Állatmodellek használata akut pankreatitisz patogenezisének vizsgálatában

Ph.D. tézis összefoglaló

Dr. Kui Balázs

Témavezetők:

Prof. Dr. Rakonczay Zoltán

Prof. Dr. Hegyi Péter

Szegedi Tudományegyetem

I. sz. Belgyógyászati Klinika

2017

A Ph.D. tézishez kapcsolódó cikkek listája:

I. **Kui B**, Balla Z, Végh ET, Pallagi P, Venglovecz V, Iványi B, Takács T, Hegyi P, Rakonczay Z Jr.: Recent Advances in the Investigation of Pancreatic Inflammation Induced by Large Doses of Basic Amino Acids in Rodents. *Lab Invest.* 2014;94:138-149. **IF: 3.676**

II. **Kui B**, Balla Z, Vasas B, Végh ET, Pallagi P, Kormányos ES, Venglovecz V, Iványi B, Takács T, Hegyi P, Rakonczay Z Jr: New Insights into the Methodology of L-Arginine-Induced Acute Pancreatitis. *PLoS ONE* 2015;10(2): e0117588. **IF: 3.057**

III. Maléth J, Balázs A, Balla Z, **Kui B,** Katona M, Judák L, Németh I, Pallagi P, Kemény LV, Rakonczay Z Jr, Venglovecz V, Földesi I, Pető Z, Somorácz Á, Borka K, Perdomo D, Lukacs G, Gray AM, Monterisi S, Zaccolo M, Sendler M, Mayerle J, Kühn J, Lerch MM, Sahin-Tóth M, Hegyi P: Alcohol Disrupts Levels and Function of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator to Promote Development of Pancreatitis. *Gastroenterology* 2015; 148(2):427-439. **IF: 18.187**

Publikációk: 3 (2 első szerő)
Kumulatív impakt faktor: 24.92

A Ph.D. tézishez nem kapcsolódó cikkek listája:

I. Katona M, Hegyi P, **Kui B**, Balla Z, Rakonczay Z Jr, Rázga Z, Tiszlavicz L, Maléth J, Venglovecz V: A Novel, Protective Role of Ursodeoxycholate in Bile-induced Pancreatic Ductal Injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016;310(3):G193-204. **IF: 3.297 (2015)**

II. Lakatos G, Balázs A, **Kui B**, Gódi S, Szücs Á, Szentesi A, Szentkereszty Z, Szmola R, Kelemen D, Papp R, Vincze Á, Czimmer J, Pár G, Bajor J, Szabó I, Izbéki F, Halász A, Leindler L, Farkas G Jr, Takács T, Czakó L, Szepes Z, Hegyi P, Kahán Z.: Pancreatic Cancer: Multicenter Prospective Data Collection and Analysis by the Hungarian Pancreatic Study Group. *J Gastrointest Liver Dis*. 2016;25(2):219-25. **IF: 1.891 (2015)**

III. Szentesi A, Tóth E, Bálint E, Fanczal J, Madácsy T, Laczkó D, Ignáth I, Balázs A, Pallagi P, Maléth J, Rakonczay Z Jr, **Kui B**, Illés D, Márta K, Blaskó Á, Demcsák A, Párniczky A, Pár G, Gódi S, Mosztbacher D, Szücs Á, Halász A, Izbéki F, Farkas N, Hegyi P; Hungarian Pancreatic Study Group. Analysis of Research Activity in Gastroenterology: Pancreatitis Is in Real Danger. *PLoS One*. 2016 24;11(10):e0165244. **IF: 3.057 (2015)**

IV. Párniczky A, **Kui B**, Szentesi A, Balázs A, Szűcs Á, Mosztbacher D, Czimmer J, Sarlós P, Bajor J, Gódi S, Vincze Á, Illés A, Szabó I, Pár G, Takács T, Czakó L, Szepes Z, Rakonczay Z, Izbéki F, Gervain J, Halász A, Novák J, Crai S, Hritz I, Góg C, Sümegi J, Golovics P, Varga M, Bod B, Hamvas J, Varga-Müller M, Papp Z, Sahin-Tóth M, Hegyi P; Hungarian Pancreatic Study Group. Prospective, Multicentre, Nationwide Clinical Data from 600 Cases of Acute Pancreatitis. *PLoS One*. 2016,31;11(10):e0165309. **IF: 3.057 (2015)**

