

A KÍSÉRLETES AKUT HASNYÁLMIRIGY-GYULLADÁS KIMENETELÉNEK JAVÍTÁSA: A KYNURÉNSAV, AZ SZR-72 ÉS A FÁJDALOMCSILLAPÍTÁS HATÁSA

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei



Kormányos Eszter Sára M.D.

Témavezetők:

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

Kiss Lóránd Ph.D.

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Kórélettani Intézet

Belgyógyászati Klinika

Szegedi Tudományegyetem

Szeged, Magyarország

2022

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés tárgyát képező közlemények

- I. 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. Kynurenic acid and its analogue SZR-72 ameliorate the severity of experimental acute necrotizing pancreatitis. *Front Immunol.* 2021 Oct 21;12:702764. doi: 10.3389/fimmu.2021.702764. [IF₂₀₂₁: 8,786], Q1
*Megosztott elsőszervezők
- II. 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. Fentanyl but not morphine or buprenorphine improves the severity of necrotizing acute pancreatitis in rats. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 21;23(3):1192. doi: 10.3390/ijms23031192. [IF₂₀₂₁: 6,208], Q1

Közlemények, melyek nem képezik az értekezés tárgyát

- I. 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. Mislocalization of CFTR expression in acute pancreatitis and the beneficial effect of VX-661 + VX-770 treatment on disease severity. *J Physiol.* 2021 Nov;599(22):4955-4971. doi: 10.1113/JP281765. [IF₂₀₂₁: 6,228], Q1
- 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 Feb 17;10(2):e0117588. doi: 10.1371/journal.pone.0117588. [IF₂₀₁₅: 3.057], Q1

Szcientometriai adatok

<https://m2.mtmt.hu/gui2/?type=authors&mode=browse&sel=10045525&view=pubTable>

Közlemények száma	4
Első szerzős közlemények	1
Összes impakt faktor	24,279
Független idézettség	36

BEVEZETÉS

A hasnyálmirigy élettana

A hasnyálmirigy a gasztrointesztinális traktus heterokrin mirigye, melynek exokrin parenchimáját acináris sejtek és duktális epitélsejtek alkotják. Hasnyálmirigynedvet termel, amely az acinusok által szintetizált inaktív emésztőenzimekből és a duktális sejtekből szekretált bikarbonátban gazdag folyadékból áll. A duodenumba ürülő napi 1,5-2 liter folyadék kimossa a duktális rendszerből a potenciálisan veszélyes emésztőenzimeket, hogy megakadályozza azok idő előtti aktiválódását. A hasnyál magas HCO_3^- tartalma optimális pH-t biztosít a béllumenben az emésztőenzimek számára. Lényeges, hogy a tripszin, kimotripszin, amiláz és lipáz csak a nyombélbe jutva váljanak aktívvá. A lumenbe kerülve az enteropeptidáz hasítja a tripszinogént ezáltal aktiválva tripszinné, elindítva az aktivációs kaszkádot.

Az akut hasnyálmirigy-gyulladás

Definíció, epidemiológia, osztályozás és etiológia

Az akut hasnyálmirigy-gyulladás a hasnyálmirigy hirtelen fellépő, steril gyulladása. Éves incidenciája kb. 10-45/100.000 lakos, és ez a fejlett országokban a mai napig enyhén emelkedő tendenciát mutat.

Az akut pankreatitisz súlyosság alapján 3 csoportba sorolható: enyhe, közepesen súlyos és súlyos. Az esetek 75%-a enyhe, 15%-a közepesen súlyos és 10%-a súlyos. A súlyos hasnyálmirigy-gyulladás mortalitása elérheti a 30%-ot is.

Az akut hasnyálmirigy-gyulladás etiológiai tényezői négy csoportba oszthatók. 1: toxikus és metabolikus rendellenességek (alkoholfogyasztás, hiperlipidémia, hiperkalcémia). 2: mechanikus okok (epekövek, papilla diszfunkció, veleszületett rendellenességek, trauma). 3: genetikai okok, például a tripszinogén gén mutációi. 4: „egyéb” (fertőzések, autoimmun betegségek, ismeretlen) okok. Az esetek mintegy 40%-ában epéuti elzáródás figyelhető meg. Az alkohol abúzus 30%-ban okozója a betegségnek.

