

AZ AKUT HASNYÁLMIRIGY-GYULLADÁS SÚLYOSSÁGÁT BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK: KÍSÉRLETES ÉS KLINIKAI VIZSGÁLATOK

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei



Mihalekné Fűr Gabriella M.Sc.

Témavezetők:

ifj. Rakonczay Zoltán M.D., Ph.D., D.Sc.

Kiss Lóránd Ph.D.

Kóréletani Intézet
Szegedi Tudományegyetem
Szeged, Magyarország
2022

I. KÖZLEMÉNYEK

I.1. Az értekezés tárgyát képező közlemények

Fűr G, Bálint ER, Orján EM, Balla Z, Kormányos ES, Czira B, Szűcs A, Kovács DP, Pallagi P, Maléth J, Venglovecz V, Hegyi P, Kiss L, Rakonczay Z Jr (2021). Mislocalization of CFTR expression in acute pancreatitis and the beneficial effects of VX-661/VX-770 treatment on disease severity. *J Physiol.* 599, 4955-4971. IF₂₀₂₀: 5.182, Q1, D1

Bálint ER, **Fűr G**, Kui B, Balla Z, Kormányos ES, Orján EM, Tóth B, Horváth G, Szűcs E, Benyhe S, Ducza E, Pallagi P, Maléth J, Venglovecz V, Hegyi P, Kiss L, Rakonczay Z Jr (2022). Fentanyl but not morphine or buprenorphine improves the severity of necrotizing acute pancreatitis in rats. *Int J Mol Sci.* 23, 1192. IF₂₀₂₀: 5.924, Q1, D1

Kiss L*, **Fűr G***, Mátrai P, Hegyi P, Ivány E, Cazacu IM, Szabó I, Habon T, Alizadeh H, Gyöngyi Z, Vigh É, Eröss B, Erös A, Ottoffy M, Czako L, Rakonczay Z Jr (2018). The effect of serum triglyceride concentration on the outcome of acute pancreatitis: systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 8, 14096. IF₂₀₁₈: 4.011, Q1, D1 *A jelölt szerzők egyenlő mértékben osztoznak az első szerzősége

I.2. További közlemények, melyek nem kapcsolódnak az értekezés tárgyához

Balla Z, Kormányos ES, Kui B, Bálint ER, **Fűr G**, Orján EM, Iványi B, Vécsei L, Fülöp F, Varga G, Harazin A, Tubak V, Deli MA, Papp C, Gácsér A, Madácsy T, Venglovecz V, Maléth J, Hegyi P, Kiss L, Rakonczay Z Jr (2021). Kynurenic acid and its analogue SZR-72 ameliorate the severity of experimental acute necrotizing pancreatitis. *Front Immunol.* 12, 702764. IF₂₀₂₀: 7.561, Q1

Gróf I, Bocsik A, Harazin A, Santa-Maria AR, Vizsnyiczai G, Barna L, Kiss L, **Fűr G**, Rakonczay Z Jr, Ambrus R, Szabó-Révész P, Gosselet F, Jaikumpun P, Szabó H, Zsembery Á, Deli MA (2020). The effect of sodium bicarbonate, a beneficial adjuvant molecule in cystic fibrosis, on bronchial epithelial cells expressing a wild-type or mutant CFTR channel. *Int J Mol Sci.* 21, 4024. IF₂₀₂₀: 5.923, Q1, D1

Bálint ER, **Fűr G**, Kiss L, Németh DI, Soós A, Hegyi P, Szakács Z, Tinusz B, Varjú P, Vincze Á, Eröss B, Czimmer J, Szepes Z, Varga G, Rakonczay Z Jr (2020). Assessment of the course of acute pancreatitis in the light of aetiology: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 10, 17936. IF₂₀₂₀: 4.379, Q1, D1

Szakács Z, Hegyi PJ, Farkas N, Hegyi P, Balaskó M, Erös A, Szujó S, Pammer J, Mosdósi B, Simon M, Nagy A, **Fűr G**, Hussain A (2020). Pregnancy outcomes of women whom spouse fathered children after tyrosine kinase inhibitor therapy for chronic myeloid leukemia: A systematic review. *PLoS One.* 15, e0243045. IF₂₀₂₀: 2.740, Q1, D1

I.3. Tudományos adatok

Közlemények száma:	7
Első szerzős közlemények:	2
Összes impakt faktor:	35,72
Független idézettség száma (MTMT2):	37
Hirsch index:	3

II. BEVEZETÉS

II.1. A hasnyálmirigy működése

A hasnyálmirigy külső elválasztásért felelős része főként acinus és ductusz sejtekből áll. Az acinusok fő feladata az emésztőenzim termelés. A ductuszok körülbelül 140 mM HCO_3^- tartalmú alkalikus folyadékot szekretálnak, aminek a térfogata elérheti a napi 2,5 litert is. A HCO_3^- szekrécióját az apikális membránban elhelyezkedő anioncsatornák és transzporterek végzik. Ezek a cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR), a solute carrier család 26-ba (SLC26) tartozó anioncsereelők (SLC26A3 és SLC26A6) és az anoctamin-1. Ezen ioncsatornák és transzporterek közül minden bizonnyal a CFTR a legjelentősebb, mivel a szekrécióban betöltött szerepe sokrétű és részt vesz más ioncsatornák, például az SLC26A6 szabályozásában.

II.2. Akut hasnyálmirigy-gyulladás

II.2.1. Epidemiológiai jellemzői és diagnosztikus kritériumai

Az akut hasnyálmirigy-gyulladás (AP) a hasnyálmirigy hirtelen kialakuló gyulladással megbetegedése, mely napjainkban az egyik leggyakoribb kórházi kezelést igénylő gyomor-bélrendszeri betegség. Előfordulása növekvő tendenciát mutat, Európában 100 000 lakosra vetítve több mint 30 esetet jelent évente. Az AP diagnózisához a következők közül legalább kettő kritérium megléte szükséges: (a) epigasztrikus hasi fájdalom; (b) több mint 3-szoros mértékben megemelkedett szérumszén- vagy vizelet-amiláz/lipáz aktivitás, (c) képalkotási eljárásokkal kimutatható elváltozások megléte. Figyelemre méltó, hogy a fájdalom az AP-s betegek 90-95%-ánál jelen van.

II.2.2. A kialakulásában közrejátszó etiológiai tényezők

Az AP-s betegek 60-80%-nál kórokként megemlíthető a nagy fokú alkoholfogyasztás és az epekövesség, míg az esetek 1-9%-ban a hipertrigliceridémia (HTG) a felelős a betegség kialakulásáért. A HTG által kiváltott AP-ben (HTG-AP) szenvedő betegekre jellemző a fiatalabb életkor és a férfi nem, de a magasabb zsírbetevitel vagy a magasabb BMI is hozzájárulhat ehhez az etiológiához. Az említett kiváltó tényezők közül a HTG-AP esetén úgy tűnik, hogy a szövődmények és a társbetegségek kialakulása vagy a halálozás és a kórházi kezelés szükségessége gyakoribb a többi etiológiához képest.

