCTCCATGTCGTCCC-3'
PARP-1 (109 bp)	forward 5'-CGAGTCGAGTACGCCAAGAG-3'
	reverse 5'-CATCAAACATGGGCGACTGC-3'
PARP-2 (97 bp)	forward 5'-GCCAGCAAAAGGGTCTCTGA-3'
	reverse 5'-CATGAGCCTTCCCCACCTTG-3'
PARP-3 (115 bp)	forward 5'-CCTGAGGCTCATGGAGAGTTG-3'
	reverse 5'-TGGAGCCATGGCCAAGAAAA-3'

3.10. Impedancia-alapú barrier integritás vizsgálat

Az intesztinális epitel barrier *in vitro* modellezésére használt Caco-2 monolayer integritását egy impedancia mérésen alapuló, valós idejű xCelligence RTCA DP (ACEA Biosciences) készülékkel monitoroztuk. Méréseinket egy speciális 16 lyukú E-plate-en végeztük, melynek alja arany mikroelektrodokkal borított. Az elektrodok felszínéhez kitapadó sejtek fokozódó impedancia értékeket eredményeznek, melyet a szoftver átkonvertál egy mértékegység nélküli Sejt Index (CI) nevű paraméterre. A CI egyenlő a mérés adott pillanatában és a nulladik időpontban mért impedancia érték különbsége, és az adott méréshez használt frekvenciához tartozó faktor hányadosával. Minél több sejt tapad a plate felületéhez, annál jobban emelkedik az impedancia érték. A módszer nagy előnye, hogy nem invazív, tehát jelölő molekulák alkalmazását nem igényli, illetve a végpontmérésen alapuló technikákkal szemben folyamatosan információt szolgáltat a sejtek aktuális állapotáról, a hatás kinetikájáról.

Az E-plate-re 10^5 sejt/well sűrűségben raktunk ki Caco-2 sejteket. A teljes konfluencia elérését követően a sejteket különböző H_2O_2 koncentrációkkal (100, 200, 500, 1000 μM ; Sigma-Aldrich) kezeltük 24 órán keresztül. További kísérleteinkben a monolayert 10 μM olaparibbal (AZD2281; MedChemExpress) kezeltük elő 30 percen keresztül, amit egy 24 óráos 1 mM-os H_2O_2 kezelés követett. A kontroll és H_2O_2 csoportok az olaparibbal kezelt csoporttal megegyező mennyiségű oldószert (DMSO) kaptak.

Kísérleteink során az impedancia változást 3 percenként, 24 órán keresztül monitoroztuk.

3.11. FITC-dextrán permeabilitási vizsgálat

A Caco-2 monolayer permeabilitását a FITC-dextrán (4 kDa) epitél sejtrétegen való átjutásával jellemeztük, amihez egy két kamrából álló Transwell plate-et (ThermoFisher Scientific) használtunk. A sejteket a felső kamrában, 0,4 μm pórusátmérőjű polikarbonát membránokon tenyésztettük a teljes konfluencia eléréséig. Az alsó kamrákat 1,5 ml médiummal töltöttük fel. A kísérlet során 10 μM olaparibbal 30 perces előkezelést végeztünk, majd 24 órán keresztül 1 mM-os H_2O_2 kezelés következett. A kontroll és H_2O_2 csoportok az olaparibbal kezelt csoporttal megegyező mennyiségű oldószert (DMSO) kaptak. A kezelés végeztével 1 mg/ml koncentrációjú FITC-dextrán oldatot adtunk a sejtréteget tartalmazó felső kamrába, majd 1 óras inkubálást követően 100 μl mintát vettünk a sejtréteg alatt található alsó kamrából. A minták fluoreszcencia intenzitását 490 nm excitációs és 510–570 nm emissziós hullámhosszon detektáltuk Promega GloMax plate reader-el.

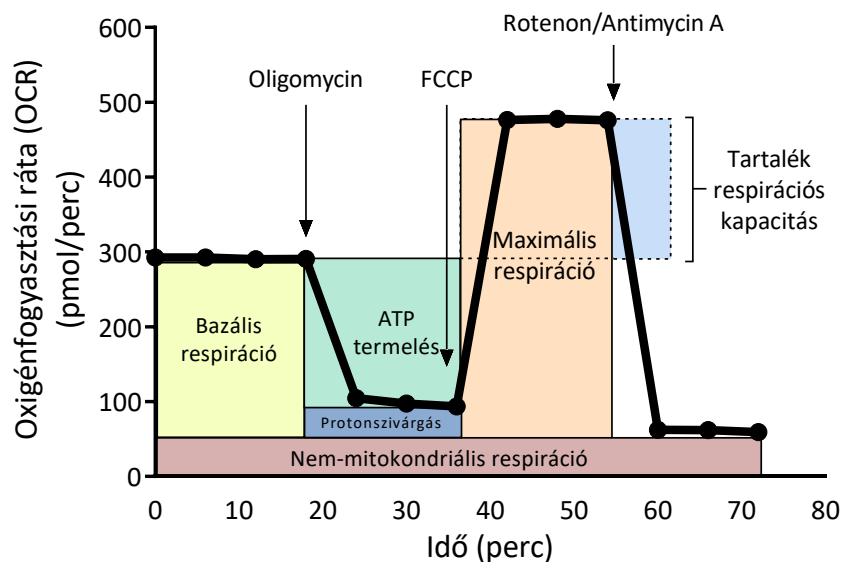
3.12. Sejtéletképesség vizsgálat flow citométerrel

Caco-2 sejteket 10^6 sejt/well denzitásban raktunk ki 6 lyukú lemezekre. A kialakult sejtréteget 30 percen keresztül 10 μM olaparibbal kezeltük elő, majd ezt követte egy 24 órás 1 mM-os H_2O_2 kezelés. Ennek végeztével a sejteket tripszin segítségével felvettük, lecentrifugáltuk, a gyártó által kiadott protokoll szerint hígítottuk, majd a sejtszuszpenziót 20 percen keresztül inkubáltuk a Muse Annexin V & Dead Cell Reagent festékkel (annexin V, 7-aminoaktinomycin D (7-AAD); Luminex Corporation). A festést követően az élő (annexin V(-)/7-AAD(-)), a korai (annexin V(+)/7-AAD(-)) és késői apoptotikus/nekrotikus (annexin V(+)/7-AAD(+)), illetve a nekrotikus (annexin V(-)/7-AAD(+)) sejtek mennyiségi meghatározása Muse Cell Analyzer (Merck-Millipore) flow citométer segítségével történt. Az annexin V már az apoptózis korai fázisában a sejtfelszínre kerülő foszfatidil-szerin csoportokat jelöli, míg a 7-AAD a késői apoptotikus és nekrotikus sejtek jelölésére alkalmas, hiszen a károsodott membránnal rendelkező sejtek DNS-éhez kötődik. Az annexin V(+)/7-AAD(+) festődés nem tesz különbséget az apoptózis vagy nekrozis útján elpusztult sejtek között (Zimmermann & Meyer, 2011).

3.13. Mitokondriális funkció vizsgálata az oxigén fogyasztás és pH-változás alapján

Az oxigén koncentráció és pH-változás valós idejű monitorozása Seahorse XFp Analyzer (Agilent Technologies) segítségével történt. A műszer által mért két paraméter az oxigénfogyasztási ráta (oxygen consumption rate, OCR) és az extracelluláris savasodási ráta (extracellular acidification rate, ECAR), melyekből az oxidatív foszforiláció, valamint a glikolízis mértékére következtethetünk.

A mérést megelőző napon a fluorimetriás szenzort tartalmazó Cartridge lemezt XF kalibráló oldattal hidratáltuk, majd CO₂-mentes termosztátba helyeztük. Caco-2 sejteket 1,5x10⁴ sejt/well sűrűségben raktunk ki 8 lyukú XFp Miniplate-re. A teljes konfluencia elérését követően a sejteket 30 percen keresztül 10 µM olaparibbal kezeltük elő, majd 2 órán keresztül 1 mM-os H₂O₂ kezelést végeztünk. Ezután a sejtek médiumát szérummentes, 10 mM glükóz, 1 mM piruvát és 2 mM glutamin tartalmú XF médiumra (pH=7,4) cseréltük, majd a plate-et 1 órára CO₂-mentes inkubátorba helyeztük. A mitokondriális funkció vizsgálatához használt XF Cell Mito Stress Test során a Cartridge lemez injektáló mikrotartályait respirációs gátlószerekkel és szétkapcsoló szerekkel töltöttük fel: oligomycin (1 µM – A port), karbonil-cianid-p-trifluormetoxi-fenil-hidrazon (FCCP; 1 µM – B port) és rotenon és antimycin A keveréke (1 µM – C port).



7. ábra: Az oxigén fogyasztás változása alapján számított, mitokondriális funkciót jellemző paraméterek

A mérés első fázisában a sejtek alap oxigénfogyasztását monitoroztuk. Ezt követte az F₀-F₁-ATP-szintáz gátló, oligomycin injektálása, melynek következtében a H⁺-ok

felhalmozódnak a mitokondriális intermembrán térben, ami az elektrontranszport gátlását és az oxigénfogyasztás drasztikus csökkenését eredményezi. Következő lépésként egy szétkapcsoló szert, FCCP-t injektáltunk, amely megszünteti a protongrádienszt, segítségével a H^+ -ok ATP termelés nélkül juthatnak vissza a mitokondrium mátrixába, ami az elektrontranszport lánc újbóli működésével és a sejtek oxigénfogyasztásának növekedésével jár. Az utolsó lépésként hozzáadott rotenon (Komplex I gátló) és antimycin A (Komplex III gátló) az elektrontranszport és oxigénfogyasztás gátlásához vezet.

Az egyes respirációs gátlószerek és szétkapcsoló szerek szakaszos injektálása az alábbi mitokondriális funkciót jellemző paraméterek vizsgálatát teszi lehetővé: bazális respiráció, ATP termeléshez kapcsolódó respiráció, protonszivárgás, nem-mitokondriális respiráció, maximális respiráció, tartalék respirációs kapacitás (**7. ábra**). Az oxidatív foszforiláció mellett a sejtek glikolitikus kapacitásáról is információt nyerhetünk. Az oligomycin injektálás hatására gátlódik a mitokondriális ATP termelés, ami az energiatermelést a glikolízis irányába tolja.

3.14. Fénymikroszkópos vizsgálat

Caco-2 sejteket 10^6 sejt/well sűrűségben raktunk ki 6 lyukú plate-re, majd a teljes konfluencia elérését követően az impedancia alapú integritás vizsgálatoknál ismertetett kezelést végeztük. 24 óra elteltével a sejtréteg morfológiai változását az EVOS XL Core Cell Imaging System (20x objektív; Thermo Fisher Scientific) segítségével vizualizáltuk.

3.15. Statisztikai analízis

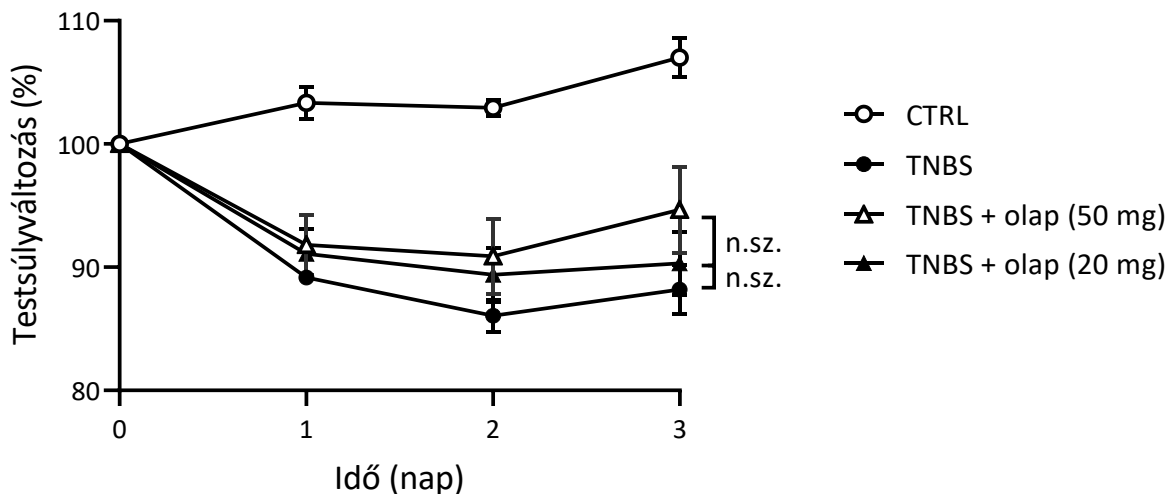
Eredményeink statisztikai kiértékelését a GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software) program segítségével végeztük. A csoportok közötti különbségeket Bonferroni által módosított kétmintás T-próbával határoztuk meg, ahol $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4. Eredmények

4.1. Az olaparib hatásának vizsgálata TNBS által indukált colitis egérmodellben

4.1.1. 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. Az ábrán megfigyelhető, hogy a nagymértékű fogyás a kísérlet 2. napjáig tart, az oldószeres kontroll csoport testsúlya pedig folyamatosan gyarapodott a kísérlet során (**8. ábra**).



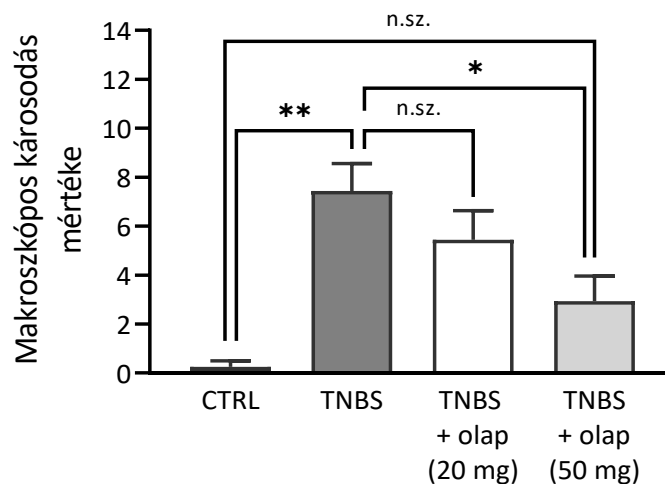
8. ábra: Az olaparib kezelés hatása a testsúly csökkenésre TNBS-indukálta colitisben

A testsúly napi változását minden egyed esetében a saját 0. napi értékhez viszonyítottuk. Az ábrán három független kísérlet közül egynek az eredményei láthatóak (n = 4-7/csoport). Átlag ± SEM; n.sz.= nem szignifikáns.

4.1.2. Makroszkópos gyulladási paraméterek

A TNBS kezelés által okozott makroszkóposan értékelhető szövettani elváltozásokat az 9. ábra mutatja be. A pontozás 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 (9. ábra).

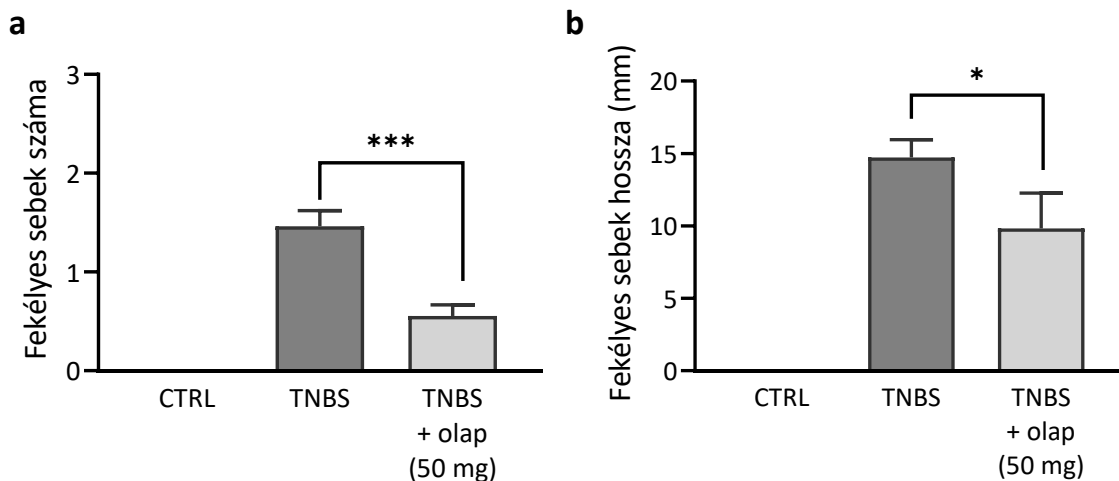


9. ábra: Az olaparib kezelés hatása a vastagbél makroszkópos károsodására TNBS-indukálta colitisben

Az ábrán kettő független kísérlet eredményének átlaga látható (n = 9-21/csoport). Átlag ± SEM; n.sz.= nem szignifikáns, *p<0,05, **p<0,01.

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 (10/a ábra) és mérete (10/b ábra) is.

Mivel az alacsonyabb dózisú (20 mg/kg) olaparib kezelés nem eredményezett szignifikáns javulást a colitis makroszkópos tüneteit tekintve, a továbbiakban kizárólag a magasabb (50 mg/kg) koncentrációval végzett kísérletek eredményei kerülnek bemutatásra.

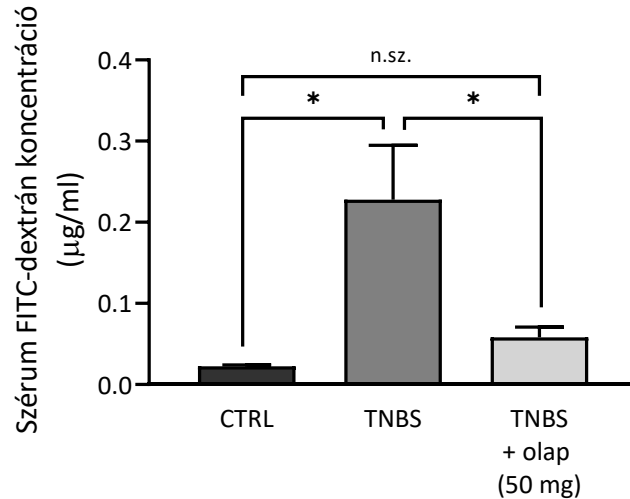


10. ábra: Az olaparib kezelés hatása a vastagbélben kialakuló fekélyek számára (a) és kiterjedésére (b) TNBS-indukálta colitisben

Az ábrán három független kísérlet eredményének átlaga látható (n = 9-27/csoport). Átlag ± SEM; *p<0,05, ***p<0,001.

4.1.3. Bélnyálkahártya permeabilitás

A bélnyálkahártya barrier funkciójának károsodását az intracolónálisan beadott, majd vérkeringésbe jutott FITC-dextrán 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 (**11. ábra**).

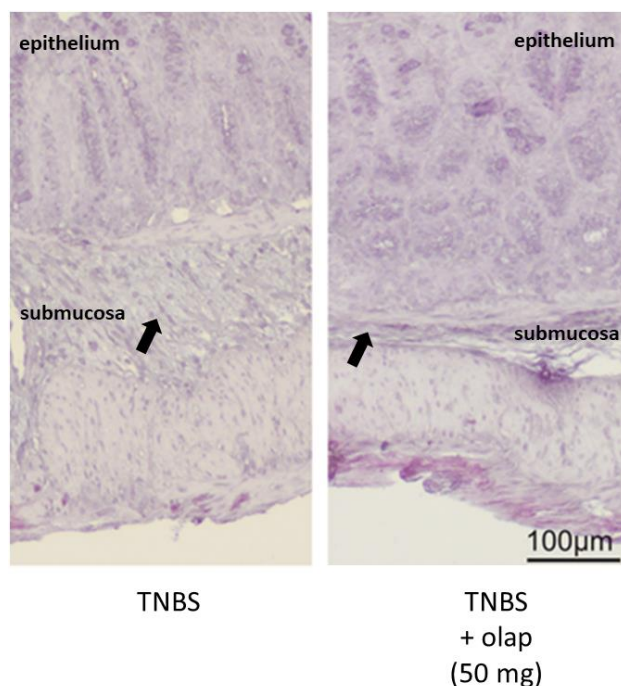


11. ábra: Az olaparib bélnyálkahártya barrier funkciójára kifejtett hatása TNBS-indukálta colitisben

Az ábrán három független kísérlet közül egynek az eredményei láthatóak (n = 5-8/csoport). Átlag ± SEM; n.sz.= nem szignifikáns, *p<0,05.

4.1.4. Szöveti vizsgálat

A TNBS-el kezelt állatok vastagbélének főbb hisztológiai jellemzői közé tartozik az ulceráció, az immunsejtek intenzív infiltrációja, kiterjedt fibrózis, valamint a submucosa ödémás megvastagodása (Antoniou és mtsai., 2016). Az általunk végzett szöveti vizsgálat alapján a TNBS kezelés hatására a vastagbél submucosa rétege valóban erőteljesen megvastagodott, melyet az 50 mg-os olaparib kezelés nagymértékben csökkentett (**12. ábra**).



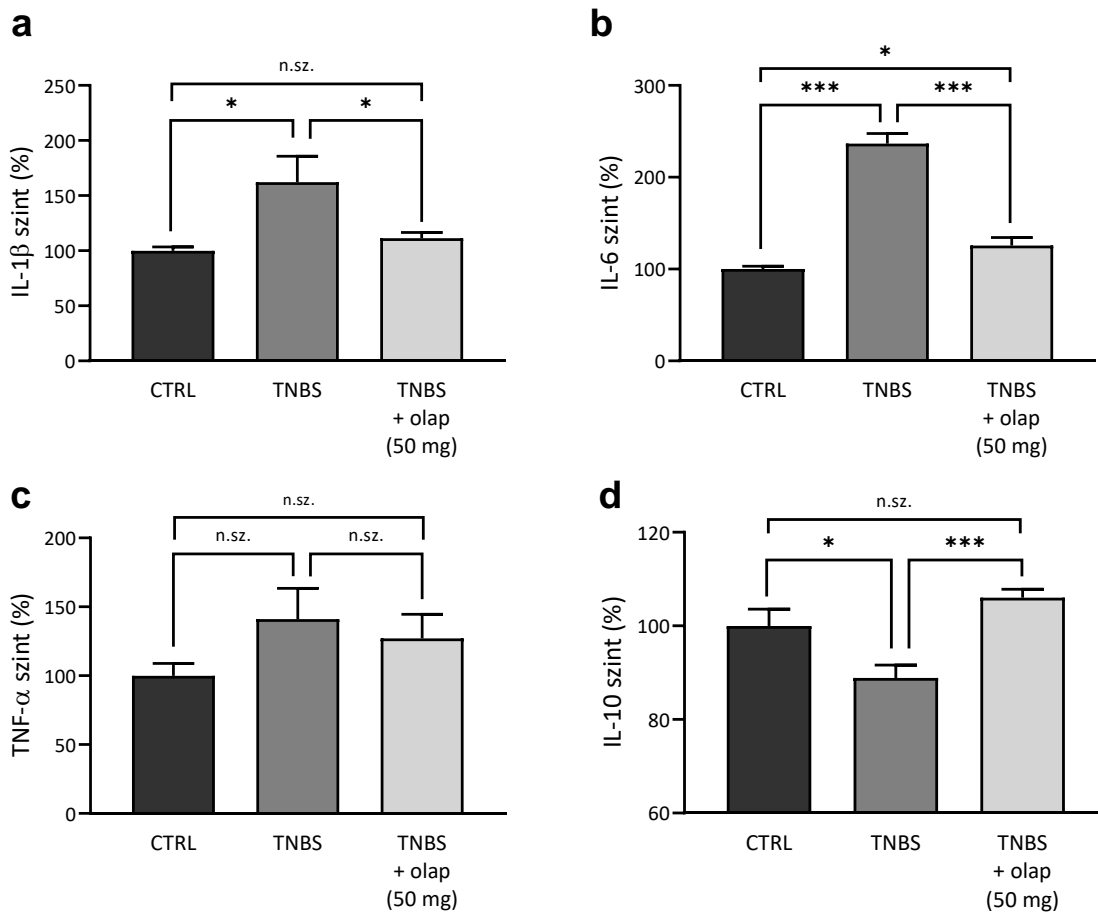
12. ábra: Az olaparib hatása a vastagbél submucosa rétegének megvastagodására TNBS-sel indukált colitis modellben

A szövettani képeken a submucosa réteget fekete nyíl jelöli.

4.1.5. Gyulladásos citokinek szintje

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

Az 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 (**13/a ábra**). 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 (**13/b ábra**). Ismert, hogy a bélszövet megnövekedett TNF- α szintje összefüggésben áll a gyulladásos bélbetegségek aktivitásával, súlyosságával. Ennek ellenére a TNBS kezelés hatására nem tapasztaltunk szignifikáns változást a TNF- α szintjében (**13/c ábra**). 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 (**13/d ábra**).



13. ábra: Az olaparib kezelés hatása a bélszövet IL-1 β (a), IL-6 (b), TNF- α (c) és IL-10 (d) citokin szintekre TNBS-indukálta colitisben

Az ábrán kettő független kísérlet eredményének átlaga látható (n = 9-13/csoport). Az ábrázolás során a kontroll csoport esetében mért OD₄₅₀ értékek átlagát tekintettük 100 százaléknak. Átlag \pm SEM; n.sz.= nem szignifikáns, *p<0,05, ***p<0,001.

4.1.6. Hematológiai paraméterek

A vérkép analízis során vizsgált húsz érték közül az általunk alkalmazott TNBS kezelés 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 (**2. táblázat**).

Hematológiai paraméterek	Mértékegység	CTRL		TNBS		TNBS + olap (50 mg)	
		Átlag	SEM	Átlag	SEM	Átlag	SEM
WBC	(10 ⁹ /L)	4,50	± 0,684	4,28	± 0,518	4,71	± 0,280
RBC	(10 ⁹ /L)	8,71	± 0,491	10,62	± 0,470	10,03	± 0,286
HGB	(g/L)	147,45	± 3,223	169,38	± 6,793	162,40	± 3,821
HCT	(%)	44,84	± 2,718	50,86	± 2,044	49,67	± 1,258
MCV	(fL)	51,43	± 0,810	47,97	± 0,511	49,71	± 0,747
MCH	(pg)	16,54	± 0,452	16,02	± 0,167	16,26	± 0,204
MCHC	(g/L)	322,33	± 9,521	333,75	± 4,753	328,05	± 5,309
PLT	(10 ⁹ /L)	1242,50	± 112,356	1310,87	± 95,849	1347,42	± 82,603
RDW-SD	(fL)	25,93	± 1,040	22,88	± 0,340	23,54	± 0,752
RDW-CV	(%)	17,28	± 0,539	18,04	± 0,422	17,56	± 0,228
PDW	(fL)	7,07	± 0,318	7,74	± 0,490	7,20	± 0,219
MPV	(fL)	6,88	± 0,156	6,89	± 0,174	6,73	± 0,111
P-LCR	(%)	6,63	± 0,975	6,99	± 1,258	6,05	± 0,692
PCT	(%)	0,75	± 0,080	0,88	± 0,055	0,79	± 0,056
NRBC	(10 ⁹ /L)	0,25	± 0,217	0,02	± 0,003	0,02	± 0,007
NEUT	(10 ⁹ /L)	1,11	± 0,156	2,08	± 0,366	2,13	± 0,259
LYMPH	(10 ⁹ /L)	2,09 ^A	± 0,309	1,15 ^B	± 0,149	1,82 ^A	± 0,212
MONO	(10 ⁹ /L)	0,14 ^A	± 0,040	0,32 ^B	± 0,073	0,22 ^A	± 0,036
EO	(10 ⁹ /L)	0,11	± 0,026	0,04	± 0,028	0,14	± 0,030
BASO	(10 ⁹ /L)	0,01	± 0,002	0,01	± 0,002	0,01	± 0,004

2. táblázat: Hematológiai paraméterek változása az olaparib kezelést követően TNBS-indukálta colitisben

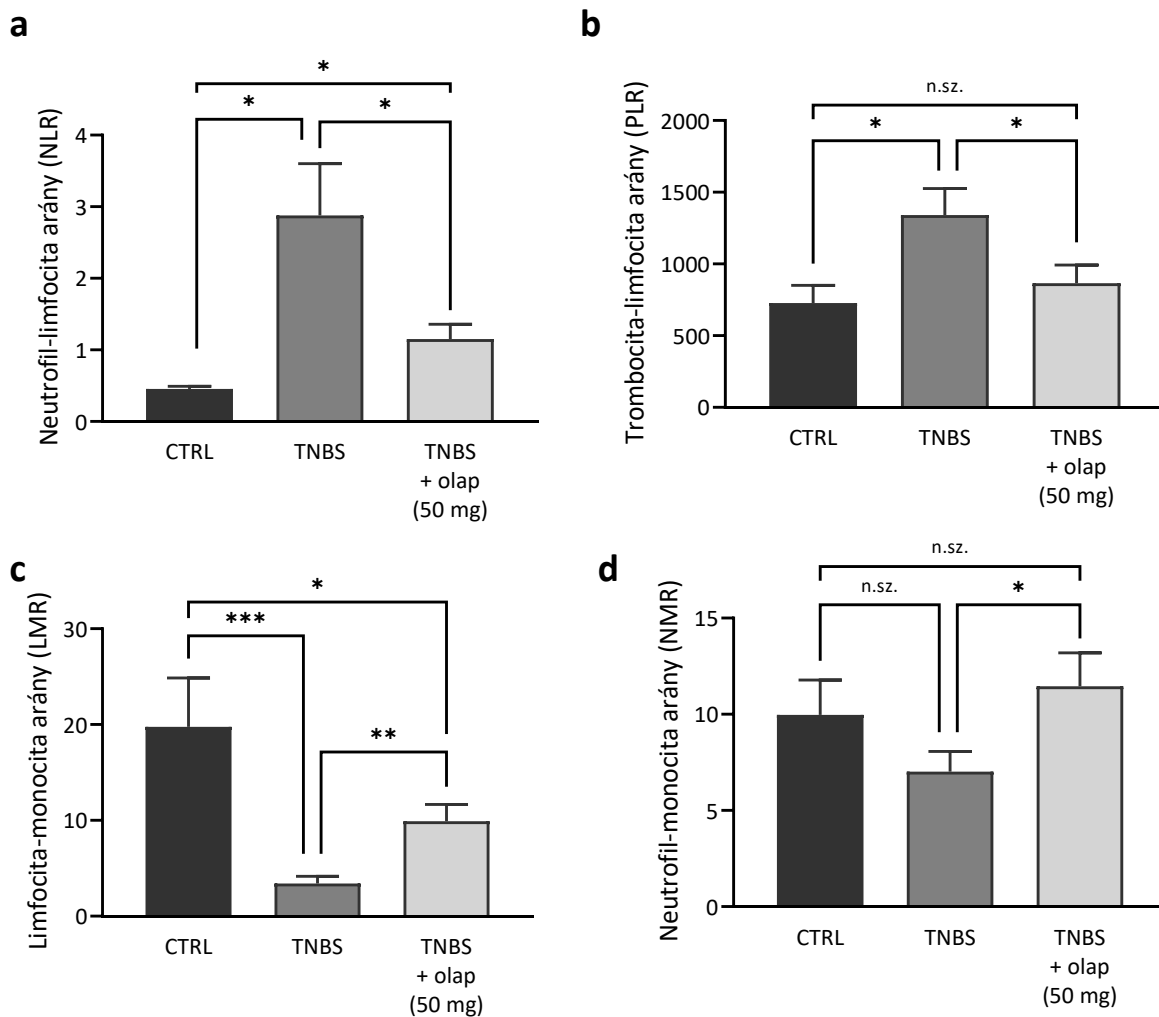
Az ábrán három független kísérlet eredményének átlaga látható (n = 9-20/csoport). Átlag ± SEM;

^{A, B} Kezelések közti szignifikáns eltérések jelölése (p<0,05).