Patogenezis

A betegség pontos patogenezise továbbra is tisztázatlan. Az akut pankreatitisz korai szakaszának már számos lépését ismerjük: patológiás intracelluláris Ca^{2+} koncentráció, amely korai tripszinogén és nukleáris faktor-kappa B (NF- κ B) aktivációt okoz; mitokondriális diszfunkció és károsodás; reaktív oxigénradikálok (ROS) felszabadulása; az emésztőenzimek szekréciójának gátlása és az intracelluláris adenosin-trifoszfát (ATP) szintjének csökkenése; csökkent duktális bikarbonát- és folyadékszekréció; károsodott autofágia; a hasnyálmirigy duktuszok cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátorának (CFTR) diszfunkciója és a csökkent gasztrointesztinális véráramlás. Ezen események némelyike tumor nekrozis faktor- α (TNF- α), citokinek [pl. interleukin 1 β (IL-1 β)] és kemokinek felszabadulásához vezet, amelyek részt vesznek a leukociták toborzásában. A neutrofil granulociták az első immunsejtek, amelyek elérik a hasnyálmirigy parenchimáját. Ezek a sejtek tovább aktiválják a tripszinogént az acináris sejtekben, gyulladást okozó citokineket és kemokineket szabadítanak fel, myeloperoxidázt (MPO) és ROS-t (pl. H_2O_2 -t) szekretálnak, amelyek mindegyike hozzájárul az akut hasnyálmirigy-gyulladás súlyosbodásához.

Számos védőfaktor és mechanizmus felelős azért, hogy az enzimek inaktív formában maradjanak a mirigyben, vagy a már aktivált enzimek kimosódjanak: α 1-antitripszin, α 2-macroglobulin, szerinproteáz-inhibitor Kazal 1-es típus (SPINK1), az idő előtt aktiválódott tripszin autolízise stb. Amint azonban az enzimaktiváció mértéke meghaladja a védekező mechanizmusok kapacitását, a folyamat az önmegsejtés irányába tolódik el. Emellett a tripszin patofiziológiai szerepet is játszik a komplementrendszer, a fibrinolízis és a véralvadás aktiválásában, elősegítve ezzel a betegségnek a hasnyálmirigyen kívülre történő terjedését. Az erek endotélje is károsodik, ami romló mikrokeringéshez és fokozott permeabilitáshoz vezet. Ez lehetővé teszi a szabad gyökök, pro-inflammatorikus citokinek és proteolitikus enzimek felszabadulását, ami trombózishoz, szöveti vérzéshez és végül nekrozishoz vezet. A heveny hasnyálmirigy-gyulladásban szenvedő betegeknél a lokálisan jelenlévő citokinek és enzimek a keringésbe kerülhetnek, szisztémás gyulladásos válaszreakciókat okozva. Ez végül lehetővé teszi, hogy a hasnyálmirigy gyulladása átlépje eredeti szerve határait, és akut respirációs distressz szindrómát, veseelégtelenséget, anyagcsere zavarokat, sokkolt és többszervi elégtelenséget okozzon. Végül, ha ez még nem lenne elég, a bélnyálkahártya barrier funkciójának károsodása lehetőséget teremt az elhalt hasnyálmirigy szövet felülfertőződésére.

De hogyan lehet megjósolni, hogy egy beteg hasnyálmirigy-gyulladása nem marad enyhe, hanem súlyossá fog válni? Be tudunk-e avatkozni valahol az események láncolatába, hogy megmentsük a beteg életét? A válasz az akut pankreatitisz során lezajló sejtszintű események részletes megértésében és egy hatékony gyógymód kifejlesztésében rejlik.

Kezelés és fájdalomcsillapítás

Sajnos az akut hasnyálmirigy-gyulladásra még mindig nincs specifikus gyógymód, és túlnyomórészt ma is konzervatív terápiát alkalmaznak. A szóba jöhető kezelések a betegség szövődményeitől függenek. A leggyakoribb tünet, amely szinte minden beteget érint, a különböző intenzitású hasi fájdalom. Enyhítésére intravenásan leggyakrabban nem-szteroid gyulladáscsökkentőket és opioidokat alkalmaznak. A morfinszármazékokat általában kerüljük, mivel azok az Oddi-szfinkter spazmúsát okozhatják. A nehezen tolerálható fájdalommal küzdő betegeknél megfontolandó a mellkasi epidurális analgészia. E módszer előnye nemcsak a fájdalom hatékony csillapítása, hanem a gyomor-bél rendszer perfúziójának javítása is. Mindezen ismeretek ellenére még mindig nincs széles körben elfogadott ajánlás a fájdalomcsillapításra, és az sem egyértelmű, hogy az milyen hatással van az akut hasnyálmirigy-gyulladás progressziójára.