II.2.2.1. A szérumszén triglicerid koncentráció hatása az akut hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságára

A triglicerid (TG) koncentráció referenciaértéke a vérérszérumban normál esetben 1,7 mM alatt van. Az Endokrin Társaság a HTG mértékét az éhomi szérumszén TG (seTG) alapján osztályozza az alábbiak szerint: enyhe (1,7-2,3 mM), mérsékelt (2,3-11,2 mM), súlyos (11,3-22,4 mM) és nagyon súlyos (>22,4 mM). Széles körben elfogadott, hogy a súlyos vagy nagyon súlyos HTG (>11,3 mM) jelentősen növeli az AP kockázatát, így ezt, mint etiológiai faktort kezelik. Ezzel szemben egyes szerzők már a seTG>5,6 mM-t is HTG-AP-ként írják le. Arra ugyan nincs szilárd bizonyíték, hogy <5,6 mM seTG esetén HTG-AP-ről beszélhetünk-e, mégis voltak korábbi publikációk, melyek leírták, hogy a seTG enyhe vagy mérsékelt megemelkedése és az AP súlyossága között kapcsolat van. Egyes tanulmányok azonban egyáltalán nem mutattak ki kapcsolatot a seTG és az AP súlyossága között. Ezen eltérő nézetek miatt a különböző seTG szintek AP súlyosságára gyakorolt hatásának alaposabb vizsgálatára van szükség.

II.2.3. A betegség kórélettanának háttérében álló tényezők

Az AP kialakulásának háttérében álló mechanizmusok összetettek és nem teljesen ismertek. Az AP patogenezeise magában foglalja a toxikus intracelluláris Ca^{2+} túlterhelést, amely az emésztőenzimek korai aktiválódását eredményezi, továbbá a nukleáris kappa B faktor aktiválódását, az autofágia károsodását, a mitokondriális diszfunkciót, valamint a duktális funkció károsodását is. A betegség etiológiája meghatározhatja az AP patogenezisét.

II.2.3.1 A hipertrigliceridémia okozta hasnyálmirigy-gyulladás patomechanizmusa

A legelfogadottabb elmélet szerint a HTG során a hasnyálmirigy lipázok a seTG-t nem-észterezett zsírsavakká (NEFA) metabolizálják. A NEFA jelenléte a Ca^{2+} koncentrációt tartósan megemeli a hasnyálmirigy acinus sejteiben, és gátolja a mitokondriumok működését, ezáltal az ATP-termelést, így indukálva vagy súlyosbítva az AP-t. Korábbi vizsgálataink is kimutatták, hogy a zsírsavak gátolják a CFTR aktivitását és csökkentik a hasnyálmirigy duktusz sejtek HCO_3^- és folyadékszekrécióját.

II.2.3.2. A hasnyálmirigy duktális sejteinek és a CFTR csatornának a gyulladásban betöltött szerepe

AP során maguk a duktusz sejtek, és azáltal a duktális szekréció is károsodhat. Továbbá, a károsodott duktális funkció, mely tisztás fibrózisban a CFTR mutációi vagy AP során a CFTR gátlása miatt alakulhat ki, csökkentik a bikarbonát- és folyadékszekréciót, és az AP súlyosbodásához vezetnek. A csatornafunkció zavara vagy elvesztése kulcsfontosságú tényező az AP kialakulásában. A közelmúltban klinikai alkalmazásban számos gyógyszert jóváhagytak már a CFTR expressziójának, lokalizációjának és működésének javítására a fehérje feltekeredésének korrigálásával vagy aktivitásának fokozásával tisztás fibrózisban. Ezek közül a CFTR-korrektor lumacaftor (VX-809), a tezacaftor (VX-661), az elxacaftor (VX-445) és a CFTR-potencirozó ivacaftor (VX-770) bizonyult a leghatékonyabbnak.

II.2.4. Kezelési lehetőségei

Az AP specifikus kezelése nem megoldott, jelenleg csak támogató jellegű. Napjainkban az AP korai kezelésének lehetőségei fájdalomcsillapítás, a Ringer-laktát oldat alapú folyadékpótlás és a korai orális táplálás, vagy ha ezt a beteg nem tolerálja, akkor enterális táplálást kell alkalmazni. Sajnos az AP kezelésére vonatkozó legújabb irányelvekben nincs egyértelmű ajánlás az alkalmazandó fájdalomcsillapítók típusaira vonatkozóan. Az opioidok, mint a fentanil (FE), a buprenorfin (BQ) vagy a morrium (MO) a leghatékonyabb fájdalomcsillapítók. Azonban az opioidok alkalmazása részben vitatott a mellékhatásaik miatt (pl. székrekedés, immunszuppresszió). A FE és a MO adása kevésbé előnyös embereken az Oddi-sphincter fokozott kontrakciója miatt, ami akár ronthatja az AP kimenetelét.

III. CÉLKITŰZÉSEK

Általános célunk az volt, hogy kísérleti állatmodellek segítségével vagy klinikai adatok feldolgozásával vizsgáljuk különböző tényezők AP-re gyakorolt hatását. A kutatás részleteire vonatkozó pontosabb céljaink a következők voltak:

- a. feltárni, hogy a betegség lefolyása hogyan befolyásolja a hasnyálmirigy duktusz sejtjeinek funkcióit és a HCO_3^- szekrécióban részt vevő fehérjék expresszióját
- b. annak vizsgálata, hogy a CFTR ioncsatorna korrekciója és stimulálása hogyan befolyásolja a betegség súlyosságát
- c. tanulmányozni, hogy a FE fájdalomcsillapító kifejt-e bármilyen hatást a kísérletes biliáris AP súlyosságára
- d. klinikai adatokat értékelni és összehasonlítani a normál és emelkedett seTG hatását az AP súlyosságára, a mortalitására és a betegség egyéb szövődményeire

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

IV.1. Állatkísérletek

IV.1.1. Etikai engedélyek

Az állatkísérletek az Európai Unió 2010/63/EU irányelvének és a 40/2013 (II.14.) Kormányrendeletnek megfelelően lettek végrehajtva. Az egereket vagy a patkányokat 200, illetve 85 mg/kg pentobarbitál (Biomedica MTC, Cambridge, Kanada) intraperitoneális (i.p.) beadásával áldoztuk fel.

IV.1.2. A kísérletekhez felhasznált vegyületek

A kísérleteinkhez felhasznált legtöbb vegyszert a Merck Life Science Kft. (Budapest, Magyarország) forgalmazza. A ceruleint (Cer) a Glentham Life Sciences-től (Corsham, Egyesült Királyság) szereztük be; a VX-661-et (tezakaptor) és a VX-770-et (ivakaptor) pedig a Cayman Chemical-től (Ann Arbor, MI, USA). A Cer-t, a VX-661-et és a VX-770-et dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk fel, a Cer-t azonban beadás előtt fiziológiás sóoldatban (PS) tovább hígítottuk.

IV.1.3. A kísérletekhez felhasznált állatok általános jellemzői

Kísérleteinkhez 8-10 hetes hím FVB/n egereket vagy 200-250 g súlyú nőstény Wistar patkányokat használtunk fel.

IV.1.4. *In vivo* állatkísérletek: az akut hasnyálmirigy-gyulladás kiváltása és egyéb alkalmazott kezelések

A nekrotizáló AP-t 6 vagy 10×50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Cer (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) óránkénti i.p. injekciójával idéztük elő FVB/n egerekben, vagy 1 ml/kg Na-taurokolát-oldat (NaTc; 40 mg/ml) intraduktális beadásával patkányokban. A VX-661-et és a VX-770-et naponta egyszer i.p. adtuk az egereknek 2 mg/kg dózisban az AP kiváltása előtt és alatt. Az FE dózisait (0,1 és 0,2 mg/kg) irodalmi adatok alapján választottuk ki és i.p. adtuk az állatoknak. A FE-t elő- vagy utókezelésként alkalmaztuk az NaTc modellben. Az egereket 0, 6, 12, 24, 48 és 72 órákor áldoztuk fel, ellenben a VX-661+VX-770 kombináció esetében az első terminálási időpont 24 órákor, a második pedig 48 órákor volt. A patkányokat 16-24 óra között áldoztuk fel az AP kiváltását

követően. A kontrollcsoportok Cer vagy NaTc helyett PS-t, a VX vegyületek helyett pedig DMSO-t kaptak.

