

ETIOLÓGIAI TÉNYEZŐK ÉS TERÁPIÁS SZEREK HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA AZ AKUT HASNYÁLMIRIGY-GYULLADÁS SÚLYOSSÁGÁRA

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei



Bálint Emese Réka MSc.

Témavezetők:

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

Kiss Lóránd Ph.D.

Szegedi Tudományegyetem, SZAOK Kórleletani Intézet

Szeged, Magyarország

2022

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés tárgyához szorosan kapcsolódó közlemények

- I. **Bálint ER**, Fűr G, Kui B, Balla Z, Kormányos ES, Tóth B, Horváth G, Pallagi P, Maléth J, Venglovecz V, Hegyi P, Kiss L, Rakonczay Z Jr. Fentanyl but not morphine or buprenorphine treatment improves the severity of necrotizing acute pancreatitis in rats. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(3):1192. PMID: 35163111 [**IF**₂₀₂₀: **5,924**].
- II. Tóth E, Maléth J, Závogyán N, Fanczal J, Grassalkovich A, Erdős R, Pallagi P, Horváth G, Tretter L, **Bálint ER**, Rakonczay Z Jr, Venglovecz V, Hegyi P. Novel mitochondrial transition pore inhibitor N-methyl-4-isoleucine cyclosporin is a new therapeutic option in acute pancreatitis. *J Physiol.* 2019; 597(24):5879-5898. PMID: 31631343 [**IF**₂₀₁₉: **4,547**].
- III. **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 Jr.. Assessment of the course of acute pancreatitis in the light of aetiology: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2020; 10(1):17936. PMID: 33087766 [**IF**₂₀₂₀: **4,379**].

További közlemények, melyek nem szorosan kapcsolódnak az értekezés tárgyához

- I. 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, Szűcs 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. PMID: 27776171 [**IF**₂₀₁₆: **3,057**].
- II. Demcsák A, Lantos T, **Bálint ER**, Hartmann P, Vincze Á, Bajor J, Czopf L, Alizadeh H, Gyöngyi Z, Márta K, Mikó A, Szakács Z, Pécsi D, Hegyi P, Szabó IL. PPIs are not responsible for elevating cardiovascular risk in patients on clopidogrel-a systematic review and meta-analysis. *Front Physiol.* 2018; 19(9):1550. PMID: 30510515 [**IF**₂₀₁₈: **3,289**].
- III. Pécsi D, Farkas N, Hegyi P, Varjú P, Szakács Z, Fábíán A, Varga G, Rakonczay Z Jr, **Bálint ER**, Eröss B, Czimmer J, Szepes Z, Vincze Á. Transpancreatic sphincterotomy is effective and safe in expert hands on the short term. *Dig Dis Sci.* 2019; 64(9):2429-2444. PMID: 31055720 [**IF**₂₀₁₉: **2,751**].

- IV. Tóth B, Hegyi P, Lantos T, Szakács Z, Kerémi B, Varga G, Tenk J, Pétervári E, Balaskó M, Rumbus Z, Rakonczay Z, **Bálint ER**, Kiss T, Csupor D. The efficacy of saffron in the treatment of mild to moderate depression: a meta-analysis. *Planta Med.* 2019; 85(1):24-31. PMID: 30036891 [**IF₂₀₁₉: 2,758**].
- V. 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 Cs, Gácsér A, Madácsy T, Venglovecz V, Maléth J, Hegyi P, Kiss L, Rakonczay Z Jr. Kynurenic acid and its analogue SZR-72 ameliorate the severity of experimental acute necrotizing pancreatitis. *Front Immunol.* 2021; 12:702764. PMID: 34745090 [**IF₂₀₂₀: 7,561**].
- VI. 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 Jr Z. Mislocalization of CFTR expression in acute pancreatitis and the beneficial effect of VX-661 + VX-770 treatment on disease severity. *J Physiol.* 2021; 599(22):4955-4971. PMID: 34587656 [**IF₂₀₂₀: 5,182**].

Összes közlemény száma:	9
Elsőszerzős közlemények száma:	2
Kumulatív impakt faktor:	39,448
Független idézetek száma (MTMT2):	107
Hirsch index:	6

I. BEVEZETÉS

I.1. A hasnyálmirigy

A hasnyálmirigy exokrin és endokrin mirigyként is működik. Az endokrin rész hormonok (inzulin, glükagon, szomatosztatin stb.) kiválasztásával szabályozza a vércukorszintet. A hasnyálmirigy exokrin része naponta kb. 1,5-2 liter izotóniás folyadékot szekretál, amely emésztőenzimeket és nagy koncentrációjú bikarbonátot (akár 140 mM/l) tartalmaz. Az exokrin hasnyálmirigy két legfontosabb sejt típusa az acináris és a ductális sejtek. Az acinus sejtek emésztő proenzimeket és Cl⁻-ban gazdag izotóniás folyadékot termelnek. A proenzimek a sejtekben lévő zimogén granulumokba vannak csomagolva. A szekréciót követően az enzimek a bél lumenébe jutnak, ahol az enterokináz katalizálja a tripszinogén átalakulását tripszinné. Ezután a tripszin tovább aktiválja a többi tripszinogén molekulát, valamint más proenzimeket. A ductális sejtek HCO₃⁻-ban gazdag izotóniás folyadékot választanak ki, mely megakadályozza a tripszinogén korai aktiválódását a ductusz lumenében, kimossa a ductusz fából származó emésztőenzimeket a duodenumba, és a gyomorsav semlegesítésével optimális pH-t biztosít az emésztőenzimek működéséhez.

I.2. Akut hasnyálmirigy-gyulladás

I.2.1. A betegség előfordulása, kialakulásának okai

Az akut hasnyálmirigy-gyulladás (AP) az egyik leggyakoribb gyomor-bélrendszeri megbetegedés, amely kórházi kezelést igényel és körülbelül 2%-a halálos kimenetelű. Előfordulása növekvő tendenciát mutat, jelenleg Európában 100 000 lakosra vetítve ez évente több, mint 30 beteget jelent.