Kísérleti eredményeink és az irodalmi adatok alapján úgy döntöttünk, hogy érdemes alaposabban megvizsgálni a fájdalomcsillapítás hatását experimentális akut pankreatitiszben. Munkánk során különböző analgetikumokat, köztük buprenorfint (BQ) teszteltünk, remélve, hogy jobb betekintést nyerhetünk a hasnyálmirigy-gyulladásra a fájdalomcsillapítás aspektusából.

A kinurénsav (KYNA)

A triptofán esszenciális aminosav, amely csak táplálékkal vihető a szervezetbe. Az L-triptofán nagy része (95%-a) a kinurenin-útvonalon keresztül metabolizálódik. Első lépésként az L-triptofánt az indoleamin-deoxigenáz vagy a triptofán-deoxigenáz alakítja N-formil-L-kinureninné. Mindkét enzimet

fokozza a gyulladás és a stressz [IL-1 β , interferon- γ (IFN- γ), TNF- α , kortizol]. A triptofán metabolizmusa ezután két lehetséges útvonalon folytatható: (1) a kinurenin-aminotranszferázok az L-kinurenint KYNA-vá alakítják, vagy (2) az L-kinurenin 3-hidroxi-L-kinureninné (3-HK), majd több lépésben nikotinamid-adenin-dinukleotiddá (NAD⁺) bomlik.

A KYNA három ionotróp glutamátreceptor antagonistájaként hat: N-metil-D-aszpartát (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propionsav (AMPA) és kainát. Ezeknek a receptoroknak az exokrin hasnyálmirigyben való eloszlása ismeretlen. Bár a KYNA-t általában a központi idegrendszerrel kapcsolatban említik, a gasztrointesztinális rendszerben, beleértve a hasnyálmirigyndvet is, szintén nagy mennyiségben fordul elő. Továbbá a KYNA a G-protein kapcsolt receptor 35 (GPR35) ligandja, amelyről megállapították, hogy túlnyomórészt a gasztrointesztinális traktusban és az immunsejtekben fejeződik ki. Bár a GPR35 részletes biokémiája és élettani szerepe még nem teljesen ismert, úgy tűnik, hogy fontos szerepet játszik immunológiai folyamatokban és a bélhomeosztázis fenntartásában.

A KYNA betegségekben betöltött szerepe

A triptofán-kinurenin-útvonal metabolitjai fontos résztvevői a sejtanyagcsere folyamatoknak, különösen a neuronokban. Számos hatásuk ismert mind a veleszületett, mind az adaptív immunreakciókban. A KYNA az NMDA-receptor (NMDAR) antagonistájaként neuroprotektív hatással bír. Csökkenti az iszkémia/reperfúzió okozta retinális ganglionsejt pusztulást. A KYNA szorosan összefügg a bélgyulladással is. Az irritábilis bél szindrómában szenvedő betegeknél emelkedett nyálkahártya- és csökkent plazma KYNA-szintet mutattak ki. Fontos továbbá megemlíteni, hogy az NMDAR antagonisták a fájdalomcsillapítók egy külön, a klinikumban is használt csoportját alkotják.

A közelmúltban több tanulmány is vizsgálta a KYNA szintetikus származékát, az SZR-72-t. A vér-ágy gát a KYNA számára impermeabilis, de az SZR-72 átjut rajta. Az SZR-72 hatékonyan szabályozza a mitokondriális légzést, míg a KYNA képes helyreállítani a mikrokeringést szepszisben. A KYNA és az SZR-72 képes kontrollálni a mononukleáris sejtek és neutrofil granulociták által kibocsátott pro-inflammatorikus faktorokat, pl. a TNF α -t, a high mobility group box fehérje 1-et és a humán neutrofil peptid 1-3-at. A KYNA és az SZR-72 az NMDAR antagonizmusán keresztül javítja a bél hipermotilitását és csökkenti a gyulladással kapcsolatos paramétereket colitiszes patkányokban.