Rövidítések: WBC: fehérvérsejtszám, RBC: vörösvértestszám, HGB: hemoglobin, HCT: hematocrit, MCV: átlagos vörösvértest térfogat, MCH: vörösvértest átlagos hemoglobin tartalom, MCHC: vörösvértest átlagos hemoglobin koncentráció, PLT: trombocitaszám, RDW-SD: vörösvértest eloszlási szélesség, RDW-CV: vörösvértest eloszlás térfogatszélességének relatív értéke, PDW: trombocita eloszlási szélesség, MPV: átlagos trombocita méret, P-LCR: vérlemezke-nagy sejt arány, PCT:

prokalcitonin, NRBC: magas vörösvértestszám, NEUT: neutrophil granulociták száma, LYMPH: limfocitaszám, MONO: monocitaszám, EO: eosinophil granulociták száma, BASO: bazofil granulociták száma.

A vérvizsgálat során kapott abszolút sejtszámok alapján négy, a gyulladásos bélbetegségek diagnosztikájában és a betegségaktivitás monitorozásában alkalmazható szerológiai marker vizsgálatát végeztük. A TNBS kezelés hatására az egyes markerek esetében a Crohn betegekre jellemző eltéréseket tapasztaltunk (Feng és mtsai., 2017). A TNBS kezelés következtében a kontroll csoporthoz képest 6-szorosára emelkedett az NLR **(14/a ábra)** és 2-szeresére a PLR **(14/b ábra)** értéke, amit az olaparib kezelés mindkét esetben hatékonyan csökkentett. A PLR esetében az olaparib és kontroll csoport között nem tapasztaltunk különbséget **(14/b ábra)**. Az LMR értékét a TNBS kezelés a kontroll szint hatodára csökkentette, míg az olaparib kezelés képes volt enyhíteni ezt a csökkenést **(14/c ábra)**. A TNBS kezelés hatására bekövetkező NMR csökkenés nem bizonyult szignifikánsnak, azonban az olaparib javulást eredményezett az NMR értékében **(14/d ábra)**.



14. ábra: Szerológiai markerek az olaparib kezelést követően TNBS-indukálta colitisben: NLR (a), PLR (b), LMR (c) és NMR (d)

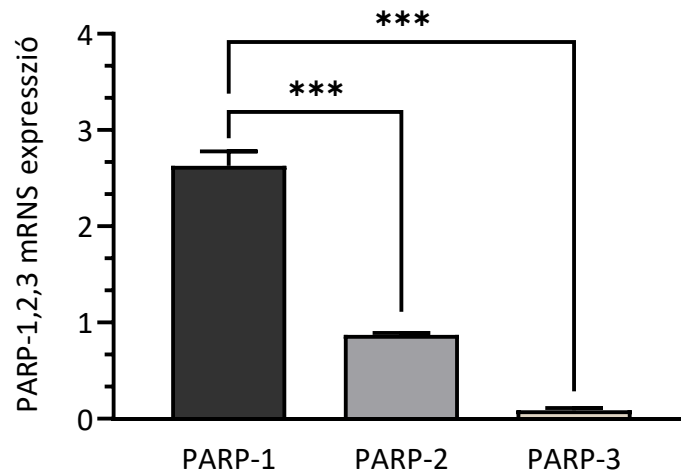
Az ábrán három független kísérlet eredményének átlaga látható ($n = 9-20$ /csoport). Elsőként minden egyed esetében meghatároztuk az arányokat, majd utána átlagoltuk az eredményeket. Átlag \pm SEM; n.sz.= nem szignifikáns, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.2. Az olaparib hatásának vizsgálata Caco-2 sejtkultúrán

4.2.1. PARP izoformák detektálása Caco-2 sejtekben

Mivel az olaparib a PARP-1 ($IC_{50} = 5$ nM), PARP-2 ($IC_{50} = 1$ nM) és PARP-3 ($IC_{50} = 4$ nM) izoformák potens gátlószere (O'Connor és mtsai., 2016), 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 génextpresszióját 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 (**15. ábra**).



15. ábra: PARP izoformák mRNS expressziója kezeletlen Caco-2 sejtekben

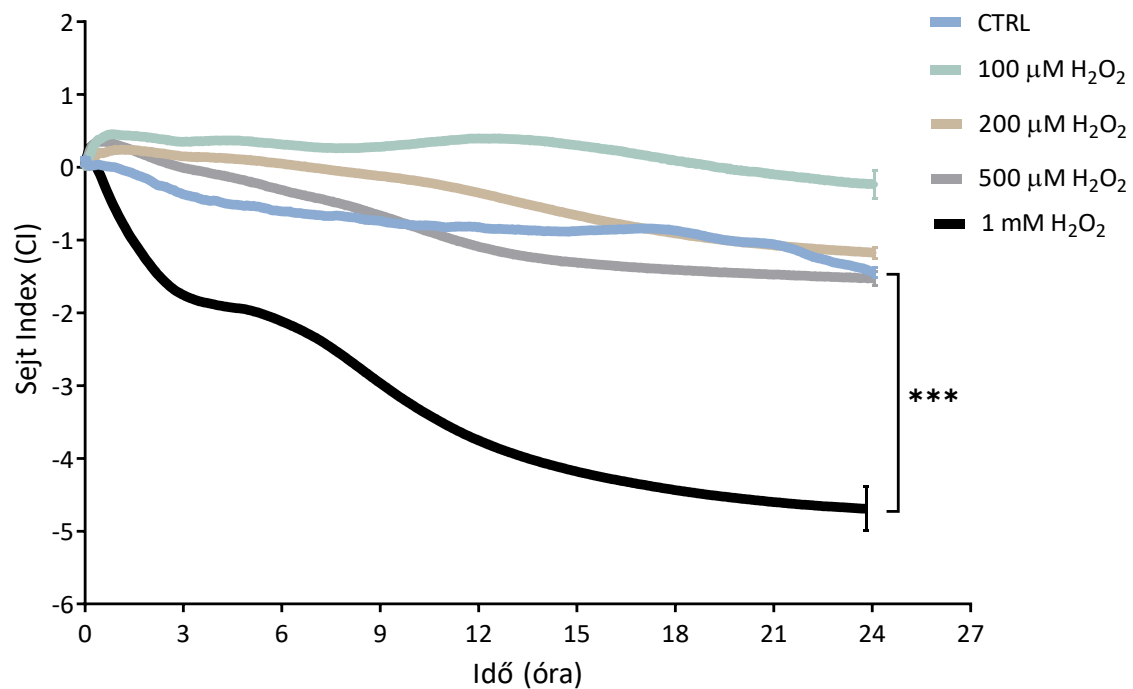
A génexpressziót β -aktinra normalizáltuk.

4.2.2. 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 (Sambuy és mtsai., 2005). Az IBD patomechanizmusában fontos szerepet tulajdonítanak a fokozott bélpermeabilitásnak, melynek hátterében nagy részben az epítél sejtek oxidatív károsodása áll (Tian és mtsai., 2017). A reaktív oxigén származékok, többek között a H_2O_2 DNS törést, ennél fogva PARP aktivációt eredményeznek (Andreone és mtsai., 2003; Jijon és mtsai., 2000).

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

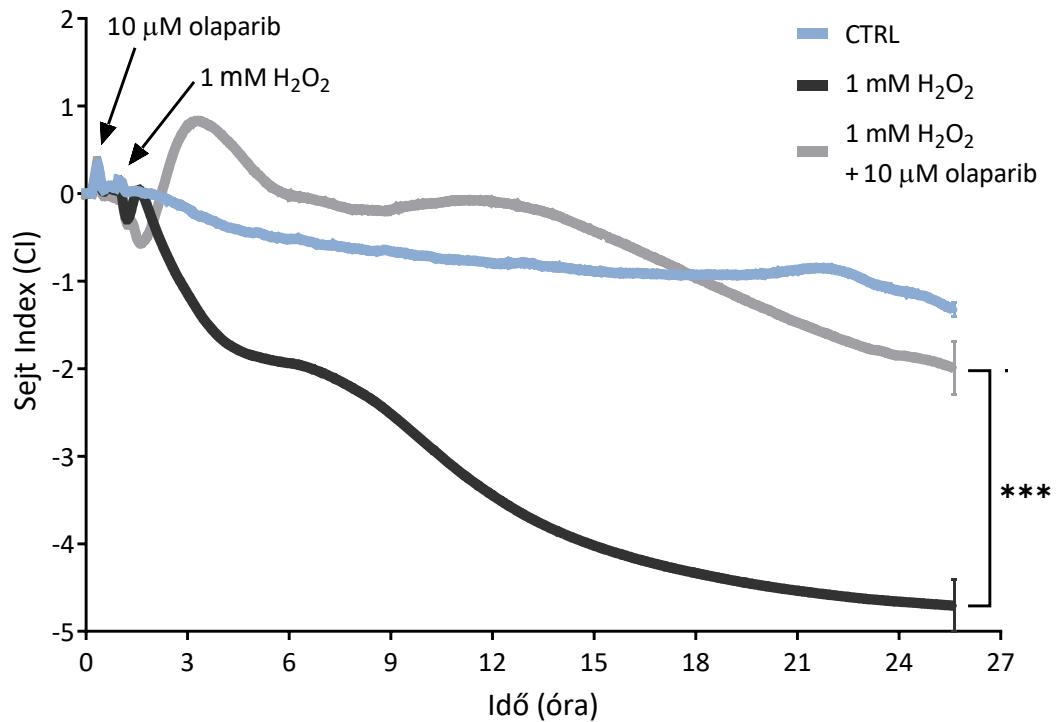
a Sejt Indexet, vagyis alkalmasnak bizonyult a barrier integritásának károsítására (16. ábra), így további kísérleteinket ezzel a koncentrációval végeztük.



16. ábra: A H₂O₂ koncentrációfüggő hatása a Caco-2 sejtréteg integritására

Az ábrán három független kísérlet közül egynek az eredményei láthatóak (n = 4-6/csoport). Átlag ± SD; ***p<0,001.

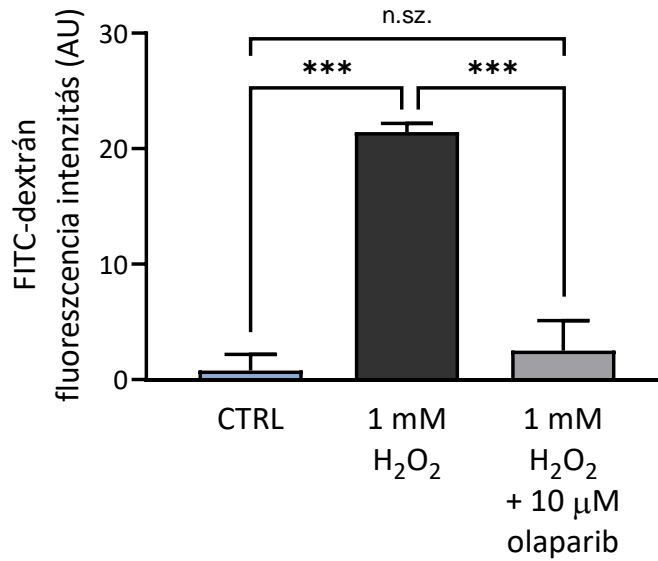
Következő lépésként megvizsgáltuk, hogy az olaparib képes-e mérsékelni a H₂O₂ károsító hatását. A 30 perces olaparib előkezelés mellett jóval kisebb mértékűnek bizonyult az 1 mM H₂O₂ hatására kialakuló Sejt Index csökkenés, azaz mérsékelte a barrier integritásának csökkenését (17. ábra).



17. ábra: Az olaparib barrier integritásra gyakorolt hatása H₂O₂-dal kezelt Caco-2 sejtrétegen

Az ábrán három független kísérlet közül egynek az eredményei láthatóak (n = 4-6/csoport). Átlag ± SD; ***p<0,001.

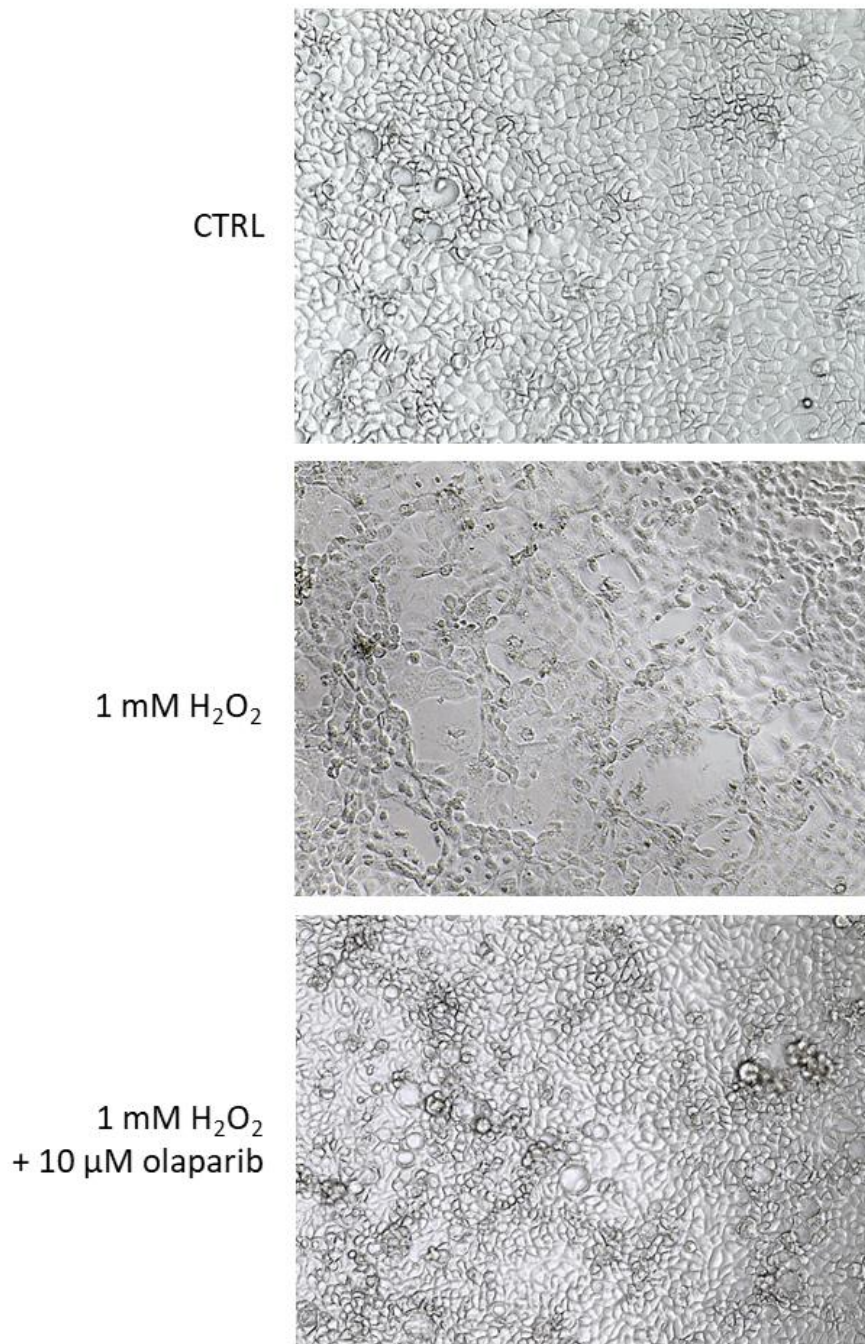
Az epitél barrier gátfunkciójának vizsgálatára egy másik módszert is alkalmaztunk, ahol a sejtréteg permeabilitását mértük 4 kDa FITC-dextrán marker segítségével. A kontroll csoport esetében rendkívül alacsony permeabilitást mértünk a jelölőmolekulára nézve, amit az 1 mM H₂O₂ kezelés körülbelül 27-szeresére 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 (18. ábra).



18. ábra: Az olaparib permeabilitásra gyakorolt hatása H₂O₂-dal kezelt Caco-2 sejtrétegen

Az ábrán kettő független kísérlet eredményének átlaga látható (n = 4/csoport). Átlag ± SD; n.sz.= nem szignifikáns, ***p<0,001.

Eredményeink további megerősítésének céljából fénymikroszkópos felvételeket készítettünk a sejtrétegekről 24 órás kezelést követően. A felvételeken (**19. ábra**) jól látható, hogy az 1 mM H₂O₂ 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.



19. ábra: Reprezentatív fénymikroszkópos felvételek az olaparib barrier integritásra gyakorolt védő hatásáról

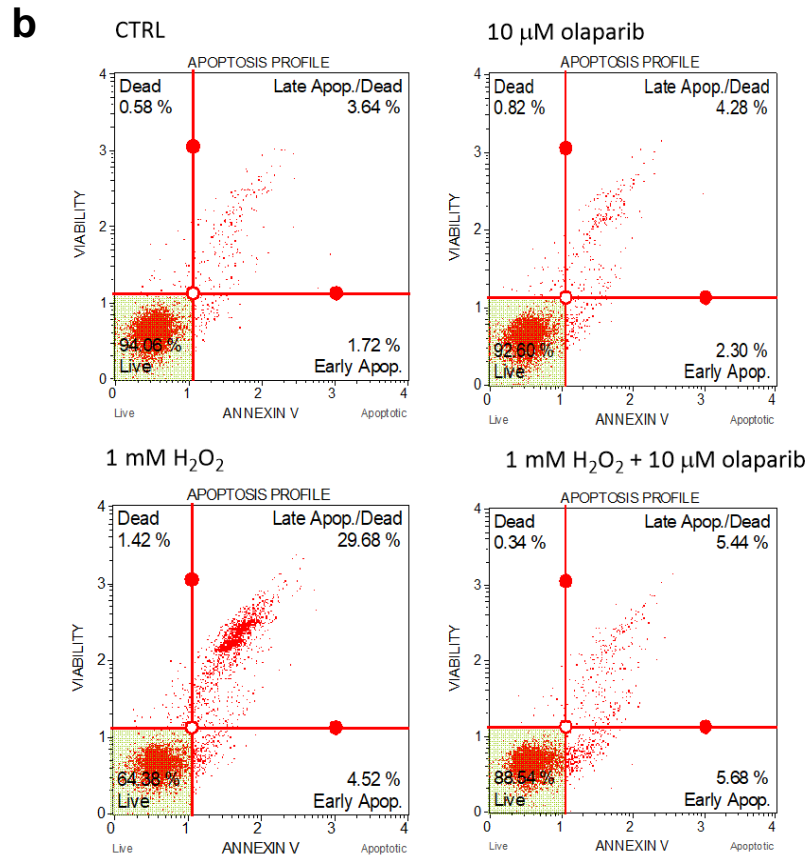
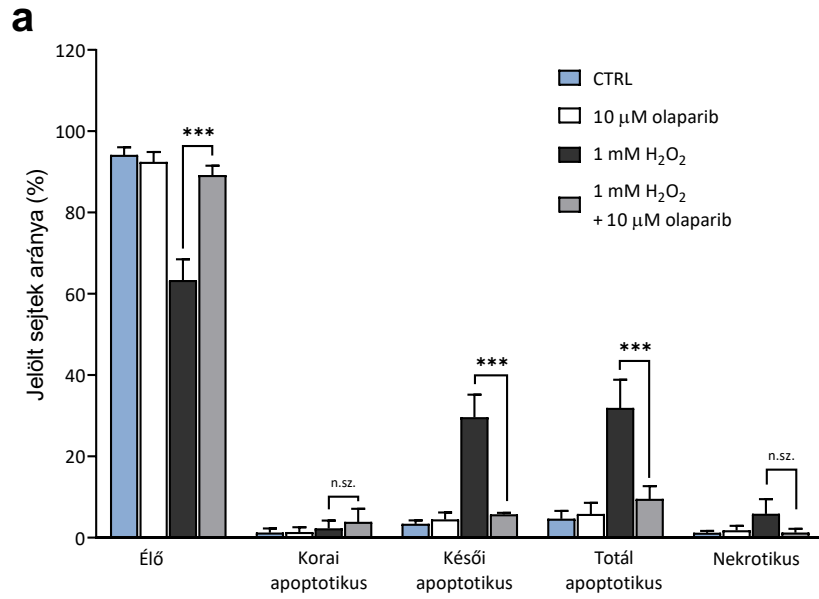
4.2.3. Az olaparib sejtleletképeségre gyakorolt hatása

Annak megállapítására, hogy a barrier integritás és permeabilitás vizsgálatok során alkalmazott kezelés hatással van-e a monolayer alkotó Caco-2 sejtek életképességére, flow citometriás vizsgálatot végeztünk annexin V/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 **(20/a ábra)**.

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



20. ábra: Az olaparib sejttétlőképesre gyakorolt hatása H₂O₂-dal kezelt Caco-2 sejtrétegen (a)

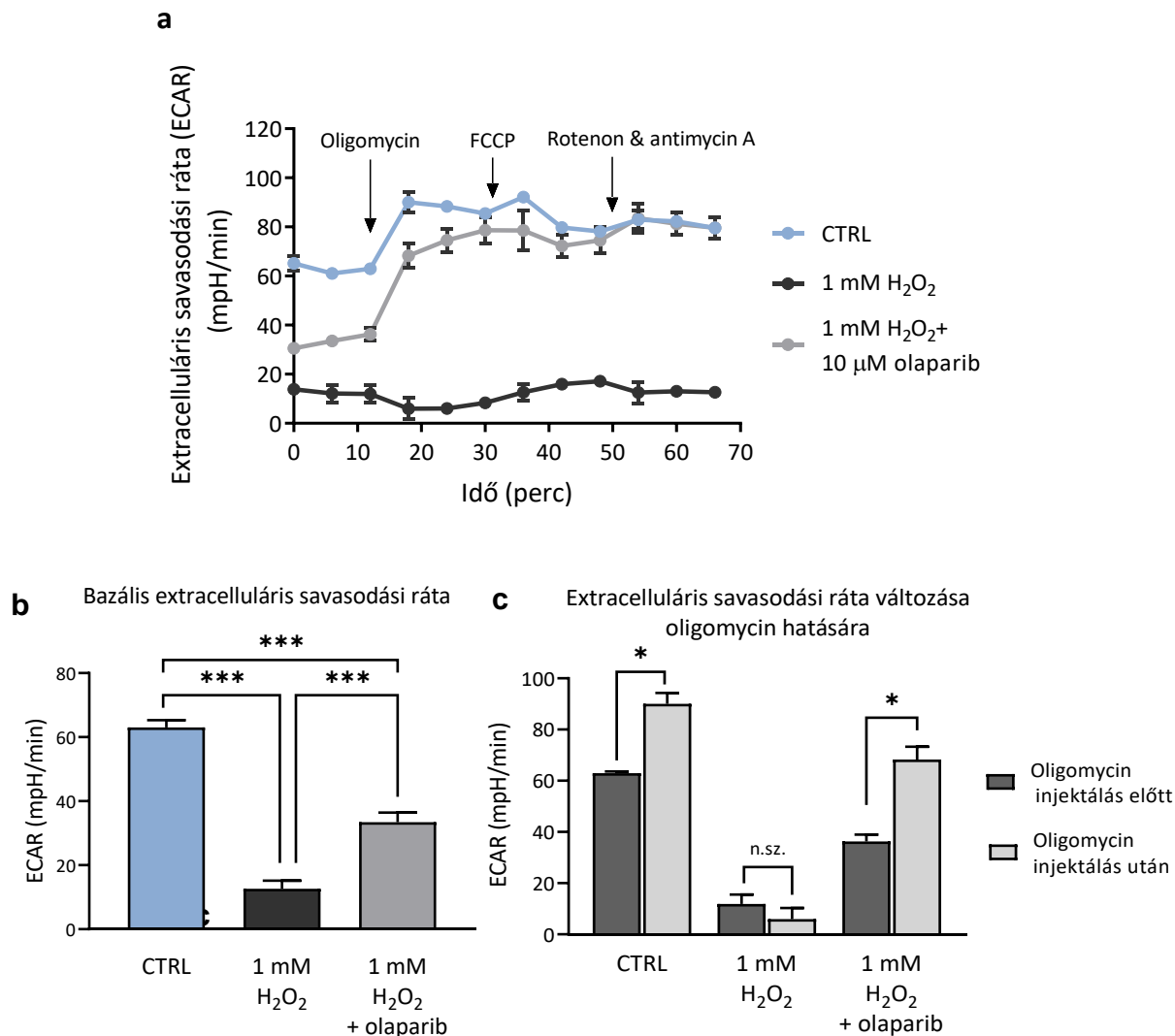
Az oszlopdiaagrammon kettő független kísérlet eredményének átlaga látható (n = 4/csoport). Átlag ± SD; n.sz.= nem szignifikáns, ***p < 0,001. Reprezentatív ábrák az egyes kezelésekre jellemző sejtpopulációkról (b).

4.2.4. Az olaparib metabolikus hatásai

4.2.4.1. 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 (Litvak és mtsai., 2018). Colitis ulcerosa-ban szenvedő betegek colonocytáinak vizsgálata során valóban megfigyelhető a butirát oxidációjának csökkenése, míg a sejtek glükózfelhasználása, valamint laktáttermelése fokozottá válik (Roediger, 1980). Ebből fakadóan, az extracelluláris savasodás mérésén keresztül vizsgáltuk H_2O_2 -dal kezelt Caco-2 sejtekben az olaparib glikolízisre gyakorolt hatását.

A 21/a ábrán láthatóak a 2 órás H_2O_2 kezelést követő extracelluláris savasodási sebesség görbék, továbbá a mérés során injektált respirációs gátlószerek és szétkapcsoló szerek hozzáadásának ideje. A mérés első 18 percében a sejtek alap extracelluláris savasodási rátájának mérése történt. Látható, hogy a H_2O_2 drasztikusan csökkentette az alap savasodási rátát, míg az olaparib szignifikáns mértékű emelkedést eredményezett (**21/b ábra**). A glikolitikus 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. A 21/a ábrán jól látható, hogy az oligomycin hatására mind a kontroll, mind a H_2O_2 + olaparib kezelt csoportokban erőteljesen megnő a savasodás sebessége, vagyis a sejtek képesek voltak a metabolikus átállásra. Az oligomycin hatására bekövetkező ECAR növekedés mindkét csoport esetében szignifikánsnak bizonyult (**21/c ábra**). 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 (**21/a,c ábra**).