IV.1.5. Szövettani vizsgálatok

A formalinnal fixált és paraffinba ágyazott hasnyálmirigy-szövetekből 3 µm vastagságú metszeteket készítettünk. Ezeket hematoxilinnal és eozinnal (H&E) festettük meg, majd a kísérleti protokollt nem ismerő, független szakértők pontozták a sejtkárosodást, a leukocita-infiltrációt, a vakuolizációt és az ödémát egy szemikvantitatív pontozási rendszert segítségével.

IV.1.6. Laboratóriumi vizsgálatok

Megmértük a hasnyálmirigy mieloperoxidáz (MPO) enzim aktivitását (normalizálva a teljes fehérje tartalomra), amely a leukocita infiltráció egyik jellemzője. A hasnyálmirigy víztartalmának értékeléséhez a hasnyálmirigy nedves tömegét (WW) és száraz tömegét (DW) is meghatároztuk, és a következő számítás alkalmaztuk: $[(WW-DW)/WW] \times 100$. A szérum amiláz aktivitást kolorimetriás kinetikus módszerrel mértük meg.

IV.1.7. mRNS izolálás és reverz transzkripció

A hasnyálmirigy egy kis darabját 1 ml TRIzol reagensben jégre tettük és azonnal homogenizáltuk. A teljes RNS-tisztítást három lépésben végeztük. A fázisszeparáció kloroformmal történt. Az RNS-t tartalmazó felső vizes fázist egy üres csőbe gyűjtöttük. Az RNS-eket izopropanollal vortexeltük és centrifugáltuk, melynek hatására az RNS kicsapódott a csövekben. A felülúszót eltávolítottuk, majd a következő lépésben az RNS-eket 75%-os alkohollal mostuk. A felesleges etanolt röviden elpárologtattuk, majd az RNS-t 70 µl RNáz és DNáz mentes vízben szuszpendáltuk fel. Az RNS-t -80 °C-on tároltuk a felhasználásig. A további folyamatok során mértük az oldatban lévő RNS-koncentrációt és az RNS integritását. A teljes RNS-ből 2 µg-ot használtunk fel reverz transzkripcióhoz, mely során cDNS-t kaptunk, amit később a valós idejű PCR-eljáráshoz használtunk fel.

IV.1.8. Immunhisztokémia

A hasnyálmirigy-szövetekből Leica kriosztáttal 7 µm vastagságú szeleteket metsztünk. A metszeteket 2%-os paraformaldehiddel fixáltuk, majd antigén feltárást végeztünk. Az ezt követő blokkolási lépés után a metszeteket anti-CFTR antitesttel inkubáltuk egy éjszakán át. Másnap a mintákat Alexa488 másodlagos antitesttel inkubáltuk sötétben, szobahőmérsékleten. A ko-immunfestést AlexaFluor647-konjugált citokeratin-19 antitesttel végeztük. A sejtmagokat Hoechst 33342-vel tettük láthatóvá. A szövetszeleteket Zeiss LSM 880 konfokális lézerpásztaó mikroszkóppal (Carl Zeiss Technika Kft., Budapest, Magyarország) fotóztuk. A hasnyálmirigy ductusz sejteinek CFTR és CK19 expressziójának számszerűsítéséhez minden csoportból három vagy négy reprezentatív nagyméretű (átlagosan 1500 x 1000 µm) képet készítettünk. Az Image J szoftver (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) segítségével meghatároztuk a CFTR és a CK19 fehérjék festődésének arányát a teljes szövethez képest.

IV.1.9. Folyadékszekréció és intracelluláris pH mérés izolált egér hasnyálmirigy duktuszokon

Az intra-/interlobuláris hasnyálmirigy duktuszokat kollagenázos emésztés után mikrodisszekciós technikával izoláltuk. A folyadékszekréció mérése esetén a duktuszokat 6-14 órán keresztül tenyésztettük. Ezek egy részét 3 μM VX-661 és 1 μM VX-770 hatóanyaggal együttesen kezeltük az inkubáció során, míg a többit az említett hatóanyagok oldószerével (0,5% DMSO tápfolyadékban) vagy csak a tápfolyadékkal kezeltük. A hasnyálmirigy duktuszok zárt luminális terébe történő folyadékszekrécióját hízásos módszerrel elemeztük. A duktuszokat különböző oldatokkal perfundáltuk a következő sorrendben: 1) standard HEPES, 2) standard HEPES 5 μM forskolinnal 3) standard $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ 5 μM forskolinnal. A fénymikroszkópos felvételeket 1 perces időközönként készítettük egy Zeiss Axio Observer 7 CMOS-kamerával ellátott készülékkel. A duktuszokról készített digitális képeket az ImageJ szoftverrel elemeztük.

Az intracelluláris pH (pH_i) mérésekhez a duktuszokat izolálás után azonnal mértük és maximum az izolálást követő 8 órában használtuk fel. A mérések során az Olympus (Budapest, Magyarország) IX71 fluoreszcens mikroszkópját és CellR képpalkotó rendszert használtuk. A hasnyálmirigy duktuszok HCO_3^- szekréciójának mérésére ammónium pulzust alkalmaztunk. A HCO_3^- szekréció mértékét a pH_i alkalózisból történő helyreállításának sebességével becsültük meg. Az izolált duktuszokat a pH-érzékeny BCECF-AM fluoreszcens festékkel töltöttük fel standard HEPES oldatban. Ezt követően az izolátumot a következő sorrendben perfundáltuk oldatokkal: 1) standard HEPES, 2) standard $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$, 3) NH_4Cl $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -ben, 4) standard $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$, 5) standard HEPES. A duktuszok az ammónium pulzus során 20 mM NH_4Cl -dal voltak kezelve, ez okozza a pH_i lúgosodását. Minden egyes intakt duktuszban négy-tíz, egyenként 5-10 sejtből álló kisebb területet figyeltünk meg. A duktuszokat 490 és 440 nm-es hullámhosszúságú fényrel gerjesztettük, és 535 nm-en mértük a 490/440 fluoreszcencia emisszió arányát. A másodpercenként mért pH_i változást ($\Delta\text{pH}/\Delta t$) lineáris regressziós elemzéssel számoltuk ki.

IV.1.10. Statisztikai kiértékelés

A grafikonokat GraphPad Prism 9.2.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) vagy Microsoft Excel és PowerPoint (Redmond, WA, USA) segítségével készítettük el. A kísérleteket egy- vagy kétutas ANOVA-val értékeltük ki, amelyet Cer-AP esetében a Tukey HSD post hoc teszt, NaTc-AP esetében a Holm-Sidak post hoc teszt követett (SPSS, IBM, Armonk, NY, USA). A $P < 0,05$ értéket statisztikailag szignifikánsnak fogadtuk el.