A kynurenin-útvonal metabolitjai és zavarai befolyásolják az akut pankreatitisz súlyosságát is. A 3-HK szabadgyököket generál és citotoxikus hatású, míg a KYNA gátolja a gyulladást, megakadályozza a lipidperoxidációt és a ROS-termelést. Akut hasnyálmirigy-gyulladásban szenvedő betegeknél a 3-HK koncentrációja megnő, és plazmaszintje korrelál a szisztémás gyulladás progressziójával és a pankreatitisz súlyosságával. A kinurenin-3-monooxigenáz gátlók csökkentik a 3-HK termelődését. Egy ilyen inhibitor alkalmazása megakadályozta a többszervi elégtelenséget rágsálóknál kísérletes akut pankreatitiszben. A 3-HK-val ellentétben az endogén KYNA vagy annak szintetikus származéka, az SZR-72 hatása az akut hasnyálmirigy-gyulladásra nem ismert.

A GPR35 receptort is meg kell említeni, mivel a KYNA a legpotensebb endogén ligandja, és szerepét számos folyamatban leírták. Összefüggésbe hozható a 2-es típusú cukorbetegséggel, a colitis ulcerosával, valamint szív- és érrendszeri betegségekkel. Továbbá a KYNA a GPR35 aktiválásával stimulálja az

adipociták energiafelhasználását, és így serkenti a lipidanyagcsere és az anti-inflammatoros gének expresszióját. Ezen túlmenően a KYNA a GPR35-ön keresztül fájdalomcsillapító hatással is rendelkezik. Mint láthatjuk, bár egyre többet tudunk a kinurenin-út vonal molekuláiról és receptorairól, az akut pankreatitiszben betöltött szerepük még felfedezésre vár.

CÉLKITŰZÉSEK

Mivel az akut hasnyálmirigy-gyulladásnak még mindig nincs megfelelő gyógymódja, kísérleteink célja az volt, hogy kiindulópontot keressünk egy lehetséges jövőbeli terápiához, és egyúttal közelebb kerüljünk a betegség kialakulásának és progressziójának megértéséhez.

1. Mivel több tanulmány is igazolta a KYNA és származéka, az SZR-72 gyulladáscsökkentő tulajdonságát számos betegségben, ezért érdemesnek tartottuk megvizsgálni hatásukat az akut pankreatitisz kimenetelére.

Részletesebben, célunk volt meghatározni:

- a KYNA/SZR-72 hatását kísérletes akut hasnyálmirigy-gyulladásra és a hasnyálmirigy acinus sejteire *in vitro*
 - hogy a KYNA és az SZR-72 az NMDAR-on keresztül fejti-e ki a hatását
2. A fájdalomcsillapítás alapvető fontosságú a hasnyálmirigy-gyulladásban szenvedő betegeknél. Nem tudjuk azonban pontosan, hogy a fájdalomcsillapítás hogyan befolyásolja a betegség kimenetelét. Konkrét célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a parciális opioidagonista BQ hatását kísérletes akut hasnyálmirigy-gyulladásra.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Anyagok

A munkánk során használt vegyszerek és egyéb anyagok többségét a Sigma Aldrich Kft.-től szereztük be. Külön jeleztük, ahol nem így történt. Az SZR-72 [2-(2-N,N-dimetilaminoetilamin-1-karbonil)-1H-kinolin-4-on hidroklorid] szintézisét a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerkémiai Intézetében végezték. Az L-ornitin-HCl-t (LO, 300 mg/ml), a KYNA-t (50 mg/ml) és az SZR-72-t (50 mg/ml) fiziológiás sóoldatban (FS) oldottuk, és az oldatok pH-ját 7,35-7,4-re állítottuk be.

Állatok

A KYNA/SZR-72 kísérletekhez 200-250 g tömegű hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk, a fájdalomcsillapítás (BQ) hatását pedig ugyanilyen tömegű nőstény Wistar patkányokon teszteltük. Kísérleteinket az Európai Unió 2010/63/EU számú irányelvvel illetve a magyar állam 40/2013 (II.14.) számú határozatával összhangban hajtottuk végre, továbbá jóváhagyta a helyi (SZTE) és az országos etikai bizottság (X/3353/2017.) is.

***In vivo* kísérletek: akut hasnyálmirigy-gyulladás indukciója, kezelések és szövet begyűjtés**

Az akut nekrotizáló pankreatitist 3 g/kg LO egyszeri intraperitoneális (i.p.) injekciójával idéztük elő. A KYNA-t vagy az SZR-72-t 1 órával az pankreatitisz indukciója előtt egyszeri i.p. injekció formájában (75, 150, 300 mg/kg) adtuk. A kontroll állatokat LO, KYNA és SZR-72 helyett FS-tal kezeltük.