Az AP fő kiváltó tényezője világszerte (kb. 40%-ban) az epekőveség, melyet elsősorban képzőanyagok elzáródásával és májfunkciós vizsgálatokkal diagnosztizálnak. Az epeúti vagy biliáris AP (BAP) kétszer olyan gyakran fordul elő, mint az alkoholfogyasztás által kiváltott AP (AAP). Az AAP-t rendszeres, túlzott alkoholfogyasztás okozza, mely általában 5 évnél hosszabban tartó, napi 50-100g-nál nagyobb mennyiségű alkoholfogyasztást jelent. A betegség harmadik leggyakoribb ismert oka a hipertrigliceridémia (HTG), ez 11.3 mM-nál magasabb szérumszintű triglicerid koncentráció esetén (kb. 9%) jelent problémát. Az AP ritkább okai közé tartozik az endoszkópos retrográd kolangiopankreatográfia (ERCP), a hypercalcaemia, a pancreas divisum, a tumorok, a genetikai polimorfizmusok és a gyógyszerek. Az ERCP utáni AP (PAP) meghatározására ezidáig nincsenek standard diagnosztikai kritériumok. Leggyakrabban Cotton és munkatársai által ajánlott irányelveket használják, mely szerint PAP akkor diagnosztizálható, ha a beavatkozást követő 24 órán belül AP alakul ki.

I.2.2. A betegség patomechanizmusa

A fent említett tényezők kóros intracelluláris Ca^{2+} jelátvitelt okoznak, amely korai tripszinogén aktivációhoz és a gyulladáshoz vezető folyamatok beindulásához vezet. A betegség kialakulása során aktiválódik a nukleáris kappa B faktor (NF- κ B), csökken a duktális bikarbonát- és folyadéksekreció, csökken az emésztőenzimek szekréciója, csökken a véráramlást a gyomor-bél traktusban, gátódik a cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulator működése, csökken az intracelluláris adenzin-trifoszfát (ATP) mennyisége, megnyílik a mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórust (mPTP), csökken a mitokondriális transzmembrán potenciál, mitokondriális károsodás és endoplazmatikus retikulum stressz jön létre. A mitokondriumok károsodása és az ATP-szint csökkenése az acinus és duktus sejtek pusztulásához vezet.

I.2.3. A betegség diagnózisa és kezelése

Az AP diagnózisához a következő három jellemző közül legalább kettő jelenléte szükséges: hasi fájdalom, a szérum amiláz/lipáz aktivitás legalább háromszoros emelkedése, a kontrasztanyaggal megerősített komputertomográfián vagy ultrahangvizsgálaton észlelt jellegzetes eltérés. Az AP kezelésére a mai napig nem áll rendelkezésünkre specifikus gyógymód. A kezdeti terápia támogató jellegű, amely folyadékpótlást, enterális táplálást és fájdalomcsillapítást jelent. Mivel a fájdalom az AP legjelentősebb tünete, ennek enyhítése elsődleges fontosságú a klinikai környezetben. Sajnos az AP kezelésére vonatkozó legújabb irányelvek nem tartalmaznak egyértelmű ajánlásokat az alkalmazandó fájdalomcsillapítók vonatkozásában. Leggyakrabban a WHO fájdalomkezelési irányelveit alkalmazzák, és a kezelés a nem szteroid gyulladásgátló gyógyszerektől (NSAID) a nagy hatású opioidokig terjed. Az utóbbiakat elsősorban súlyos AP esetén alkalmazzák, ide tartozik pl. a fentanil (FE), buprenorfin (BQ), petidin, pentazocin, morfium (MO). Bár az opioidok a leghatékonyabb fájdalomcsillapítók, az alkalmazásukról - mellékhatásaik (pl. székrekedés, immunszuppresszió) miatt - tudományos vita folyik. A MO használatát humán betegeknek gyakran nem részesítik előnyben az Oddi záróizom görcse miatt, ami ronthatja az AP kimenetelét. Emellett Barlass és munkatársai kimutatták a MO AP-ben való alkalmazásának hátrányait és mellékhatásainak patológiai folyamatait egérmodellben.

I.2.4. A betegség súlyosságának osztályozása

A revidált Atlanta klasszifikációs rendszer (RAC) alapján az AP súlyossága három csoportba osztható: enyhe, középsúlyos és súlyos. Bár az esetek többsége enyhe, önkorlátozó lefolyású, a súlyos AP halálzási aránya elérheti a 30%-ot, ami alátámasztja a megfelelő kezelés megtalálásának égető szükségességét. A szervi elégtelenség (OF) a legfontosabb meghatározó tényező ebben az osztályozási rendszerben. Az enyhe AP-ben szenvedő betegeknek nincs szervi diszfunkció, és általában egy héten belül felépülnek. A közepesen súlyos AP lassabban szűnik meg, és átmeneti szervi elégtelenség (<48 óra) miatt

beavatkozásra lehet szükség. A súlyos AP tartós szervi elégtelenséget (POF) eredményez, amely 48 óránál tovább tart. A többszervi elégtelenséget (MOF) két vagy több szervrendszer elégtelenségeként definiálják, amely lehet átmeneti vagy tartós. Az AP által leggyakrabban érintett három szerv a hasnyálmirigyen kívül a tüdő, a szív és a vese. Az AP betegek körülbelül 25%-ánál súlyos szövődmények alakulnak ki, ezért intenzív osztályra (ICU) kerülnek. A betegek körülbelül 25-30%-ánál fordul elő visszatérő AP, amely az AP ismétlődő epizódjai által meghatározott klinikai állapotot jelenti. Az ismétlődő AP nagy kockázatot jelent a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás vagy hasnyálmirigyrák kialakulására.