IV.2. Szisztematikus irodalmi áttekintés és meta-analízis

IV.2.1. A meta-analízis regisztrálása és az analízis elvégzéséhez szükséges szempontok felállítása

A HTG és AP témakört vizsgáló összefoglaló áttekintésünket és meta-analízisünket a PROSPERO adatbázisban regisztráltuk (<https://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/>, ID: CRD4201707071264). A szisztematikus keresést a probléma felvetés, intervenció, összehasonlító intervenció és kimenetel modell (PICO) alapján készítettük el. A (P) az AP, míg az (I) a HTG volt, aminél az elemzéshez különböző csoportokat alakítottunk ki: $>1,7$, 1,7-5,6, 1,7-11,3, $>5,6$ és $>11,3$ mM seTG. A (C) a következő seTG koncentrációk voltak: normál ($<1,7$), $<5,6$, 1,7-5,6, 1,7-11,3 és $<11,3$ mM. A tanulmányban a

szövődmények kapcsán (O) a felsoroltakat vizsgáltuk: az AP súlyosságát, a mortalitást, a hasnyálmirigy-nekrózist, a tartós szervi elégtelenséget (POF) és a többszervi elégtelenséget (MOF), a tüdő- és veseelégtelenséget, valamint az intenzív osztályra (ICU) való felvételt.

IV.2.2. A meta-analízis elvégzéséhez szükséges irodalmi háttér feltárása

Az irodalmi adatbázisokban a releváns tanulmányok megkeresésére 2017 augusztusának végén került sor. A megfigyeléseken alapuló prospektív és retrospektív kohorszokat, valamint az esetkontroll tanulmányokat válogattunk ki az Embase (1948-tól 2017 júliusáig megjelent) és a PubMed (1961-től 2017 júliusáig megjelent) adatbázisokból. Ezenkívül a ClinicalTrials.gov honlapot is átnéztük további még nem publikált adatok után.

IV.2.3. A tanulmányok beválogatásának kritériumai

A cikkeket akkor válogattuk be az elemzésbe, ha megfeleltek a következő kritériumoknak: 1) esetkontroll vagy kohorsz tanulmányok; 2) AP-s beteget vizsgáló tanulmányok; 3) a HTG (>1,7 mM) jelen volt a vizsgált csoportok legalább egyikében; 4) a seTG szinteket pontosan meghatározták; 5) a kimeneti adatokat a következők közül legalább az egyikre vonatkozóan feltüntették: az AP súlyossága a Revidált Atlanta Osztályozás szerint, halálozás, hasnyálmirigy-nekrózis, POF, MOF, tüdőelégtelenség, veseelégtelenség és ICU; 6) angol nyelven írták. Fontos volt továbbá, hogy a seTG a kontrollként használt különböző csoportokban 1,7; 5,6 vagy 11,3 mM alatt, valamint az 1,7-5,6 és 1,7-11,3 mM tartományon belül legyen.

IV.2.4. A kiválasztás menete és az adatok kinyerésének folyamata

A releváns tanulmányokat két egymástól független szerző külön-külön válogatta ki. A kutatók ezt követően kinyerték a tanulmányok általános jellemzőit és az elemzéshez szükséges adatokat, amelyeket aztán statisztikailag elemeztek. A felmerülő eltéréseket másik két szerzővel folytatott megbeszélés során egyeztetették.

IV.2.5. A meta-analízisbe bevont tanulmányok minőségi ellenőrzésének szempontjai

A bevont cikkek minőségének értékelésére a Newcastle-Ottawa-skálát (NOS) használtuk. Mivel a seTG a táplálékbevitel korlátozásakor gyorsan csökken, a NOS-t egy másik pontozási szemponttal is kiegészítettük. Ebben a szempontban a beválogatott cikkeket a szerinti értékeltük, hogy a betegeknél mikor mérték a seTG-t először a kórházba történt betegfelvételtől számítva.

IV.2.6. A kinyert adatok elemzésének módszere

Az adatok statisztikai elemzését a Stata 11 SE (StataCorp LLC, College Station, TX, USA) programmal végeztük. Az esélyhányadosokat (OR) a DerSimonian-Laird becsléssel ellátott véletlen hatásmodell segítségével összehasonlítottuk és erdődiagramon ábrázoltuk. Összefoglaló OR becslést, p-értéket és 95%-os konfidenciaintervallumot (CI) számoltunk. A $p < 0,05$ értéket szignifikáns különbségnek tekintettük, ha az összefoglaló OR értéke 1-től eltért. A statisztikai heterogenitást az I^2 statisztika és a chi-négyzet teszt segítségével elemeztük a valószínűségi értékek megszerzéséhez; $p < 0,05$ jelentős heterogenitást jelzett.

V. EREDMÉNYEK

V.1. Állatkísérletek

V.1.1. A cerulein által kiváltott akut hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságának időbeli alakulása

A Cer-AP progresszióját 0-tól 72 óráig (h) követtük. A Cer injekció 24 h-val az első oltáshoz képest okozta a legnagyobb mértékű sejtkárosodást. Ezt teljes mértékben alátámasztják a vakuolizáció pontozási eredményei. A sejtkárosodás és a vakuolizáció jelentősen csökkent 48 és 72 h időpontokban a 24 h csoporthoz képest. A leukocita infiltráció szignifikánsan megemelkedett 6, 12, 24 és 72 h-val az első Cer-injekciót követően a kontrollhoz képest. A hasnyálmirigy MPO-aktivitásának változása szorosan követte a leukocita-infiltráció alakulását, azaz 12 és 24 h elteltével jelentős növekedést mutatott. Az AP a hasnyálmirigy víztartalmának és a szérum amiláz-aktivitásának jelentős emelkedését idézte elő 12 és 24 h-val a kontroll (0 h) csoporthoz képest. A szérum amiláz aktivitás a 12 h csoportban volt a legmagasabb, majd 48 h elteltével visszaesett a kontroll szintre. 48-72 h után szinte minden szövettani és laboratóriumi paraméter csökkenő tendenciát mutatott a 12 vagy 24 h csoportokhoz képest.

V.1.2. A CFTR expressziójának és festődési morfológiájának változása akut hasnyálmirigy-gyulladás során

A *Cftr* mRNS expressziója 24 h-val az első Cer oltástól számítva jelentősen megnövekedett a kontrollhoz képest. A legnagyobb (20-szoros) növekedést 48 h elteltével mértük a *Cftr* mRNS mennyiségében az egészséges csoporthoz képest. Ez a tendencia a ductuszokra specifikus marker, a *Ck19* esetében is megfigyelhető volt, de a *Ck19* mRNS-e kevésbé fokozott expressziót mutatott, mint a *Cftr*. A *Ck19* mRNS-expressziója 12 és 24 h-val az AP kiváltása után volt a legmagasabb. Az *Slc26a3* mRNS expressziója szintén 24 h elteltével emelkedett a legmagasabb szintre, míg az *Slc26a6* mRNS-e 24 és 72 h között alacsonyabb értéket mutatott, mint a kontroll.

A CFTR és a CK19 fehérjék területének százalékos festődését fluoreszcens immunfestéssel határoztuk meg. A kezeletlen csoportban a hasnyálmirigy-szövet hat százaléka festődött CFTR-ra. Az AP kezdetén (6 és 12 h) a CFTR festődési területe csökkenő tendenciát mutatott, de 24 h elteltével a fehérje expressziója szignifikánsan megnőtt a kontroll vagy a 6-12 h kezelési csoportokhoz képest. A CFTR fehérjeexpresszió növekedése összhangban van az mRNS-mérések eredményeivel. A CK19 festődési területe a kontroll csoportban körülbelül 20 % volt. Ez az érték az AP kezdetén (6 h) csökkent, míg később a CK19-expresszió nem különbözött a kontrollcsoporttól.