V. Szücs Á, Marjai T, Szentesi A, Farkas N, Párniczky A, Nagy G, **Kui B**, Takács T, Czakó L, Szepes Z, Németh BC, Vincze Á, Pár G, Szabó I, Sarlós P, Illés A, Gódi S, Izbéki F, Gervain J, Halász A, Farkas G, Leindler L, Kelemen D, Papp R, Szmola R, Varga M, Hamvas J, Novák J, Bod B, Sahin-Tóth M, Hegyi P; Hungarian Pancreatic Study Group. Chronic Pancreatitis: Multicentre Prospective Data Collection and Analysis by the Hungarian Pancreatic Study Group. *PLoS One*. 2017, 16;12(2):e0171420. **IF: 3.057 (2015)**

Publikációk: 5
Kumulatív impakt faktor: 14.359

Rövidítések listája

AP: akut pankreatitisz

CCK: cholecisztokinin

CDE: kolin deficiens-etionin szupplementált

CFTR: cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor

ERCP: endoszkópos retrográd kolangio-pankreatográfia

ip.: intraperitoneális

IL: interleukin

KO: knock-out

MPO: mieoloperoxidáz

Bevezetés

A hasnyálmirigy élettana

A hasnyálmirigy acinusokból, duktuszokból, vérerekből, endokrin sejtekből, valamint extracelluláris mátrixból áll. A legnagyobb mennyiségben előforduló acinus sejtek fő funkciója, az emésztőenzimek termelése. Az enzimszekréció fő stimulusai: a nervusz vágusz által termelt acetilkolin, valamint a keringésből az acinusokhoz érkező cholecystokinin (CCK). Mind az acetilkolin, mind a CCK az intracelluláris Ca^{++} koncentráció emelésén vált ki enzim szekréciót az acinusokban. A megtermelt emésztőenzimek zimogén granulomok formájában tárolódnak, majd exocitózis útján szekretálódnak a hasnyálmirigy duktuszaiba. A duodénum lumenébe jutva az enterokináz nevű enzim aktiválja a tripszinogént, aktív tripszinné, majd ezek után kaszkádszerűen aktiválódik a többi emésztőenzim is.

A hasnyálmirigy duktuszok 1.5-2 liter alkalikus folyadékot termelnek naponta, amelynek bikarbonát tartalma a 140 mM-t is elérheti. Az alkalikus pankreatikus szekrétum egyik fő feladata, az emésztőenzimek kimosása a hasnyálmirigy duktális rendszeréből, valamint a savas kémhatású chymus neutralizálása.

A hasnyálmirigy duktuszok apikális felszínén elhelyezkedő SLC26 transzporter család, valamint a cisztás fibrózis konduktancia transzmembrán regulator (CFTR) segítségével jutnak az anionok a duktuszok lumenébe. Ismert, hogy a CFTR mutációi okozzák a cisztás fibrózis genetikai betegséget, azonban kevéssé tudott, hogy ezen mutációk fokozzák a hasnyálmirigy-gyulladás rizikóját is.

Heveny hasnyálmirigy-gyulladás

A hasnyálmirigy-gyulladás az egyik leggyakoribb kórházi felvételt igénylő sürgősségi gasztroenterológiai kórkép. Éves incidenciája 10-45 eset/100 ezer lakos, a fejlett országokban, azonban a betegség előfordulása jelenleg is növekvő tendenciát mutat. Az Egyesült Államokban évente 200 ezer kórházi felvétel történik heveny hasnyálmirigy-gyulladás miatt, ami 2-2.5 milliárd dollárba kerül az egészségügyi ellátórendszer számára.

A pankreatitisz leggyakoribb okai az epekövesség, valamint a túlzott mértékű alkohol fogyasztás. Egyéb ritkább okok lehetnek: genetikai mutációk, emelkedett vérzsírszint, emelkedett szérum kálcium szint, fertőzések, mérgezések, hasnyálmirigy daganat, veleszületett malformációk és autoimmun betegségek. Megkülönböztetünk enyhe, középsúlyos, valamint

súlyos lefolyású heveny hasnyálmirigy-gyulladást, a szervi elégtelenség jelenléte és fennállásának ideje alapján. A súlyos hasnyálmirigy-gyulladás mortalitása akár az 50 %-ot is elérheti, ami elfogadhatatlanul magas.