21. ábra: Az olaparib hatása H₂O₂-dal kezelt Caco-2 sejtek glikolízisére

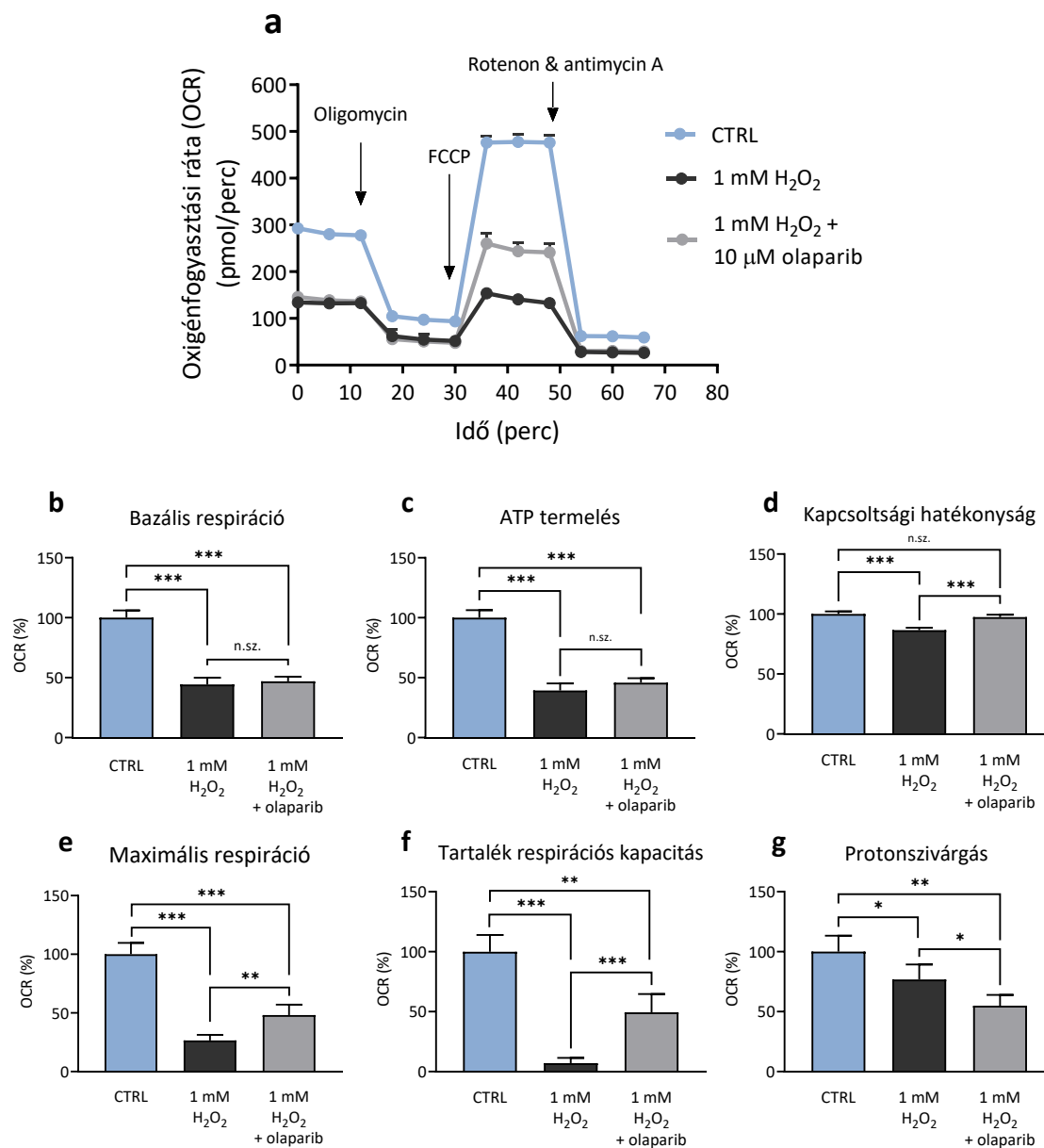
Caco-2 sejtek extracelluláris savasodási rátája oligomycin, FCCP és rotenon-antimycin A hozzáadására (a). Az ábrán három független kísérlet közül egynek az eredményei láthatóak (n = 2/csoport). Oligomycin injektálás előtti bazális savasodási ráta (b), az extracelluláris savasodás változása oligomycin hatására (c). Az ábrákon kettő független kísérlet eredményének átlagai láthatóak (n = 4/csoport). Átlag ± SD; n.sz.= nem szignifikáns, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

4.2.4.2. Az olaparib mitokondriális respirációra gyakorolt hatása

A colonocyták elsődleges energiaforrása a bakteriális fermentáció során termelt butirát, amely nélkülözhetetlen a barrier funkció fenntartásához (Parada Venegas és mtsai., 2019). A butirátból történő ATP termeléshez a mitokondriális légzési lánc és oxidatív foszforiláció intenzív működésére van szükség (Donohoe és mtsai., 2011). 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 (Gallyas Jr & Sumegi, 2020), az IBD-ben szenvedő betegeknél pedig megfigyelték a mitokondriális ROS emelkedett szintjét, valamint az elektronszállító lánc sérült szabályozását (Aviello & Knaus, 2017). 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 22/a ábrán látható görbék jelzik a kezelést követően a sejtek oxigénfogyasztását, a mérés teljes időtartama alatt, illetve a vizsgálat során alkalmazott respirációs gátlószerek és szétkapcsoló szerek injektálásának idejét, amely az egyes mitokondriális paraméterek **(22/b,c,d,e,f,g ábrák)** számítását teszi lehetővé. A mérés első 18 percében a sejtek alap oxigénfogyasztása került meghatározásra. A H_2O_2 kezelés 44%-ra csökkentette a sejtek bazális respirációját, amire az olaparib kezelés nem volt hatással **(22/b ábra)**. 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 **(22/c ábra)**. 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 **(22/d ábra)**. A következő lépés során alkalmazott 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%) **(22/e ábra)**. 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 **(22/f ábra)**. 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 **(22/g ábra)**.



22. ábra: Az olaparib mitokondriális respirációra gyakorolt hatása H₂O₂-dal kezelt Caco-2 sejtrétegen

Caco-2 sejtek oxigénfogyasztása oligomycin, FCCP és rotenon-antimycin A hozzáadására (a). Az ábrán három független kísérlet közül egynek az eredményei láthatóak (n = 2/csoport). Az (a) ábra oxigénfogyasztási értékei alapján kalkulált mitokondriális funkciót jellemző paraméterek: bazális respiráció (b), ATP termelésre fordított respiráció (c), kapcsoltsági hatékonyság (d), maximális respiráció (e), tartalék respirációs kapacitás (f), protonszivárgás (g). Az ábrákon kettő független kísérlet eredményének átlagai láthatóak (n = 4). Átlag ± SD; n.sz.= nem szignifikáns, *<p<0,05, **<p<0,01,***<p<0,001.

5. Eredmények megvitatása

5.1. *In vivo* eredmények

Bár a PARP-1 enzim farmakológiai gátlása, valamint a PARP-1 gén kiütése számos akut és krónikus gyulladással járó kórkép kísérletes modelljében védő hatásúnak bizonyult, a PARP inhibitorok klinikai vizsgálata eddig nem történt meg nem-onkológiai betegségek esetében. Munkánk során kísérletes bizonyítékokkal kívántunk hozzájárulni az eddig BRCA1/2 mutációt hordozó daganatok kezelésére használt, klinikailag elérhető olaparib alkalmazási lehetőségeinek kiszélesítéséhez, Crohn-betegségben történő kipróbálásához. Béres és munkatársai ugyanis fokozott PARP-1 mRNS expressziót mértek Crohn-betegek vastagbél nyálkahártyájának gyulladt szakaszain (Judit Béres és mtsai., 2018), ami hangsúlyozza a PARP enzim Crohn-betegség patogenezisében betöltött fontos szerepét. A Crohn-betegség kísérletes indukálásához a TNBS kezelést választottuk, ami jól modellezi a betegség tüneteit, hiszen egy Th1 típusú immunválaszt indít be, továbbá a bélfal összes rétegét érintő gyulladást eredményez (Silva és mtsai., 2019). Továbbá Crespo és munkatársai TNBS-el kezelt patkányok vastagbéljében fokozott PARP-1 fehérje expressziót mértek (Crespo és mtsai., 2012), ami különösen alkalmassá teszi a modellt a PARP gátlók hatásának tanulmányozására. A kísérleteink során alkalmazott TNBS dózis (4 mg/100 µl 30%-os etanol) egy közepesen súlyos, akut gyulladást idézett elő a vastagbélben, a mortalitás minimális volt. A szakirodalomban olvasható, különböző gyulladással járó modellekben alkalmazott olaparib dózisokat figyelembe véve, két olaparib koncentrációt teszteltünk: 20 és 50 mg/kg.

A kísérletes colitis legfőbb tünete a hasmenés és a drasztikus fogyás, ami a TNBS-indukálta szisztémás gyulladással, illetve a vastagbélbe történő direkt injektálásnak köszönhető (Antoniu és mtsai., 2016). Kísérleteinkben a TNBS jelentős testsúly csökkenést okozott, amely a 2. napon érte el a maximumot. Ezt a csökkenést az olaparib nem befolyásolta szignifikáns mértékben (**8. ábra**). Hozzá kell azonban tennünk, hogy az olaparib kezelés hatására tapasztaltunk egy dózisfüggő, javuló tendenciát, tehát feltételezzük, hogy az olaparibnak lehet pozitív hatása a testsúly csökkenésre. Patkányokon végzett TNBS modellben egy másik PARP inhibitor, az 1,5-dihidroxiizokinolin (1,5-DIQ) képes volt mérsékelni a fogyást (Sánchez-Fidalgo és mtsai., 2007). Miután az említett eredményt több állat (n=12) bevonásával kapták, az általunk tapasztalt tendencia alapján feltételezzük, hogy az elemszám növelésével esetleg olaparibbal is elérhető lenne az 1,5-DIQ használatával tapasztalt szignifikáns eredményt.

A Crohn-betegségben és a TNBS által előidézett colitisben jelentős mértékű ROS képződés tapasztalható a bélben, amely direkt módon, illetve a PARP enzim aktivációján keresztül is károsítja a szövetet (Jijon és mtsai., 2000; Tian és mtsai., 2017). A magasabb koncentrációjú olaparib (50 mg/kg) alkalmazásával a TNBS-indukálta makroszkópikus sérülések (**9. ábra**), ulcerek számának és méretének (**10/a,b ábrák**) szignifikáns csökkenését tapasztaltuk. A vastagbélgyulladás súlyosságának hisztopatológiai elemzése során a TNBS kezelés esetében a submucosa ödémás megvastagodását és kiterjedt fibrózist találtak (Antonίου és mtsai., 2016), mely eredményeket mi is megerősítettük. Szövettani vizsgálataink során az olaparib csökkentette a TNBS kezelés hatására bekövetkező submucosa vastagodást (**12. ábra**). Ez jól korrelál a makroszkópos kiértékelés során vizsgált bélfal vastagodás eredményével, miszerint az olaparib csökkentette a TNBS-indukálta ödémás bélfal vastagodást (**9. ábra**).

A reaktív oxigén származékok mellett a citokinek is döntő szerepet játszanak az IBD kialakulásában. Az anti- és proinflammatorikus citokinek egyensúlyának felborulása gyulladáshoz, a bélnyálkahártya barrier funkciójának károsodásához vezet (Dosh és mtsai., 2019). A lamina propria immunsejtjei által termelt TNF- α , IL-6 és IL-1 β szintjének emelkedése figyelhető meg IBD betegekben (Dosh és mtsai., 2019; Neurath, 2014), a PARP-1 enzim pedig többek között az NF- κ B transzkripció faktor koaktivátoraként részt vesz a gyulladással citokinek termelésében (P. Hassa & Hottiger, 2002). Modellünkben az olaparib általi PARP gátlás hatékonyan csökkentett a bélszövet IL-6 és IL-1 β szintjét (**13/a,b ábrák**). A TNF- α esetében mért csökkenés nem bizonyult szignifikánsnak, azonban érdemes megjegyezni, hogy az általunk végzett kísérletek során maga a TNBS kezelés sem eredményezett szignifikáns TNF- α emelkedést (**13/c ábra**). Santos és munkatársai az olaparib citokin termelésre gyakorolt hatását vizsgálták egészséges páciensek perifériás vér mononukleáris sejtjein (PBMC) lipopoliszacharid (LPS) kezelést követően. Eredményeinkkel ellentétben az olaparib szignifikánsan csökkentette a TNF- α szintjét, azonban az IL-6 esetében nem tapasztaltak ilyen hatást (Santos és mtsai., 2022). Egyéb betegségekkel (égési sérülés, akut tüdőkárosodás okozta neurokognitív zavar) kapcsolatos állatkísérletek során az olaparib eredményeinkhez hasonlóan képes volt csökkenteni az IL-6 és IL-1 β szintjét, azonban ezek mellett a TNF- α szintjét is (Ahmad és mtsai., 2018; Sahu és mtsai., 2020). A tapasztalt eltérések feltehetően az indukáló ágensek és a gyulladással modellek közötti különbségekből eredeztethetőek. A legjelentősebb gyulladáscsökkentő citokinnek tekinthető IL-10 több szempontból is összefüggésbe hozható a gyulladással bélbetegségekkel. Egyfelől az IL-10 gén expresszióját szabályozó promóter régióban található polimorfizmusok miatti

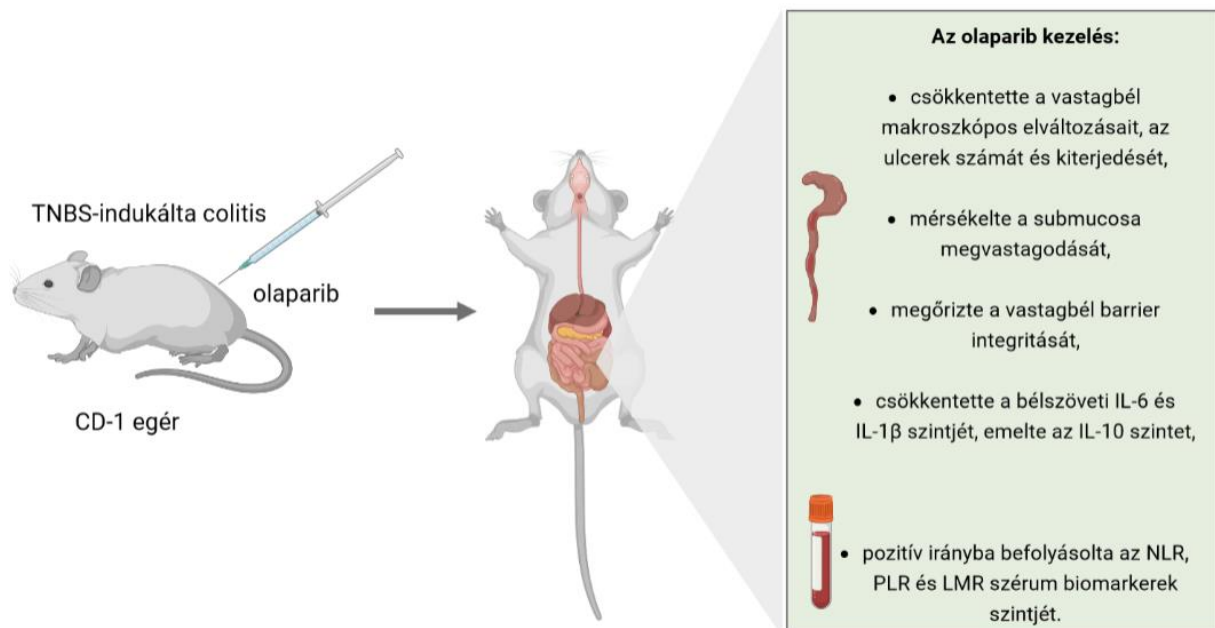
csökkent szérumban IL-10 szint kapcsolatba hozható a Crohn-betegség és colitis ulcerosa kialakulásával (Aithal és mtsai., 2001; A. H. Wang és mtsai., 2011). Másfelől az IL-10 gén kiütése egerekben spontán colitist eredményez 2-3 hónapos korukban, így ezek az IL-10^{-/-} állatok jól alkalmazhatóak az IBD modellezésére (H. Wang és mtsai., 2019). Kísérleteinkben a TNBS jelentős mértékű IL-10 csökkenést eredményezett a vastagbélben, amit az olaparib kezelés hatására szignifikáns mértékű emelkedés követett (**13/d ábra**), mely szintén hozzájárulhat a PARP gátló gyulladáscsökkentő hatásához. A kapott eredményt alátámasztja Chung és munkatársainak munkája, miszerint a 3-AB PARP inhibitor humán monocitákban fokozta az IL-10 termelődését (Chung és mtsai., 2007).

Az olaparib gyulladáscsökkentő hatásával kapcsolatban már születtek eredmények, azonban az IBD kialakulásában főszerepet játszó intesztinális epitel barrierre gyakorolt hatását *in vivo* nem vizsgálták. Miután a makroszkópos vizsgálatok során az olaparib figyelemre méltóan csökkentette a gyulladt sebek számát és kiterjedését, feltételeztük, hogy a gyulladáscsökkentő hatása nem kizárólag az immunsejtek által termelt pro- és antiinflammatorikus citokin szintek befolyásolásán keresztül valósul meg, hanem direkt hatást gyakorolhat az epitel sejtekre, az epitel barrier permeabilitására is. A kísérletes colitis indukálását etanolban oldott TNBS-el végeztük, ahol az etanol közvetlenül károsítja a bélhámsejteket, rontja a barrier funkciót, ezzel lehetővé téve a TNBS bélfalon történő átjutását, mely a gyulladás kialakulásáért felelős (Antonίου és mtsai., 2016). A bélpermeabilitás vizsgálatokor leggyakrabban nyelőcsőszonda segítségével juttatják be a szervezetbe a FITC-dextránt, majd meghatározzák a koncentrációját a vérplazmában. Állatkísérleteink során megfigyeltük, hogy a TNBS-el kezelt egyedek vastagbélének kezdeti szakaszán olyan nagy mennyiségű széklet halmozódik fel a kísérlet utolsó napján, hogy a gyomorba juttatott FITC-dextrán nem jut el a vizsgálni kívánt bélszakaszhoz. Ennek kiküszöbölése érdekében a festék intracolónális injektálása mellett döntöttünk (Tu és mtsai., 2020). A TNBS által nagymértékben megnövekedett permeabilitást az olaparib kezelés szignifikáns mértékben, kontroll közeli állapotra csökkentette (**11. ábra**), így elsőként sikerült bizonyítanunk az olaparib bélpermeabilitásra gyakorolt védő hatását.

Az IBD diagnosztikájában és a betegség aktivitásának monitorozására alkalmazott arany-standard endoszkópos vizsgálat mellett a vérvizsgálatokon alapuló markereket (C-reaktív protein, eritrocita ülepedési sebesség) is rutinszerűen használják a klinikai gyakorlatban, azonban alacsony specificitásuk révén nehéz segítségükkel a betegséget nyomkövetni, vagy akár a relapszus valószínűségét prognosztizálni. Az elmúlt években egyre inkább fókuszba került a limfocita-monocita arány (LMR), a neutrofil-monocita arány

(NMR), a trombocita-limfocita arány (PLR) és a neutrofil-limfocita arány (NLR) betegség aktivitás és gyógyszeres kezelés nyomonkövetésére történő felhasználása. Mérésük egyszerű, gyors és olcsó, hiszen egy rutin laborvizsgálat során nyert abszolút fehérvérsejt számok alapján kalkulálhatóak (He és mtsai., 2022). Feng és munkatársai Crohn-betegeknél szignifikánsan emelkedett NLR és PLR, valamint csökkent LMR értékeket mértek a kontroll páciensekhez képest, míg az NMR értékében nem találtak különbséget (Feng és mtsai., 2017). Ezek az arányok a kísérleteink során elvégzett TNBS kezelés hatására pontosan a Crohn-betegekhez hasonló módon változtak: az NLR és PLR arányszámok emelkedtek (**14/a,b ábrák**), míg az LMR szintje lecsökkent (**14/c ábra**). Bár a TNBS modell során bekövetkező szövettani és immunológiai változások jól ismertek, a fent említett prognosztikai mérőszámok vizsgálatát munkacsoportunk végezte először, ezzel még inkább megerősítve a modell alkalmasságát. Az olaparib kezelés szignifikánsan csökkentette az NLR és PLR szintjét (**14/a,b ábrák**), továbbá megnövelte az LMR szintet (**14/c ábra**). Jól ismert tény az is, hogy a szisztémás gyulladásos immunválasz során a perifériás neutrofilek száma megnő, míg a limfociták száma lecsökken, ami emelkedett NLR értéket eredményez (Langley és mtsai., 2021). Vizsgálataink során az abszolút sejtszámokat tekintve neutrofil emelkedést nem tapasztaltunk, azonban a TNBS kezelés a limfocita számot valóban csökkentette, míg az olaparib kezelés hatására ez a csökkenés kisebb mértékű volt (**2. táblázat**), ami egy jóval alacsonyabb NLR értéket eredményezett (**14/a ábra**). A magas NLR szint Crohn-betegekben jól korrelál a az oxidatív stressz mértékével (Eraldemir és mtsai., 2016), továbbá Crispino és munkatársai által végzett tanulmányban a magas NLR értékkel rendelkező Crohn-betegek sokkal kisebb eséllyel érték el a biológiai terápiát követő endoszkópos remissziót (Crispino és mtsai., 2021). Vizsgálataink alapján feltételezzük tehát, hogy az olaparib általi NLR szint csökkenés kisebb mértékű oxidatív stresszt jelenthet a kísérleti állataink szöveteiben is. A PLR és LMR arányszámok és a Crohn-betegség prognózisa közötti összefüggés még nem ismert, azonban a colitis ulcerosával kapcsolatban vannak eredmények. A PLR szintjének emelkedését a proinflammatorikus mediátorok forrásának is tekinthető trombociták abszolút számának növekedése, valamint a gyulladás következtében történő perifériás limfocita szám csökkenés eredményezi. A PLR alkalmasnak bizonyult a colitis ulcerosa enyhe és középsúlyos formáinak elkülönítésére, továbbá jól tükrözi a bélnyálkahártya állapotát (Jeong és mtsai., 2021). Colitis ulcerosás betegeknél a limfociták és monociták abszolút számából kalkulált LMR érték alacsony szintje endoszkópos aktivitásra utal (Ishida és mtsai., 2021). Esetükben a perifériás monocita szám is szignifikánsan magasabb és korrelál a betegség aktivitásával (Mee és mtsai., 1980). Olaparib kezelésünk szignifikánsan csökkentette a

perifériás monocita számot (**2. táblázat**), növelve ezzel az LMR értékét (**14/c ábra**). Ennek megfelelően, az olaparib alkalmazása mellett valóban enyhébb tüneteket és makroszkópos elváltozásokat tapasztaltunk a kezelt állatainkban.



23. ábra: Az olaparib TNBS-indukálta colitisre gyakorolt védő hatásának összefoglaló ábrája

5.2. *In vitro* eredmények

Állatkísérleteink során az olaparib kezelés jelentős védelmet nyújtott a vastagbél fokozott permeabilitása ellen, így a továbbiakban *in vitro* vizsgáltuk az olaparib epitél sejtek metabolizmusára és az epitél barrier funkcióra gyakorolt hatását.

A mucosát elérő aktivált immunsejtekre fokozott ROS termelés jellemző, így a Crohn-betegséget kísérő nyálkahártya károsodás kialakulásában döntő szerepet játszik az oxidatív stressz (Beltran és mtsai., 2010). A kontrollálatlan és tartós oxidatív stressz sejthalált, szövetkárosodást indukál, mely az intesztinális barrier funkció csökkenését eredményezi (Aviello & Knaus, 2017). Aktív Crohn-beteg perifériás immunsejtjeiben szignifikánsan magasabb a H₂O₂ termelés (Beltran és mtsai., 2010), colitis ulcerosás betegek ép és gyulladt nyálkahártyájában pedig szintén magas H₂O₂ szint mérhető (Santhanam és mtsai., 2007). A H₂O₂ a vastagbél hámsejtekben DNS károsodást idéz elő (Rosignoli és mtsai., 2001), ami a PARP-1 enzim aktivációját eredményezi (Nosseri és mtsai., 1994). Az intesztinális epitél barrier *in vitro* modellezésére használt Caco-2 egysejtrétegben az olaparib mindhárom célnzimjének (PARP-1,-2,-3) mRNS expresszióját megfigyeltük, közülük is a PARP-1 mRNS mennyisége volt a legmagasabb (**15. ábra**). A H₂O₂ Crohn-betegség

patomechanizmusában betöltött szerepe révén a Caco-2 egysejtréteg oxidatív károsodását magas koncentrációjú (1 mM) H₂O₂-dal idéztük elő. Bár a H₂O₂ alacsonyabb koncentrációkban (5-50 µM) is növeli a paracelluláris permeabilitást, sejtkárosodás csak millimólos koncentrációban érhető el vele (Rao, 2008). Impedancia alapú méréseink eredménye is ezt támasztotta alá, hiszen az alacsonyabb koncentrációk nem károsították a sejtréteg integritását, míg a magasabb, 1 mM-os dózis hatására a letapadt, életképes sejtekkel arányos Sejt Index érték nagymértékben lecsökkent (**16. ábra**). Ezt a csökkenést az olaparib szignifikánsan mérsékelte, vagyis megőrizte a Caco-2 monolayer integritását (**17. ábra**). Ugyanerre az eredményre jutottunk egy másik gátfunkció vizsgálatára alkalmas módszerrel is. A H₂O₂ hatására fokozódott a FITC-dextrán átjutása a Caco-2 egysejtrétegen, míg az olaparib kezelés esetében ez az átjutás erőteljesen mérséklődött (**18. ábra**). Az olaparib barrier integritásra kifejtett pozitív hatását vér-agy gát modell esetében már igazolták. Humán agyi mikrovaskuláris endotélsejtekből álló tenyészetben az olaparib az általunk is alkalmazott koncentrációban a tight junction fehérjéket kódoló gének expressziójának fokozásán keresztül képes a barrier védelmére (Rom és mtsai., 2015).

Az annexin V/7-AAD jelölésen alapuló flow citometriás méréseink alapján feltételezzük, hogy az általunk tapasztalt protektív hatás háttérében a Caco-2 sejtek életképességének megőrzése áll. Az 1 mM-os, 24 órás H₂O₂ kezelés drasztikus sejthalált eredményezett, míg az olaparib kezelés esetében a kontroll szinthez közeli maradt az élő sejtek aránya (**20. ábra**). A sejtréteg morfológiai vizsgálata során is megfigyeltük az olaparib védő hatását (**19. ábra**). A szakirodalmi adatok alapján a PARP-1 enzim sejthalálban betöltött aktív szerepe rendkívül sokrétű, mely nagyban függ a sejttípustól, a tenyésztési körülményektől, vagy akár az indukálószerstől. A nagymértékű oxidatív stressz a PARP-1 túlzott mértékű aktivációját, NAD⁺ depléciót, ebből fakadóan az ATP szintjének drasztikus csökkenését eredményezi (Bürkle & Virág, 2013). Virág és munkatársai bizonyították, hogy az így kialakult energiahiány végső kimenetele a nekrozis, illetve a PARP gátlás képes elnyomni a nekrozist, ezzel egy időben fokozni a szöveti szempontból előnyösebb apoptotikus útvonalat, tehát egyfajta molekuláris kapcsolóként működik a két sejthalál típus között. Annexin V/propidium-jodid jelölésen alapuló vizsgálattal kimutatták, hogy a peroxinitrit kezelés hatására egyaránt megtörténik az apoptózis korai eseményének tekinthető foszfatidil-szerin expozíció, valamint a nekrozis útján elhalt sejtekre jellemző plazmamembrán integritásának elvesztése is. A 3-AB általi PARP gátlás a nekrotikus annexin V(+)/PI(+) populációt az apoptotikus annexin V(+)/PI(-) populáció irányába toltá el (Virág és mtsai., 1998). Kísérleteink során a H₂O₂ is az annexin V(+)/7-AAD(+) sejtpopuláció növekedését

eredményezte, azonban az olaparib kezelés hatására nem emelkedett a korai apoptotikus sejtek aránya, nem történt meg az apoptózis irányába való eltolódás, hanem drasztikusan nőtt az élő sejtek aránya (**20. ábra**). Eredményeink alapján úgy véljük, hogy a vastagbél epitél sejtek az olaparib közvetlen célpontjai lehetnek, és a barrier integritás védelme kulcsfontosságú része az állatkísérletek során tapasztalt antiinflammatorikus hatásnak.