A CFTR és a CK19 immunfestéssel ezen fehérjék morfológiai változásait vizsgálatuk. A CFTR fiziológiásan a hasnyálmirigy csatornák apikális membránjában helyezkedik el. Egyértelműen kimutatható duktális morfológia volt megfigyelhető a kontroll állatokban mind a CFTR, mind a CK19 esetében. A pozitívan festődött intralobuláris csatornák lumenjei körülbelül 2-3 µm átmérőjűek voltak, amelyek több µm-en keresztül követhetők. A sejtmagok a ductuszok lumenének közelében helyezkedtek el. A nagyobb interlobuláris ductuszok nem festődtek CFTR-ra. Figyelemre méltó, hogy az AP már 6 h-val az első oltást követően zavart okozott a duktális struktúra jellegzetes szerkezetében. A CFTR lokalizációja

megváltozott, és mind a CFTR, mind a CK19 fehérjék diffúz és perinukleáris megjelenést mutattak. A betegség kezdetéhez képest 72 h elteltével a szövetszeleteken néhány dukális struktúra újra megjelent, mely mögött a fehérjék újra rendeződését feltételezzük.

V.1.3. A hasnyálmirigy duktusok HCO_3^- szekréciója akut hasnyálmirigy-gyulladás során

Az izolált duktusokon alkalmazott ammonium-pulzus technika és a pH_i változásának mérése lehetővé tette a duktusok HCO_3^- szekréciójának becslését. Ezt elsősorban az apikális transzporterek (CFTR, SLC26A3, SLC26A6) végzik. Amikor a közegből elvontuk az ammóniumot, ezáltal leállítottuk az alkalózist, a sejtek rövidesen acidotikus állapotba kerültek. Az acidózisból a sejtek szintén regenerálódni fognak, mely során aktiválódnak a bazolaterális transzporterek (pl. $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ ko-transzporter, Na^+/H^+ -kicsérélő és/vagy a H^+ -ATPáz). Ezért az acidózisból való regeneráció sebessége elsősorban a bazolaterális transzporterek aktivitására utal. Az AP korai fázisában (6 h) az alkalózisból való regeneráció, vagyis az apikális transzporterek HCO_3^- szekréciója jelentősen megnövekedett. A bazolaterális transzporterek aktivitása is 6 h elteltével szignifikánsan megemelkedett, amikor az acidózisból való regenerációt mértük. Azonban 12 és 72 h között az alkalózisra és az acidózisra adott válasz nem különbözött szignifikánsan a kontroll csoporthoz képest.

V.1.4. A CFTR-korrektor VX-661 és a CFTR-potencirozó VX-770 kombinációs kezelése csökkentette az akut hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságát

A VX-661 és a VX-770 kombinációja önmagában nem okozott károsodást a hasnyálmirigy-szövetben. A hasnyálmirigy morfológiája normális volt a VX-661+VX-770 kezelést követően, és a szövettani és laboratóriumi paraméterek is hasonlóak voltak a nem kezelt csoporthoz viszonyítva. Az AP-s csoportokban szinte minden mért paraméter emelkedett értéket mutatott a kontroll csoporthoz képest. A reprezentatív szövettani metszetek azt mutatták, hogy a VX-661+VX-770 előkezelés javította az AP által okozott sejtkárosodás mértékét. Az AP-s csoportokban nem volt szignifikáns különbség a vakuolizációban az idő vagy a kezelés függvényében. A hasnyálmirigy leukocita-infiltráció és az MPO-aktivitás mérése hasonló kinetikát mutatott, és nem volt szignifikáns különbség az AP-s csoportokban. A hasnyálmirigy víztartalmában sem volt mérhető változást, amikor az AP-s csoportot az AP+VX-661+VX-770 csoporttal hasonlítottuk össze. A szérum-amiláz aktivitás esetében nem volt szignifikáns különbség a kontroll és a kezelt csoportok között.

V.1.5. A VX 661 CFTR-korrektor és a VX-770 CFTR-potencirozó hatása a duktus morfológiájára és fehérjeexpressziójára akut hasnyálmirigy-gyulladásban

A CFTR és a CK19 ko-immunfestése 24 és 48 h időpontokban intakt dukális rendezettséget mutatott a kontroll csoportokban. Az AP mind 24, mind 48 h elteltével károsította a CFTR és a CK19 festődési morfológiáját. A CFTR és a CK19 festés alapján azt láttuk, hogy a VX-661+VX-770 előkezelés sem helyreállítani, sem javítani nem tudta az AP által károsított fehérjék festődésének morfológiáját. A CFTR fehérje expresszióját az AP növelte, míg a CK19 expressziója nem változott. A VX-661+VX-770 előkezelés nem volt hatással a CFTR és a CK19 fehérje expressziójának AP által kiváltott változásaira.

V.1.6. A VX-661 és a VX-770 kombinációs kezelés fokozza a folyadékszekeréciót akut hasnyálmirigy-gyulladásban szenvedő egerek izolált ductuszaiban

Annak vizsgálatára, hogy a folyadékszekeréciót befolyásolja-e a VX-661 és VX-770 kezelés, kontroll és AP-s egerekből származó izolált (0,5% DMSO/VX-661 és VX-770-vel vagy anélkül kezelt) ductuszokat használtunk méréseink során, és követtük a hízásukat. A cAMP-agonista forskolin-kezelés jelentősen fokozta a kontroll állatokból származó ductuszok folyadékszekerécióját, különösen HCO₃/CO₂-tartalmú puffer oldatban. A DMSO előkezelés nem befolyásolta a ductuszok relatív luminális térfogatának változását. Ezért a DMSO-val vagy anélkül kezelt megfelelő csoportokat összevontuk (azaz Cer és Cer+DMSO). A Cer-nel kezelt állatokból izolált ductuszok megnövekedett folyadékszekeréciót mutattak a PS-kezelt kontroll egerekhez képest, de ez nem érte el a statisztikai szignifikanciát. Érdekes módon a VX-661 és VX-770 kezelt ductuszokban szignifikáns növekedés volt megfigyelhető a folyadékszekeréció mértékében az AP-s állatokból származó nem VX kezelt ductuszokhoz képest.

V.1.7. A fentanil utókezelés hatása az akut hasnyálmirigy-gyulladásra

A NaTc intraduktális infúziója AP-t indukált a patkányokban, és növelte a hasnyálmirigy-nekrózis, a leukocita-infiltráció és az ödéma mértékét. Mind a nekrozist, mind a leukocita-infiltrációt csökkentette a nagyobb dózisu FE, míg az ödéma pontszáma nem változott az AP csoportokban az FE-kezelést követően. A szérum amiláz aktivitása is csökkent a NaTc+3x0,2 mg/kg FE csoportban a FE kezelés nélküli AP csoporthoz képest.

V.2. Meta-analízis: a szérum triglicerid-koncentráció hatásának vizsgálata az akut hasnyálmirigy-gyulladás kimenetelére

V.2.1. A meta-analízishez felhasznált tanulmányok kiválasztása

Három különböző adatbázisban végeztünk cikk gyűjtést, mely során 2261 találatot kaptunk. A duplikátumok eltávolítása, valamint a címek és összefoglalók átvizsgálása után 90 cikk teljes szövegét elemeztük ki az előzetesen felállított kritériumoknak megfelelően. E kéziratok közül 29 prospektív és retrospektív kohorsz tűnt alkalmasnak az adatgyűjtésre. Azonban 13 publikációban a seTG-kezelést nem megfelelően határozták meg (pl. <1,88 mM normálisnak minősült), vagy a kimeneti adatokat nem lehetett felhasználni. Ezért ezt a 13 publikációt kizártuk az értékelésből, és végül csak 16 cikket vontunk be a statisztikai elemzésbe. Ezeket a tanulmányokat 2000 januárja és 2016 márciusa között publikálták.