A betegség patomehanizmusa nem teljesen tisztázott, specifikus terápia nem ismert, ezért új terápiás célpontok keresése rendkívül fontos a betegség mortalitásának csökkentése érdekében.

Az experimentális heveny hasnyálmirigy-gyulladás állat modellei

Az egyik leggyakrabban használt pankreatitisz modell a szekretagógok (kolecisztokinin, cerulein) parenterális használata. A cerulein kezelés enyhe, ödémás hasnyálmirigy-gyulladást okoz patkányokban, míg súlyos nekrotizáló gyulladást indukál egerekben. A szekretagógok nagy dózisban gátolják az emésztőenzimek szekrécióját, korai tripszinogén aktivációt okoznak, gyulladást keltő transzkripciós faktorokat aktiválnak, emelik a gyulladásos citokinek szérumszintjét, valamint csökkentik a hasnyálmirigy acinusok fehérje termelését.

Az epesavak retrográd duktális infúziója egy gyakran használt és népszerű hasnyálmirigy-gyulladás modell, azonban anesztéziát igényel, valamint komoly sebészeti beavatkozással jár, a gyulladás hasonlóan a humán megbetegedéshez inhomogén, azonban ez nem ideális a kutatás számára a homogén mintavétel nehézsége miatt. A modell a „közös csatorna" teóriáján alapszik, miszerint az epevezetéknek, valamint a hasnyálmirigy vezetéknek közös szakasza van. A modell az endoszkópos retrográd kolangio-pankreatográfia (ERCP) beavatkozás után kialakuló hasnyálmirigy-gyulladást hívatott modellezni.

A kolin deficiens-etionin (CDE) szupplementált hasnyálmirigy-gyulladás modell nem túl gyakran használatos, mivel kizárólag fiatal nőstény egerekben működik, valamint a modellhez használatos diéta igen költséges. A CDE-diéta vérzéses-nekrotizáló gyulladást indukál egerekben.

A bázikus aminosavak okozta hasnyálmirigy-gyulladás modell már az 1980-as évek óta használatos patkányokban (Mizunuma és mtsai, 1986), azonban csak a 2000-es években írták le egerekben (Dawra és mtsai 2007), használata jelenleg is növekvő népszerűségnek örvend. A bázikus aminosavak kizárólag az acinus sejteket károsítják, míg a duktális sejtek, valamint a Langerhans szigetek morfológiailag épek maradnak a kialakult hasnyálmirigy-gyulladás során. A modell olcsó, könnyű kivitelezni, nem igényel invazív beavatkozást, valamint kiválóan

használható a kutatásban, hiszen homogén gyulladást okoz a hasnyálmirigyben, ami azonban eltér a human betegség morfológiai megjelenésétől.

Az etanol, valamint zsírsavak keverékének parenterális adása, mint heveny hasnyálmirigy-gyulladás modell azon a feltevésen alapszik, hogy emberekben ezen két etiológiai tényező a pankreatitisz leggyakoribb oka. Érdekes módon önmagában sem az alkohol, sem zsírsavak nem okoznak gyulladást rágcsálókban, kizárólag a kettő kombinációja. Az alkohol oxidatív (alkohol dehidrogenáz, mikroszómális enzimrendszer), valamint nem-oxidatív (zsírsav etil észterek) úton metabolizálódik. Huang és munkatársai írták le a modellt 2014-ben, amely etanol, valamint palmitát keverékének intraperitoneális (ip.) adagolásán alapul, a gyulladás súlyosságának maximuma 24 óránál detektálható.

Célkitűzések

L-arginin okozta heveny hasnyálmirigy-gyulladás karakterizálása egerekben

A Dawra és mtsai által 2007-ben leírt modell nem működött tökéletesen előkísérleteink során, mert a C57Bl/6 egerekben túl nagy mortalitást okozott, a Balb/c egértörzsben nem találtunk mortalitást, azonban a kialakuló heveny hasnyálmirigy-gyulladás igen enyhe volt. Ezért elhatároztuk, hogy az L-arginin okozta hasnyálmirigy-gyulladás modellt karakterizáljuk, különböző a kutatásban gyakran használatos egértörzsekben. Célul tűztük ki az L-arginin okozta hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságának -dózis -koncentráció -nem, valamint különböző egértörzs függésének vizsgálatát.