A BQ-t kétféle módon adagoltuk: i.p. és intratekálisan (i.t.). Az i.t. beadáshoz egy katétert a cisterna magna-n keresztül 8,5 cm mélységben caudalisan a subarachnoidalis térbe vezetünk. Így a katéter hegye a Th12-es és az L2-es csigolyák közé került, a hátsó lábakat beidegző gerincvelői szegmensek magasságába. Kizártuk azokat a patkányokat (kb. 10%), amelyeknél a műtét után neurológiai deficitet észleltünk, vagy amelyek hátsó lábai nem bénultak le 100 µg lidokain beadása után. Elhúzódó fájdalomcsillapító hatása miatt a BQ ajánlott adagolási intervalluma 8-12 óra. 3 és 6 µg/kg i.t. BQ injekciót adtunk 1 órával az LO előtt, és megismételtük 7 és 12 órával a hasnyálmirigy-gyulladás indukció után. A katéteren keresztül 10 µl BQ-t infundáltunk 120 sec-ig, majd 10 µl FS-tal öblítettünk. Az i.p. 0,1; 0,5 és 1 mg/kg BQ-t 1 órával a LO beadása előtt, majd 12 órával utána adtuk be.

Az állatokat 24 órával a LO injekció beadása után 45 mg/kg i.p. pentobarbitállal (Bimeda MTC, Cambridge, Kanada) történő mélyaltatással feláldoztuk. A vérmintát szívpunkcióval vettük le, majd a hasnyálmirigyet a lehető leggyorsabban eltávolítottuk. A hasnyálmirigy-szövetet jégen megtisztítottuk a zsírtól és a nyirokcsomóktól, majd darabokra vágtuk. Egy nagy darabot azonnal folyékony nitrogénben lefagyasztottunk, és a biokémiai vizsgálatok elvégzéséig -80 °C-on tároltuk. A hasnyálmirigy egy másik darabját 8%-os formaldehid oldatban fixáltuk a szövettani elemzéshez. A harmadik darabot Eppendorf-csövekben tároltuk a száraz-nedves tömegméréshez szobahőmérsékleten. Az utolsó darabot cryomatrixban fagyasztottuk le metszés és immunfluoreszcens festés céljából. A vérmintákat 2500 RCF-en 15 percig 4 °C-on centrifugáltuk, a szérumokat összegyűjtöttük és felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

A LO beadása után az állatok a várakozásoknak megfelelően rosszullettek jeleit mutatták és lomhává váltak. Néhányuk azonban az LO beadását követő 12 órán belül passzív és letargikus lett. Ezeknek az állatoknak a maghőmérsékletét rektális digitális hőmérővel figyeltük. Amint a maghőmérséklet kritikus szintre csökkent (27-29 °C), a patkányokat pentobarbitál túladagolással (200 mg/kg i.p.) eutanizáltuk, hogy a szenvedést minimalizáljuk. Az elaltatott patkányok aránya 3% volt az LO kezelt csoportokban.

Szövettani elemzés

A formalin-fixált pankreasz darabkából 3 µm-es metszetek készültek, majd azokat hematoxin-eozin festést követően két, a kísérleti protokollt nem ismerő szakértő elemezte és pontozta azokat. Szemikvantitatív pontozási módszerrel értékeltük az ödéma, a leukocita-infiltráció és a szöveti nekrozis százalékos arányát.

Laboratóriumi mérések

Lemértük a hasnyálmirigy nedves (WW) és szárítás utáni tömegét (DW), majd kiszámítottuk víztartalmát: $[(WW-DW)/WW] \times 100$. A szérumok amiláz aktivitását kolorimetriás kinetikus módszerrel vizsgáltuk. A hasnyálmirigy szövet MPO aktivitását Kuebler és mtsai módszerével határoztuk meg, és a

Lowry metodikával mért teljes fehérjetartalomra normalizáltuk. ELISA kit használatával, a gyártó (R&D Systems Minneapolis, MN, USA) által leírt módon meghatároztuk a pankreatikus IL-1 β mennyiségét. Femorális artériából nyert mintákban vérgáz analízátor segítségével mértük a vér pH-ját, HCO₃⁻ koncentrációját és parciális CO₂ nyomását (pCO₂). A hasnyálmirigy hősokkfehérje 72 (HSP72) expresszióját szövethomogenizátumban Western blot analízissel vizsgáltuk.