V.2.2. A meta-analízishez felhasznált tanulmányok általános jellemzői

Az analízis során az egy- (13 db) és a multicentrikus (3 db) kohorsz vizsgálatokat is bevontuk. A populáció mérete 43 és 3203 között volt az egyes tanulmányokban, és volt hat vizsgálat melyekben több mint 300 beteg vett részt. Az AP etiológiáját minden vizsgálatban feltüntették, nyolc HTG-AP-t (>11,3 mM seTG) tartalmazott, és tizenkét vizsgálatban alkoholos és epeúti hasnyálmirigy-gyulladásban szenvedő betegek szerepeltek. Egyes cikkekben egyéb etiológiájú, például poszt-ERCP, idiopátiás, kevert és gyógyszer okozta AP is szerepelt. A vizsgálatokat a következő országokban végezték: Kína (9 db), az USA (3 db), Magyarország (2 db), az Egyesült Királyság (1 db) és Spanyolország (1 db). A tanulmányok

minőségi ellenőrzése során értékeltük a betegek kiválasztási szempontjait, a csoportok összehasonlíthatóságát, a kimeneti adatokat és a seTG-mérés időpontját a kórházi felvételhez képest.

V.2.3. Klinikai vizsgálati eredmények

V.2.3.1. A hipertrigliceridémia vs. normál szérum triglicerid hatásainak összehasonlítása az akut hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságára

A HTG mértéke alapján különböző csoportokat hoztunk létre, és az AP által okozott következményeket összehasonlítottuk a normál (<1,7 mM) seTG csoport eredményeivel. A HTG szignifikánsan növelte a súlyos AP esetek számát (súlyosság), a hasnyálmirigy-nekrózis, a POF és a veseelégtelenség kialakulásának lehetőségét a nem HTG csoporthoz képest. A HTG azonban nem növelte szignifikánsan a halálozás és a tüdőelégtelenség esélyét a <1,7 mM-os csoporthoz képest. A seTG hatásának elemzése az 1,7 és 11,3 mM közötti tartományban az előző összehasonlításhoz hasonló eredményeket mutatott. Az AP súlyossága és a POF előfordulása szignifikánsan megnőtt az 1,7-11,3 mM-os tartományban a <1,7 mM seTG csoporthoz képest, míg a betegek mortalitására nem volt szignifikáns hatása.

A HTG-t tovább osztottuk 1,7-5,6, >5,6 és >11,3 mM seTG tartományokra. Az AP súlyossága nem különbözött szignifikánsan az 1,7-5,6 mM seTG-vel diagnosztizált betegeknél a <1,7 mM-os csoporthoz képest. A >5,6 mM seTG azonban szignifikánsan növelte a súlyos AP kockázatát, 2,01-es OR értékkel a <1,7 mM seTG-hez képest. A súlyos és nagyon súlyos HTG (>11,3 mM) jelenléte jelentősen megnövelte a súlyos AP, a POF gyakoriságát, és az ICU-ra való felvétel gyakoriságát, de nem volt szignifikáns emelkedés a mortalitásban a normál seTG csoporthoz képest.

V.2.3.2. A hipertrigliceridémia különböző mértékének hatása az akut hasnyálmirigy-gyulladásra

Ha a seTG emelkedett, az emelkedés mértéke hatással lehet az AP lefolyására. Az 5,6 mM alatti és feletti seTG hatásának összehasonlítása azt mutatta, hogy az 5,6 mM-nál magasabb seTG jelentősen megnövelte a súlyos AP, a halálozás, valamint a tüdő- és veseelégtelenség kockázatát. Az AP súlyossága azonban nem különbözött szignifikánsan az 1,7-5,6 mM közötti seTG-vel rendelkező HTG-betegeknél az 5,6 mM-nál magasabb seTG-vel rendelkező betegekhez képest.

A súlyos és nagyon súlyos HTG (>11,3 mM seTG) szignifikánsan növelte az AP súlyosságának, a mortalitásnak, a hasnyálmirigy-nekrózisnak és az ICU felvételnek az OR-jét a <11,3 mM seTG-vel rendelkező csoporthoz képest, de nem befolyásolta a MOF kialakulásának esélyét.

Érdekes módon, amikor a HTG>11,3 mM hatását összehasonlítottuk az enyhe és mérsékelt HTG-vel (seTG 1,7-11,3 mM), nem mutatkozott szignifikáns különbség a két csoport között az AP súlyossága, a mortalitás és a POF tekintetében.

VI. MEGBESZÉLÉS

VI.1. Állatkísérletek

VI.1.1. A CFTR, mint az akut hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságának javításában kulcsfontosságú szereplő

Az AP patomechanizmusa összetett, és a mögöttes folyamatok nem teljesen ismertek. Az azonban már tény, hogy a ductuszok károsodásának és a CFTR működésének fontos szerepe van a betegség patomechanizmusában. Pallagi és mtsai. (2011) kimutatták, hogy a tripszin a proteináz-aktiválta 2-es receptoron keresztül gátolja a ductuszokban a CFTR-t és emellett az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt is emeli. Vizsgálatunk kimutatta, hogy nemcsak a CFTR funkcionális gátlása, de a CFTR fehérje megfelelő lokalizációjának a hiánya is kiválthatja a ductális funkció csökkenését. Eredményeink alapján az látható, hogy AP során a CFTR festődése a ductuszok lumene mentén megváltozik az egészséges állapotokban észlelthez viszonyítva, és a CFTR fehérjék a perinukleáris régióba helyeződnek át. Feltehetően a gyulladás és a sejtek stresszválasza a CFTR fehérjéket proteosómákba irányítja lebontás céljából. Érdekes módon a *Cftr* mRNS-expressziója az AP kezdetén (6-12 h) változatlan volt, majd 24 h-tól szignifikánsan megnőtt. 24 h elteltével a CFTR fehérje expressziója követte az mRNS-változásokat, és növekvő tendenciát mutatott. A jelen tanulmány eredményei és ezzel egybehangzóan más AP modellen korábbi vizsgálatok is azt mutatták, hogy az AP a CFTR lokalizációjának a károsodását okozta, ami alapján feltételezhetjük, hogy ez a hatás független a betegség etiológiájától.