Bár számos kockázati tényező létezik, nehéz megjósolni, hogy melyik betegnél alakul ki enyhe, közepesen súlyos vagy súlyos AP. Eddig számos klinikai tanulmány vizsgálta az etiológia hatását az AP progressziójára. Legjobb tudomásunk szerint azonban nem történt kísérlet arra, hogy összefoglalják a klinikai adatokat arról, hogy a különböző etiológiai hátterek miként befolyásolják az AP súlyosságát és lefolyását.

II. CÉLKITŰZÉSEK

Az alapkutatások során munkánk fő célja az volt, hogy felmérjük az analgézia és a mitokondriális védelem hatását az AP lefolyására. Ezekon kívül szerettük volna feltárni az etiológia hatását az AP súlyosságára. A kutatás részleteire vonatkozó céljaink a következők voltak:

- az opioid (FE és MO) adagolás (elő- vagy utókezelés) hatásának vizsgálata az AP lefolyására patkányokban különböző betegségmodellekben
- az új CYA-származék, az N-metil-4-izoleucin-ciklosporin (NIM811) hatásának vizsgálata az AP súlyosságára *in vivo* kísérletek során egerekben
- az AP etiológiai tényezőinek a betegség súlyosságára gyakorolt hatásának feltárása a rendelkezésre álló klinikai adatokon végzett alapos irodalomkutatás és metaanalízis segítségével.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III.1. A kísérletekhez felhasznált állatok

Az opioid kezeléssel kapcsolatos kísérletekhez Wistar patkányokat használtunk, míg az mPTP-t C57Bl/6 J egereken próbáltuk ki. Minden kísérletet az Európai Unió 2010/63/EU irányelvének és a 40/2013 (II.14.) Kormányrendeletnek megfelelően végeztünk. Az állatkísérleteket mind a helyi (Szegedi Tudományegyetem), mind az országos etikai bizottságok (X/3354/2017 és XII/4988/2015) jóváhagyták.

III.2. A kísérletekhez felhasznált vegyületek

A legtöbb vegyszert a Sigma-Aldrich-től (Budapest, Magyarország) vásároltuk, a kivételek esetében ezt külön jeleztük.

III.3. Kísérleti elrendezés

III.3.1. Fájdalomcsillapítás

A nekrotizáló AP-t 3 g/kg L-ornitin-HCl (LO, 30%, pH=7,4) egyszeri intraperitoneális (i.p.) injekciójával, míg az ödémás AP-t 20 µg/kg caerulein (CER, 50 µg/ml) négyszeri, óránkénti i.p. injekciójával idéztük elő patkányban. A kontrollcsoportok LO/CER helyett fiziológiás sóoldatot (PS: 0,9% NaCl) kaptak.

Az FE-t 0,1 és 0,2 mg/kg dózisban adtuk be irodalmi adatok alapján. Az AP-modellekben különböző időzítéseket alkalmaztunk a FE beadására, elő- vagy utókezelésként alkalmaztuk. Az előkezelt csoportokban az első FE-injekciót 1 órával az AP indukciója előtt adtuk be, amit 10 óránként megismételtünk CER-, illetve 11 óránként LO-indukált AP esetén. Utókezelés esetén az állatok az első FE-injekciót 1 órával az AP indukciója után kapták az LO-modellnél, illetve 0,5 órával az AP indukciója után a CER-modell esetében.

Utókezelésnél 5 mg/kg dózisban injektáltuk a MO-t i.p. 8 alkalommal, 2 óránként az LO-modell esetében. Az MO dózisának és időzítésének meghatározása irodalmi adatok alapján történt. Az előkezelés során 9x10 mg/kg MO-t adtuk be i.p., 2 óránként. Amikor az AP-t CER-rel indukáltuk, 4x5 mg/kg MO-t használtunk i.v. 2 óránként, és a fájdalomcsillapítás az AP indukcióval egyidejűleg kezdődött.

III.3.2. A mitokondriális tranzíciós pórus mint potenciális terápiás célpont az akut hasnyálmirigy-gyulladás kezelésére

Egérben enyhe AP-t váltottunk ki 1,75 g/kg etanol és 750 mg/kg palmitinsav i.p. alkalmazásával. A NIM811-et (MedChem Express Europe, Sollentuna, Svédország) szájon át adtuk be 1 órával az AP indukció előtt előkezelés, és 12 órával az AP indukció után utókezelés során 5 és 10 mg/kg dózisban.

III.3.3. A kísérlet befejezése, szövetyűjtés

A kísérletek végén az állatokat pentobarbitál injekcióval altattuk el (85 mg/kg i.p. a patkányoknál és 200 mg/kg az egereknél; Bimeda MTC, Cambridge, Kanada). Az AP LO-val történő kiváltása esetén a patkányokat az AP indukció után 24 órával, míg CER AP esetén a betegség kiváltása után 12 órával áldoztuk fel. Az egereket az AP indukció után 24 órával termináltuk. A vért szívpunkcióval vettük le, majd a hasnyálmirigyet gyorsan eltávolítottuk és jégen megtisztítottuk a zsírtól és nyirokcsomóktól. A hasnyálmirigy-szövet két részét azonnal lefagyasztottuk folyékony nitrogénben és felhasználásig -80 °C-on tároltuk. A hasnyálmirigy harmadik részét 8%-os semleges formaldehid oldatban rögzítettük szövettani elemzéshez. A vérmintákat 2500 RCF-en 15 percig 4 °C-on centrifugáltuk, a szérumokat összegyűjtöttük és felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

III.3.4. Laboratóriumi mérések

A szérumban amiláz aktivitást Fluorostar Optima plate reader segítségével (BMG Labtech, Ortenberg, Németország) mértük kolorimetrikus kinetikus módszerrel a Diagnosticum ZRt.-től (Budapest, Magyarország) vásárolt kereskedelmi kit segítségével. A hasnyálmirigy víztartalmának értékeléséhez kiszámítottuk a hasnyálmirigyek nedves/száraz tömegarányát. A hasnyálmirigy myeloperoxidáz (MPO) aktivitását a Kuebler-féle módszer szerint mértük. Az MPO-aktivitást a Lowry-módszerrel mért teljes fehérjetartalomra normalizáltuk. A hasnyálmirigyben a gyulladáshoz való válasz mértékének meghatározásához az IL-1 β szintjét az R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) kereskedelmi ELISA-kitjével mértük a gyártó által leírtak szerint.