Az intesztinális epitél barrier integritásának fenntartása egy rendkívül energiaigényes folyamat, így a mitokondriumok elégtelen működése nagy kockázatot jelent a gát épségére nézve. Ma már egyre több kutatás bizonyítja, hogy a mitokondriális diszfunkció kulcsfontosságú tényező az IBD kialakulásában (Goudie és mtsai., 2022; Özsoy és mtsai., 2022; Rath & Haller, 2022). A barrieret alkotó colonocyták elsődlegesen a bélbaktériumok fermentációja során képződött rövid szénláncú zsírsavakból, legfőképpen butirátból nyerik energiájukat az oxidatív foszforiláción keresztül (Hamer H és mtsai., 2008). Crohn-betegek vastagbelében megfigyelhető a légzési lánc komplexeinek csökkent expressziója (Schneider és mtsai., 2022), a glikolízis több enzimjének (aldoláz-A, foszfoglicerát-mutáz, enoláz, piruvát-kináz) fokozott expressziója (Vermeulen és mtsai., 2011), továbbá az aktív fázisban lévő Crohn-betegek szérum laktát szintje is szignifikánsan magasabb (Cai és mtsai., 2019). Mindez alátámasztja azt a tényt, miszerint a gyulladás során az epitél sejtek az ATP-t az oxidatív foszforiláció helyett az intenzív laktát termeléssel járó glikolízisen keresztül termelik (Litvak és mtsai., 2018; Rath & Haller, 2022). Mindemellett a gyulladásos bélbetegségben szenvedőknél fokozott ROS termelés figyelhető meg a mitokondriális elektrontranszport lánc elégtelen működéséből fakadóan (Aviello & Knaus, 2017), s a fennálló oxidatív stressz során aktiválódó PARP-1 súlyos mitokondriális diszfunkciót eredményez (Virág és mtsai., 1998). Továbbá a PARP aktiváció a hexokináz-1-en keresztül gátolja a glikolízist is (Fouquerel és mtsai., 2014). A nagymértékű PARP aktiváció miatt a sejtek képtelenek lesznek metabolizmusukat átkapcsolni és a glikolízisen keresztül energiát termelni. Ez a nyálkahártya további sérüléséhez, a barrier funkció gyengüléséhez vezethet. A Caco-2 monolayer metabolizmusának vizsgálata során egyidőben mértük a sejtek extracelluláris savasodási rátáját (ECAR), melyből a glikolízisről (laktát képződés) nyerhető információ, illetve az oxigénfogyasztási rátát (OCR), ami az oxidatív foszforiláció vizsgálatát teszi lehetővé. A kontroll sejteket egyaránt erőteljes glikolízis és oxidatív foszforiláció jellemezte, a bazális ECAR (**21/b ábra**) és OCR (**22/b ábra**) értékek is magasnak bizonyultak. Az 1 mM H₂O₂-dal kiváltott oxidatív stressz drasztikusan csökkentette a bazális ECAR mértékét, azaz a glikolízis intenzitását. Ezzel szemben az olaparib kezelés mellett már a sejtek alap glikolitikus aktivitása is szignifikánsan magasabbnak bizonyult (**21/b ábra**). A mérés során elsőként oligomycinnel

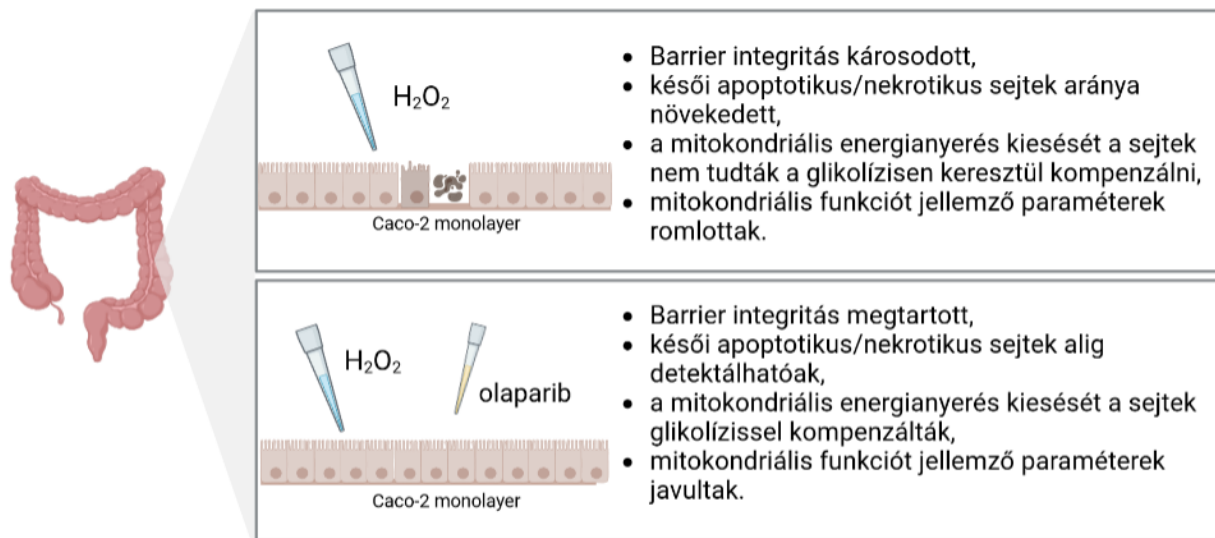
gátoltuk az oxidatív foszforilációt, ami nem okozott emelkedést a H₂O₂-dal kezelt sejtek ECAR értékében (**21/c ábra**), azaz a sejtek képtelenek voltak átállni a glikolízisen keresztüli energianyérésre. Andrabi és munkatársai bizonyították, hogy a PARP aktiváció során képződött PAR polimer közvetlenül gátolja a hexokinázt (Andrabi és mtsai., 2014), így feltételezzük, hogy eredményeink háttérében a H₂O₂ hatására aktiválódott PARP-1 általi hexokináz-1 represszió állhat, hiszen az olaparib kezelés esetében intenzív savasodást tapasztaltunk. Mindez arra enged következtetni, hogy a PARP enzim gátlásával az oxidatív foszforiláció kiesése mellett a sejtek képesek voltak egy metabolikus átállásra, azaz döntően a glikolízisen keresztüli ATP termelésre. Nem zárható ki azonban, hogy a csökkent glikolitikus aktivitás esetlegesen a H₂O₂ közvetlen, a glikolízis enzimeit károsító hatásának is köszönhető. A mérés során az oligomycin injektálás után FCCP (mitokondriális szétkapcsoló szer), majd rotenon és antimycin A (Komplex I és III gátlók) keverékének hozzáadásával a mitokondriális energiatermelést teljesen megszüntettük, tehát a sejtek egyetlen lehetősége az ATP szintézisre a glikolízis maradt. Mivel a H₂O₂ + olaparib kezelt sejtek savasodási rátája kontroll közeli értékre tudott emelkedni (**21/a ábra**), arra következtetünk, hogy a glikolitikus blokk elsősorban nem a H₂O₂ direkt károsító hatásának, hanem a túlzott mértékű PARP aktivációnak köszönhető, amit az olaparib sikeresen megakadályozott.

Fontos kiemelni, hogy a hexokináz által katalizált reakció során képződő glükóz-6-foszfát a szénhidrát anyagcsere egyik kulcsfontosságú intermediere. A pentóz-foszfát-út prekurzoraként részt vesz a nukleotidok és nukleinsavak szintéziséhez szükséges ribóz-5-foszfát termelésében, így a gyorsan osztódó colonocytákban ez az útvonal kitüntetett jelentőséggel bír. Továbbá ezen keresztül termelődik a legfőbb antioxidáns redukált glutation (GSH) szintjének fenntartásához nélkülözhetetlen NADPH is (Butler és mtsai., 1990). MNNG által kiváltott PARP aktiváció hatására a NADPH és GSH szintje is lecsökkent, amit a DPQ PARP inhibitor hatékonyan megakadályozott a hexokináz aktivitásának fokozásán keresztül (Andrabi és mtsai., 2014). Mivel az olaparib kezelés mellett fokozott glikolitikus aktivitást tapasztaltunk (**21. ábra**), feltételezzük, hogy a hexokináz működésének biztosításán keresztül a sejtek képesek megtermelni a pentóz-foszfát-útvonalhoz szükséges glükóz-6-foszfátot, ezzel támogatva az antioxidáns védelmi rendszer fenntartását is.

Az oxigénfogyasztási ráta alapján történő mitokondriális funkció vizsgálata során az 1 mM-os H₂O₂ drasztikus csökkenést eredményezett a sejtek bazális respirációjában, mely paraméter esetében az olaparib nem eredményezett javulást (**22/b ábra**). A bazális OCR és ECAR értékek együttes elemzése alapján kirajzolódik a sejtek metabolikus fenotípusa. A H₂O₂-dal kezelt sejtekben a mitokondriális respiráció és a glikolízis is limitált, míg az

olaparib kezelt sejtekben bár az oxidatív foszforiláció szintén alacsony intenzitású, a glikolízis fokozott mértékű. Az olaparib kezelés két fontos paraméter esetében szignifikáns javulást eredményezett: maximális respiráció és tartalék respirációs kapacitás. Az FCCP ionofór hatására a mitokondriális belső membrán protonáteresztő képessége megnő, a membránpotenciál lecsökken, ekkor az elektrontranszfert, oxigénfogyasztást már nem gátolhatja a protongrádiens, így mérhetővé válik a maximális oxigénfogyasztás. A maximális és bazális respiráció közötti különbségből kalkulálható a tartalék légzési kapacitás, ami megmutatja, hogy megnövekedett energiaigény esetén milyen mértékű ATP termelésre képes a sejt az oxidatív foszforiláción keresztül (Hill és mtsai., 2012). A H₂O₂ kezelés esetében mind a maximális, mind a tartalék respirációs kapacitás alacsonynak bizonyult, azonban az olaparib kezelés mellett ez a csökkenés jóval kisebb mértékű volt (**22/e,f ábrák**). Ezt a két paramétert elsősorban a szubsztrát elérhetősége, illetve a légzési lánc komplexeinek aktivitása határozza meg. MNNG-vel (DNS alkilálószer) kiváltott PARP aktiváció esetében szintén csökkent a sejtek bazális és maximális respirációja, továbbá az ATP szintézis, valamint a glikolízis intenzitása is, míg a DPQ (PARP inhibitor) mindegyik paraméter esetében pozitív változást eredményezett. Piruvát hozzáadásával a PARP aktiváció általi mitokondriális funkció csökkenés megakadályozható volt, ami arra enged következtetni, hogy a mitokondriális diszfunkció a glikolízis közvetlen gátlása miatt alakult ki, hiszen a végtermék piruvát hiányában csökken a citrátkör fluxusa, limitálttá válik a NADH termelés, ami akadályozza a terminális oxidációt és oxidatív foszforilációt (Andrabi és mtsai., 2014). Mivel kísérleteink során az olaparib kezelés esetében fokozott savasodást mértünk (**21. ábra**), úgy véljük az olaparib elsősorban a glikolízis gátlásának feloldásán keresztül fokozta az energiatermelést. Az MNNG által kiváltott PARP aktiváció esetében is csökkent a sejtek bazális respirációja, azonban eredményeinkkel ellentétben a DPQ PARP inhibitor képes volt ezt fokozni (Andrabi és mtsai., 2014). Feltételezzük, hogy a tapasztalt ellentmondás az eltérő PARP indukálószernek köszönhető. Az MNNG közvetlenül a DNS károsításán keresztül eredményez PARP aktivációt, míg az általunk alkalmazott H₂O₂ a DNS-en kívül a citrátkör és légzési lánc enzimeit is károsíthatta (Tretter & Adam-Vizi, 2000; Y. Zhang és mtsai., 1990). A bazális savasodás nem csupán az anaerob glikolízis során történő laktát termelésből fakad, hanem a citrátkörben képződő CO₂ oldódásával keletkezett H₂CO₃, majd annak disszociációja (HCO₃⁻ + H⁺) is hozzájárul a savasodáshoz (Mookerjee és mtsai., 2015). Mivel az olaparib kezelés esetében a bazális savasodás szignifikánsan magasabbnak bizonyult, azonban nem érte el a kontroll szintet (**21/b ábra**), a bazális oxigénfogyasztás pedig nem bizonyult magasabbnak (**22/b ábra**), feltételezhetjük, hogy a H₂O₂ direkt károsította a citrátköri

enzimeket. Mindez csökkenti a légzési lánc szubsztrátjainak elérhetőségét, ami a bazális oxigénfogyasztási ráta csökkenésében nyilvánulhat meg. Tretter és munkatársai kimutatták, hogy a magasabb koncentrációjú H_2O_2 az α -ketoglutarát-dehidrogenáz komplex gátlásán keresztül csökkenti az elérhető NADH mennyiségét a légzési lánc számára (Tretter & Adam-Vizi, 2000). Kísérleteink során a H_2O_2 kezelt csoportban a sejtek maximális respirációja és tartalék respirációs kapacitása is rendkívül alacsonynak bizonyult (**22/e,f ábrák**), amit a légzési lánc komplexek integritásának csökkenése eredményezhet. Kimutatták, hogy az elektrontranszport lánc bizonyos tagjai (Komplex III és IV, F_0 - F_1 -ATP-szintáz) direkt targetjei a PARP-1 enzim által irányított PARilációnak, mely károsítja az elektronok vándorlását (Lai és mtsai., 2008). Ez alapján az olaparib hatására megnövekedett maximális respiráció és tartalék respirációs kapacitás nem csupán a glikolízis megtartott működéséből fakadhat, hanem gátolhatja a légzési lánc fehérjéinek poszttranszlációs módosítását, ezzel biztosítva az elektrontranszportot.



24. ábra: Az olaparib H_2O_2 -dal kezelt Caco-2 sejtrétegre gyakorolt protektív hatásának összefoglaló ábrája

6. 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.

7. Irodalomjegyzék

Ádám, V. (2002). *Orvosi biokémia*. Medicina.

Ahmad, A., Olah, G., Herndon, D. N., & Szabo, C. (2018). The clinically used PARP inhibitor olaparib improves organ function, suppresses inflammatory responses and accelerates wound healing in a murine model of third-degree burn injury. *British Journal of Pharmacology*, *175*(2), 232–245.

Aithal, G. P., Craggs, A., Day, C. P., Welfare, M., Daly, A. K., Mansfield, J. C., & Hudson, M. (2001). Role of polymorphisms in the interleukin-10 gene in determining disease susceptibility and phenotype in inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences*, *46*(7), 1520–1525.

Alemasova, E. E., & Lavrik, O. I. (2019). Poly (ADP-ribosyl) ation by PARP1: Reaction mechanism and regulatory proteins. *Nucleic acids research*, *47*(8), 3811–3827.

Almalouf, P., Shehab, T. M., Daniel, A., Robinson, E. A., & Barnett, J. L. (2008). Therapeutic hydrogen peroxide enema causing severe acute colitis. *International journal of colorectal disease*, *23*(11), 1139–1140.

Aly, A., & Ganesan, S. (2011). BRCA1, PARP, and 53BP1: Conditional synthetic lethality and synthetic viability. *Journal of molecular cell biology*, *3*(1), 66–74.

Amé, J., Spenlehauer, C., & de Murcia, G. (2004). The PARP superfamily. *Bioessays*, *26*(8), 882–893.

Andrabi, S. A., Umanah, G. K., Chang, C., Stevens, D. A., Karuppagounder, S. S., Gagné, J.-P., Poirier, G. G., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2014). Poly (ADP-ribose) polymerase-dependent energy depletion occurs through inhibition of glycolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(28), 10209–10214.

- Andreone, T. L., O'Connor, M., Denenberg, A., Hake, P. W., & Zingarelli, B. (2003). Poly (ADP-ribose) polymerase-1 regulates activation of activator protein-1 in murine fibroblasts. *The Journal of Immunology*, *170*(4), 2113–2120.
- Antoniou, E., Margonis, G. A., Angelou, A., Pikouli, A., Argiri, P., Karavokyros, I., Papalois, A., & Pikoulis, E. (2016). The TNBS-induced colitis animal model: An overview. *Annals of medicine and surgery*, *11*, 9–15.
- Aviello, G., & Knaus, U. (2017). ROS in gastrointestinal inflammation: Rescue or sabotage? *British journal of pharmacology*, *174*(12), 1704–1718.
- Bai, P. (2015). Biology of poly (ADP-ribose) polymerases: The factotums of cell maintenance. *Molecular cell*, *58*(6), 947–958.
- Bai, P., & Virág, L. (2012). Role of poly (ADP-ribose) polymerases in the regulation of inflammatory processes. *FEBS letters*, *586*(21), 3771–3777.
- Barkauskaite, E., Brassington, A., Tan, E. S., Warwicker, J., Dunstan, M. S., Banos, B., Lafite, P., Ahel, M., Mitchison, T. J., & Ahel, I. (2013). Visualization of poly (ADP-ribose) bound to PARG reveals inherent balance between exo-and endo-glycohydrolase activities. *Nature communications*, *4*(1), 1–8.
- Bauer, P. I., Farkas, G., Buday, L., Mikala, G., Meszaros, G., Kun, E., & Farago, A. (1992). Inhibition of DNA binding by the phosphorylation of poly ADP-ribose polymerase protein catalysed by protein kinase C. *Biochemical and biophysical research communications*, *187*(2), 730–736.
- Beltran, B., Nos, P., Dasí, F., Iborra, M., Bastida, G., Martínez, M., O'Connor, J.-E., Saez, G., Moret, I., & Ponce, J. (2010). Mitochondrial dysfunction, persistent oxidative damage, and catalase inhibition in immune cells of naive and treated Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*, *16*(1), 76–86.

- Berger, N. A. (1985). Poly (ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiation research*, 101(1), 4–15.
- Berger, N. A., Besson, V. C., Boulares, A. H., Bürkle, A., Chiarugi, A., Clark, R. S., Curtin, N. J., Cuzzocrea, S., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2018). Opportunities for the repurposing of PARP inhibitors for the therapy of non-oncological diseases. *British journal of pharmacology*, 175(2), 192–222.
- Blander, J. M. (2018). On cell death in the intestinal epithelium and its impact on gut homeostasis. *Current opinion in gastroenterology*, 34(6), 413.
- Bork, P., Hofmann, K., Bucher, P., Neuwald, A. F., Altschul, S. F., & Koonin, E. V. (1997). A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *The FASEB Journal*, 11(1), 68–76.
- Bourgonje, A. R., Feelisch, M., Faber, K. N., Pasch, A., Dijkstra, G., & van Goor, H. (2020). Oxidative stress and redox-modulating therapeutics in inflammatory bowel disease. *Trends in Molecular Medicine*, 26(11), 1034–1046.
- Brand, K. A., & Hermfisse, U. (1997). Aerobic glycolysis by proliferating cells: A protective strategy against reactive oxygen species 1. *The FASEB journal*, 11(5), 388–395.
- Brand, S. (2009). Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: New immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut*, 58(8), 1152–1167.
- Bryant, H. E., Schultz, N., Thomas, H. D., Parker, K. M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N. J., & Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. *Nature*, 434(7035), 913–917.

- Bultman, S. J. (2016). Butyrate consumption of differentiated colonocytes in the upper crypt promotes homeostatic proliferation of stem and progenitor cells near the crypt base. *Translational cancer research*, 5(Suppl 3), S526.
- Butler, R., Arora, K., Collins, J., Flanigan, I., Lawson, M., Roberts-Thomson, I., & Williams, J. (1990). Pentose phosphate pathway in rat colonic epithelium. *Biochemistry International*, 22(2), 249–260.
- Bürkle, A., & Virág, L. (2013). Poly (adp-ribose): Paradigms and paradoxes. *Molecular aspects of medicine*, 34(6), 1046–1065.
- Cai, J., Chen, H., Weng, M., Jiang, S., & Gao, J. (2019). Diagnostic and clinical significance of serum levels of D-lactate and diamine oxidase in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology Research and Practice*, 2019.
- Cantó, C., Menzies, K. J., & Auwerx, J. (2015). NAD⁺ metabolism and the control of energy homeostasis: A balancing act between mitochondria and the nucleus. *Cell metabolism*, 22(1), 31–53.
- Carson, D., Barry, R., Hopkins, E. G., Roumeliotis, T. I., García-Weber, D., Mullineaux-Sanders, C., Elinav, E., Arriemerlou, C., Choudhary, J. S., & Frankel, G. (2020). *Citrobacter rodentium* induces rapid and unique metabolic and inflammatory responses in mice suffering from severe disease. *Cellular microbiology*, 22(1), e13126.
- Catana, C. S., Magdas, C., Tabaran, F. A., Craciun, E. C., Deak, G., Magdas, V. A., Cozma, V., Gherman, C. M., Berindan-Neagoe, I., & Dumitrascu, D. L. (2018). Comparison of two models of inflammatory bowel disease in rats. *Adv Clin Exp Med*, 27(5), 599–607.
- Chung, E., Liu, J., Zhang, Y., & Ma, X. (2007). Differential expression in lupus-associated IL-10 promoter single-nucleotide polymorphisms is mediated by poly (ADP-ribose) polymerase-1. *Genes & Immunity*, 8(7), 577–589.

- Cohen-Armon, M. (2007). PARP-1 activation in the ERK signaling pathway. *Trends in pharmacological sciences*, 28(11), 556–560.
- Collins, A. (1987). Cellular responses to ionizing radiation: Effects of interrupting DNA repair with chemical agents. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 51(6), 971–983.
- Crespo, I., San-Miguel, B., Prause, C., Marroni, N., Cuevas, M. J., González-Gallego, J., & Tuñón, M. J. (2012). Glutamine treatment attenuates endoplasmic reticulum stress and apoptosis in TNBS-induced colitis. *PloS one*, 7(11), e50407.
- Crispino, F., Grova, M., Maida, M., Renna, S., Mocciaro, F., Casà, A., Rizzuto, G., Tesè, L., Scimeca, D., & Di Mitri, R. (2021). Blood-based prognostic biomarkers in Crohn's disease patients on biologics: A promising tool to predict endoscopic outcomes. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 21(8), 1133–1141.
- Curtin, N. J., & Szabo, C. (2013). Therapeutic applications of PARP inhibitors: Anticancer therapy and beyond. *Molecular aspects of medicine*, 34(6), 1217–1256.
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., & Poirier, G. G. (1999). Poly (ADP-ribosyl) ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochemical Journal*, 342(2), 249–268.
- Davis, K., Banerjee, S., Friggeri, A., Bell, C., Abraham, E., & Zerfaoui, M. (2012). Poly (ADP-ribosyl) ation of high mobility group box 1 (HMGB1) protein enhances inhibition of efferocytosis. *Molecular medicine*, 18(3), 359–369.
- de Groof, E. J., Carbonnel, F., Buskens, C. J., & Bemelman, W. A. (2014). Abdominal abscess in Crohn's disease: Multidisciplinary management. *Digestive Diseases*, 32(Suppl. 1), 103–109.
- Decker, P., Isenberg, D., & Muller, S. (2000). Inhibition of caspase-3-mediated poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) apoptotic cleavage by human PARP autoantibodies and

- effect on cells undergoing apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 9043–9046.
- Deeks, E. D. (2015). Olaparib: First global approval. *Drugs*, 75(2), 231–240.
- Donohoe, D. R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O’Connell, T. M., Bunger, M. K., & Bultman, S. J. (2011). The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell metabolism*, 13(5), 517–526.
- Dosh, R. H., Jordan-Mahy, N., Sammon, C., & Le Maitre, C. (2019). Interleukin 1 is a key driver of inflammatory bowel disease-demonstration in a murine IL-1Ra knockout model. *Oncotarget*, 10(37), 3559.
- Eraldemir, F., Musul, M., Duman, A., Oztas, B., Baydemir, C., & Hulagu, S. (2016). The relationship between neutrophil/lymphocyte and platelet/lymphocyte ratios with oxidative stress in active Crohn’s disease patients. *Hippokratia*, 20(4), 368.
- Esworthy, R. S., Aranda, R., Martín, M. G., Doroshov, J. H., Binder, S. W., & Chu, F.-F. (2001). Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 281(3), G848–G855.
- Farmer, H., McCabe, N., Lord, C. J., Tutt, A. N., Johnson, D. A., Richardson, T. B., Santarosa, M., Dillon, K. J., Hickson, I., & Knights, C. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 434(7035), 917–921.
- Fatokun, A. A., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2014). Parthanatos: Mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *British journal of pharmacology*, 171(8), 2000–2016.

- Feng, J.-R., Qiu, X., Wang, F., Chen, P.-F., Gao, Q., Peng, Y.-N., Lin, X., Liu, Q., Liu, J., & Zhao, Q. (2017). Diagnostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio in Crohn's disease. *Gastroenterology research and practice*, 2017.
- Fouquerel, E., Goellner, E. M., Yu, Z., Gagné, J.-P., de Moura, M. B., Feinstein, T., Wheeler, D., Redpath, P., Li, J., & Romero, G. (2014). ARTD1/PARP1 negatively regulates glycolysis by inhibiting hexokinase 1 independent of NAD⁺ depletion. *Cell reports*, 8(6), 1819–1831.
- Gajendran, M., Loganathan, P., Catinella, A. P., & Hashash, J. G. (2018). A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Disease-a-month*, 64(2), 20–57.
- Gajendran, M., Loganathan, P., Jimenez, G., Catinella, A. P., Ng, N., Umaphathy, C., Ziade, N., & Hashash, J. G. (2019). A comprehensive review and update on ulcerative colitis. *Disease-a-month*, 65(12), 100851.
- Gallyas Jr, F., & Sumegi, B. (2020). Mitochondrial protection by parp inhibition. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 2767.
- Gariani, K., Ryu, D., Menzies, K. J., Yi, H.-S., Stein, S., Zhang, H., Perino, A., Lemos, V., Katsyuba, E., & Jha, P. (2017). Inhibiting poly ADP-ribosylation increases fatty acid oxidation and protects against fatty liver disease. *Journal of hepatology*, 66(1), 132–141.
- Gasche, C. (2000). Complications of inflammatory bowel disease. *Hepato-gastroenterology*, 47(31), 49–56.
- Goudie, L., Mancini, N. L., Shutt, T. E., Holloway, G. P., Mu, C., Wang, A., McKay, D. M., & Shearer, J. (2022). Impact of experimental colitis on mitochondrial bioenergetics in intestinal epithelial cells. *Scientific reports*, 12(1), 1–12.
- Gouloze, S. C., Cohen, A. F., & Rissmann, R. (2016). Olaparib. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 81(1), 171–173.

- Groschwitz, K. R., & Hogan, S. P. (2009). Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *Journal of allergy and clinical immunology*, 124(1), 3–20.
- Guan, Q. (2019). A comprehensive review and update on the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Journal of Immunology Research*, 2019.
- Gunji, A., Uemura, A., Tsutsumi, M., Nozaki, T., Kusuoka, O., Omura, K., Suzuki, H., Nakagama, H., Sugimura, T., & Masutani, M. (2006). Parp-1 deficiency does not increase the frequency of tumors in the oral cavity and esophagus of ICR/129Sv mice by 4-nitroquinoline 1-oxide, a carcinogen producing bulky adducts. *Cancer letters*, 241(1), 87–92.
- Hadrava Vanova, K., Kraus, M., Neuzil, J., & Rohlena, J. (2020). Mitochondrial complex II and reactive oxygen species in disease and therapy. *Redox Report*, 25(1), 26–32.
- Hamer H, J. D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F., & Brummer, R. (2008). Review article: The role of butyrate on colonic function. *Aliment. Pharmacol. Ther*, 27, 104–119.
- Hassa, P., & Hottiger, M. (2002). The functional role of poly (ADP-ribose) polymerase 1 as novel coactivator of NF- κ B in inflammatory disorders. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(9), 1534–1553.
- Hassa, P. O., Haenni, S. S., Buerki, C., Meier, N. I., Lane, W. S., Owen, H., Gersbach, M., Imhof, R., & Hottiger, M. O. (2005). Acetylation of poly (ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF- κ B-dependent transcription. *Journal of biological chemistry*, 280(49), 40450–40464.
- He, C., Zhou, Z., Zhang, Y., Yang, X., Pan, Y., Li, L., & Gao, C. (2022). Clinical significance of novel neutrophil-based biomarkers in the diagnosis and prediction of response to infliximab therapy in Crohn’s disease. *Frontiers in Immunology*, 891.