CFTR gátlásának vizsgálata zsírsav és alkohol keveréke által kiváltott heveny hasnyálmirigy-gyulladásban egérben

A Huang és mtsai által 2014-ben leírt modellt módosítottuk, majd CFTR knock-out (KO), valamint vad típusú egerekben kialakult pankreatitiszt hasonlítottuk össze.

.

Anyagok és módszerek

Mind a helyi Munkahelyi Állatkísérletes Bizottság (MÁB), mind a Csongrád Megyei Állategészségügyi Hivatal által kiadott etikai engedélyekkel rendelkeztünk, valamint kísérleteink során törekedtünk az állatetikai normák betartására. Kísérleteinkhez 20-25 gramm közötti, hím és nőstény egereket használtunk. Az FVB/n, C57BL/6, valamint BALB/c egértörzseket a Charles Rivers cégtől szereztük be. Az állatokat standard laboratóriumi körülmények között tartottuk. Az állatetikai elvek alapján egyes csoportokban néhány egérnél eutanáziát hajtottunk végre, elkerülve ezzel az állatok felesleges szenvedését.

A CFTR KO egereket Ratcliff és mtsai hozták létre 1993-ban, FVB/n háttéren, számunkra Prof. Ursula Seidler adományozta őket. Az állatoknak speciálisan CFTR KO egerek számára gyártott tápot, valamint ivóvizet adagoltunk. Az egereket polimeráz láncreakció segítségével genotipizáltuk a kísérletek előtt.

A kísérleteink során használt vegyszereinket a Sigma-Aldrich cégtől szereztük be, amennyiben máshonnan származtak, ezt külön jelöltük.

Az L-arginin-HCl-t fiziológiás sóban oldottuk fel, pH-ját NaOH segítségével titráltuk be 7.4-re. Különböző koncentrációjú (5, 8, 10, 30), valamint dózisú (2×4, 3×3, 4×2.5 g/kg) L-arginin-HCl-t használtunk kísérleteink során. Az L-arginin-HCl-t ip. adagoltuk, a kontroll állatok fiziológiás sóoldatot kaptak L-arginin-HCl helyett. Az egereket a gyulladás súlyosságának csúcsán, a hasnyálmirigy-gyulladás indukció után 72 órával áldoztuk fel, pentobarbitál anesztéziában. A vérvétel kardiális punkció útján történt, az állatok hasnyálmirigyét kipreparáltuk, megtisztítottuk a nyirokcsomóktól, valamint a zsírszövettől. A szöveteket azonnal folyékony nitrogénben fagyasztottuk le, valamint -80 °C-on tároltuk, egészen a felhasználásig. A hasnyálmirigyek másik részét 6 %-os formalinban fixáltuk, szövettani feldolgozás céljából. A vérmintákat 2500-as RCF-en, 15 percig 4 °C-on centrifugáltuk, majd -20 °C-on tároltuk, egészen a felhasználásig. Kísérleteink során az egerek az L-arginin oldat ip. injekciója után azonnal letargiássá váltak. A legtöbb egérnél azonban ezen állapot 12 órán belül oldódott. Előkísérleteink, valamint irodalmi adatok alapján azonban, ha az állatok rektálisan mért maghőmérséklete kritikus szint alá csökkent (27-29 °C), 12 órával az L-arginin injekciója után, az egereket pentobarbitállal eutanizáltuk a szenvedések elkerülése végett (az állatok a későbbiekben biztosan elpusztultak volna). A postmortem makroszkópos, valamint szövettani analízis igazolta, hogy az eutanizált állatokban nem alakult ki heveny hasnyálmirigy-gyulladás. Azoknál az egereknél, ahol a letargia 12 óránál oldódott, mortalitás a későbbiekben már nem volt tapasztalható. A kísérleteket a gyulladás súlyosságának

maximumánál, 72 óránál termináltuk, az egereket pentobarbitál anesztéziában áldoztuk fel. Az effektivitási hányados (%): a túlélő, hasnyálmirigy-gyulladásos egerek száma, osztva az összes beoltott egerek számával × 100. A heveny hasnyálmirigy-gyulladás makroszkópos, valamint szövettani jelei az ödéma, gyulladásos sejtes infiltráció, valamint a nekrózis voltak. Az eutanizált, valamint a túlélő, de heveny hasnyálmirigy-gyulladás jelét nem mutató egereket a laboratóriumi mérésekből, valamint a szövettani analízisből kizártuk (kivéve a BALB/c 2×4 g/kg 5 % L-arginin-HCl-el kezelt csoportot, ahol minden állat túlélt, azonban egyik sem mutatta a hasnyálmirigy-gyulladás jeleit).