III.3.5. Szöveti vizsgálatok

A formalinnal fixált hasnyálmirigy-szövetekből 3 μ m-es metszeteket készítettünk. Ezt követően a metszeteket hematoxilinnal és eozinnal festettük, majd a mintákat két független, a kísérleti protokollt nem ismerő szakértő elemezte és pontozta. Az ödémát 0-3, a leukocita infiltrációt 0-4, a vakuolizációt 0-3 pont között értékeltük, míg az acinussejtek károsodásának mértékét százalékos arányban határoztuk meg.

III.3.6. A kísérleti adatok statisztikai elemzése

Az adatokat átlag \pm SEM értékben ábrázoltuk. A kísérleteket egy- vagy kétirányú ANOVA-val értékeltük, amelyet Holm-Sidak post hoc teszt követett (SPSS, IBM, Armonk, NY, USA). A $P < 0,05$ értéket statisztikailag szignifikánsnak fogadtuk el.

III.4. Szisztematikus irodalmi áttekintés és metaanalízis

III.4.1. Alkalmazott protokollok

A szisztematikus irodalmi áttekintés és metaanalízis Stroup és munkatársai ajánlásait követte és a Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses guidelines iránymutatásoknak megfelelően készült. Az elemzés a probléma, intervenció, összehasonlító beavatkozás és intervenció és kimenetel (PICO) modelljén alapult a következők szerint: az alkoholos, epeúti, hipertrigliceridémiás és ERCP utáni etiológiájú AP-betegeket hasonlítottunk össze, hogy megvizsgáljuk az etiológia esetleges hatását a betegség kimenetelére. Az elsődleges kimenetel a súlyosság volt, a másodlagos pedig a POF, MOF, ICU-ra való felvétel, kiújulási arány, mortalitás és hasnyálmirigy nekrozis. A metaanalízis protokollját 2018. május 15-én regisztráltuk a PROSPERO adatbázisban. (<https://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/>, ID: CRD42018093574).

III.4.2. Keresési stratégia

Az Embase és a Pubmed elektronikus adatbázisokban 2012. 01. 01. és 2018. 05. 31. 05. között megjelent tanulmányokat vizsgáltuk. Azért ezt a kezdeti dátumot választottuk, mert a RAC-ot, amely a legelfogadottabb és legelterjedtebb osztályozást biztosítja az AP súlyosságának meghatározásához, 2012-ben vezették be. A tézis terjedelmi korlátai miatt csak az AAP, BAP és HTG-AP betegek eredményeit elemezzük. További részletekért lásd a Scientific Reports-ban megjelent cikkünket. A keresés az angol vagy magyar nyelven írt tanulmányokra korlátozódott.

III.4.3. A tanulmányok beválogatásának kritériumai

Minden olyan randomizált vizsgálatot, retrospektív és prospektív kohorszvizsgálatot bevontunk, amelyben felnőtt AP-s betegek vettek részt, és a releváns adatokat a betegség etiológiája szerint kategorizálták. Négy fő etiológiát vettünk figyelembe: alkoholos, HTG, epeúti betegség és poszt-ERCP. Kizártuk azokat a cikkeket, amelyek csak egy etiológiai csoportot vizsgáltak vagy egy etiológiai csoportot hasonlítottak össze egy másik, nem-... nevű csoporttal (pl. alkoholos AP-t a nem alkoholos AP-val). Nem humán vizsgálatok vagy 18 évnél fiatalabb betegek adatait tartalmazó cikkek nem kerültek bevonásra. A tanulmányok közötti kohorszátfedés esetén csak a legfrissebb tanulmányt vettük figyelembe, kivéve, ha egy korábbi tanulmány jobb minőségű volt.

Az AP súlyosságának értékelésénél csak olyan tanulmányok kerültek elemzésre, amelyekben a súlyosságot a RAC szerint határozták meg, mivel ebben az esetben alapvető fontosságú volt, hogy az elemzéshez következetes és egyértelmű meghatározást adjunk. Azokat a cikkeket is kizártuk, amelyek a három súlyossági csoportból csak egyet vagy kettőt elemeztek. Mind a helyi szövődmények, mind az OF-k súlyos állapotokhoz és halálhoz vezethetnek, amelyek a közepesen súlyos és súlyos AP-t egyaránt jellemzik. Ezért tanulmányunkban ezt a két csoportot összevontuk, és "nem enyhe" betegségformáknak nevezzük, melyet az enyhe csoporttal hasonlítottunk össze. A súlyosságtól eltérő kimenetelű esetekben csak a RAC használata nem szerepelt a kritériumokban.

III.4.4. A tanulmányok kiválasztása és az adatok kinyerése

A publikációk címét és absztraktját két szerző egymástól függetlenül vizsgálta meg, hogy azonosítsa azokat a tanulmányokat, amelyek potenciálisan megfelelnek a beválogatási kritériumoknak. A potenciálisan alkalmas tanulmányok teljes szövegét ugyanez a két szerző egymástól függetlenül értékelt, majd szintén egymástól függetlenül összegyűjtötte a tanulmányok jellemzőit (szerző, cím, folyóirat, a tanulmány helyszíne, ideje, a bevont központok száma, a tanulmány típusa, a résztvevők száma) és a kimeneti adatokat (súlyosság, POF, MOF, ICU-ra való felvétel, kiújulási arány, halálozás, hasnyálmirigy nekrozis), amelyeket szabványosított Microsoft Excel táblázatban rögzítettek. A felmerülő nézeteltéréseket másik két szerzővel folytatott megbeszélés során oldották meg.