- Hegedűs, C., & Virág, L. (2014). Inputs and outputs of poly (ADP-ribose) polymerase: Relevance to oxidative stress. *Redox biology*, 2, 978–982.
- Hill, B. G., Benavides, G. A., Lancaster, J. R., Ballinger, S., Dell'Italia, L., Zhang, J., & Darley-Usmar, V. M. (2012). Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. *Biological chemistry*, 393(12), 1485–1512.
- Ho, G., & Theiss, A. L. (2022). Mitochondria and inflammatory bowel diseases: Toward a stratified therapeutic intervention. *Annual review of physiology*, 84, 435.
- Hsieh, S., Shih, T., Yeh, C., Lin, C., Chou, Y., & Lee, Y. (2006). Comparative proteomic studies on the pathogenesis of human ulcerative colitis. *Proteomics*, 6(19), 5322–5331.
- Ishida, N., Takahashi, S., Asai, Y., Miyazu, T., Tamura, S., Tani, S., Yamada, M., Iwaizumi, M., Hamaya, Y., & Osawa, S. (2021). Lymphocyte-to-Monocyte Ratio as a Marker for Endoscopic Activity in Ulcerative Colitis. *Immuno*, 1(4), 360–368.
- Ito, S., Murphy, C. G., Doubrovina, E., Jasin, M., & Moynahan, M. E. (2016). PARP inhibitors in clinical use induce genomic instability in normal human cells. *PloS one*, 11(7), e0159341.
- Jeong, Y., Jeon, S. R., Kim, H. G., Moon, J. R., Lee, T. H., Jang, J. Y., Cho, J.-H., Park, J. S., Park, H., & Lee, K. (2021). The role of platelet to lymphocyte ratio and neutrophil to lymphocyte ratio in ulcerative colitis. *Intestinal research*, 19(1), 62.
- Jijon, H. B., Churchill, T., Malfair, D., Wessler, A., Jewell, L. D., Parsons, H. G., & Madsen, K. L. (2000). Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase attenuates inflammation in a model of chronic colitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279(3), G641–G651.
- Jones, W., & Bianchi, K. (2015). Aerobic glycolysis: Beyond proliferation. *Frontiers in immunology*, 6, 227.

- Juarez-Salinas, H., Sims, J. L., & Jacobson, M. K. (1979). Poly (ADP-ribose) levels in carcinogen-treated cells. *Nature*, 282(5740), 740–741.
- Kaczmarczyk, O., Dąbek-Drobny, A., Woźniakiewicz, M., Paśko, P., Dobrowolska-Iwanek, J., Woźniakiewicz, A., Piątek-Guziewicz, A., Zagrodzki, P., Mach, T., & Zwolińska-Wcisło, M. (2021). Fecal levels of lactic, succinic and short-chain fatty acids in patients with ulcerative colitis and crohn disease: A pilot study. *Journal of Clinical Medicine*, 10(20), 4701.
- Kameyama, J.-I., Narui, H., Inui, M., & Sato, T. (1984). Energy level in large intestinal mucosa in patients with ulcerative colitis. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 143(2), 253–254.
- Ke, Y., Wang, C., Zhang, J., Zhong, X., Wang, R., Zeng, X., & Ba, X. (2019). The role of PARPs in inflammation—And metabolic—Related diseases: Molecular mechanisms and beyond. *Cells*, 8(9), 1047.
- Krietsch, J., Rouleau, M., Pic, É., Ethier, C., Dawson, T. M., Dawson, V. L., Masson, J.-Y., Poirier, G. G., & Gagné, J.-P. (2013). Reprogramming cellular events by poly (ADP-ribose)-binding proteins. *Molecular aspects of medicine*, 34(6), 1066–1087.
- Lai, Y., Chen, Y., Watkins, S. C., Nathaniel, P. D., Guo, F., Kochanek, P. M., Jenkins, L. W., Szabó, C., & Clark, R. S. (2008). Identification of poly-ADP-ribosylated mitochondrial proteins after traumatic brain injury. *Journal of neurochemistry*, 104(6), 1700–1711.
- Langley, B. O., Guedry, S. E., Goldenberg, J. Z., Hanes, D. A., Beardsley, J. A., & Ryan, J. J. (2021). Inflammatory Bowel Disease and Neutrophil–Lymphocyte Ratio: A Systematic Scoping Review. *Journal of clinical medicine*, 10(18), 4219.
- Lee, H.-S., Lee, N. C., Kouprina, N., Kim, J.-H., Kagansky, A., Bates, S., Trepel, J. B., Pommier, Y., Sackett, D., & Larionov, V. (2016). Effects of anticancer drugs on

- chromosome instability and new clinical implications for tumor-suppressing therapies. *Cancer research*, 76(4), 902–911.
- Litvak, Y., Byndloss, M. X., & Bäumlner, A. J. (2018). Colonocyte metabolism shapes the gut microbiota. *Science*, 362(6418), eaat9076.
- Loddo, I., & Romano, C. (2015). Inflammatory bowel disease: Genetics, epigenetics, and pathogenesis. *Frontiers in immunology*, 6, 551.
- Loeffler, P. A., Cuneo, M. J., Mueller, G. A., DeRose, E. F., Gabel, S. A., & London, R. E. (2011). Structural studies of the PARP-1 BRCT domain. *BMC structural biology*, 11(1), 1–11.
- Lonskaya, I., Potaman, V. N., Shlyakhtenko, L. S., Oussatcheva, E. A., Lyubchenko, Y. L., & Soldatenkov, V. A. (2005). Regulation of poly (ADP-ribose) polymerase-1 by DNA structure-specific binding. *Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 17076–17083.
- Mabley, J., Jagtap, P., Perretti, M., Getting, S. J., Salzman, A. L., Virag, L., Szabo, E., Soriano, F., Liaudet, L., & Abdelkarim, G. (2001). Anti-inflammatory effects of a novel, potent inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase. *Inflammation Research*, 50(11), 561–569.
- Martínez-Bosch, N., Iglesias, M., Munné-Collado, J., Martínez-Cáceres, C., Moreno, M., Guerra, C., Yélamos, J., & Navarro, P. (2014). Parp-1 genetic ablation in Ela–myc mice unveils novel roles for Parp-1 in pancreatic cancer. *The Journal of Pathology*, 234(2), 214–227.
- Martin-Oliva, D., Aguilar-Quesada, R., O’valle, F., Munoz-Gámez, J. A., Martínez-Romero, R., García del Moral, R., Ruiz de Almodóvar, J. M., Villuendas, R., Piris, M. A., & Oliver, F. J. (2006). Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase modulates tumor-related gene expression, including hypoxia-inducible factor-1 activation, during skin carcinogenesis. *Cancer research*, 66(11), 5744–5756.

- Masutani, M., & Fujimori, H. (2013). Poly (ADP-ribosyl) ation in carcinogenesis. *Molecular aspects of medicine*, 34(6), 1202–1216.
- Mateo, J., Lord, C., Serra, V., Tutt, A., Balmaña, J., Castroviejo-Bermejo, M., Cruz, C., Oaknin, A., Kaye, S., & De Bono, J. (2019). A decade of clinical development of PARP inhibitors in perspective. *Annals of Oncology*, 30(9), 1437–1447.
- Mazen, A., Murcia, J. M., Molinete, M., Simonin, F., Gradwohl, G., Poirier, G., & de Murcia, G. (1989). Poly (ADP-ribose) polymerase: A novel finger protein. *Nucleic acids research*, 17(12), 4689–4698.
- McGuckin, M. A., Eri, R., Simms, L. A., Florin, T. H., & Radford-Smith, G. (2009). Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases*, 15(1), 100–113.
- Mee, A., Berney, J., & Jewell, D. (1980). Monocytes in inflammatory bowel disease: Absolute monocyte counts. *Journal of clinical pathology*, 33(10), 917–920.
- Melkonian, E. A., & Schury, M. P. (2019). *Biochemistry, anaerobic glycolysis*.
- Meyer, C. T., Brand, M., DeLuca, V. A., & Spiro, H. M. (1981). Hydrogen peroxide colitis: A report of three patients. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 3(1), 31–35.
- Mookerjee, S. A., Goncalves, R. L., Gerencser, A. A., Nicholls, D. G., & Brand, M. D. (2015). The contributions of respiration and glycolysis to extracellular acid production. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1847(2), 171–181.
- Morampudi, V., Bhinder, G., Wu, X., Dai, C., Sham, H. P., Vallance, B. A., & Jacobson, K. (2014). DNBS/TNBS colitis models: Providing insights into inflammatory bowel disease and effects of dietary fat. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 84.
- Mueller-Dieckmann, C., Kernstock, S., Lisurek, M., von Kries, J. P., Haag, F., Weiss, M. S., & Koch-Nolte, F. (2006). The structure of human ADP-ribosylhydrolase 3 (ARH3)

- provides insights into the reversibility of protein ADP-ribosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(41), 15026–15031.
- Mukherjee, S., & Ghosh, A. (2020). Molecular mechanism of mitochondrial respiratory chain assembly and its relation to mitochondrial diseases. *Mitochondrion*, 53, 1–20.
- Neurath, M. F. (2014). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology*, 14(5), 329–342.
- Neurath, M. F., & Travis, S. P. (2012). Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: A systematic review. *Gut*, 61(11), 1619–1635.
- Nolfi-Donagan, D., Braganza, A., & Shiva, S. (2020). Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox biology*, 37, 101674.
- Nosseri, C., Coppola, S., & Ghibelli, L. (1994). Possible involvement of poly (ADP-ribosyl) polymerase in triggering stress-induced apoptosis. *Experimental cell research*, 212(2), 367–373.
- Nozaki, T., Fujihara, H., Watanabe, M., Tsutsumi, M., Nakamoto, K., Kusuoka, O., Kamada, N., Suzuki, H., Nakagama, H., & Sugimura, T. (2003). Parp-1 deficiency implicated in colon and liver tumorigenesis induced by azoxymethane. *Cancer science*, 94(6), 497–500.
- Nunes, T., Bernardazzi, C., & de Souza, H. S. (2014). Cell death and inflammatory bowel diseases: Apoptosis, necrosis, and autophagy in the intestinal epithelium. *BioMed research international*, 2014.
- O'Connor, L. O., Rulten, S. L., Cranston, A. N., Odedra, R., Brown, H., Jaspers, J. E., Jones, L., Knights, C., Evers, B., & Ting, A. (2016). The PARP inhibitor AZD2461 provides insights into the role of PARP3 inhibition for both synthetic lethality and tolerability with chemotherapy in preclinical models. *Cancer Research*, 76(20), 6084–6094.

- Odenwald, M. A., & Turner, J. R. (2017). The intestinal epithelial barrier: A therapeutic target? *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, *14*(1), 9–21.
- Oka, J., Ueda, K., Hayaishi, O., Komura, H., & Nakanishi, K. (1984). ADP-ribosyl protein lyase. Purification, properties, and identification of the product. *Journal of Biological Chemistry*, *259*(2), 986–995.
- Okamoto, R., & Watanabe, M. (2016). Role of epithelial cells in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel disease. *Journal of gastroenterology*, *51*(1), 11–21.
- Osellame, L. D., Blacker, T. S., & Duchon, M. R. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, *26*(6), 711–723.
- Özsoy, M., Stummer, N., Zimmermann, F. A., Feichtinger, R. G., Sperl, W., Weghuber, D., & Schneider, A. M. (2022). Role of Energy Metabolism and Mitochondrial Function in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*.
- Parada Venegas, D., De la Fuente, M. K., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., Harmsen, H. J., Faber, K. N., & Hermoso, M. A. (2019). Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. *Frontiers in immunology*, *10*, 277.
- Pazzaglia, S., & Pioli, C. (2020). Multifaceted role of PARP-1 in DNA repair and inflammation: Pathological and therapeutic implications in cancer and non-cancer diseases. *Cells*, *9*(1), 41.
- Peng, S., Shen, L., Tian, M.-X., Li, H.-M., & Wang, S.-S. (2021). Poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by regulating the balance of Th17/Treg cells and inhibiting the NF- κ B signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *21*(2), 1–1.

- Perler, B. K., Ungaro, R., Baird, G., Mallette, M., Bright, R., Shah, S., Shapiro, J., & Sands, B. E. (2019). Presenting symptoms in inflammatory bowel disease: Descriptive analysis of a community-based inception cohort. *BMC gastroenterology*, *19*(1), 1–8.
- Pizarro, T. T., Arseneau, K. O., Bamias, G., & Cominelli, F. (2003). Mouse models for the study of Crohn's disease. *Trends in molecular medicine*, *9*(5), 218–222.
- Pravda, J. (2019). Can ulcerative colitis be cured? *Discovery Medicine*, *27*(149), 197–200.
- Ramos, G. P., & Papadakis, K. A. (2019). *Mechanisms of disease: Inflammatory bowel diseases*. *94*(1), 155–165.
- Rao, R. (2008). Oxidative stress-induced disruption of epithelial and endothelial tight junctions. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, *13*, 7210.
- Rath, E., & Haller, D. (2022). Intestinal epithelial cell metabolism at the interface of microbial dysbiosis and tissue injury. *Mucosal Immunology*, 1–10.
- Roediger, W. (1980). The colonic epithelium in ulcerative colitis: An energy-deficiency disease? *The Lancet*, *316*(8197), 712–715.
- Rosado, M. M., Bennici, E., Novelli, F., & Pioli, C. (2013). Beyond DNA repair, the immunological role of PARP-1 and its siblings. *Immunology*, *139*(4), 428–437.
- Rosenthal, F., Feijs, K. L., Frugier, E., Bonalli, M., Forst, A. H., Imhof, R., Winkler, H. C., Fischer, D., Caflisch, A., & Hassa, P. O. (2013). Macrodomein-containing proteins are new mono-ADP-ribosylhydrolases. *Nature structural & molecular biology*, *20*(4), 502–507.
- Rosignoli, P., Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Spinozzi, F., Agea, E., Pelli, M., & Morozzi, G. (2001). Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. *Carcinogenesis*, *22*(10), 1675–1680.

- Saenz, L., Lozano, J. J., Valdor, R., Baroja-Mazo, A., Ramirez, P., Parrilla, P., Aparicio, P., Sumoy, L., & Yélamos, J. (2008). Transcriptional regulation by poly (ADP-ribose) polymerase-1 during T cell activation. *BMC genomics*, *9*(1), 1–11.
- Sahu, B., Narota, A., & Naura, A. S. (2020). Pharmacological inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase by olaparib, prevents acute lung injury associated cognitive deficits potentially through suppression of inflammatory response. *European Journal of Pharmacology*, *877*, 173091.
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M., Stammati, A., & Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: Influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell biology and toxicology*, *21*(1), 1–26.
- Sánchez-Fidalgo, S., Villegas, I., Martín, A., Sánchez-Hidalgo, M., & de la Lastra, C. A. (2007). PARP inhibition reduces acute colonic inflammation in rats. *European journal of pharmacology*, *563*(1–3), 216–223.
- Santhanam, S., Rajamanickam, S., Motamarri, A., Ramakrishna, B. S., Amirtharaj, J. G., Ramachandran, A., Pulimood, A., & Venkatraman, A. (2012). Mitochondrial electron transport chain complex dysfunction in the colonic mucosa in ulcerative colitis. *Inflammatory bowel diseases*, *18*(11), 2158–2168.
- Santhanam, S., Venkatraman, A., & Ramakrishna, B. S. (2007). Impairment of mitochondrial acetoacetyl CoA thiolase activity in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut*, *56*(11), 1543–1549.
- Santos, S. S., Brunialti, M. K. C., Rodrigues, L. de O. C. P., Liberatore, A. M. A., Koh, I. H. J., Martins, V., Soriano, F. G., Szabo, C., & Salomão, R. (2022). Effects of the PARP Inhibitor Olaparib on the Response of Human Peripheral Blood Leukocytes to Bacterial Challenge or Oxidative Stress. *Biomolecules*, *12*(6), 788.

- Schicho, R., Bashashati, M., Bawa, M., McHugh, D., Saur, D., Hu, H.-M., Zimmer, A., Lutz, B., Mackie, K., & Bradshaw, H. B. (2011). The atypical cannabinoid O-1602 protects against experimental colitis and inhibits neutrophil recruitment. *Inflammatory bowel diseases*, *17*(8), 1651–1664.
- Schneider, A. M., Özsoy, M., Zimmermann, F. A., Brunner, S. M., Feichtinger, R. G., Mayr, J. A., Kofler, B., Neureiter, D., Klieser, E., & Aigner, E. (2022). Expression of Oxidative Phosphorylation Complexes and Mitochondrial Mass in Pediatric and Adult Inflammatory Bowel Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022.
- Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.-C., & De Murcia, G. (2006). Poly (ADP-ribose): Novel functions for an old molecule. *Nature reviews Molecular cell biology*, *7*(7), 517–528.
- Schreiber, V., Molinete, M., Boeuf, H., de Murcia, G., & Ménissier-de Murcia, J. (1992). The human poly (ADP-ribose) polymerase nuclear localization signal is a bipartite element functionally separate from DNA binding and catalytic activity. *The EMBO journal*, *11*(9), 3263–3269.
- Shall, S., & de Murcia, G. (2000). Poly (ADP-ribose) polymerase-1: What have we learned from the deficient mouse model? *Mutation Research/DNA Repair*, *460*(1), 1–15.
- Shao, L., Kamalu, O., & Mayer, L. (2005). Non-classical MHC class I molecules on intestinal epithelial cells: Mediators of mucosal crosstalk. *Immunological reviews*, *206*(1), 160–176.
- Shieh, W. M., Amé, J.-C., Wilson, M. V., Wang, Z.-Q., Koh, D. W., Jacobson, M. K., & Jacobson, E. L. (1998). Poly (ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(46), 30069–30072.
- Sifroni, K. G., Damiani, C. R., Stoffel, C., Cardoso, M. R., Ferreira, G. K., Jeremias, I. C., Rezin, G. T., Scaini, G., Schuck, P. F., & Dal-Pizzol, F. (2010). Mitochondrial

- respiratory chain in the colonic mucosal of patients with ulcerative colitis. *Molecular and cellular biochemistry*, 342(1), 111–115.
- Silva, I., Pinto, R., & Mateus, V. (2019). Preclinical study in vivo for new pharmacological approaches in inflammatory bowel disease: A systematic review of chronic model of TNBS-induced colitis. *Journal of Clinical Medicine*, 8(10), 1574.
- Sims, J. L., Berger, S. J., & Berger, N. A. (1983). Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors preserve oxidized nicotinamide adenine dinucleotide and adenosine 5'-triphosphate pools in DNA-damaged cells: Mechanism of stimulation of unscheduled DNA synthesis. *Biochemistry*, 22(22), 5188–5194.
- Singh, S., Blanchard, A., Walker, J. R., Graff, L. A., Miller, N., & Bernstein, C. N. (2011). Common symptoms and stressors among individuals with inflammatory bowel diseases. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 9(9), 769–775.
- Slade, D., Dunstan, M. S., Barkauskaite, E., Weston, R., Lafite, P., Dixon, N., Ahel, M., Leys, D., & Ahel, I. (2011). The structure and catalytic mechanism of a poly (ADP-ribose) glycohydrolase. *Nature*, 477(7366), 616–620.
- Sousa, F. G., Matuo, R., Soares, D. G., Escargueil, A. E., Henriques, J. A., Larsen, A. K., & Saffi, J. (2012). PARPs and the DNA damage response. *Carcinogenesis*, 33(8), 1433–1440.
- Southan, G. J., & Szab, C. (2003). Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Current medicinal chemistry*, 10(4), 321–340.
- Szabó, C., Zingarelli, B., O'Connor, M., & Salzman, A. L. (1996). DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(5), 1753–1758.

- Tian, T., Wang, Z., & Zhang, J. (2017). Pathomechanisms of oxidative stress in inflammatory bowel disease and potential antioxidant therapies. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.
- Tretter, L., & Adam-Vizi, V. (2000). Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of α -ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *Journal of Neuroscience*, 20(24), 8972–8979.
- Tsui, J. J., & Huynh, H. Q. (2018). Is top-down therapy a more effective alternative to conventional step-up therapy for Crohn's disease? *Annals of gastroenterology*, 31(4), 413.
- Tu, L., Gharibani, P., Yin, J., & Chen, J. D. (2020). Sacral nerve stimulation ameliorates colonic barrier functions in a rodent model of colitis. *Neurogastroenterology & Motility*, 32(10), e13916.
- Tytgat, K. M., van der Wal, J.-W. G., Einerhand, A. W., Büller, H. A., & Dekker, J. (1996). Quantitative analysis of MUC2 synthesis in ulcerative colitis. *Biochemical and biophysical research communications*, 224(2), 397–405.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *science*, 324(5930), 1029–1033.
- Vermeulen, N., Vermeire, S., Arijs, I., Michiels, G., Ballet, V., Derua, R., Waelkens, E., Lommel, L. V., Schuit, F., & Rutgeerts, P. (2011). Seroreactivity against glycolytic enzymes in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, 17(2), 557–564.
- Villanacci, V., Reggiani-Bonetti, L., Caprioli, F., Saragoni, L., Salviato, T., Mescoli, C., Canavese, G., Manenti, S., Spada, E., & Baron, L. (2020). Histopathology of inflammatory bowel disease—Position statement of the Pathologists of the Italian

- Group for the Study of Inflammatory Bowel Disease (IG-IBD) and Italian Group of Gastrointestinal Pathologists (GIPAD-SIAPEC). *Digestive and Liver Disease*, 52(3), 262–267.
- Virág, L., Salzman, A. L., & Szabó, C. (1998). Poly (ADP-ribose) synthetase activation mediates mitochondrial injury during oxidant-induced cell death. *The Journal of Immunology*, 161(7), 3753–3759.
- Virág, L., & Szabó, C. (2002). The therapeutic potential of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacological reviews*, 54(3), 375–429.
- Wang, A. H., Lam, W.-J., Han, D.-Y., Ding, Y., Hu, R., Fraser, A. G., Ferguson, L. R., & Morgan, A. R. (2011). The effect of IL-10 genetic variation and interleukin 10 serum levels on Crohn's disease susceptibility in a New Zealand population. *Human immunology*, 72(5), 431–435.
- Wang, H., Vilches-Moure, J. G., Cherkaoui, S., Tardy, I., Alleaume, C., Bettinger, T., Lutz, A., & Paulmurugan, R. (2019). Chronic model of inflammatory bowel disease in IL-10^{-/-}-transgenic mice: Evaluation with ultrasound molecular imaging. *Theranostics*, 9(21), 6031.
- Wang, Y., Kim, N. S., Haince, J.-F., Kang, H. C., David, K. K., Andrabi, S. A., Poirier, G. G., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2011). Poly (ADP-ribose)(PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos). *Science signaling*, 4(167), ra20–ra20.
- Wehkamp, J., Schmid, M., Fellermann, K., & Stange, E. F. (2005). Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease. *Journal of leukocyte biology*, 77(4), 460–465.

- Xie, N., Zhang, L., Gao, W., Huang, C., Huber, P. E., Zhou, X., Li, C., Shen, G., & Zou, B. (2020). NAD⁺ metabolism: Pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 1–37.
- Xue, X., Bredell, B. X., Anderson, E. R., Martin, A., Mays, C., Nagao-Kitamoto, H., Huang, S., Györfy, B., Greenson, J. K., & Hardiman, K. (2017). Quantitative proteomics identifies STEAP4 as a critical regulator of mitochondrial dysfunction linking inflammation and colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(45), E9608–E9617.
- Yamada, A., Arakaki, R., Saito, M., Tsunematsu, T., Kudo, Y., & Ishimaru, N. (2016). Role of regulatory T cell in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*, 22(7), 2195.
- Ying, W., Garnier, P., & Swanson, R. A. (2003). NAD⁺ repletion prevents PARP-1-induced glycolytic blockade and cell death in cultured mouse astrocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 308(4), 809–813.
- Zhang, S., Lin, Y., Kim, Y., Hande, M., Liu, Z., & Shen, H. (2007). C-Jun N-terminal kinase mediates hydrogen peroxide-induced cell death via sustained poly (ADP-ribose) polymerase-1 activation. *Cell Death & Differentiation*, 14(5), 1001–1010.
- Zhang, Y., Marcillat, O., Giulivi, C., Ernster, L., & Davies, K. (1990). The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *Journal of biological chemistry*, 265(27), 16330–16336.
- Zheng, F., Zhang, Y., Chen, S., Weng, X., Rao, Y., & Fang, H. (2020). Mechanism and current progress of Poly ADP-ribose polymerase (PARP) inhibitors in the treatment of ovarian cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 123, 109661.
- Zimmermann, M., & Meyer, N. (2011). Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. In *Mammalian Cell Viability* (o. 57–63). Springer.

Zingarelli, B., O'Connor, M., & Hake, P. W. (2003). Inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase modulate signal transduction pathways in colitis. *European journal of pharmacology*, 469(1-3), 183-194.

8. 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., Kéringер, 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., Götzter, 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.

9. 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 disszertációm elkészítésében nyújtott segítségét. Hálas 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.

Research Article

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

Dominika Kovács ¹, Viola Bagóné Vántus ¹, Eszter Vámos ¹, Nikoletta Kálmán ¹,
Rudolf Schicho ^{2,3}, Ferenc Gallyas ^{1,4,5} and Balázs Radnai ¹

¹Department of Biochemistry and Medical Chemistry, Medical School, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary

²Division of Pharmacology, Otto Loewi Research Center, Medical University of Graz, Universitätsplatz 4, 8010 Graz, Austria

³BioTechMed, 8010 Graz, Austria

⁴Szentagothai Research Centre, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary

⁵HAS-UP Nuclear-Mitochondrial Interactions Research Group, 1245 Budapest, Hungary

Correspondence should be addressed to Balázs Radnai; balazs.radnai@aok.pte.hu

Received 18 April 2021; Accepted 24 August 2021; Published 15 September 2021

Academic Editor: Mariaurea Matias Sarandy

Copyright © 2021 Dominika Kovács et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Crohn's disease (CD) is an inflammatory disorder of the intestines characterized by epithelial barrier dysfunction and mucosal damage. The activity of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) is deeply involved in the pathomechanism of inflammation since it leads to energy depletion and mitochondrial failure in cells. Focusing on the epithelial barrier integrity and bioenergetics of epithelial cells, we investigated whether the clinically applied PARP inhibitor olaparib might improve experimental CD. We used the oral PARP inhibitor olaparib in the 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid- (TNBS-) induced mouse colitis model. Inflammatory scoring, cytokine levels, colon histology, hematological analysis, and intestinal permeability were studied. Caco-2 monolayer culture was utilized as an epithelial barrier model, on which we used qPCR and light microscopy imaging, and measured impedance-based barrier integrity, FITC-dextran permeability, apoptosis, mitochondrial oxygen consumption rate, and extracellular acidification rate. Olaparib reduced the inflammation score, the concentration of IL-1 β and IL-6, enhanced the level of IL-10, and decreased the intestinal permeability in TNBS-colitis. Blood cell ratios, such as lymphocyte to monocyte ratio, platelet to lymphocyte ratio, and neutrophil to lymphocyte ratio were improved. In H₂O₂-treated Caco-2 monolayer, olaparib decreased morphological changes, barrier permeability, and preserved barrier integrity. In oxidative stress, olaparib enhanced glycolysis (extracellular acidification rate), and it improved mitochondrial function (mitochondrial coupling efficiency, maximal respiration, and spare respiratory capacity) in epithelial cells. Olaparib, a PARP inhibitor used in human cancer therapy, improved experimental CD and protected intestinal barrier integrity by preventing its energetic collapse; therefore, it could be repurposed for the therapy of Crohn's disease.

1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic and remitting inflammatory disease of the gut. More than 1 million inhabitants in the USA and approximately 2.5 million in Europe suffer from IBD, and its incidence is permanently rising [1].

IBD exhibits two main forms, namely, ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), and it appears in flare-up and remission phases [2]. Although UC and CD are two distinct forms of IBD, they share the phenomenon of epithelial barrier dysfunction. Barrier failure often results in increased intestinal permeability, a condition called "leaky gut" [3]. In

this disorder, the gut microbiota can directly enter the colonic tissue and induce the activation of immune cells causing chronic inflammation [4, 5]. The initiators of increased gut permeability are not clearly elucidated, but it is often suggested that increased permeability is a consequence of altered energy metabolism and mitochondrial dysfunction of intestinal epithelial cells (IEC) [6]. For example, investigations with conplastic mouse strains, which share the same nuclear genome but have different mitochondrial genomes, demonstrated that those mice with high mucosal respiratory chain activity and elevated concentration of ATP develop less intense colitis than those that produce a smaller amount of mucosal ATP [7]. In CD patients, increased mucosal permeability in the ileum was accompanied by mitochondrial swelling and decreased ATP concentration [8]. In addition, the activity of complex II (CII), a part of the mitochondrial electron transport chain (ETC), was found to be abolished in the colon of UC patients [9]. Another group found lower levels of CI and CIV in IBD patients compared to control subjects and also measured lower ATP concentrations [10]. Furthermore, enhanced lactate levels were found in CD patients in comparison with healthy individuals, which correlated with the disease activity [11]. All these results suggest mitochondrial dysfunction, disturbed oxidative phosphorylation, and enhanced glycolytic activity in the mucosa of IBD patients.