Az egerekből izolált interlobuláris ductuszok (luminális átmérőjük 20-130 μm) *ex vivo* HCO_3^- szekréció mérése során 6 h-val az AP kiváltását követően emelkedett apikális és bazolaterális transzporter aktivitást mértünk, míg a későbbi időpontokban a kontroll csoportéhoz hasonló értékeket kaptunk. Azonban a CFTR fehérje expressziója a 20-130 μm -es méretű ductuszokban immunhisztokémiával nem volt megfigyelhető, csak a kisebb (2-3 μm luminális átmérőjű) interkaláris csatornáknban, ahogy azt humán mintákban korábban már kimutatták. Azonban, más vizsgálatok és ez a munka is bizonyította a ductális folyadéksekreció mérésével, hogy a CFTR funkcionálisan aktív az interlobuláris csatornáknban. Ezek alapján feltételezzük, hogy az egér hasnyálmirigy interlobuláris ductuszaiban van CFTR expresszió, de ez alacsonyabb az interkalált ductuszokhoz képest. Ebből következően a ductuszok HCO_3^- szekréciójában mért növekedés 6 h-val az AP indukciója után elsősorban a CFTR-csatornától eltérő transzporterek, pl. SLC26A3, SLC26A6, ANO1, NBC, NHE vagy H^+ -ATPáz aktivitásától függhet. Korábbi publikációk és a jelen munka is arra utal, hogy az AP etiológiai tényezői vagy maga a betegség indítja el a CFTR lokalizációjának a károsodását vagy degradációját és a folyadéksekreció gátlását. Ezek a tényezők valószínűleg hozzájárulnak a fokozott hasnyálmirigy-gyulladásához. Ezért feltételeztük, hogy a ductuszok funkciójának farmakológiai korrekciója jótékony hatással bírhat a hasnyálmirigy-károsodásra és az acinus sejtek nekrozis/apoptózis arányának eltolódására AP-ban. Ennek vizsgálatára a CFTR-korrektor VX-661 és a potenciózó VX-770 kombinációját alkalmaztuk. Az egerek VX-661+VX-770 előkezelésével jelentősen csökkent a hasnyálmirigy szöveti károsodása az AP során; más gyulladásos paraméterek

azonban hasonlóak voltak az AP-s, gyógyszeresen nem kezelt csoporthoz. Érdekes módon a CFTR fehérje expressziója nem változott a VX-661+VX-770 kezelés hatására, ezért feltételeztük, hogy a hasnyálmirigy duktuszokban az ép és funkcionális CFTR fehérjék aktiválódtak, és ez vezethetett a csökkent acinus károsodáshoz. Mivel a CFTR-fehérje lokalizációja sem változott a VX kezelésekre hatására, ezért úgy gondoljuk, hogy a CFTR-potenciáló (VX-770) felelős az AP-ben mutatkozó kedvező hatás elérésért. Bizonyítani tudtuk továbbá, hogy a CFTR-t moduláló szerek növelik a folyadékszekréciót az AP-s egerekből izolált hasnyálmirigy duktuszokban. Feltételezésünk szerint a duktális HCO_3^- szekréció védi a hasnyálmirigyet a toxikus anyagok, például az aktivált emésztőenzimek kimosásával. Ha ez a védelmi mechanizmus nem elégséges, a káros anyagokat nem lehet eltávolítani a hasnyálmirigyből és ez szövétkárosodáshoz vezethet.

VI.1.2. A fentanil hatása az akut hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságára

AP-s betegeknek elterjedt az opioidok adása a fájdalom enyhítésére, de a szakirodalom megoszlik abban a kérdésben, hogy a gyógyszerek alkalmazása előnyös vagy káros. Az általunk publikált tanulmány részleteiben foglalkozik ezzel a kérdéssel egy több szempontos összehasonlító munka keretében, de a jelen dolgozat csak az NaTc-AP modell és a FE kapcsolatára összpontosít.

A NaTc-modellben az FE előkezelés nagymértékben súlyosította az állatok állapotát, ezért a kísérletek humánus befejezése után ezt a fajta kezelést megszüntettük. Az L-ornitin indukálta AP-ben a FE előkezelés fokozta a betegség súlyosságát, de az állatok túlélési esélyét nem befolyásolta, míg a Cer-AP modellben a gyógyszernek nem volt hatása (munkánk további részei a Bálint et al., 2022-ben jelentek meg). Az AP nekrotizáló modelljeiben (NaTc és L-ornitin) a FE utókezelése javította a betegség kimenetelét. NaTc-AP-ben a FE nagyobb dózisa (0,2 mg/kg), míg az L-ornitin modellben már a FE kisebb dózisa (0,1 mg/kg) is jelentősen csökkentette az AP súlyosságát. Ez arra enged következtetni, hogy a betegség enyhe formájában a FE kezelés nem rontja a betegség kimenetelét, de súlyos nekrotizáló gyulladásban fontos a gyógyszeres kezelés időzítése.

Kísérleti és klinikai vizsgálatok is beszámoltak az FE jótékony hatásairól. Mások a FE intravénás adagolásának hatását vizsgálták a NaTc által kiváltott AP-re. Ők 23-23,5 h-val az AP kiváltását követően adták be a FE-t, és 24 h-val a betegség indukciója után feláldozták az állatokat. Meglepő módon az FE csökkentette a hasnyálmirigy-gyulladást és az AP által kiváltott szívizomkárosodást ezen a valóban rövid időn belül (30-60 perc). Az opioidokkal kapcsolatos potenciális problémák közé tartozik azonban a bélmotilitást gátló hatása, ami étvágytalanságot, székrekedést, hányingert és hányást okoz a betegeknek, valamint hajlamosíthat a hozzászokásra és a visszaélésre. Egy nemrégiben végzett kísérleti vizsgálat kimutatta, hogy a MO adása súlyosította az AP-t és növelte a bakteriális transzlokáció kockázatát. A MO késleltette a makrofágok migrációját is, és ezzel a gyulladás elhúzódását okozta.

VI.2. Meta-analízis: A szérum triglicerid-koncentráció hatásának vizsgálata az akut hasnyálmirigy-gyulladás kimenetelére

A HTG (>1,7 mM) megléte betegfelvételtkor rontja az AP lefolyását a normál seTG szinttel diagnosztizált csoporthoz képest. A seTG 5,6 mM-ig történő növekedése azonban nem befolyásolta szignifikánsan az AP súlyosságát a normál seTG-hez képest. A HTG-n belüli alcsoportokba (>5,6; >11,3 mM) való besorolás vizsgálatánál a súlyosságra vonatkozó OR-ok szignifikáns emelkedését mutattak (2,01, illetve 3,08), amikor a csoportokat összehasonlítottuk a normál seTG-dél. Ezen eredményeink összhangban vannak a korábbi állatkísérletekkel, amelyekben a hiperlipidémia fokozta az AP súlyosságát.

Érdekes azonban, hogy a betegek mortalitása nem mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget a >1,7; 1,7-11,3; 11,3 mM csoportok között a normálshoz képest, ami valószínűleg a betegek kis száma miatt lehetett. A szövődmények (SIRS, POF, beleértve a tüdő-, vese- és keringési elégtelenséget) esélye szignifikánsan megnőtt a HTG csoportokban. Bár a halálozás összefügg a betegség szövődményeivel, a halálozásra vonatkozó statisztikai elemzés eredményei nem álltak összhangban az AP kimenetelével (pl. súlyosság, POF, nekrozis). Ezért a HTG és az AP mortalitásra vonatkozó kapcsolatának további vizsgálata előnyös lenne nagyobb elemszámmal.

Bár a HTG-AP-re nincs egyhangú definíció, széles körben elfogadott, hogy a 11,3 mM fölötti seTG szint az AP-s betegeknél HTG-vel kapcsolatos kórokra vezethető vissza. Egyes kutatók azonban úgy vélik, hogy a HTG-AP definiálást már az 5,6 mM fölötti seTG szint elérése is indokolja. Ezért ez arra ösztönzött minket, hogy megvizsgáljuk a HTG különböző súlyossági szintjei és az AP kimenetele közötti összefüggéseket. A seTG >5,6 mM jelentősen rontotta az AP kimenetelét a seTG <5,6 mM csoporttal összehasonlítva, azonban nem volt különbség, amikor a seTG >5,6 mM-ot az 1,7-5,6 mM tartományba eső seTG-vel hasonlították össze. Hasonló eredményeket tapasztaltak a 11,3 mM seTG határértéknél is. A seTG >11,3 mM súlyosabb AP-t okozott, mint a seTG <11,3 mM, de amikor a seTG >11,3 mM hatását az 1,7-11,3 mM tartományban lévő seTG-vel hasonlították össze, nem volt szignifikáns különbség a két csoport között. Ezek az összehasonlítások is alátámasztják korábbi feltételezésünket, miszerint a normál seTG-hez képest a HTG súlyos AP-t okoz és a szövődmények fokozott kockázatával is jár. Mindezek ellenére további vizsgálatok kellene a HTG mértéke és az AP súlyossága közötti kapcsolat tisztázására.