III.4.5. Adatelemzés

A statisztikai elemzést a Stata 11 SE (StataCorp LLC, College Station, TX, USA) segítségével végeztük. A betegszámokból számított esélyhányadosokat (OR) használtuk a különböző etiológiai csoportok kimenetelének összehasonlítására. Összefoglaló OR becslést, p-értéket és 95%-os konfidenciaintervallumot (CI) számítottunk. A $P < 0,1$ értéket szignifikáns különbségnek tekintettük, ha az összefoglaló OR értéke eltért 1-től. A BAP-ot elsődleges referenciacsoportként határoztuk meg, a többi etiológiát a következő sorrendben rangsoroltuk: AAP, HTG-AP. Összefoglaló OR becslést, p-értéket és 95%-os konfidenciaintervallumot (CI) számoltunk.

A statisztikai heterogenitást I^2 statisztika és chi-négyzet teszt segítségével elemeztük a valószínűségi értékek meghatározásához; a $p < 0,1$ értéket jelentős heterogenitást jelzett. A kis tanulmányok hatását (a legalább 10 cikket tartalmazó összehasonlítások esetében) vizuálisan vizsgáltuk tölcserdiagramon, és Egger-tesztel is megerősítettük. Eredményeink robusztusságának vizsgálatára érzékenységi elemzést végeztünk.

IV. EREDMÉNYEK

IV.1. Állatkísérletek

IV.1.1. A fentanil előkezelés hatása az akut hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságára

A kontrollcsoportban szereplő állatok hasnyálmirigyei normál morfológiát mutattak, és a FE-t önmagában alkalmazva nem okozott szerkezeti változást hasnyálmirigyben. AP esetén a nagyobb dózisu (3x0,2 mg/kg) FE alkalmazásakor a szöveti nekrozis mértéke szignifikánsan megnőtt, míg a leukocita infiltráció mértéke magasabb volt a 3x0,1 mg/kg FE+AP csoportban, mint a FE nélküli AP csoportban. A FE előkezelés nem okozott változást a hasnyálmirigy víztartalmában az AP csoportokban. A 3x0,1 mg/kg FE jelentősen megnövelte a szérum amiláz aktivitást, míg az pankreász MPO aktivitása a 3x0,2 mg/kg FE dózis hatására emelkedett meg az AP csoportban. A hasnyálmirigy IL-1 β koncentrációja szignifikánsan csökkent a 3x0,1 mg/kg FE kezelés hatására az AP csoportban.

A CER i.p. alkalmazása enyhe AP-t idézett elő, és a kontrollcsoporthoz képest növelte a hasnyálmirigy vakuolizációt, leukocita infiltrációt és az ödéma mértékét. A FE előkezelés nem okozott változást az AP progressziója során a szövettani paraméterekben vagy a víztartalomban. A CER-indukálta AP emelkedett szérum amiláz-aktivitást és hasnyálmirigy IL-1 β -tartalmat eredményezett, míg az MPO-aktivitást nem befolyásolta jelentősen. A FE előkezelés nem változtatta meg szignifikánsan a szérum amiláz aktivitást vagy a pankreatikus IL-1 β szintet az AP csoportokban.

IV.1.2. A fentanil utókezelés hatása az akut hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságára

A FE előkezeléssel ellentétben az utókezelés mindkét dózisa csökkentette az LO-indukálta AP által

okozott szövettani változások (leukocita infiltráció, hasnyálmirigy nekrozis) mértékét. Ezzel szemben a FE nem változtatta meg a hasnyálmirigy víztartalmát az AP csoportokban. A szérumban az amiláz és a hasnyálmirigy MPO aktivitása mindkét FE dózis hatására csökkent AP esetén. A hasnyálmirigy IL-1 β szintje csak az LO + 3 x 0,2 mg/kg FE csoport esetében csökkent szignifikánsan.

A CER adminisztráció növelte a hasnyálmirigy vakuolizációt, a leukocita infiltrációt és a hasnyálmirigy víztartalom mértékét, ami enyhe ödémás AP-t okozott. A FE utókezelés nem befolyásolta a szövettani paramétereket (szöveti nekrozis, leukocita-infiltráció), a hasnyálmirigy víztartalmát, illetve az AP során megemelkedett amiláz- és MPO-aktivitást. Érdekes módon a kisebb dózisú FE (0,1 mg/kg) tovább növelte az AP-ben megemelkedett pankréász IL-1 β értékét, míg a nagyobb dózisú FE hatástalannak bizonyult.

IV.1.3. A morfin adminisztráció nem befolyásolja az akut hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságát

A MO önmagában nem okozott szerkezeti változást a patkányok hasnyálmirigy szöveteiben a vizsgált dózisokban, a szövettani metszeteken gyulladásos sejt infiltráció nem volt megfigyelhető. Az LO-indukálta AP során az AP csoportokban sem változtatta meg szignifikánsan a szövettani paramétereket (szöveti nekrozis, leukocita infiltráció), a hasnyálmirigy víztartalmát, a szérumban az amiláz és a hasnyálmirigy MPO aktivitás értékeit.

A CER-indukálta ödémás AP-ben az MO szignifikánsan csökkentette a vakuolizációt, de nem volt hatással a leukocita-infiltrációra, a hasnyálmirigy víztartalomra, a szérumban az amiláz- és pankréátikus MPO-aktivitásra.