Under physiological conditions, IECs use butyrate as a primary energy source [12]. Butyrate is produced by several species of the microbiota, and it is catabolized in IECs via β -oxidation and citric acid cycle (CAC) [13–15]. In addition, dehydrogenases of these catabolic pathways reduce NAD^+ and FAD to $\text{NADH}+\text{H}^+$ and FADH_2 which promote the reduction of the mitochondrial respiratory chain CI and CII [16]. Thereafter, CI, CIII, and CIV pump protons across the inner membrane from the matrix to the intermembrane space raising a proton gradient [16]. At the end of ETC, CIV consumes O_2 and reduces it to H_2O . Finally, the proton gradient drives F_0F_1 -ATPase, which produces ATP from ADP and P_i [16].

However, in inflammation, mitochondrial dysfunction and mitochondria-derived ROS increase. Under these circumstances, IECs switch their metabolism from oxidative phosphorylation (OXPHOS) to aerobic glycolysis [13, 17]. In aerobic glycolysis, glucose transforms to lactate without oxygen consumption, although sufficient amount of oxygen is present in the cells [18]. In this situation, glycolysis produces ATP and, as a by-product, lactate is synthesized from pyruvate by lactate dehydrogenase [17]. Since the mitochondria are a major source of ROS [19], the catabolic pathway via glycolysis and lactate dehydrogenase bypasses the mitochondria and do not feed mitochondrial ROS generation [20]. Thus, the cell shuts down the mitochondria to protect itself from mitochondrial ROS [21]. This concept is strengthened by the findings that proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , and IFN- γ) increased the rate of glycolysis in rat enterocytes and also triggered ATP turnover [22]. Also *C. rodentium* infection in mice induced aerobic glycolysis and enhanced the level of sodium-glucose transporter 4 and lactate dehydrogenase A. At the same time,

enzymes of CAC and OXPHOS were downregulated [23]. Most importantly, a strong expression of glycolytic enzymes was found in the colon of IBD patients [24]. In active CD, lactate levels were significantly higher compared to the control subjects [11]. Therefore, in colitis, aerobic glycolysis becomes the main source of ATP. Nevertheless, in severe inflammation, activation of the enzyme poly(ADP-ribose)-polymerase-1 (PARP-1) blocks glycolysis [25], i.e., it terminates the “last safe way” of energy production and forces the cells along the death pathway causing strong mucosal damage with severe ulceration and compromised barrier function.

PARP-1 has been long involved in cancer development and inflammation. Accordingly, PARP-1^{-/-} mice were protected in 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid- (TNBS-) induced colitis [26] and pharmacological inhibitors of PARP-1 improved dextran sodium sulfate-induced [27] and TNBS-induced colitis [28] in rodents. PARP-1 is activated by DNA damage and catalyzes polyADP-ribosylation (PARylation) of numerous nuclear proteins using NAD^+ as a substrate [29]. This process is a part of the DNA damage response leading to activation of the DNA repair enzymes [30]. However, excessive PARP activation can totally deplete NAD^+ pools, which makes cellular energy metabolism impossible [31]. Several lines of evidence demonstrate that PARP activation not only depletes NAD^+ pools but also inhibits the enzyme hexokinase, which catalyzes the first step of glycolysis [25]. As a result, repressed glycolysis cannot feed CAC with Acetyl-CoA (produced by pyruvate dehydrogenase from the glycolytic end-product pyruvate), and CAC is not able to reduce NAD^+ and FAD to feed mitochondrial ETC and OXPHOS [32], so PARP-induced mitochondrial dysfunction originates, at least partially, from the decreased substrate flow from glycolysis to CAC and ETC [25]. Since, in severe colitis, glycolysis is the main source of ATP (because of mitochondrial shutdown) [21] and also glycolysis is inhibited by PARP [25], IECs have to face with energetic collapse and they lose the ability to form a strong and continuous barrier [7].

In the present study, we investigated whether olaparib, a PARP inhibitor used in human cancer therapy, has a beneficial effect in a CD mouse model and, accordingly, whether it could be repurposed for CD treatment. To answer this question, we applied olaparib during a TNBS-induced experimental colitis model. Additionally, since IECs are the first line of defence in the colon and barrier interruption is a hallmark of IBD, we used Caco-2 colonic epithelial cells and investigated barrier function and energy production *in vitro*.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and Experimental Colitis. Male CD1 mice (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) were bred and maintained at the SPF animal facility of the Department of Immunology and Biotechnology, Medical School, University of Pécs. At the age of 6–8 weeks, they were transported to our animal house facility and acclimatized for 2 weeks under standardized circumstances. Standard laboratory chow and water were available *ad libitum*. Experimental procedures

were approved by the Animal Research Review Committee of the University of Pécs, Medical School (Permit number: BA02/2000-4/2017). For the colitis experiments, we used the vehicle (VEH), TNBS, and TNBS+olaparib (TNBS+olap) treatment groups. In total, 72 animals were used; 1 mouse died during the experiments before evaluation. In our experimental setting, every group contained 3-9 animals. We performed 3 independent experiments including in total 9 VEH, 26 TNBS, 9 TNBS+20 mg olaparib, and 27 TNBS+50 mg olaparib). The age-matched (8-10 weeks), sex-matched (male), and bodyweight-matched (30-40 g) animals were randomly divided into groups by a technician. During the experiments, mice were individually housed to avoid aggressive behavior. Individual housing was approved by the Animal Research Review Committee of the University of Pécs. The experimental period lasted in total for 4 days (Figure 1(a)). On day 1, olaparib treatment started (pretreatment), and thereafter, we administered it daily once for 3 times (thus, in total, we performed 4 olaparib treatments). On day 0, animals were treated with TNBS (1 bolus), and on day 3, mice were anesthetized and euthanized. Olaparib (AZD2281, MedChemExpress, New Jersey, USA) was administered intraperitoneally (single injection) on the day before TNBS challenge, followed by daily administration for 3 days at the dose of 20 or 50 mg/kg bodyweight. The applied dose of olaparib was selected based on literature data [33]. The vehicle group received sterile distilled water containing 4% DMSO and 30% PEG300. After 12 hrs fasting, mice were anesthetized with 5% isoflurane (Baxter Hungary Ltd., Budapest, Hungary) in 100% oxygen in an anaesthetic chamber. Colitis was induced by a single intracolonic injection of TNBS (4 mg in 100 μ l of 30% ethanol; Sigma-Aldrich, Missouri, USA) through a catheter inserted 3 cm into the colon. The VEH group received an equal volume of 30% ethanol. Animals were weighed daily during the experiment and sacrificed 72 hrs after TNBS administration. Mice were anesthetized with 5% isoflurane and decapitated gently by a dedicated surgical scissor to collect the highest possible amounts of trunk blood. This technique was approved by the Animal Research Review Committee of the University of Pécs. Trunk blood was collected; the colons were removed, measured, weighted, and opened longitudinally to detect the macroscopic colon damage. Tissue samples were processed for further analyses. Treatments and macroscopic scoring were carried out blind.

2.2. Intestinal Permeability Measurement. Intestinal permeability was determined by measuring the concentration of fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran (40 kDa; Sigma-Aldrich Missouri, USA) in serum. 3 days after TNBS treatment, FITC-dextran solution (100 μ l of a 60 mg/ml solution) was administered intrarectally. Serum was collected 1 hour after the administration, and fluorescence intensities were detected by a Promega GloMax plate reader (excitation, 490 nm; emission, 510–570 nm). A standard curve was generated from a serial dilution of FITC-dextran in PBS.

2.3. Hematological Analysis. At the endpoint of the TNBS model, mice were anesthetized with 5% isoflurane and

decapitated gently by a dedicated surgical scissor, and trunk blood was collected directly into microtainer tubes (Becton Dickinson, Hungary) containing EDTA as an anticoagulant. Hematological parameters were determined by a Sysmex XN-1000-V Multispecies Hematology Analyzer (Sysmex America Inc., USA) within 2 hours of sampling. Lymphocyte to monocyte ratio (LMR), platelet to lymphocyte ratio (PLR), neutrophil to lymphocyte ratio (NLR), and neutrophil to monocyte ratio (NMR) were calculated from the absolute cell counts for each animal separately.

2.4. Macroscopic Scoring. Colonic tissue damage score was assessed by a macroscopic scoring system described previously [34]. Briefly, individual points were added for ulcers (0.5 points for each 0.5 cm), adhesions (0 points = absent, 1 point = 1 adhesion, and 2 points = 2 or more adhesions or adhesions to organs), colon shortening, based on a mean length of a healthy colon (1 point = >15%, 2 points = >25%), wall thickness (measured in mm), consistency of the stool, and the presence of blood in the stool (hemorrhage, fecal blood, or diarrhea increase the total points by 1).

2.5. Histology of Colon Tissue. Segments of the distal colon were stapled flat onto a cardboard with the mucosal side up and fixed for at least 24 hrs in 10% neutral-buffered formalin. Tissue was then dehydrated and embedded in paraffin, and standard hematoxylin staining was performed on 5 μ m thick sections. To this end, slides were deparaffinized, cleared in xylol, rehydrated in a descending ethanol series, stained with hematoxylin solution according to Gill II, and cleared in tap water. Images were taken with an Olympus DP50 camera and processed with cellSens imaging software (Olympus, Vienna, Austria).

2.6. Cytokine Levels of Colon Tissue. Levels of inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α , and IL-10 were measured in colon tissues. Tissue was homogenized mechanically in an extraction buffer supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, California, USA) was used to measure the concentration of total protein. Subsequently, normalization of protein concentrations was performed and cytokine levels were determined by Ready-Set-Go ELISA kits (eBioscience, California, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.7. Epithelial Cell Culture. The Caco-2 human colon carcinoma epithelial cell line was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Virginia, USA) and cultured in Eagle's minimum essential medium (Biosera, France) supplemented with 20% fetal bovine serum (Corning, New York, USA) and 1% nonessential amino acid solution (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Cells were maintained in a humidified incubator containing 5% CO₂ at 37° C.

2.8. RNA Isolation and qPCR. Total RNA was extracted from the Caco-2 monolayer using NucleoSpin RNA Plus kit (Macherey-Nagel, Germany) according to the manufacturer's protocol. It was quantified using a Nanodrop spectrophotometer and Qubit 2.0 fluorometer (Thermo Fisher

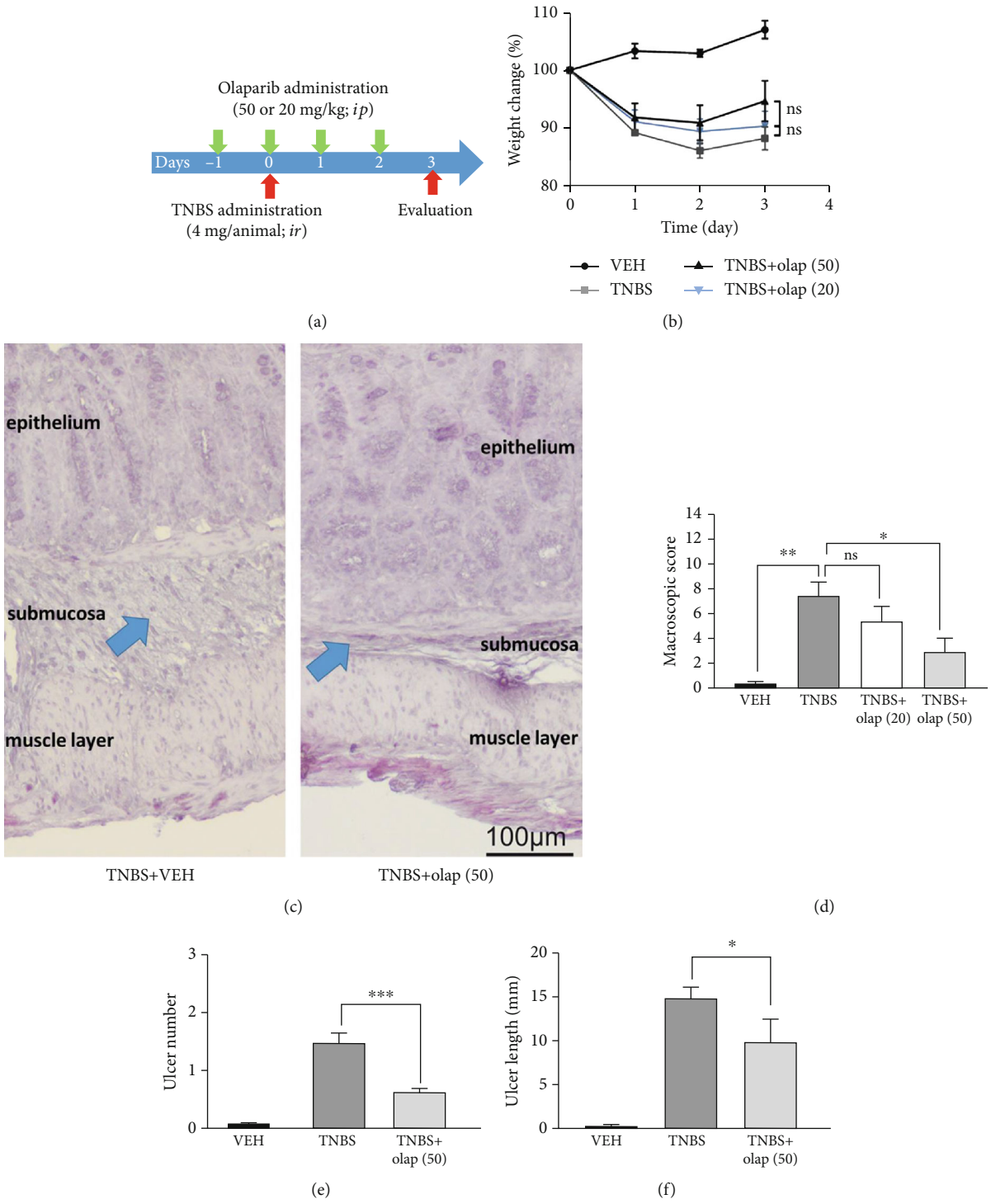


FIGURE 1: Continued.

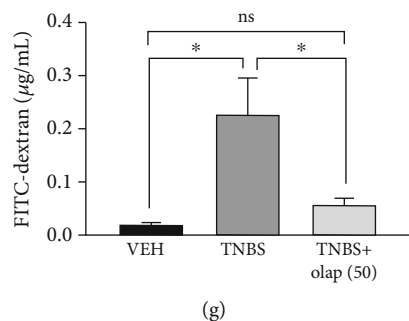


FIGURE 1: Olaparib treatment attenuated TNBS-induced colitis in mice. (a) Experimental protocol of TNBS-induced colitis and olaparib treatment. (b) Bodyweight changes (percentage of the initial bodyweight of each animal) in every experimental group. Data from one of three independent experiments are expressed as mean \pm SEM ($n = 4-7$). (c) Representative images of hematoxylin staining of colon cross-sections from the TNBS- and TNBS+olap (50)-treated mice. Arrows indicate the most affected part of the colon tissue, the submucosa. (d) Macroscopic score in every experimental group. Data combined from 2 separate experiments ($n = 9-21$). (e) Ulcer number and (f) ulcer length in the VEH, TNBS, and TNBS+olap (50) groups. Data combined from 3 separate experiments ($n = 9-27$). (g) Intestinal permeability based on the measurement of FITC-dextran in blood samples 3 days after TNBS treatment. Data from one of three independent experiments are expressed as mean \pm SEM ($n = 5-8$); ns: not significant; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. VEH: vehicle; TNBS: 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid; olap (50): 50 mg/kg olaparib; olap (20): 20 mg/kg olaparib.

Scientific, USA). 1 μ g of total RNA was reverse-transcribed with M-MuLV RT (Maxima First-Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher Scientific, USA). 100 ng cDNA was used in 20 μ l reactions for real-time PCR using the Xceed qPCR SG 2 \times Mix (Institute of Applied Biotechnologies, Praha-Strašnice, Czech Republic) and a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA). After 40 cycles of PCR reaction, products were run on a 1.5% agarose gel using 20 bp DNA Ladder (Lonza, Basel, Switzerland). Data were analyzed by Δ Ct method. As a reference for gene expression, we used β -actin expression. Primers for the investigated gene expression were as follows: (i) β -actin (121 bp): forward 5'-GCATGGGTCAGAAGGATTCC-3', reverse 5'-CAGATTTTCTCCATGTCTGCC-3'; (ii) PARP-1 (109 bp): forward 5'-CGAGTCGAGTACGCCAAGAG-3', reverse 5'-CATCAAACATGGGCGACTGC-3'; (iii) PARP-2 (97 bp): forward 5'-GCCAGCAAAGGGTCTCTGA-3', reverse 5'-CATGAGCCTTCCCCACCTTG-3'; and (iv) PARP-3 (115 bp): forward 5'-CCTGAGGCTCATGGAGAGTTG-3', reverse 5'-TGGAGCCATGGCCAAGAAAA-3'. The efficiency of the reactions was in all cases near 100%.

2.9. Impedance-Based Barrier Integrity Measurements. First, the epithelial barrier integrity was determined by measuring electrical impedance using xCELLigence RTCA DP Real-Time Cell Analyzer (ACEA Biosciences, California, USA). Caco-2 cells were seeded on RTCA E-plates (E-plate 16) at a density of 10^5 cells/well. We applied the control (CTRL) and H_2O_2 or H_2O_2 +olaparib treatment groups. After attaining confluency, the monolayers were treated with different concentrations of H_2O_2 (100, 200, 500, and 1000 μ M) or with olaparib (10 μ M) as a pretreatment, 30 min before H_2O_2 . The CTRL and H_2O_2 treatment groups received the same amount of DMSO as the olaparib-treated cells. The cell index (CI) was continuously monitored by the equipment for 24 hours.

2.10. FITC-Dextran Epithelial Permeability Assay. Permeability was assessed by measuring the flux of FITC-dextran from the upper compartment to the lower compartment in Transwell plates (pore size 0.4 μ m; polyester membrane, Corning, New York, USA). Caco-2 cells were grown until full confluency in 12 well Transwell plates. Here, we applied the same treatment groups as described in the impedance-based technique. Cells were treated with 1000 μ M H_2O_2 or pretreated with 10 μ M olaparib for 30 minutes. After 24 hours, FITC-dextran solution (1 mg/ml) was added to the upper chamber. 1 hour later, a medium from the lower chamber was collected and the fluorescence intensities were detected by a Promega GloMax plate reader (Promega, USA) at 490-nm excitation and 510–570 nm emission wavelengths.

2.11. Determination of Apoptosis. Mouse Annexin V & Dead Cell Kit (Merck Millipore, Massachusetts, USA) was used for the quantitative analysis of live, early, and late apoptotic and necrotic cells. Caco-2 cells were seeded onto 6-well plates at a density of 10^6 cells/well. Treatments and treatment groups were exactly the same as described above at the FITC-dextran assay. 24 hrs after treatment, cells were trypsinized and collected; sample preparation was performed as suggested by the manufacturer. Briefly, 100 μ l of cell suspension was incubated with 100 μ l of Muse Annexin V & Dead Cell reagent for 20 minutes, in the dark at room temperature. After staining, the assay was performed with a Muse Cell Analyzer (flow cytometer).

2.12. Seahorse XFp Cell Mito Stress Test. Measurement of the oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) in Caco-2 monolayers was performed by a Seahorse XFp Extracellular Flux Analyzer (Agilent Technologies, California, USA). The day before the assay, the Seahorse XFp Sensor Cartridge was hydrated with XF Calibrant Solution and was kept at 37°C in a CO_2 -free incubator overnight. Caco-2 cells were seeded on XFp Miniplates

at a density of 1.5×10^4 cells/well. After reaching 100% confluence, cells were treated exactly as described at the FITC-dextran assay. After the treatment, a complete growth medium was replaced with an unbuffered, serum-free Agilent XF Base assay medium, pH 7.4. XFp Mito Stress Test Kit was used to test mitochondrial function. Injection of oligomycin, carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), and the mix of rotenone and antimycin A allows determining the key bioenergetic parameters: basal respiration, ATP production-linked respiration (ATP production), maximal respiration, spare respiratory capacity, nonmitochondrial respiration, proton leak, and coupling efficiency. Oligomycin inhibits the F_0 subunit of the F_0F_1 -ATP synthase, thereby indicating ATP-linked OCR, i.e., level of ATP synthesis. ATP-linked respiration is calculated by the difference between baseline OCR and OCR after oligomycin injection. Distracting nonmitochondrial respiration from the OCR after FCCP injection represents maximal respiration. FCCP is a mitochondrial uncoupler, which separates the activity of phosphorylation and oxidation. Under these circumstances, ETC might work with its maximum rate and consumes higher amounts of O_2 without developing membrane potential between the two sides of the mitochondrial inner membrane. Spare respiratory capacity is defined by the difference between maximal and basal respiration. The mixture of rotenone and antimycin A inhibits CI and CIII, respectively; thus, mitochondrial ETC and O_2 consumption are blocked. The final concentrations of the modulators were $1 \mu M$. OCR after rotenone/antimycin A injection represents nonmitochondrial respiration. ATP-linked respiration divided by basal respiration reveals coupling efficiency.

2.13. Light Microscopy Imaging. Caco-2 cells were seeded at a density of 10^6 cells/well on 6-well plates. After reaching confluency, the monolayers were treated exactly as described at the FITC-dextran assay. 24 hours later, monolayers were visualized by EVOS XL Core Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, USA) using a 20 \times objective.

2.14. Statistical Analysis. Experimental data were analyzed by using GraphPad Prism Software (GraphPad Software Inc., California, USA). Statistical difference between groups was established by Student's *t*-test, with Bonferroni correction; *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Olaparib Improved TNBS-Colitis in Mice. To evaluate the effect of olaparib in experimental colitis, we used the TNBS-colitis model (Figure 1(a)), a mouse model of CD [35]. Olaparib was used as a pretreatment in 20 and 50 mg/kg bodyweight dose. On the one hand, olaparib failed to significantly ameliorate weight loss in TNBS-challenged animals (Figure 1(b)). But on the other hand, it decreased inflammation scores by more than ~50% in 50 mg/kg ($n = 21$), but not in 20 mg/kg dosage ($n = 9$) (Figure 1(d)). Hence, we used 50 mg/kg dose in the further experiments.

Olaparib impeded histological injury in the colon (Figure 1(c)), reduced the number of ulcers ($n = 27$) (Figure 1(e)) and their lengths ($n = 27$) (Figure 1(f)), and most importantly, diminished FITC-dextran permeability ($n = 8$) (Figure 1(g)) compared to the CTRL group ($n = 5$). Levels of inflammatory cytokines were also modulated. Olaparib diminished IL-1 β (Figure 2(a)) and IL-6 (Figure 2(b)) proinflammatory cytokine levels, but enhanced anti-inflammatory IL-10 production (Figure 2(c)) in the colon ($n = 13$). Interestingly, we could not find statistically significant alteration in the TNF- α level (Figure 2(a)). We also evaluated numerous hematological parameters in colitic mice (Figure 3(a)). We found only 2 parameters, namely, the amounts of lymphocytes and monocytes, which were significantly modulated by the treatments. In agreement with others' findings on colitis models, TNBS substantially reduced lymphocyte number in mice ($n = 9$), while olaparib counteracted this effect ($n = 20$). In contrast, monocyte number was higher in the TNBS group ($n = 9$), whereas it was significantly less elevated in the TNBS+olaparib group (Figure 3(a)) ($n = 20$). We calculated specific blood cell ratios, which were previously shown to be changed in CD [36] based upon the individual blood cell counts. Similarly to CD, neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) (Figure 3(e)) and platelet to lymphocyte ratio (PLR) (Figure 3(c)) were both increased in TNBS-colitis and they were markedly reduced by olaparib treatment. Again, as in CD, lymphocyte to monocyte ratio (LMR) (Figure 3(b)) was reduced in experimental colitis, and it was amended by the PARP inhibitor. Unfortunately, TNBS-induced changes in the neutrophil to monocyte ratio (NMR) (Figure 3(d)) did not reach statistical significance compared to the vehicle. However, olaparib improved NMR related to the TNBS-treated group.

3.2. Caco-2 Colonic Epithelial Cells Expressed PARP-1, PARP-2 and PARP-3. Olaparib has been shown to inhibit three members of the PARP enzyme family, namely, PARP-1 ($IC_{50} = 5$ nM), PARP-2 ($IC_{50} = 1$ nM), and PARP-3 ($IC_{50} = 4$ nM) [37]. Thus, we investigated the basal expression profile of the three target isoforms in untreated Caco-2 cells forming a confluent monolayer. We detected continuous PARP-1, PARP-2, and PARP-3 mRNA expressions (Figures 4(a)–4(c)), but with different expression rates (PARP-1 > PARP-2 > PARP-3) (Figure 4(c)). In Caco-2 cells, PARP-1 was the most highly expressed isoform. PARP-2 and PARP-3 mRNA expressions were at about ~9-fold and ~335-fold weaker compared to PARP-1 (Figure 4(c)).

3.3. Olaparib Improved Barrier Function of Epithelial Monolayer in Oxidative Stress. Caco-2 monolayers are widely used as a model for intestinal epithelial barrier [38]. Since the activity of PARP-1, PARP-2, and PARP-3 isoforms can be induced by DNA-damage [39], and as oxidative stress induces mucosal injury in IBD [40, 41], we tested different H_2O_2 concentrations (100–1000 μM) on Caco-2 monolayers. We assessed barrier integrity by an impedance-based technique (Figure 4(d)). Lower concentrations of H_2O_2 (100–500 μM) did not considerably modify cell index (CI; calculated from TEER impedance values) meaning they did not

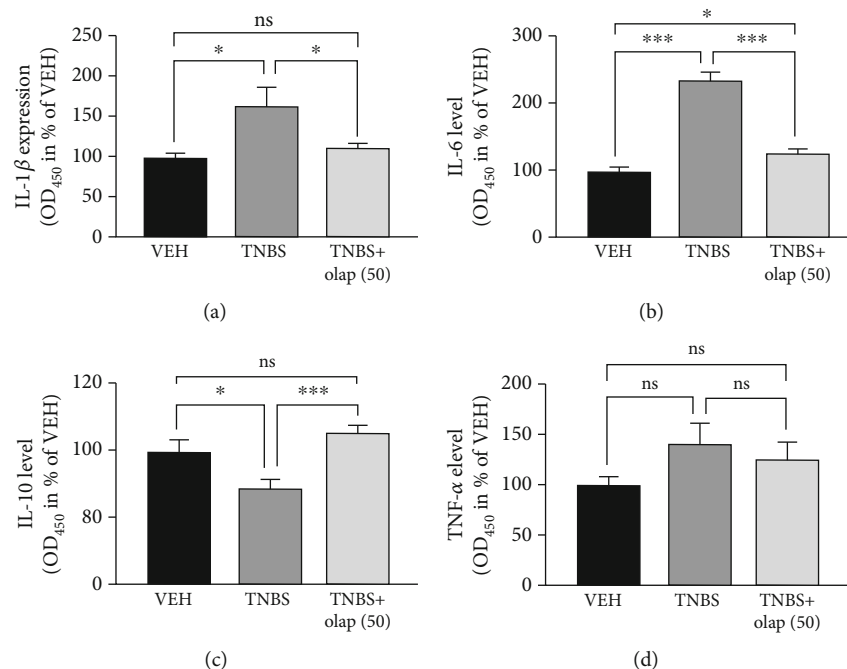


FIGURE 2: Olaparib decreased colonic proinflammatory cytokine (IL-1 β and IL-6) and increased anti-inflammatory IL-10 cytokine levels. Cytokine levels of (a) IL-1 β , (b) IL-6, (c) IL-10, and (d) TNF- α . Data combined from 2 separate experiments ($n = 9-13$) and expressed as mean \pm SEM; ns: not significant; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. VEH: vehicle; TNBS: 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid; olap (50): 50 mg/kg olaparib.

impair barrier integrity. However, 1 mM H₂O₂ rapidly and permanently decreased CI. After 24 hrs, 1 mM H₂O₂ strongly eroded the epithelial monolayer (Figure 4(d)). Consequently, in the further experiments, we applied 1 mM concentration of H₂O₂ to challenge the barrier. Olaparib pretreatment, 30 min before H₂O₂ exposure, improved CI compared to H₂O₂-treated cells and protected monolayer integrity (Figure 5(b)). To confirm these findings, we also performed FITC-dextran *trans*-epithelial permeability assay in the same model at the endpoint of the impedance-based measurement, after 24 hrs incubation (Figure 5(a)). We detected about ~20-fold increase in FITC-dextran fluorescent intensity after H₂O₂ treatment (i.e., FITC-dextran could pass the monolayer) in relation to CTRL. In contrast, olaparib reduced H₂O₂-induced FITC-dextran permeability near to the level of control (Figure 5(a)). To even further refine our results, we performed microscopic imaging and observed morphological changes in the structure of epithelial monolayer after H₂O₂ treatment. We realized compromised, in some places broken monolayer, with presumably dying cells, which lost their connection to neighbors in the monolayer. Olaparib prevented these morphological changes and kept the cells as an integral part of the barrier in their normal, epithelial phenotype (Figure 5(c)).