Az alkohol, és zsírsav kombinációja által kiváltott heveny hasnyálmirigy-gyulladást először Huang és mtsai írták le 2014-ben. Az eredeti protokollt módosítottuk, majd így heveny hasnyálmirigy-gyulladást váltottunk ki egerekben. Vad típusú, valamint CFTR KO egereket kezeltünk ip. 1,75 g/kg, valamint 750 mg/kg palmitát keverékével. A kezelés előtt az állatoknak ip. fiziológiás sót injektáltunk a peritoneális izgalom elkerülése végett. A kontroll állatok fiziológiás sóoldatot kaptak ip., az etanol és zsírsav keveréke helyett. A módosított protokollt használva mortalitást nem észleltünk. Az állatokat a kezelés után 24 órával, pentobarbitál anesztéziában áldoztuk fel.

A szérum amiláz aktivitás mérése kolorimetriás kinetikus mérésen alapult. A hasnyálmirigy víztartalmát a pankreatikus ödéma detektálása céljából mértük meg. Ehhez a hasnyálmirigyeket 24 órán keresztül 100°C-on inkubáltuk, majd száraz súly-nedves súly arányt számoltunk. A hasnyálmirigy mieloperoxidáz aktivitását, ami a neutrofil granulociták infiltrációjára jellemző marker, Kuebler és mtsai (1996) által leírt metodika szerint mértük meg, az eredményeket Lowry metódussal mért fehérje tartalomra normalizáltuk. A hasnyálmirigyekből interleukin-1β szintet mértünk, ELISA kit segítségével, amely a gyulladásos citokinek szintjét jellemezte. A hematoxilin-eozin festett pankreasz metszetekből szövettani analízist végeztünk. A szövettani pontozást, egy, a kísérleti csoportokat nem ismerő patológus végezte. Minden metszetnél 6-8 látótér lett kiértékelve, 100×-os nagyításon. Ödéma pontszám 0-3. (0: nincs, 1: foltos interlobáris, 2: diffúz interlobuláris, 3: diffúz interlobuláris és intraacináris). Leukocita infiltráció pontszám: 0-3 (0: nincs, 1: foltos interlobáris, 2: diffúz interlobuláris, 3: diffúz interlobuláris és intraacináris). A sejtelhalás mértékét ImageJ szoftver segítségével értékeltük ki.

Az adatokat átlag ± standard hiba formátumban ábrázoltuk. Az effektivitási rátánál kapott adatokat khí négyzet próba segítségével ábrázoltuk, Yates korrekciót alkalmaztunk. A laboratóriumi, valamint szövettani paramétereknél kétutas ANOVÁ-t használtunk, Bonferroni post hoc tesztet alkalmaztunk amennyiben az adatok normál eloszlást mutattak. Nem normál

eloszlás esetén Kruskal-Wallis tesztet használtunk, Dunett post hoc teszttel. P<0,05-öt fogadtuk el, mint a szignifikancia határát.

Eredmények

Az L-arginin oldat koncentrációjának hatása az akut pankreatitisz súlyosságára BALB/c, C57BL/6 and FVB/n egerekben

Az akut pankreatitisz kiváltására Dawra és mtsai (2007) 2×4 g/kg L-arginin-HCL-t használtak, 8 %-os koncentrációban. Mivel ezen ip. injekciók relative nagy beadott volumennel jártak, ezért első körben szerettük volna karakterizálni a különböző koncentrációjú, L-arginin-HCl oldatok hatását, Balb/c egerekben. Az előkísérleteink alapján a 30 %-os L-arginin-HCl oldat használata nagyon magas halálozást okozott (~90 %), így későbbiekben ezt a koncentrációt már nem használtuk tovább. Érdekes módon 2×4 g/kg 5 % oldat használata nem okozott mortalitást, azonban pankreatitiszt sem tudtunk vele kiváltani, így az effektivitási ráta 0 % volt, míg 8 és 10 %-os L-arginin használata 90 % feletti effektivitási rátát mutatott. Kiemelendő azonban, hogy az összes csoportban, ahol hasnyálmirigy-gyulladás kifejlődött, a gyulladás súlyossága igen enyhe volt. Mivel a 8 és 10 %-os csoport között nem találtunk szignifikáns különbséget, így a későbbiekben 10 %-os oldatot használtunk, hogy csökkentsük az állatokba injektált volument.