IV.1.4. A NIM811 védő hatással rendelkezik az alkohol+zsírsav által kiváltott akut hasnyálmirigy-gyulladással szemben egerekben

Az alkohol+zsírsav kezelés szignifikánsan fokozta a szérumban az amiláz aktivitását, valamint a pankréász nekrozis, az ödéma és a leukocita infiltráció mértékét az abszolút kontrollcsoportéhoz képest. A nagyobb dózisú NIM811 előkezelés (10 mg/kg) szignifikánsan csökkentette az általunk vizsgált AP legtöbb jelét (emelkedett szérumban az amiláz aktivitás, pankréátikus nekrozis és leukocita infiltráció), míg az ödémát nem befolyásolta. A NIM811 utókezelés esetén az alacsonyabb dózis (5 mg/kg) csökkentette a hasnyálmirigy leukocita-infiltrációt és az ödéma mértékét, míg a szérumban az amiláz aktivitás és a pankréász nekrozis szintjét jelentősen nem befolyásolta.

IV.2. Metaanalízis

IV.2.1. A tanulmányok kiválasztása

A keresési stratégia 11 288 találatot azonosított. A duplikációk eltávolítása után 7 733 cikk maradt. Ezek közül a cím vagy az absztrakt alapján végzett szűrés 456 bejegyzést mutatott relevánsnak a vizsgálati kérdés szempontjából. A tanulmányok teljes szövegének értékelése után 329-et ki kellett zárni különböző

okok miatt. Végül 127 publikáció felelt meg az előzetesen felállított kritériumoknak.

IV.2.2. A felhasznált tanulmányok általános jellemzői

A bevont kohorszvizsgálatok többsége (127-ből 108) a 2010-es években gyűjtött adatokat. Metaanalízisünk 102 egy és 23 multicentrikus tanulmányt tartalmaz. Két esetben nem álltak rendelkezésre releváns adatok a bevont központok számát illetően. A közlemények elemszáma 11 és 1,165,777 között mozgott. Csak a négyféle AP (AAP, BAP, HTG-AP, PAP) adatait elemezték. A dolgozat korlátai miatt a bevont tanulmányok részletes jellemzőit vagy a minőségértékelést itt nem közöljük. A részletek a Scientific Reports folyóiratban megjelent publikációinkban olvashatók.

IV.2.3. Klinikai eredmények

IV.2.3.1. Az akut hasnyálmirigy-gyulladás súlyossága

A HTG az esetek jelentősen nagyobb számában váltott ki nem enyhe AP-t, mint a többi etiológiai tényező. Az alkoholos etiológia szignifikánsan növelte az AP súlyosságát a biliáris eseményekhez képest. Heterogenitást találtunk az AAP - BAP összehasonlításban. A kis tanulmányok hatása nem volt kimutatható az AAP - BAP, AAP - HTG-AP, BAP - HTG-AP, BAP - HTG-AP összehasonlításokban.

IV.2.3.2. Szervi elégtelenség és intenzív osztályra való felvétel

A POF és a MOF előfordulása tekintetében nem volt szignifikáns különbség az AAP és a BAP között. Az ICU-ra való felvétel gyakorisága is hasonló volt az AAP és BAP betegeknel. Heterogenitást találtunk az ICU-ra való felvétel esetében.

IV.2.3.3. A rekurrens betegség aránya

A rekurrens AP aránya szignifikánsan magasabb volt az AAP és HTG-AP betegeknel is a BAP betegekhez képest. Az AP azonban nem fordult elő gyakrabban alkoholos etiológia miatt, mint HTG vagy poszt-ERCP miatt. Heterogenitást találtunk minden összehasonlításban, kivéve a HTG-AP és az AAP közötti összehasonlítás esetén. A kis tanulmány hatás jelei nem volt megfigyelhető az AAP és a BAP csoportok kiújulási arányának összehasonlítása során.

IV.2.3.2. Mortalitás és hasnyálmirigy nekrozis

A halálozási arány szignifikánsan magasabbnak bizonyult HTG-AP-ben, mint AAP-ben, míg a többi betegcsoport között nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget. Az AAP és a BAP összehasonlításában a betegek nagy része egy tanulmányból származott, amely 1 165 777 alanyt vont be a vizsgálatba (12,76%-os súlyt képezve). Az érzékenységi elemzés azonban azt mutatta, hogy az adott

tanulmány kizárásával az eredmények hasonlóak maradtak.

A hasnyálmirigy nekrózis gyakrabban fordult elő az AAP, mint a BAP betegeknel. A nekrózis tekintetében semmilyen más összehasonlításban nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget. A halálozási arány összehasonlításakor heterogenitást találtunk a BAP és a HTG-AP, az AAP és a BAP között, valamint a nekrózis esetében az AAP és a BAP csoportok között.

V. MEGBESZÉLÉS

V.1. Állatkísérletes vizsgálatok

V.1.1. Az opioidok hatása az akut hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságára

Az opioidok használata széles körben elterjedt az AP során fellépő fájdalom csillapítására. Feltételezések szerint ezek a fájdalomcsillapítók (mint pl. a MO) befolyásolhatják az AP progresszióját. Ezért átfogóan megvizsgáltuk a FE hatását a kísérleti AP súlyosságára, kiegészítve a MO hatásainak vizsgálatával. Fontos megjegyezni, hogy a méréseket akkor végeztük, amikor a kísérleti AP elérte a maximális súlyosságát.

A FE előkezelés jelentősen növelte az LO által kiváltott nekrotizáló AP súlyosságát, míg nem volt hatása a CER által kiváltott ödémás AP-re. Érdekes módon a klinikailag relevánsabb FE utókezelés vagy csökkentette, vagy nem volt hatással az AP súlyosságának paramétereire a különböző állapotmodellekben. A MO elő- vagy utókezelés nem befolyásolta a betegség súlyosságát LO által kiváltott nekrotizáló AP esetén. A MO és a CER egyidejű adása sem volt figyelemre méltó hatással a betegség progressziójára, kivéve a vakuolizációt, amelyet a MO csökkentett.