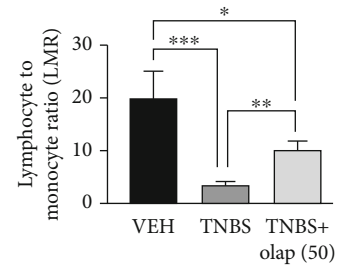
3.4. Olaparib Protected against Oxidative Stress-Induced Cell Death in Epithelial Barrier. To assess whether oxidative stress-induced barrier dysfunction involves epithelial cell death we performed flow cytometry analysis using Annexin V/7-AAD labeling (Figure 5(d)). H₂O₂ (1 mM) induced a

marked increase in the amount of 7-AAD positive dead, basically necrotic cells (5.87% of total cells; 4.89-fold increase) compared to CTRL. In addition, it enhanced the annexin V/7-AAD double-positive, late apoptotic cell number (31.9% of total cells; 6.86-fold increase). In our hands, H₂O₂ had no significant effect on early apoptosis. Olaparib protected against H₂O₂-induced cell death, i.e., it reduced necrotic cell death (1.25% of total cells; 4.70-fold decrease) and late apoptosis (5.73%; 5.17-fold decrease) almost to the level of CTRL (Figure 5(d)).

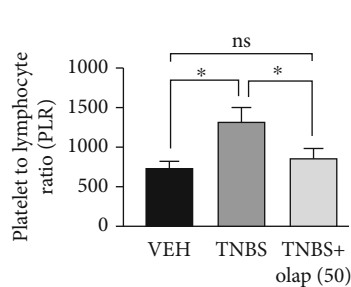
3.5. PARP Inhibition Recovered Glycolytic Activity Compromised by H₂O₂ Treatment. In inflammation, colonocytes switch their oxidative metabolism (butyrate consumption) to aerobic glycolysis and produce lactate [13, 17] (Figure 6(a)). Thus, we investigated the glycolytic activity by measuring extracellular acidification rate (ECAR), i.e., lactate production (Figure 6(b)), two hours after H₂O₂ treatment in the early phase of oxidative stress. H₂O₂ caused a dramatic collapse in basal ECAR (w/o oligomycin) compared to CTRL, which was markedly enhanced by olaparib (Figure 6(b) (1-3 points of the measurement) and Figure 6(c)). Oligomycin treatment increased ECAR both in the CTRL and H₂O₂+olaparib-treated cells compared to the untreated (w/o oligomycin) group but failed to stimulate acidification in the H₂O₂-damaged monolayer (Figure 6(b) (4-6 points of measurement) and Figure 6(d)). FCCP, rotenone, and antimycin A did not influence ECAR significantly in either treatment groups (Figure 6(b) (7-12 points of measurement)).

Hematological parameters	Unit	CTRL		TNBS		TNBS + olaparib	
		mean	SEM	mean	SEM	mean	SEM
WBC	(10 ⁹ /L)	4,50	± 0,684	4,28	±0,518	4,71	±0,280
RBC	(10 ⁹ /L)	8,71	± 0,491	10,62	±0,470	10,03	±0,286
HGB	(g/L)	147,45	± 3,223	169,38	±6,793	162,40	±3,821
HCT	(%)	44,84	± 2,718	50,86	±2,044	49,67	±1,258
MCV	(fL)	51,43	± 0,810	47,97	±0,511	49,71	±0,747
MCH	(pg)	16,54	± 0,452	16,02	±0,167	16,26	±0,204
MCHC	(g/L)	322,33	± 9,521	333,75	±4,753	328,05	±5,309
PLT	(10 ⁹ /L)	1242,50	± 112,356	1310,87	±95,849	1347,42	±82,603
RDW-SD	(fL)	25,93	± 1,040	22,88	±0,340	23,54	±0,752
RDW-CV	(%)	17,28	± 0,539	18,04	±0,422	17,56	±0,228
PDW	(fL)	7,07	± 0,318	7,74	±0,490	7,20	±0,219
MPV	(fL)	6,88	± 0,156	6,89	±0,174	6,73	±0,111
P-LCR	(%)	6,63	± 0,975	6,99	±1,258	6,05	±0,692
PCT	(%)	0,75	± 0,080	0,88	± 0,055	0,79	± 0,056
NRBC	(10 ⁹ /L)	0,25	± 0,217	0,02	± 0,003	0,02	± 0,007
NEUT	(10 ⁹ /L)	1,11	± 0,156	2,08	± 0,366	2,13	± 0,259
LYMPH	(10 ⁹ /L)	2,09 ^A	± 0,309	1,15 ^B	± 0,149	1,82 ^A	± 0,212
MONO	(10 ⁹ /L)	0,14 ^A	± 0,040	0,32 ^B	± 0,073	0,22 ^A	± 0,036
EO	(10 ⁹ /L)	0,11	± 0,026	0,04	± 0,028	0,14	± 0,030
BASO	(10 ⁹ /L)	0,01	± 0,002	0,01	± 0,002	0,01	± 0,004

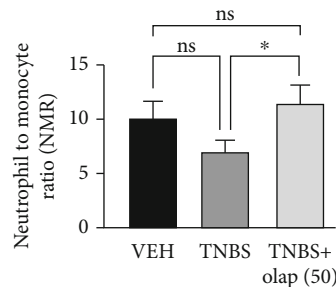
(a)



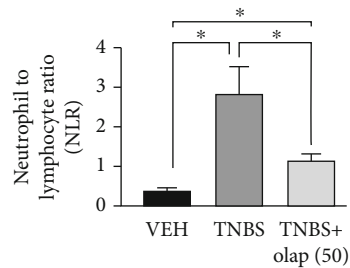
(b)



(c)



(d)



(e)

FIGURE 3: Olaparib modified hematological parameters and improved blood cell ratios in TNBS-treated mice. (a) Hematological parameters in the VEH, TNBS, and TNBS+olap (50) groups. Mean values \pm SEM are shown in the table. A, B = different letters in each row indicate significant differences between groups ($P < 0.05$). Data combined from 3 separate experiments ($n = 9-20$). (b) Lymphocyte to monocyte ratio (LMR), (c) platelet to lymphocyte ratio (PLR), (d) neutrophil to monocyte ratio (NMR) (e), and neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) values were calculated for each mouse individually before the averages were determined. Mean \pm SEM is shown; ns: not significant; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. Data are combined from 3 separate experiments ($n = 9-20$). Abbreviations: WBC: white blood cell number; RBC: red blood cell number; HGB: hemoglobin; HCT: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; PLT: platelet count; RDW-SD: red cell distribution width-standard deviation; RDW-CV: red cell distribution width-coefficient of variation; PDW: platelet distribution width; MPV: mean platelet volume; P-LCR: platelet large cell ratio; PCT: procalcitonin; NRBC: nucleated red blood cells; NEUT: neutrophil count; LYMPH: lymphocyte count; MONO: monocyte count; EO: eosinophil count; BASO: basophil count.

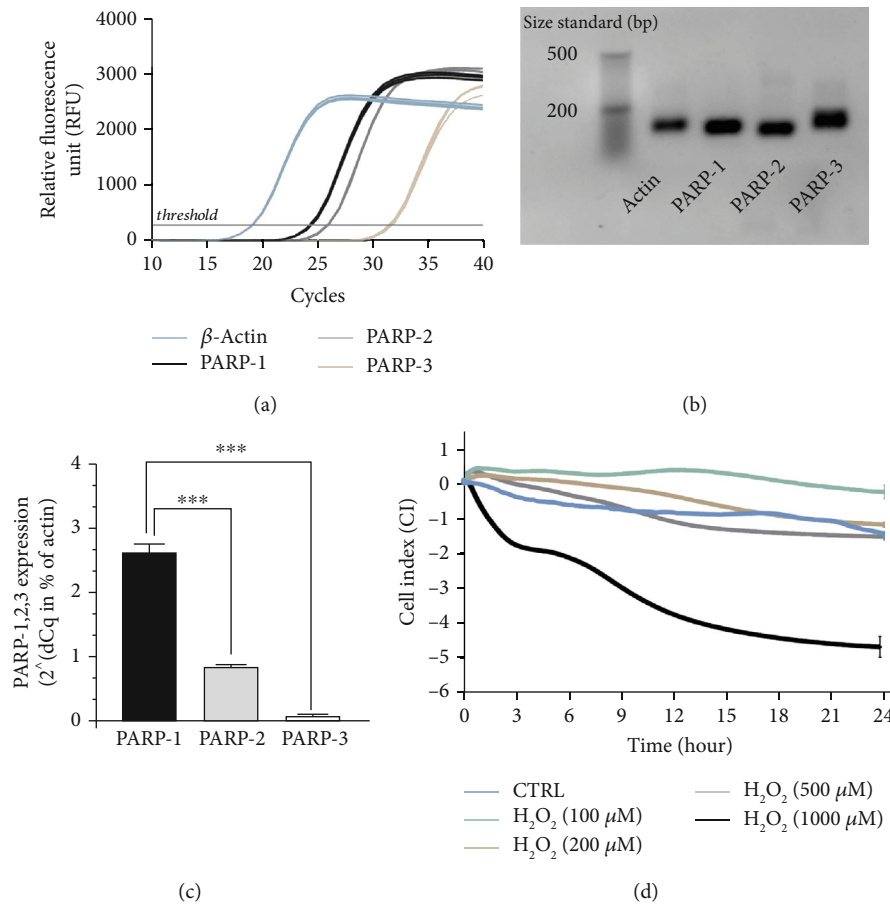


FIGURE 4: PARP-1, PARP-2, and PARP-3 are expressed in Caco-2 monolayers and high concentration of H_2O_2 disrupted barrier integrity. (a) Representative amplification curves of PARP-1, PARP-2, PARP-3, and β -actin quantitative real-time PCR (each containing three biological replicates and three technical replicates (data for biological replicates is not shown)). β -Actin is used as reference gene. (b) Agarose gel electrophoresis of the PCR products of the amplification (after 40th cycles) introduced in (a). Nonquantitative gene amplicons visualized in a 1.5% agarose gel. (product size: β -actin: 121 bp, PARP-1: 109 bp, PARP-2: 97 bp, and PARP-3: 115 bp; size standard from LONZA DNA ladder, 20 bp). (c) Relative gene expression results ($2^{-\Delta\text{Cq}}$ mean), where β -actin expression is considered 100% (data is not shown). The relative differences (dCq) between the average Cq for the β -actin and the mean Cq per individual samples (PARP-1, PARP-2, and PARP-3). (d) Effect of H_2O_2 at different concentrations (100-1000 μM) on the disruption of epithelial barrier integrity of Caco-2 monolayers. Electrical impedance was monitored every 3 minutes for 24 hours with an xCELLigence RTCA instrument. Impedance-related cell index (CI) values from one of three independent experiments are expressed as mean \pm SD ($n = 4-6$).

3.6. PARP Inhibitor Olaparib Preserved Mitochondrial Respiration in H_2O_2 -Induced Stress. Under physiologic conditions, butyrate is the main source of ATP in colonocytes [12], and butyrate metabolism involves dynamic mitochondrial ETC activity and continuous OXPHOS [42]. Therefore, we investigated the activity of ETC and OXPHOS by measuring the oxygen consumption rate in our epithelial barrier model (Figure 7(a)). First, the basal respiration (OCR w/o oligomycin, green field on Figure 7(a)) was determined. H_2O_2 reduced basal respiration in epithelial cells compared to CTRL, and olaparib did not modulate this effect (Figure 7(b) (1-3 points of measurement and Figure 7(c)) indicating that olaparib had no effect on basal respiration. After oligomycin treatment, the ATP production-linked OCR (OCR with oligomycin, yellow field on Figure 7(a)) can be measured that reflects the activity of OXPHOS and ATP generation. Oligomycin reduced OCR and OXPHOS

overall in all three experimental groups (Figure 7(b) (4-6 points of measurement)) and Figure 7(d)), but H_2O_2 -treated cells consumed O_2 even to a lesser extent than CTRL, which suggested a reduced ATP production. Olaparib had no significant effect on the ATP-linked OCR in H_2O_2 -treated cells (Figure 7(d)). Furthermore, olaparib ameliorated the H_2O_2 -induced decline in coupling efficiency (Figure 7(e)). In contrast, FCCP, an uncoupling agent that induces maximal respiration in the mitochondria (OCR with FCCP, beige field on Figure 7(a)), enhanced OCR in all three groups in different extents (Figure 7(b) (7-10 points of measurement)). We detected the highest OCR in CTRL, the lowest in the H_2O_2 -induced cells while olaparib counteracted the effect of H_2O_2 (Figure 7(b) (7-10 points of measurement) and Figure 7(f)). FCCP application also determined spare respiratory capacity (blue field on Figure 7(a)). Spare respiratory capacity was intensely reduced by H_2O_2 compared to CTRL, but olaparib

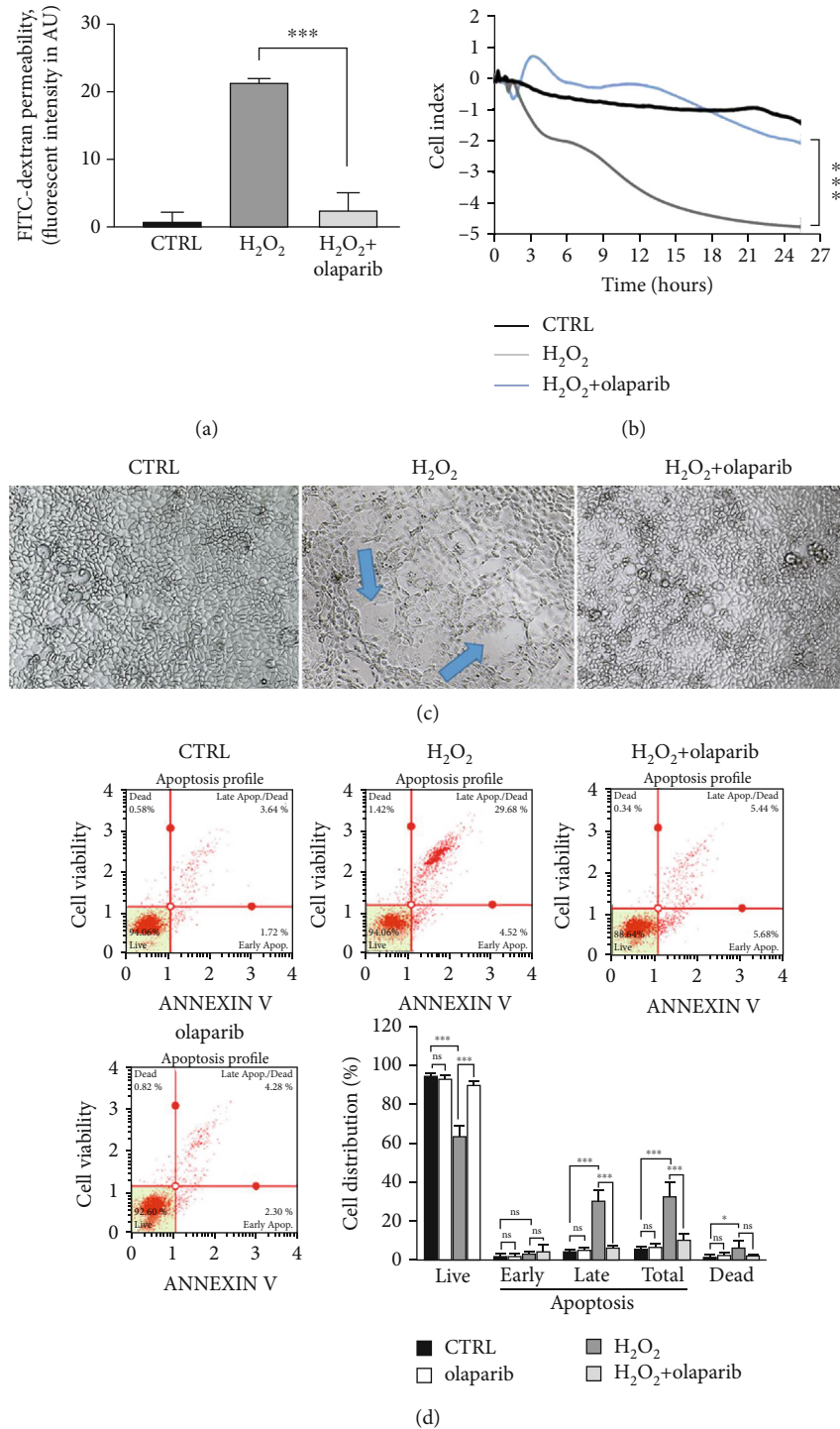


FIGURE 5: Olaparib improved epithelial barrier integrity in H₂O₂-treated Caco-2 monolayers. Caco-2 monolayers were pretreated with 10 μ M olaparib for 30 minutes before 1 mM H₂O₂ treatment for 24 hours in all experimental settings. The CTRL and H₂O₂ groups received the same amount of DMSO as the olaparib-treated cells. (a) FITC-dextran epithelial permeability assay. 40 kDa FITC-dextran (1 mg/ml) was added to the upper chamber of the Transwell plate. After 1 hour of incubation, the medium from the lower chamber was collected and the fluorescence intensities were measured. Data combined from 2 separate experiments ($n = 4$). (b) Electrical impedance monitoring of Caco-2 monolayers using E-Plates and xCELLigence RTCA instrument. Data from one of three experiments are expressed as mean \pm SD ($n = 4-6$). (c) Representative light microscopy images of confluent Caco-2 monolayers after 24 hours treatment. (d) Determination of apoptosis and necrosis in Caco-2 monolayers analyzed by Muse Annexin V & Dead Cell Kit. Representative apoptosis profiles and the percentage of live, early apoptotic, late apoptotic, total apoptotic, and necrotic cells are presented. Data are combined from 2 separate experiments ($n = 4$) and expressed as mean \pm SD; ns: not significant; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$.

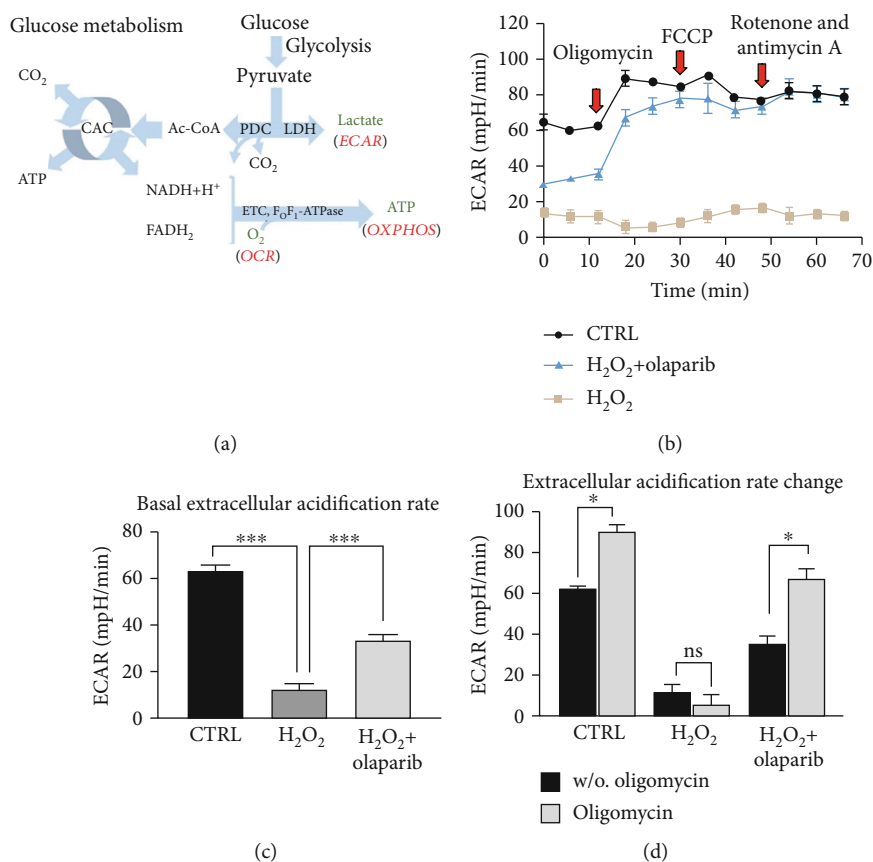


FIGURE 6: Olaparib improved aerobic glycolysis in Caco-2 monolayers exposed to H₂O₂-induced oxidative stress. Seahorse XFp Mito Stress test was performed after Caco-2 monolayers were pretreated with 10 μ M olaparib for 30 minutes and then treated with 1000 μ M H₂O₂ for 2 hours. The CTRL and H₂O₂ groups received the same amount of DMSO as the olaparib-treated cells. Oligomycin (1 μ M), FCCP (1 μ M), and the mixture of rotenone and antimycin A (1 μ M) were added sequentially during the measurement. (a) Schematic illustration of glucose metabolism. (b) Extracellular acidification rate (ECAR), (c) basal ECAR, and (d) ECAR changes are shown. ECAR changes were calculated by the difference between ECAR before and after oligomycin injection. Data combined from 2 separate experiments ($n = 4$); ns: not significant; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. Abbreviations: PDC: pyruvate dehydrogenase complex; LDH: lactate dehydrogenase; CAC: citric acid cycle; ETC: mitochondrial electron transport chain; ECAR: extracellular acidification rate; OCR: oxygen consumption rate; OXPHOS: oxidative phosphorylation.

attenuated this reduction (Figure 7(g)). H₂O₂ reduced proton leak (orange field on Figure 7(a)) compared to CTRL, and it was further reduced by olaparib in Caco-2 cells (Figure 7(h)).

4. Discussion

The anti-inflammatory role of PARP inhibition is thoroughly established; however, introduction of PARP inhibitors into clinical therapy of anti-inflammatory diseases has not been initiated yet because of the potential risk in long-term use of the drugs [33]. In this study, we intended to provide experimental support for repositioning the PARP inhibitors (which are successfully applied in human cancer therapy) for the clinical management of the acute flare-up periods of CD. For that purpose, we used a TNBS-induced experimental colitis model in mice, which is widely accepted for studying CD, since they share many pathological (clinical, histological, and biochemical) characteristics [35]. Furthermore, enhanced PARP-1 expression was found in the colon of rodents [43, 44] in experimental colitis models, as

well as in IBD patients [45], which makes the model more valuable for studying PARP inhibitors. In this report, we explicitly focused on the epithelial barrier function, cell survival, and bioenergetics; hence, we used a Caco-2 monolayer as an *in vitro* model of intestinal epithelial barrier [46]. We demonstrate that olaparib improves inflammation in TNBS-colitic mice and that it protects Caco-2 epithelial barrier in oxidative stress by rescuing glycolytic activity and by protecting some aspects of mitochondrial function.

In a recent review about repurposing PARP inhibitors for the therapy of nononcological diseases [33], Berger et al. did not consider IBD among those chronic diseases, in which the assumed benefits vs. the risks justify first priority of repurposing. However, the available preclinical data on IBD models successfully utilized outdated PARP inhibitors such as 3-aminobenzamide [47]. Our findings of *in vivo* anti-inflammatory effects of olaparib, a PARP inhibitor approved for human cancer therapy, may justify initiation of clinical trials for repurposing this drug for IBD therapy. We hypothesize that PARP inhibition might be beneficial in the acute flare-ups of severe CD, where detrimental

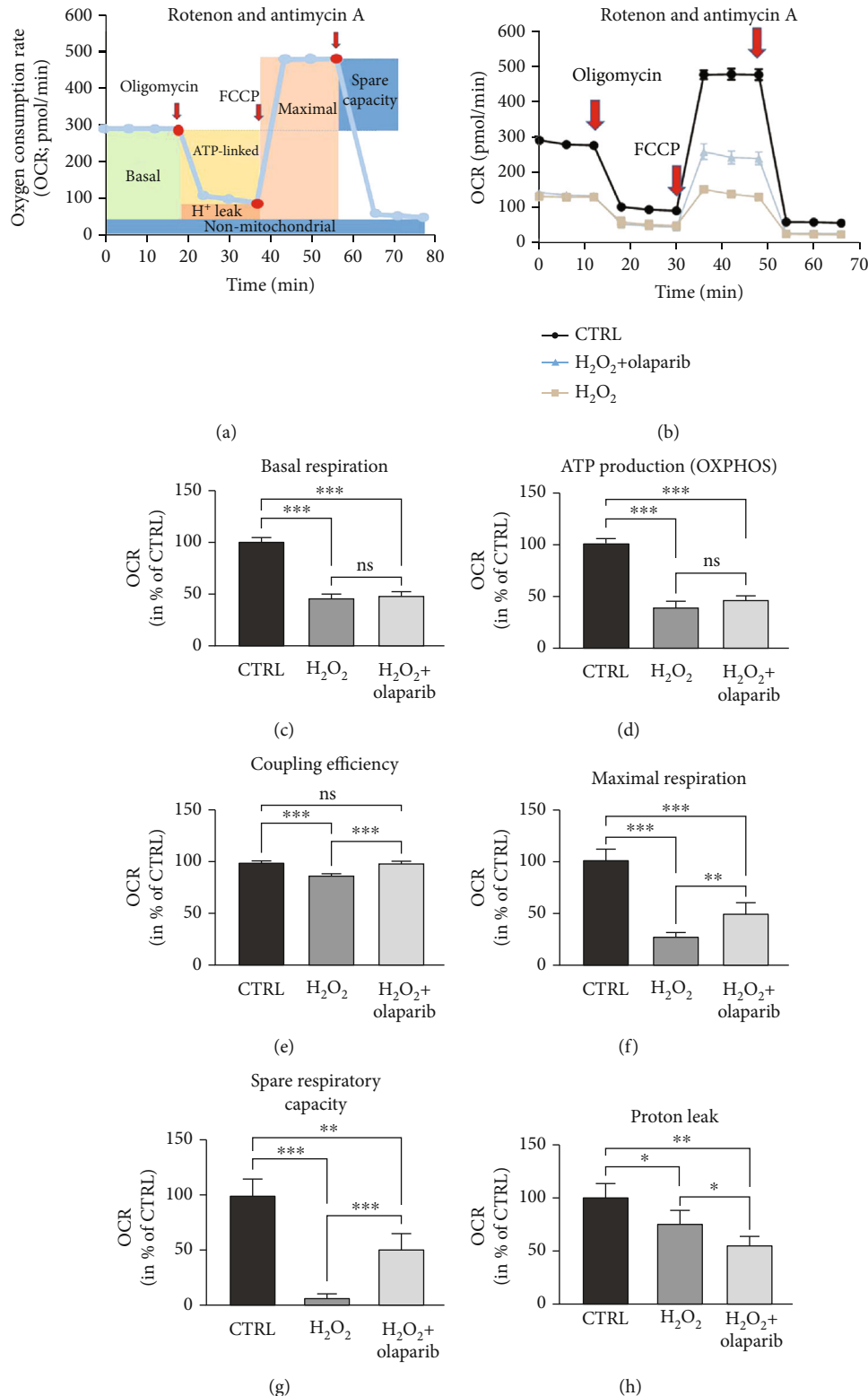


FIGURE 7: Olaparib protected mitochondrial function in Caco-2 monolayers subjected to H₂O₂-induced oxidative stress. Caco-2 monolayers were pretreated with 10 μ M olaparib for 30 minutes and then treated with 1000 μ M H₂O₂ for 2 hours. The CTRL and H₂O₂ groups received the same amount of DMSO as the olaparib-treated cells. Seahorse XFp Mito Stress test was performed, when oligomycin (1 μ M), FCCP (1 μ M), and the mixture of rotenone and antimycin A (1 μ M) were injected sequentially. (a) Key parameters of mitochondrial respiration measured by Seahorse XFp Extracellular Flux Analyzer. (b) Measurement of oxygen consumption rate (OCR). Data combined from 2 separate experiments are expressed as mean \pm SD ($n = 4$). Bioenergetic parameters: (c) basal respiration, (d) ATP production, (e) coupling efficiency, (f) maximal respiration, (g) spare respiratory capacity, and (h) proton leak were calculated. Results are expressed in percentage of control (mean \pm SD of two independent experiments, $n = 4$); ns: not significant; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

ulceration and tissue damage are caused by the energetic collapse of mucosal cells. It could be especially true in the severe cases of drug nonresponders, e.g., those one-third of IBD patients who primarily do not respond to infliximab (anti-TNF- α mAb; commonly prescribed drug in IBD) [48] or to other pharmacological therapies.