Következő lépésben C57Bl/6 egértörzset használtunk. Az állatokat fiziológiás sóoldattal, vagy 2×4 g/kg, 5-10 % L-arginin-HCl oldattal kezeltük. Míg az effektivitási ráta 93 % volt az 5 %-os L-arginin oldattal kezelt csoportban, addig ez az érték 33 % volt, a 10 %-os oldattal kezeltben. A rosszabb effektivitási ráta oka a magas eutanizáció miatt alakult ki a 10 %-os L-argininnel kezelt csoportban. A laboratóriumi és szövettani paraméterek heveny hasnyálmirigy-gyulladásra jellemzők voltak minden L-argininnel kezelt csoportban, azonban a kialakult gyulladás súlyosabb volt a 10 %-os oldattal kezelt egerekben.

Következő lépésben 2×4 g/kg 5-10 % L-arginin-HCl oldatot használtunk FVB/n egerekben. Az effektivitási ráta 92 %-os volt az 5 %-os L-arginin-HCl-el kezelt csoportban, míg 25 %, a 10 %-os L-argininnel kezelt csoportban. Az alacsony effektivitási ráta a magas eutanizáció miatt alakult ki. A laboratóriumi és szövettani paraméterek súlyos heveny hasnyálmirigy-gyulladás kifejlődését mutatták, azonban a két csoport között nem találtunk szignifikáns különbséget a kialakult gyulladás súlyosságának tekintetében.

Az L-arginin dózisának vizsgálata C57Bl/6, valamint FVB/n egértörzsekben

A Balb/c egerek kifejezett rezisztenciát mutattak a beadott L-argininnel szemben. A mortalitás elhanyagolható volt, azonban a kialakult gyulladás súlyossága is igen enyhe volt.

A következő kísérleteinkhez C57BL/6 és FVB/n egereket használtunk. 2×4, 3×3, 4×2.5 g/kg, 10 %-os L-arginin-HCl oldatot adagoltunk ip. A 2×4 g/kg L-arginin-HCl alacsony effektivitási rátát mutatott, a magas eutanizálási ráta miatt, míg a 3×3 g/kg és 4×2.5 g/kg L-arginin-HCl-el kezelt csoportokban az effektivitási ráta szignifikánsan magasabb volt a 2×4 g/kg L-argininel kezelt csoporthoz képest. A kialakult gyulladás súlyossága között nem találtunk szignifikáns különbséget a különböző csoportok között. Kiemelendő azonban, hogy 5×2 g/kg L-arginin-HCl adása nem okozott heveny hasnyálmirigy-gyulladást a kísérleti állatokban.

A hasnyálmirigy-gyulladás súlyossága hím és nőstény egerekben

Mivel bizonyos állatmodellek esetén különbség lehet a betegség súlyossága között a hím és nőstény állatokban (pl: CDE diéta estén), így elhatároztuk, hogy megvizsgáljuk az L-arginin-HCl okozta heveny hasnyálmirigy-gyulladást hím és nőstény egerekben. C57BL/6 egereknek 3×3 g/kg 10 % L-arginin-HCl oldatot adtuk ip, A különböző nemű állatokban mind az effektivitási ráta, mind a kialakuló gyulladás súlyossága igen hasonló volt, nem találtunk szignifikáns különbséget.

A zsírsav és etanol keveréke által okozott heveny hasnyálmirigy-gyulladás

A Huang és mtsai által (2014) leírt hasnyálmirigy-gyulladás modell, nem működött tökéletesen az előkísérleteink során, így palmitoleát, helyett egy másik zsírsavat palmitátot használtunk, amivel már ki tudtunk váltani hasnyálmirigy-gyulladást, mortalitás nélkül.

Maléth és mtsai (2015) kimutatták, hogy 0,8 g/kg etanol és 300 mg/kg palmitát adagolása csökkentette a CFTR expresszióját izolált tengerimalac pankreasz duktális epitél sejteken, míg egyidőben a citoplazmában növekedett a CFTR expressziója. Ezen *in vitro* adatok alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy *in vivo* is hasonló hatása lehet az alkohol és zsírsav kombinációjának. Korábbi kísérletek kimutatták, hogy a CFTR expressziójának csökkenése gátolja a duktális folyadék szekréciót, így súlyosabb gyulladást okozva.