Az opioidok hatásukat elsősorban a mu-, kapa- vagy delta-opioid receptorokon keresztül fejtik ki, melyeket főként neuronális vagy immunsejtek expresszálnak. A hatások az egyes receptorokhoz való affinitásuktól vagy specifitásuktól függően különbözhetnek. Publikációk kimutatták, hogy a MO immunszuppresszív tulajdonságokkal rendelkezik, mivel teljes mu-receptor agonista. A MO-kezelés gátolta a citokintermelést, az NK sejtek aktivitását, a mitogénekre adott sejtválaszokat, az antitesttermelést, a sejtnövekedést és csökkentette a fagocitikus aktivitást. A FE, a MO 80-szor erősebb analógja, a MO-hoz hasonlóan teljes mu-receptor agonista, így szintén képes az immunrendszer elnyomására. A MO és a FE az Oddi-szfinkter görcsét is okozhatja, ami tovább súlyosbíthatja az AP lefolyását.

Kísérleteinkben csak a FE előkezelés növelte az AP súlyosságát, míg az utókezelés kedvezően hatott az AP kimenetelére. A káros hatást valószínűleg a FE korai immunszuppressziója okozhatta. A hosszabb távú következményeket nem vizsgáltuk. Az összes klinikailag alkalmazott opioid esetében (beleértve a FE-t és a MO-t is) a fent említett hatásokat figyelembe kell venni és jövőbeli tanulmányokban vizsgálat tárgyává tenni. Emellett az opioidok beadásának időzítése kritikus lehet, különösen a FE esetében.

A klinikai gyakorlatban nincsenek iránymutatások arra vonatkozóan, hogy melyik opioid a legjobb AP esetén. A hatékony fájdalomcsillapás azonban szükséges a betegség kezelésében. A fent tárgyalt

eredmények fényében az utókezelések (pl. FE, MO) nem növelik a betegség súlyosságát, de egyes opioidok (pl. MO) befolyásolhatják az AP-ból való felépülés folyamatát, ezért ennek vizsgálatára további tanulmányokra van szükség.

Eredményeink azt mutatták, hogy az FE utókezelés a fájdalomcsillapítás mellett ígéretes hatásokkal rendelkezik, ezért alkalmazása az AP súlyosságára is jótékony hatással lehet. Összességében kutatásunk hozzájárul az AP során alkalmazott opioidok hatásának jobb megértéséhez, és segíthet a további klinikai vizsgálatok tervezésében, amelyek szükségesek ahhoz, hogy kiválasszuk a legmegfelelőbb opiátot ennek a potenciálisan halálos betegségnek a kezelésére.

Bár a fájdalomcsillapítókkal való előkezelés AP-ben klinikailag kevésbé releváns, de endoszkópos retrográd kolangiopankreatográfia (ERCP) esetén a NSAID-ek (pl. indometacin vagy diklofenák) rektális adagolása javallott, melyek csökkentik az ERCP utáni AP kialakulását. Ez esetben az opiátok körültekintő alkalmazása javasolt.

V.1.2. A mitokondriális tranzíciós pórus mint potenciális terápiás célpont az akut hasnyálmirigy-gyulladásban

A mitokondriális károsodás az egyik legfontosabb patofiziológiai esemény az AP korai fázisában. Az elmúlt évtizedben az mPTP genetikai és farmakológiai gátlása egyaránt csökkentette az epesav vagy alkohol+zsírsav által kiváltott acináris sejtkárosodást, és enyhítette az AP súlyosságát. Számos mPTP-gátlóval kísérleteztek, de egyik sem bizonyult előnyösnek. Ez alól kivétel a NIM811, mely több betegségben is jótékony hatást fejtett ki, káros mellékhatások nélkül. A NIM811 5 vagy 10 mg/kg dózisu orális alkalmazása jelentősen enyhítette a kísérletes AP súlyosságát. Érdekes azonban, hogy a NIM811 nagyobb dózisa elő-, míg a kisebb dózis utókezelésben bizonyult hatásosnak. A mögöttes mechanizmusok feltáráshoz további vizsgálatokra van szükség. Eredményeink azt sugallják, hogy a mitokondriális funkció és a sejtek energiájának helyreállítása kulcsfontosságú az AP kezelése során. Csapatunk erősítette meg először, hogy a NIM811 alkalmas az AP klinikai vizsgálatára. Fázis 2 klinikai vizsgálatok indításával tesztelhetnék ennek az ígéretes gyógyszerjelöltnek a humán gyógyászatban való hasznosságát.

V.2. Metaanalízis

Ez az első részletes metaanalízis, amely a különböző etiológiák (túlzott alkoholfogyasztás, epékövesség, HTG, poszt-ERCP) és az AP lefolyása közötti kapcsolatot vizsgálta. Vizsgálatunkból kiderült, hogy a súlyos és közepesen súlyos (nem enyhe) kórformák prevalenciája a HTG-AP esetében volt a legmagasabb, amelyet az AAP, majd a BAP és PAP követett. A bevont cikkek és betegek nagy száma miatt eredményeink a súlyossági kimenetel esetében erős bizonyítékokkal rendelkeznek. Ezen eredmények összhangban vannak korábbi megfigyeléseinkkel, illetve Wang és munkatársainak adataival. Az egyik lehetséges patomechanizmus az, hogy a telítetlen zsírsavak által közvetített lipotoxicitás hozzájárul a pankreász nekrozishoz, az OF-hez (pl. tüdő, szív- és érrendszeri) és a halálozáshoz. Kísérletes vizsgálatok is kimutatták, hogy a HTG fokozza az AP súlyosságát. A zsírsav adminisztráció megemelte

az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt a hasnyálmirigy acinus sejtjeiben és károsította a mitokondriális működést. A HTG-AP-t gyakran kíséri egy vagy több másodlagos tényező (alkoholizmus, gyógyszerek, kontrollálatlan cukorbetegség, fizikai inaktivitás), amelyek tovább súlyosbíthatják a betegséget.