We demonstrated that olaparib improved TNBS-induced colitis in mice, reduced histological damage of the colon, diminished the number and length of the ulcers, inhibited proinflammatory cytokine production (IL-1 β , IL-6), but it enhanced the level of anti-inflammatory cytokine IL-10. Inflammatory cytokines participating in the generation of colon damage are predominantly produced by activated leukocytes [49]. The fact that PARP inhibition reduces leukocyte infiltration into the colon in experimental colitis is well characterized [50–52]. Accordingly, we investigated hematological parameters from peripheral blood in our TNBS-colitis model. Several types of blood cell ratios were recently highlighted as possible diagnostic parameters in IBD [36, 53]. Specifically in CD, NLR and PLR were suggested to be valuable diagnostic factors [36]. Moreover, NLR might predict disease severity [54]; however, this notion is debated [55]. In detail, elevated NLR, PLR, and reduced LMR were found in CD patients compared to control subjects, while NMR was not modified [36]. In our experiments, alterations in NLR, PLR, LMR, and NMR in TNBS-treated mice followed the observed changes in CD patients. In addition, olaparib effectively reversed CD-specific alterations in PLR and LMR, and most importantly, it reduced NLR. NLR was found to be a significant predictor of infliximab drug response in CD patients [56]. That is, the anti-inflammatory efficacy of infliximab correlated with decreased NLR in CD. Olaparib's identical anti-inflammatory effect in our TNBS-colitis model underlines the drug's potential in CD therapy.

Elevated NLR can also refer to oxidative stress in CD patients [57], which is an important inducer of PARP activation [58]. In active CD, excessive amounts of ROS are produced by the immune cells. The main source of ROS in immune cells is the H_2O_2 production [59], and H_2O_2 causes DNA damage in colonocytes [60] that triggers PARP activation. High concentrations of ROS result in apoptosis of IECs leading to disruption of epithelial barrier integrity in the colon, which is a definite hallmark of IBD. Accordingly, we treated Caco-2 monolayer with high concentration of H_2O_2 (1 mM) to imitate a strong oxidative stress-injured barrier, *in vitro*. We demonstrated that Caco-2 monolayer cells expressed PARP-1 mRNA in a high extent similarly to colonic mucosa [45]. In addition, we detected PARP-2 and PARP-3 expressions, however, in a decreasingly lower extent. That is, Caco-2 cells express the mRNA of olaparib's target enzymes (PARP-1, PARP-2, and PARP-3); furthermore, in the monolayer, these cells mimic the intestinal barrier [46]. Therefore, the Caco-2 monolayer seemed to be an appropriate model to investigate the effect of PARP-inhibition on barrier integrity, *in vitro*. Our results showed that olaparib preserved the Caco-2 monolayer integrity in oxidative stress and protected the epithelial cells from apoptosis. These findings indicated that colonic epithelial cells

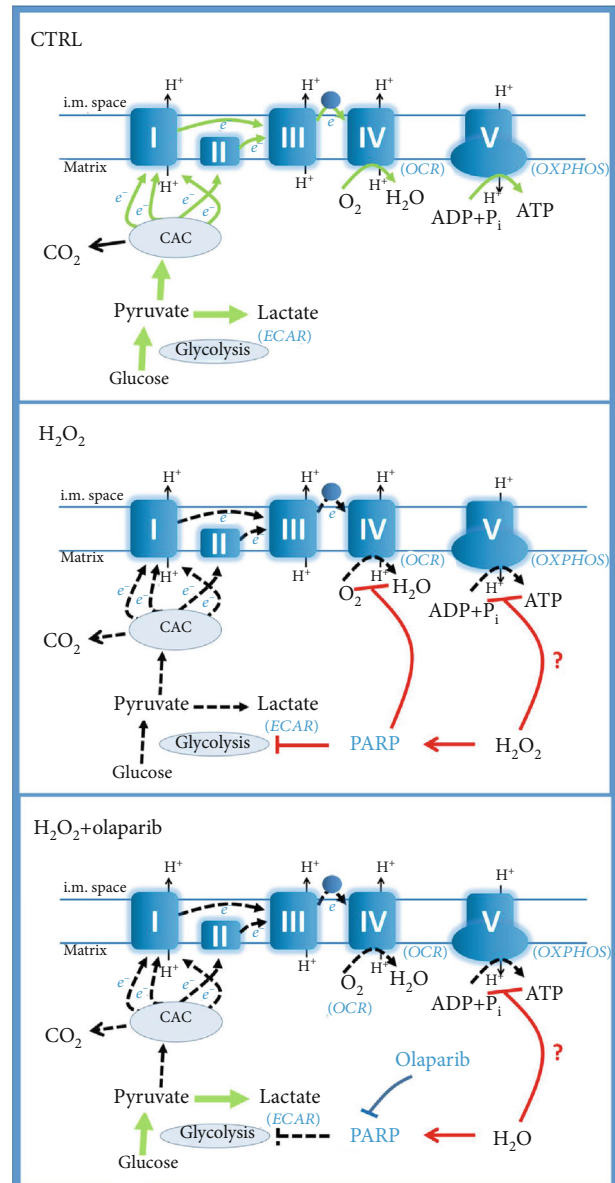


FIGURE 8: Schematic illustration of the assumed mechanistic effect of olaparib. CAC: citric acid cycle; OCR: oxygen consumption rate; OXPHOS: oxidative phosphorylation; ECAR: extracellular acidification rate; PARP: poly(ADP-ribose) polymerase.

might be direct targets of olaparib in TNBS-colitis, and barrier protection might be one of the key components of its anti-inflammatory action.

Reduced barrier integrity and increased gut permeability are typical signs of IBD. They have been recently associated with epithelial cell death, mitochondrial dysfunction, and depleted energy metabolism in IECs. IECs produce ATP predominantly by aerobic glycolysis in colitis. However, overactivation of PARP might fully block glycolysis [25]. To study the metabolic effect of olaparib in epithelial cell death, we induced powerful oxidative stress (1 mM H_2O_2 , 2 hrs) in Caco-2 monolayer and determined various parameters of the energy metabolism (Figure 8). The H_2O_2 stress dramatically decreased basal ECAR (basal glycolysis) and induced

energetic collapse in Caco-2 cells. Lower proton leak rate in H_2O_2 -treated cells compared to control also reflected this metabolic failure, because ATP demand reduces proton motive force and diminish proton leakage [61, 62]. In contrast, olaparib significantly enhanced ECAR in H_2O_2 -treated cells. Our results are strongly supported by the finding that poly(ADP-ribose) (PAR) binds to the PAR-binding motif in hexokinase and inhibits it thereby reducing glycolysis [25]. These data indicate that olaparib exerted its effect by inhibiting PAR production, thereby preventing PAR-mediated inhibition of hexokinase and the blockade of aerobic glycolysis (Figure 8).

Oligomycin is a F_0F_1 -ATPase inhibitor, which blocks OXPHOS. As expected, oligomycin had no effect on ECAR in the H_2O_2 treatment group; however, it intensely increased ECAR in H_2O_2 +olaparib-treated cells. An explanation for this finding might be that oligomycin blocked ATP synthesis and cells could not compensate for the lack of ATP by boosting glycolysis in H_2O_2 treatment group because of the strong PARP-mediated repression of hexokinase. Olaparib, however, prevented PARP activation and glycolytic collapse in H_2O_2 +olaparib-treated cells (Figure 8) even in the presence of oligomycin. One may say that oxidative stress per se might affect glycolytic enzymes and not only PARP activation regulates glycolytic activity. By using FCCP (mitochondrial uncoupler), rotenone, and antimycin A (inhibitors of ETC) mitochondrial energy production is totally abrogated. Under these circumstances, glycolysis remains the ultimate source of ATP (Figure 8). The fact that ECAR could reach the level of CTRL cells in the H_2O_2 +olaparib group after FCCP, rotenone and antimycin A treatment clearly indicated that glycolytic enzymes were not significantly affected by the oxidative stress in our system, and glycolytic energy production was controlled by PARP activation. Thus, olaparib protected from PARP-induced energetic collapse by improving aerobic glycolysis in oxidative stress (Figure 8).

Previous studies indicated that the mitochondria are the primary source of ROS in IECs during inflammation [63] and PARP-1 activation in oxidative stress causes mitochondrial dysfunction [25]. Accordingly, we wanted to know whether olaparib can prevent mitochondrial failure in our model. We found that basal respiration, mitochondrial ATP production, and nonmitochondrial oxygen consumption were strongly impeded in oxidative stress, and olaparib could not reverse these changes. However, it increased maximal respiration, spare respiratory capacity, and coupling efficiency and reduced proton leak. For understanding these results, we should consider the direct and indirect effects of H_2O_2 on CAC enzymes, ETC complexes, and F_0F_1 -ATPase and the effects of PARP activation on glycolysis and ETC complexes.

Previous studies using the DNA-alkylating agent N-methyl-N-nitroso-N-nitroguanidine (MNNG) for PARP activation reported mitochondrial dysfunction [25]. MNNG treatment resulted in decreased basal OCR, maximal OCR, ATP synthesis, and ECAR, while PARP inhibition significantly reversed these changes. Most importantly, they found that administration of pyruvate completely prevented MNNG-induced mitochondrial failure [25]. That is, the mitochondrial dysfunction was a direct consequence of

downregulated glycolysis, i.e., it compromised fuel supply for the CAC and ETC. Our results led to the same conclusion, namely, PARP activation reduced glycolysis and caused mitochondrial dysfunction (Figure 8).

In contrast to MNNG-induced PARP activation, we found that inhibition of the enzyme did not prevent the H_2O_2 -induced reduction of basal respiration and mitochondrial ATP production. On the other hand, olaparib enhanced ECAR, i.e., it effectively prevented glycolytic collapse (Figure 8). Additionally, it increased maximal respiration, spare respiratory capacity, coupling efficiency, and reduced proton leak, i.e., it increased efficacy of OXPHOS. The discrepancy between our results and the previous ones [25] can be resolved by considering that MNNG alkylates the DNA leading to DNA breaks and PARP activation. H_2O_2 , however, induces oxidative DNA damage-mediated PARP activation but can cause direct structural impairment to CAC, ETC, and F_0F_1 -ATPase components as collateral damage. It is well established that H_2O_2 deteriorates CAC activity and reduces proton motive force, which is a prerequisite for mitochondrial pyruvate transport [64]. Also, F_0F_1 -ATPase was reported to be susceptible to oxidative stress [65, 66]. In addition, ROS and especially H_2O_2 can directly block many components of the respiratory chain, such as NADH dehydrogenase or cytochrome c oxidase [65]. Our findings that maximal OCR of the H_2O_2 +olaparib treatment group could not reach the maximum OCR level of control cells are in line with the notion that ETC is sensitive toward oxidative stress (Figure 8). The observed difference between maximal OCRs of the two groups could be the result of oxidative damage to CAC, ETC, and F_0F_1 -ATPase components in the H_2O_2 +olaparib group. Because the glycolytic fuel supply pathway was unimpeded in both groups, thanks to olaparib's inhibitory effect on PARP in the H_2O_2 +olaparib group. Furthermore, the observed increase of maximal OCR in the H_2O_2 +olaparib group vs. the H_2O_2 group could result from direct control of the ETC by PARylation. Studies found excessively PARylated mitochondrial proteins, including components of ETC. In addition, PARP-inhibitors such as 3-aminobenzamide and nicotinamide prevented the H_2O_2 -induced electron transport blockade on CIV in isolated mitochondria [67]. These results suggest that PARP could regulate ETC activity on CIV, and it also proposed a mitochondrial target for PARP inhibitors. Another study suggested a pivotal role for PARP-1 in mitochondrial energy homeostasis and demonstrated CI as a mitochondrial target of PARP-1 activation [68]. However, it should be noted that the existence of PARP-1 or other PARP isoforms in the mitochondria is debated. But whether present or not in the mitochondria, PARP has a clear effect on mitochondrial function [69].

5. Conclusion

In conclusion, olaparib, a PARP inhibitor used in human oncotherapy, restored bioenergetics by glycolytic reactivation of colonic epithelial cells, and it decreased cell death. Epithelial cell protection might be a cause of improved barrier function that eventually resulted in reduced incidence

and severity of CD-like symptoms in an experimental rodent IBD model. However these findings provide experimental evidence for repurposing olaparib for IBD treatment and highlight its potential in the therapy of CD; clinical application of the drug in IBD needs further investigations.

Data Availability

The data underlying this article are available in the article.

Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This work was supported by the European Union, cofinanced by the European Social Fund (EFOP-3.6.1-16-2016-00004) and by the Ministry of Finance, Hungary (GINOP-2.3.3-15-2016-00025 and GINOP-2.3.2-15-2016-00049G). This work was also supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences (BO/00855/18/5 to BR) and the New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology from the source of the National Research, Development and Innovation Fund (UNKP-19-4-PTE-405 and UNKP-20-5-PTE-762 to BR). Work in the lab of RS is funded by the Austrian Science Fund (FWF grant P33325).

References

- [1] G. G. Kaplan, "The global burden of IBD: from 2015 to 2025," *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, vol. 12, no. 12, pp. 720–727, 2015.
- [2] A. Kaser, S. Zeissig, and R. S. Blumberg, "Inflammatory bowel disease," *Annual Review of Immunology*, vol. 28, no. 1, pp. 573–621, 2010.
- [3] S. Citi, "Intestinal barriers protect against disease," *Science*, vol. 359, no. 6380, pp. 1097–1098, 2018.
- [4] L. C.-H. Yu, "Microbiota dysbiosis and barrier dysfunction in inflammatory bowel disease and colorectal cancers: exploring a common ground hypothesis," *Journal of Biomedical Science*, vol. 25, no. 1, p. 79, 2018.
- [5] M. Camilleri, K. Madsen, R. Spiller, B. G. van Meerveld, and G. N. Verne, "Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease," *Neurogastroenterology & Motility*, vol. 24, no. 6, pp. 503–512, 2012.
- [6] E. Rath, A. Moschetta, and D. Haller, "Mitochondrial function – gatekeeper of intestinal epithelial cell homeostasis," *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, vol. 15, no. 8, pp. 497–516, 2018.
- [7] F. Bär, W. Bochmann, A. Widok et al., "Mitochondrial gene polymorphisms that protect mice from colitis," *Gastroenterology*, vol. 145, no. 5, pp. 1055–1063.e3, 2013.
- [8] J. D. Söderholm, G. Olaison, K. H. Peterson et al., "Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease," *Gut*, vol. 50, no. 3, pp. 307–313, 2002.
- [9] S. Santhanam, S. Rajamanickam, A. Motamarri et al., "Mitochondrial electron transport chain complex dysfunction in the colonic mucosa in ulcerative colitis," *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 18, no. 11, pp. 2158–2168, 2012.
- [10] S. Heller, H. M. Penrose, C. Cable et al., "Reduced mitochondrial activity in colonocytes facilitates AMPK α 2-dependent inflammation," *The FASEB Journal*, vol. 3, pp. 2013–2025, 2017.
- [11] J. Cai, H. Chen, M. Weng, S. Jiang, and J. Gao, "Diagnostic and clinical significance of serum levels of D-lactate and diamine oxidase in patients with Crohn's disease," *Gastroenterology Research and Practice*, vol. 2019, Article ID 8536952, 7 pages, 2019.
- [12] W. E. Roediger, "Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man," *Gut*, vol. 21, no. 9, pp. 793–798, 1980.
- [13] L. E. Glover, J. S. Lee, and S. P. Colgan, "Oxygen metabolism and barrier regulation in the intestinal mucosa," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 126, pp. 3680–3688, 2016.
- [14] N. D. Mathewson, R. Jenq, A. V. Mathew et al., "Gut microbiome-derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graft-versus-host disease," *Nature Immunology*, vol. 17, no. 5, pp. 505–513, 2016.
- [15] H. M. Hamer, D. Jonkers, K. Venema, S. Vanhoutvin, F. J. Troost, and R. J. Brummer, "Review article: the role of butyrate on colonic function," *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, vol. 27, no. 2, pp. 104–119, 2008.
- [16] E. Fernandez-Vizarra and M. Zeviani, "Mitochondrial disorders of the OXPHOS system," *FEBS Letters*, vol. 8, pp. 1062–1106, 2021.
- [17] C. C. Gillis, E. R. Hughes, L. Spiga et al., "Dysbiosis-associated change in host metabolism generates lactate to support *Salmonella* growth," *Cell Host & Microbe*, vol. 23, no. 1, pp. 54–64.e6, 2018.
- [18] B. Kelly and L. A. J. O'Neill, "Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity," *Cell Research*, vol. 25, no. 7, pp. 771–784, 2015.
- [19] K. Hadrava Vanova, M. Kraus, J. Neuzil, and J. Rohlena, "Mitochondrial complex II and reactive oxygen species in disease and therapy," *Redox Report*, vol. 25, no. 1, pp. 26–32, 2020.
- [20] K. A. Brand and U. Hermfisse, "Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species," *The FASEB Journal*, vol. 11, no. 5, pp. 388–395, 1997.
- [21] H. R. Molavian, M. Kohandel, and S. Sivaloganathan, "High concentrations of H₂O₂ make aerobic glycolysis energetically more favorable for cellular respiration," *Frontiers in Physiology*, vol. 7, p. 362, 2016.
- [22] S. Berg, P. L. Sappingto, L. J. Guzik, R. L. Delude, and M. P. Fink, "Proinflammatory cytokines increase the rate of glycolysis and adenosine-5'-triphosphate turnover in cultured rat enterocytes," *Critical Care Medicine*, vol. 3, pp. 1203–1212, 2003.
- [23] D. Carson, R. Barry, E. G. D. Hopkins et al., "Citrobacter rodentium induces rapid and unique metabolic and inflammatory responses in mice suffering from severe disease," *Cellular Microbiology*, vol. 22, no. 1, article e13126, 2020.
- [24] N. Vermeulen, S. Vermeire, I. Arijis et al., "Seroreactivity against glycolytic enzymes in inflammatory bowel disease," *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 17, no. 2, pp. 557–564, 2011.
- [25] S. A. Andrabi, G. K. E. Umanah, C. Chang et al., "Poly(ADP-ribose) polymerase-dependent energy depletion occurs through inhibition of glycolysis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 111, no. 28, pp. 10209–10214, 2014.
- [26] B. Zingarelli, P. W. Hake, T. J. Burroughs, G. Piraino, M. O'Connor, and A. Denenberg, "Activator protein-1

- signalling pathway and apoptosis are modulated by poly(ADP-ribose) polymerase-1 in experimental colitis," *Immunology*, vol. 113, no. 4, pp. 509–517, 2004.
- [27] S. Peng, L. Shen, M.-X. Tian, H.-M. Li, and S.-S. Wang, "Poly(-ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by regulating the balance of Th17/Treg cells and inhibiting the NF- κ B signaling pathway," *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 21, p. 134, 2020.
- [28] S. Sánchez-Fidalgo, I. Villegas, A. Martín, M. Sánchez-Hidalgo, and C. Alarcón de la Lastra, "PARP inhibition reduces acute colonic inflammation in rats," *European Journal of Pharmacology*, vol. 563, no. 1-3, pp. 216–223, 2007.
- [29] D. S. Kim, S. Challa, A. Jones, and W. L. Kraus, "PARPs and ADP-ribosylation in RNA biology: from RNA expression and processing to protein translation and proteostasis," *Genes & Development*, vol. 34, no. 5-6, pp. 302–320, 2020.
- [30] T. Jubin, A. Kadam, M. Jariwala et al., "The PARP family: insights into functional aspects of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in cell growth and survival," *Cell Proliferation*, vol. 49, no. 4, pp. 421–437, 2016.
- [31] S. Pazzaglia and C. Pioli, "Multifaceted role of PARP-1 in DNA repair and inflammation: pathological and therapeutic implications in cancer and non-cancer diseases," *Cell*, vol. 9, p. 41, 2019.
- [32] Z. Chen, J. Dudek, C. Maack, and U. Hofmann, "Pharmacological inhibition of GLUT1 as a new immunotherapeutic approach after myocardial infarction," *Biochem Pharmacol*, vol. 190, article 114597, 2021.
- [33] N. A. Berger, V. C. Besson, A. H. Boulares et al., "Opportunities for the repurposing of PARP inhibitors for the therapy of non-oncological diseases," *British Journal of Pharmacology*, vol. 175, no. 2, pp. 192–222, 2018.
- [34] R. Schicho, M. Bashashati, M. Bawa et al., "The atypical cannabinoid O-1602 protects against experimental colitis and inhibits neutrophil recruitment," *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 17, no. 8, pp. 1651–1664, 2011.
- [35] E. Antoniou, G. A. Margonis, A. Angelou et al., "The TNBS-induced colitis animal model: an overview," *Annals of Medicine and Surgery*, vol. 11, pp. 9–15, 2016.
- [36] J.-R. Feng, X. Qiu, F. Wang et al., "Diagnostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio in Crohn's disease," *Gastroenterology Research and Practice*, vol. 2017, Article ID 3526460, 5 pages, 2017.
- [37] L. Oplustil O'Connor, S. L. Rulten, A. N. Cranston et al., "The PARP inhibitor AZD2461 provides insights into the role of PARP3 inhibition for both synthetic lethality and tolerability with chemotherapy in preclinical models," *Cancer Research*, vol. 76, no. 20, pp. 6084–6094, 2016.
- [38] T. Lea, "Caco-2 Cell Line," in *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*, K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, and H. Wichers, Eds., Springer International Publishing, Cham, Switzerland, 2015.
- [39] N. C. Hoch and L. M. Polo, "ADP-ribosylation: from molecular mechanisms to human disease," *Genet Mol Biol*, vol. 43, no. 1, article e20190075, 2020Supplement 1, 2020.
- [40] A. D'Odorico, S. Bortolan, and R. Cardin, "Reduced plasma antioxidant concentrations and increased oxidative DNA damage in inflammatory bowel disease," *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, vol. 36, no. 12, pp. 1289–1294, 2001.
- [41] L. Lih-Brody, S. R. Powell, K. P. Collier et al., "Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease," *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 41, no. 10, pp. 2078–2086, 1996.
- [42] D. R. Donohoe, N. Garge, X. Zhang et al., "The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon," *Cell Metabolism*, vol. 13, no. 5, pp. 517–526, 2011.
- [43] I. Crespo, B. San-Miguel, C. Prause et al., "Glutamine treatment attenuates endoplasmic reticulum stress and apoptosis in TNBS-induced colitis," *PLoS One*, vol. 7, no. 11, article e50407, 2012.
- [44] R. R. Gerner, V. Klepsch, S. Macheiner et al., "NAD metabolism fuels human and mouse intestinal inflammation," *Gut*, vol. 67, no. 10, pp. 1813–1823, 2018.
- [45] H. M. El-Emshaty, A. A. Abdelfatah, H. Ismail, F. M. El-Taweel, and M. M. El-Hemaly, "Potential association of poly(-ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) with CD133 and G2/M as independent predictors in colorectal cancer development," *Biochemistry Letters*, vol. 14, no. 1, pp. 156–166, 2019.
- [46] L. Peng, Z. He, W. Chen, I. R. Holzman, and J. Lin, "Effects of butyrate on intestinal barrier function in a Caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier," *Pediatric Research*, vol. 61, no. 1, pp. 37–41, 2007.
- [47] H. B. Jijon, T. Churchill, D. Malfair et al., "Inhibition of poly(-ADP-ribose) polymerase attenuates inflammation in a model of chronic colitis," *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 279, no. 3, pp. G641–G651, 2000.
- [48] J. T. Bjerrum, C. Steenholdt, M. Ainsworth et al., "Metabonomics uncovers a reversible proatherogenic lipid profile during infliximab therapy of inflammatory bowel disease," *BMC Medicine*, vol. 15, no. 1, p. 184, 2017.
- [49] W. Strober and I. J. Fuss, "Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases," *Gastroenterology*, vol. 140, no. 6, pp. 1756–1767.e1, 2011.
- [50] B. Zingarelli, M. O'Connor, and P. W. Hake, "Inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase modulate signal transduction pathways in colitis," *European Journal of Pharmacology*, vol. 469, no. 1-3, pp. 183–194, 2003.
- [51] B. Zingarelli, C. Szabó, and A. L. Salzman, "Blockade of poly(-ADP-ribose) synthetase inhibits neutrophil recruitment, oxidant generation, and mucosal injury in murine colitis," *Gastroenterology*, vol. 116, no. 2, pp. 335–345, 1999.
- [52] R. di Paola, E. Mazzon, W. Xu et al., "Treatment with PARP-1 inhibitors, GPI 15427 or GPI 16539, ameliorates intestinal damage in rat models of colitis and shock," *European Journal of Pharmacology*, vol. 527, no. 1-3, pp. 163–171, 2005.
- [53] M. Celikbilek, S. Dogan, O. Ozbakir et al., "Neutrophil-lymphocyte ratio as a predictor of disease severity in ulcerative colitis," *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, vol. 27, no. 1, pp. 72–76, 2013.
- [54] W.-M. Kang, C.-Z. Zhu, X.-X. Yang et al., "Application of the Onodera prognostic nutrition index and neutrophil-to-lymphocyte ratio in risk evaluation of postoperative complications in Crohn's disease," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, p. 8481, 2017.
- [55] S.-Q. Gao, L.-D. Huang, R.-J. Dai, D. D. Chen, W. J. Hu, and Y. F. Shan, "Neutrophil-lymphocyte ratio: a controversial marker in predicting Crohn's disease severity," *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, vol. 8, no. 11, pp. 14779–14785, 2015.

- [56] M. K. Włodarczyk, A. E. Sobolewska, K. Stec-Michalska, J. J. Fichna, and M. E. Wisniewska-Jarosinska, "Neutrophil-lymphocyte ratio in Crohn's disease patients predicts sustained response to infliximab 52-week therapy," *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, vol. 24, pp. 127-128, 2015.
- [57] F. Eraldemir, M. Musul, A. Duman, B. Oztas, C. Baydemir, and S. Hulagu, "The relationship between neutrophil/lymphocyte and platelet/lymphocyte ratios with oxidative stress in active Crohn's disease patients," *Hippokratia*, vol. 20, no. 4, pp. 368-373, 2016.
- [58] A. A. Pieper, A. Verma, J. Zhang, and S. H. Snyder, "Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 20, no. 4, pp. 171-181, 1999.
- [59] B. Beltrán, P. Nos, F. Dasí et al., "Mitochondrial dysfunction, persistent oxidative damage, and catalase inhibition in immune cells of naïve and treated Crohn's disease," *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 16, no. 1, pp. 76-86, 2010.
- [60] P. Rosignoli, R. Fabiani, A. de Bartolomeo et al., "Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells," *Carcinogenesis*, vol. 22, no. 10, pp. 1675-1680, 2001.
- [61] M. D. Brand, L.-F. Chien, E. K. Ainscow, D. F. S. Rolfe, and R. K. Porter, "The causes and functions of mitochondrial proton leak," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1187, no. 2, pp. 132-139, 1994.
- [62] M. Wikström and R. Springett, "Thermodynamic efficiency, reversibility, and degree of coupling in energy conservation by the mitochondrial respiratory chain," *Communications Biology*, vol. 3, no. 1, p. 451, 2020.
- [63] M. G. Basilicata, G. Pepe, S. F. Rapa et al., "Anti-inflammatory and antioxidant properties of dehydrated potato-derived bioactive compounds in intestinal cells," *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 23, p. 6087, 2019.
- [64] L. Tretter and V. Adam-Vizi, "Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: a key role of α -ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress," *The Journal of Neuroscience*, vol. 20, no. 24, pp. 8972-8979, 2000.
- [65] Y. Zhang, O. Marcillat, C. Giulivi, L. Ernster, and K. J. A. Davies, "The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, no. 27, pp. 16330-16336, 1990.
- [66] G. Lippe, M. Comelli, D. Mazzilis, F. D. Sala, and I. Mavelli, "The inactivation of mitochondrial F_1 ATPase by H_2O_2 is mediated by iron ions not tightly bound in the protein," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 181, no. 2, pp. 764-770, 1991.
- [67] R. Halmosi, Z. Berente, E. Osz, K. Toth, P. Literati-Nagy, and B. Sumegi, "Effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on the ischemia-reperfusion-induced oxidative cell damage and mitochondrial metabolism in Langendorff heart perfusion system," *Molecular Pharmacology*, vol. 59, no. 6, pp. 1497-1505, 2001.
- [68] A. Kadam, T. Jubin, R. Roychowdhury et al., "Insights into the functional aspects of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in mitochondrial homeostasis in *Dictyostelium discoideum*," *Biology of the Cell*, vol. 112, no. 8, pp. 222-237, 2020.
- [69] A. Tapodi, Z. Bogнар, C. Szabo, F. Gallyas, B. Sumegi, and E. Hocsak, "PARP inhibition induces Akt-mediated cytoprotective effects through the formation of a mitochondria-targeted phospho-ATM-NEMO-Akt-mTOR signalosome," *Biochemical Pharmacology*, vol. 162, pp. 98-108, 2018.