Vizsgálataink során 1,75 g/kg etanol, valamint 750 mg/kg palmitát kombinációját használtuk, ami heveny hasnyálmirigy-gyulladást okozott a kísérleti állatokban. Kísérleteinkben a CFTR KO egerekben súlyosabb hasnyálmirigy-gyulladást sikerült kiváltani, mint vad típusú társaikban.

Megbeszélés

L-arginin indukálta akut pankreatitisz

Kísérleteink fontos eredménye volt, hogy különböző egértörzsek eltérő szenzitivitást mutatnak a mortalitás és a hasnyálmirigy-gyulladás súlyossága tekintetében, az L-arginin indukálta akut pankreatitisz során. A kutatás során gyakran használatos egértörzsek esetén, mint FVB/n, C57BL/6, 2×4 g/kg L-arginin-HCl adagolása jelentős fokú mortalitást okozott, így különböző alternatív dózisok használatát próbáltuk ki (3×3 g/kg, 4×2.5 g/kg). Ezen alternatív dózisok használata jobb hatásfokúnak bizonyult az eredetileg publikált 2×4 g/kg dózishoz képest. Ezen kívül a beadott L-arginin-HCl oldat koncentrációja is jelentősen befolyásolta mind az egereknél tapasztalt mortalitást, mind a kialakuló hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságát. A patkányok esetén gyakran használt és jól tolerált 30 %-os L-arginin-HCl oldat koncentrációja jelentős fokú mortalitást okozott az egerekben, így figyelembe véve a beadandó folyadék volumenét is, 5-10 % közötti L-arginin koncentrációkat használtunk.

Az FVB/n, valamint C57Bl/6 egerek érzékenysége jóval nagyobb volt az L-arginin iránt, mint a Balb/c egereké. Többek között az eredetileg megjelent cikkben is Balb/c egereket használtak Dawra és mtsai (2007), hozzánk hasonlóan ők sem találtak mortalitást.

Bohus és mtsai (2008), parenterálisan adott bázikus aminosavakkal kezeltek Sprague-Dawley patkányokat. A kezelés során súlyos metabolikus acidózist, valamint ehhez kapcsolódva jelentős fokú kóros központi idegrendszeri eltéréseket detektáltak. A parenterális L-arginin kezelés során gyenge, normál, valamint erős respondereket találtak az állatok között. A gyenge, valamint normál responderekénél nem találtak mortalitást, míg az erős responderek jelentős része elpusztult a bázikus aminosavas kezelés után.

Laborunk korábban megjelent cikkeiben 3,5 g/kg L-arginin-HCl súlyos akut pankreatitiszt okozott patkányokban, azonban megjegyzendő, hogy néhány állat elhullását megfigyeltük. Erre alapozva feltételezzük, hogy az egereknél is léteznek különböző fokú responderek, amelyek magyarázatot adhatnak a különböző törzs-dózis-koncentráció függésre. Az irodalomban használt pankreatitisz kiváltására adott L-arginin-HCl dózisa tág határokon

belül változott: 1×0.000004 g/kg- 2×2.25 g/kg, természetesen a legtöbb cikkben az eredetileg leírt 2×4 g/kg-os L-arginin-HCl dózist használták. Dawra és mtsai (2007) által leírt eredeti cikkben használt 2×2, valamint 2×3 g/kg L-arginin-HCl adagolása szintén nem okozott gyulladást, ami az eredményeinkkel jól egybevág.

Kísérleteink során bebizonyítottuk, hogy az L-arginin-indukálta pankreatitisz törzsfüggést is mutat. Korábbról ismert más hasnyálmirigy-gyulladás modellek esetében is a súlyosság-törzs függése. Wang és mtsai (2010) cerulein és CDE diétával kiváltott pankreatitisz esetén különböző egerekben vizsgálták a kiváltott gyulladás súlyosságát. Ceruleinnel kiváltott experimentális pankreatitisz esetén enyhe gyulladást detektáltak C57Bl/6 egerekben, valamint közepes súlyosságút Balb/c állatokban. Kísérleteikben pozitív korrelációt találtak a PRSS1, valamint negatív korrelációt a SPINK3 expressziója és a kialakult gyulladás súlyossága között.

A hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságának, valamint az állatok nemének összefüggése több experimentális modellben megfigyelhető, úgymint a CDE kiváltotta pankreatitszben is, ugyanis az ösztrogén-progeszteron hormon szintek változása befolyásolhatja a gyulladásos folyamatokat. L-arginin használata esetén, a kísérleteinkben ilyen összefüggést nem találtunk.

Összefoglalva, a nagy dózisú L-arginin ip. injekció használata a pankreatitisz kutatásban egy előremutató, könnyen használható metodika, amely a hasnyálmirigy-gyulladás kutatás fejlődését szeretné előre lendíteni.

CFTR gátlásának hatása az akut pankreatitisz lefolyására

1965-ben Henry Sarles és mtsai a cisztás fibrózisban szenvedő betegekhez hasonló eltéréseket találtak alkoholos pankreatitiszben szenvedő betegeik hasnyálmirigy nedvében. Korábbról ismert, hogy a CFTR mutációk a hasnyálmirigy-gyulladás rizikófaktorai. A del508F mutáció heterozigóta hordozóinak emelkedett rizikója van a pankreatitisz iránt. Ez kb 7 %-kal nagyobb, mint a mutációt nem hordozó társaik esetén, míg ennyhébb mutációk esetén, mint az R117H, a fokozott rizikó 2.5 %-kal nagyobb a vad típusú allélt hordozó emberekhez képest.

DiMagno és mtsai kimutaták 2005-ben, hogy CFTR KO egrekben súlyosabb a ceruleines akut pankreatitsz, vad típusú társaikhoz képest.

Pallagi és mtsai 2015-ben bebizonyították, hogy NHERF-1 KO egerekben csökken az állatok pankreasz duktális szekréciója, súlyosabb a ceruleines, valamint az epesavak retrográd infúziója által kiváltott pankreatitisz, vad típusú táraikhoz képest. A NHERF-1 egy scaffold fehérje, ami a CFTR helyes működéséhez szükséges, enélkül a CFTR funkciója csökken.

Maléth és mtsai 2015-ben kimutatták *in vitro* (CAPAN-1 sejtvonalon), valamint *in vivo* (tengerimalacokon), hogy a zsírsav és alkohol keveréke csökkentette a CFTR expresszióját. Mágneses rezonancia cholangio-pankreatográfiás vizsgálattal igazolták egerekben, hogy zsírsav és alkohol hatására csökken a duktális szekréció mértéke is.

A kutatásaink során kapott eredmények jól korrelálnak az irodalmi adatokkal, miszerint a CFTR gátlása csökkenti a pankreasz duktális szekerécióját, valamint fokozza a kialakuló akut pankreatitisz súlyosságát.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném őszinte köszönetemet kifejezni Prof. Dr. Rakonczay Zoltán, valamint Prof. Dr. Hegyi Péter témavezetőimnek. Folyamatos támogatásuk, valamint segítségük nélkül a Ph.D. munkám nem jöhetett volna létre. Ezen kívül szeretném megköszönni az SZTE ÁOK I. sz. Belgyógyászati korábbi, valamint, jelenlegi vezetőjének Prof. Dr. Wittmann Tibornak, valamint, Prof. Dr. Ábrahám Györgynek, hogy munkámhoz az intézményi háttért biztosították.

Szeretném megköszönni minden laboros kollégámnak a folyamatos segítségét: **Balla Zsolt, Dr. Kormányos Eszter**, Dr. Hegyi Eszter, Dr. Balázs Anita, Dr. Maléth József, Dr. Németh Balázs, **Dr. Pallagi Petra**, Madácsy Tamara, Dr. Kunstár Éva, Dr. Geisz Andrea, Dr. Schnúr Andrea, Dr. Laczkó Dorottya, **Dr. Katona Máté**, **Dr. Végh Eszter**, Dr. Venglocecz Viktória, Dr. Szentesi Andrea, Magyarné Pálfi Edit, Pritz Tünde, Fritz Rea, **Árva Miklósné**, Fuksz Zoltánné, Ignáth Imre.

Szeretném megköszönni a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal anyagi támogatását (OTKA K116634, K119938, GINOP-2.3.2-15-2016-00015), MTA-SZTE Lendület Pályázat (LP2014-10/2014), amelyek anyagi támogatása nélkül a kutatás nem jöhetett volna létre.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni a menyasszonyom és a családom folyamatos támogatását.

"Per aspera ad astra" (latin közmondás)

"Göröngyös út vezet a csillagokhoz"