Az AP pontos etiológiájának meghatározása egyes esetekben kihívást jelenthet. Az alkohol például nemcsak az AP független kockázati tényezőjeként ismert, hanem - mint már említettük - a szérum TG-koncentrációját is növelheti. Ezenkívül a TG-koncentráció enyhe vagy mérsékelt emelkedése megfigyelhető az AP korai szakaszában, függetlenül az etiológiától. Mivel a TG-koncentráció az AP diagnózisát követően gyorsan csökkenhet éhomi állapotban, a TG-koncentráció mérése a felvételnél (vagy röviddel azt követően) döntő fontosságú.

Az események száma viszonylag magas volt a súlyosság és részben a halálozás és a rekurrencia arány esetében. Az egyéb kimenetek elemzésébe kisebb számú eseményt lehetett bevonni. Az alacsony eseményszámok hátrányosan befolyásolhatják az eredmények megbízhatóságát. A fent említett tanulmányok alapján az összes súlyossági összehasonlítás, a halálozási és a kiújulási arányok eredményei az AAP-BAP összehasonlításban erősen megbízhatóak. A többi számítás megbízhatósága jellemzően alacsonyabb, de összhangban van az AP súlyosság vizsgálatok kapott eredményekkel.

VI. AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEGZÉSE ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A FE utókezelés jótékony hatásának bizonyult kísérletes AP esetén. Eredményeink arra utalnak, hogy az opioid kezelés típusa, adagolása, beadási módja és időzítése meghatározhatja az AP kimenetelére gyakorolt hatását.

Kísérleteink bebizonyították, hogy a NIM811 alkalmazása határozottan előnyös kísérletes AP-ben. A vegyületnek nem voltak káros mellékhatásai.

Összefüggést találtunk az etiológia és az AP kialakulása és lefolyása között. A HTG jelenti a legnagyobb kockázatot a nem enyhe (közepesen súlyos és súlyos) AP kialakulására, amelyet az AAP követ. A legkevésbé súlyos betegségformákat a BAP és a PAP esetében figyeltük meg. A betegség okának időben történő meghatározása elengedhetetlen a legmegfelelőbb terápia kiválasztásához. Az eredmények alapján nagyobb hangsúlyt kell fektetni az etiológia felvételnél meghatározására, különösen a HTG-AP esetében.

VII. TÁMOGATÓK

Doktori munkámat 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), illetve a Magyar Tudományos Akadémia (LP2014-10/2014) támogatta.

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik segítettek és inspiráltak doktori tanulmányaim

során. Legőszintébb köszönetemet szeretném kifejezni mentoraimnak, Prof. Rakonczay Zoltánnak és Dr. Kiss Lórándnak (Szegedi Tudományegyetem - SZTE, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar - SZAOK Kórélettani Intézet). Támogatásuk nélkül ez a doktori értekezés nem jöhetett volna létre.

Szeretnék köszönetet mondani továbbá Prof. Hegyi Péternek, a Pécsi Tudományegyetem Transzlációs Medicina Intézet vezetőjének, Dr. Szentesi Andreának (Pécsi Tudományegyetem Transzlációs Medicina Intézet), Dr. Venglovecz Viktóriának (SZTE SZAOK, Farmakológiai és Farmakoterápiái Intézet), Dr. Maléth Józsefnek és Dr. Pallagi Petrának (SZTE SZAOK, Belgyógyászati Klinika; MTA-SZTE, Momentum Epithelsejt Szigнал és Szekréció Kutatócsoport) az útmutatásért és támogatásért.

Nagyon hálás vagyok együttműködő partnereinknek, Prof. Benyhe Sándornak, Dr. Ducza Eszternek és Prof. Horváth Gyöngyinek az egyes kísérletek elvégzésében nyújtott kiváló útmutatásukért.

Köszönetet szeretnék mondani továbbá Prof. Szabó Gyulának, a SZTE SZAOK Kórélettani Intézet korábbi vezetőjének, Prof. Lengyel Csabának és Prof. Ábrahám Györgynek, az SZTE SZAOK Belgyógyászati Klinika jelenlegi és korábbi vezetőjének, akik lehetőséget biztosítottak számomra, hogy tanszékükön dolgozhassak.

Köszönetet szeretnék mondani továbbá kollégáimnak és barátaimnak, Dr. Balla Zsoltnak, Fűr Gabriellának, Dr. Tóth Emesének, Dr. Kui Balázsnak, Dr. Kormányos Sára Eszternek, Dr. Orján Márk Eriknek, Váczi Sándornak, Dr. Fanczal Júliának, Dr. Végh Eszter Teréznek, Dr. Jászberényi Miklósnak, Dr. Mezei-Leprán Zsófia, Dr. Bagosi Zsolt, Dr. Pataki Imre, Dr. Csabafi Krisztina, Dr. Szakács Júlia, Dr. Ibos Katalin, Dr. Gecse Árpád a sok segítségért, biztatásért és a közös élményekért.

Ez a dolgozat nem jöhetett volna létre Pritz Tünde, Fritz Rea, Árva Miklósné, Magyarne Pálfi Edit, Fuksz† Zoltánné, Dr. Zsilák-Urbán Mihály, Tóth Zsolt, Laurinyecz Magdolna, Vass Nóra Ildikó, Kiss Gusztáv, Pál Ágnes, Romhányi Veronika, Ancsányi Kitti és Dallos-Szilágyi Erzsébet segítségével és támogatása nélkül.

Végül, de nem utolsósorban, köszönettel tartozom szüleimnek (Bálintné Felső Rózsa és Bálint István), vőlegényemnek, Joó Zoltánnak és lányomnak, Lénának, minden szeretetükért, támogatásukért, véget nem érő türelmükért és bátorításukért. Ezt a munkát nekik ajánlom.

” Mindig lehetetlennek tűnik, amíg meg nem valósul.” — Nelson Mandela