A vérből mért seTG egy dinamikus változó paraméter, amelyet a táplálékbevitel és a koplalás nagy mértékben befolyásol. Az AP-s betegek legtöbbször a kórházi kezelés megkezdésekor a protokollok koplalást írnak elő, kivéve a súlyos AP gyanúja esetén, ahol korai (48 órán belüli) enterális táplálás javasolt. A koplalás a seTG gyors (48 órán belüli) csökkenését eredményezi, és a seTG 48 vagy 72 órával a felvétel után történő mérése alul reprezentálhatja az AP kezdetekor mért szintet. Többet leírták már a seTG drámai csökkenését koplalás alatt: a seTG kb. 30 mM-ról 5 mM-ra esik három nap alatt. Hogy ezt a torzítást figyelembe vegyüik, a cikketek a seTG-mérés időzítését alapján pontoztuk. A NOS és a seTG-mérés időzítésére vonatkozó magas pontszámok jó minőséget

jelentenek a cikkek kiválasztása szempontjából a meta-analízishez.

VI.3. Következtetések

Kimutattuk, hogy az AP jelentősen befolyásolja a CFTR expresszióját és működését a hasnyálmirigy duktuszaiban. A CFTR korrekciója és stimulálása előnyösnek bizonyult, mivel a VX-vegyületek előkezelésben jelentősen gátolták a hasnyálmirigy sejtkárosodását és javították a dukális HCO_3^- szekréció mértékét az AP-s egerekben a kontroll csoportokhoz képest. Azt is kimutattuk, hogy a FE-kezelés hatékonyan csökkentheti a nekrotizáló AP súlyosságát, de a gyógyszeradagolás időzítése nagyon fontos. A klinikai tanulmányok meta-analízise megerősítette, hogy a HTG rontja az AP súlyosságát és növeli a szövődmények esélyét. Összességében úgy tűnik, hogy számos tényezőnek szerepe van az AP kialakulásában és súlyosbodásában. Ezért a kezelések megfelelő kombinációja lehet a válasz a betegség gyógyítására.

VII. AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEGRÉSE

- Kísérletes AP modellben kimutattuk a CFTR fehérje lokalizációjának károsodását, miközben megnövekedett *Cfr* mRNS expressziót mértünk.
- A CFTR korrektor és potencírozó, azaz a VX-661 és a VX-770 jelentősen csökkentette a hasnyálmirigy szöveti károsodását, valószínűleg a fokozott folyadékszekréció révén, de a CFTR fehérje expressziója nem változott.
- A NaTc-AP során a FE utókezelés csökkentette, míg az előkezelés súlyosbította a betegség kimenetelét. Ezért az időzítés döntő fontosságú a FE AP-s betegeknek adása esetén.
- Az emelkedett seTG koncentráció jelentősen növeli az AP súlyosságát humán betegeknél, ami a halál, a szervkárosodás és a kórházi kezelés nagyobb valószínűségével jár. Az AP ezen etiológiai tényezője különös figyelmet érdemel.

VIII. TÁMOGATÓK

Ez a munka nem jöhetett volna létre az Emberi Erőforrások Minisztériuma (EFOP-3.6.2-16-2017-00006), a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (GINOP-2.3.2-15-2016-00048, NKFIH K119938) és a Magyar Tudományos Akadémia (LP2014-10/2014) pénzügyi támogatása nélkül.

IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani mindkét témavezetőmnek, Prof. Rakonczay Zoltánnak és Dr. Kiss Lórándnak (Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar, Kóréletani Tanszék). Az ő tudásuk, útmutatásuk és támogatásuk nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre. Köszönöm továbbá Prof. Hegyi Péter (Semmelweis Egyetem és Pécsi Tudományegyetem), Dr. Szentesi Andrea (Pécsi Tudományegyetem), Dr. Venglovecz Viktória, Dr. Maléth József és Dr. Pallagi Petra (Szegedi Tudományegyetem) tanácsait és útmutatását.

Hálás vagyok továbbá Prof. Szabó Gyulának, a Szegedi Tudományegyetem Kóréletani Tanszékének korábbi vezetőjének, Prof. Lengyel Csabának és Prof. Ábrahám Györgynek, a Szegedi Tudományegyetem Belgyógyászati Klinika jelenlegi és korábbi tanszékvezetőjének, akik lehetőséget biztosítottak számomra, hogy intézetükben dolgozhassak.

Köszönetet szeretnék mondani továbbá kollégáimnak és barátaimnak, Bálint Réka Emese, Dr. Balla Zsolt, Dr. Kormányos Sára Eszter, Dr. Végh Teréz Eszter, Orján Márk Erik, Dr. Tóth Emese, Lőrincz Anett, Dr. Fanczal Júlia, Dr. Molnár Réka, Ébert Attila, dr. Kui Balázs, Madácsy Tamara, Varga Árpád, Dr. Csabafi Krisztina, Dr. Szakács Júlia, Dr. Ibos Katalin, Bodnár Éva, Dr. Jászberényi Miklós, Dr. Bagosi Zsolt, Dr. Mezei Zsófia, Dr. Pataki Imre, Dr. Gecse Árpád minden segítségért, útmutatásért, bátorításért és az együtt töltött éveikért. Köszönöm mindannyiuknak az inspirációt!

Ez az értekezés nem jöhetett volna létre egy kiváló csapat nélkül, akik a háttérben évek óta segítettek munkámat, név szerint: Miklósné Árva Zsuzsanna, Horesnyi Béláné Pritz Tünde, Magyar né Pálfi Edit, Fritz Rea, Fuksz Zoltánné, Tóth Zsolt, Vass Nóra Ildikó, Laurinyecz Magdolna, Pál Ágnes, Romhányi Veronika, Fráter Zsuzsanna, Kiss Gusztáv, Terhes Anikó és Szabó Lajosné (Szegedi Tudományegyetem). Külön köszönet illeti Ancsányi Kitti-t és Dallos-Szilágyi Erzsébetet, akik az évek során közvetlen segítséget nyújtottak.

Külön köszönettel tartozom a saját és a férjem családjának a rendületlen támogatásért és bizalomért, valamint azért, hogy lehetővé tették számomra tudományos munkám folytatását. Szeretném még kiemelni férjemet, Ferencet, valamint szüleimet, Veronikát és Józsefet, akik a nehéz időszakokban napi szinten adták jelét lelki támogatásuknak. Köszönöm testvéremnek és családjának, 5 keresztgyermekemnek, akik minden találkozásunk alkalmával feltöltöttek és új lendületet adtak a folytatáshoz. Ezt a doktori disszertációt nekik szeretném ajánlani.

"A kutató tudja, mi a frusztráció, tudja, hogy hány hónapig dolgozott rossz irányba, és ismeri a kudarcokat. De a kudarcok is hasznosak, mert ha helyesen elemezzük őket, akkor sikerhez vezethetnek." - Sir Alexander Fleming