Hemodinamikai mérések és a hasnyálmirigy mikrokeringésének vizsgálata

Az állatokat az LO beadás után 24 órával i.p. nátrium-pentobarbitállal (50 mg/kg) altattuk. A felszálló aortába egy termisztoros katétert helyeztünk a szívteljesítmény termodilúciós technikával történő méréséhez. A bal oldali carotis communis kipreparáltuk, és ultrahangos áramlásmérőt helyeztünk köré az arteria carotis áramlásának méréséhez. Az arteria carotis áramlását és nyomását folyamatosan detektáltuk és számítógépes adatgyűjtő rendszerrel regisztráltuk. Medián laparotómia után a hasüregből a hasnyálmirigyet a keringés megzavarása nélkül a detektorra helyeztük. A hasnyálmirigy mikrokeringését a vörös vérszettek áramlásának sebességével (RBCV) jellemeztük és intravitalis ortogonális polarizációs spektrális képalkotó technikával vizualizáltuk.

RNS izolálás és reverz transzkripció

A kontroll patkányok agykéregéből és hasnyálmirigyéből RNS-t izoláltunk, és minden mintából 1 μ g RNS-t használtunk fel reverz transzkripcióhoz, amely során cDNS-t kaptunk. Génspecifikus és exon/exon-junkciót átívelő oligonukleotid primerpárokat terveztünk a The Universal Probe Library Assay Design Center (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) segítségével. A PCR-t DreamTaq DNS-polimerázzal (Thermo Fisher) végeztük BioRad C1000 ThermalCyclerben (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A termékeket 3%-os MetaPhor agaróz gélen (Lonza, Basel, Svájc) futtattuk, majd az izolált fragmensek szekvenenciaellenőrzését kapilláris DNS eleftróforézissel végeztük.

NMDAR és amidáz immunfluoreszcens festése

A cryomatrixba ágyazott hasnyálmirigyeket 7 μ m vastag szeletekre vágtuk. A metszeteket anti-NMDAR1 nyúl monoklonális antitesttel inkubáltuk (1:100, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). A következő napon Alexa Fluor 568-as kecske anti-nyúl másodlagos antitestet adtunk hozzá (1:500). Ezt követően a ko-immunfestést anti-amidáz egér monoklonális antitesttel (1:200) és Alexa Fluor 488 kecske anti-egér másodlagos antitesttel (1:500) végeztük. A sejtmagokat 2,5 μ g/ml Hoechst 33342-vel festettük. Szárítás után a tárgylemezeket 4°C-on tároltuk a konfokális mikroszkóppal (ZEISS LSM 880) történő elemzésig. A képeket ImageJ szoftverrel (NIH, Bethesda, MD, USA) dolgoztuk fel.

Hasnyálmirigy acinus sejtek izolálása és viabilitásának vizsgálata

A patkányok hasnyálmirigy acinus sejtjeit Pandol és mtsai kollagenáz emésztéses technikájával izoláltuk. Az emésztés után az acinus sejteket háromszor mostuk, majd Medium 199 oldatban reszuszpendáltuk és 37°C-os CO₂ inkubátorba helyeztük 15 percre. Az acinusokat közvetlenül ezután használtuk fel a kísérletekhez.

Az izolált hasnyálmirigy acinus sejteket 96 lyukú lemezbe helyeztük, és minden lyukba 1 μ M propidium-jodidot mértünk. A fluoreszcencia intenzitását 540 nm-es excitációs és 620 nm-es emissziós

hullámhosszon mértük Fluorostar Optima platereaderrel 5 percenként. Az *in vivo* kísérletekben használt 300 mg/kg KYNA dózist átszámoltuk ekvimoláris koncentrációra (250 mM). Az intenzitás stabilizálódása után a sejteket 20 mM LO, 25-2500 μ M KYNA/SZR-72/NMDA-val kezeltük a kísérleti protokoll szerint. A kísérlet végén Triton X-100-at adtunk mindegyik lyukhoz, hogy az összes maradék élő sejtet elpusztítsuk. Az ekkor mért intenzitást tekintettük 100% toxicitásnak. Az adatokat az egyes kezelési csoportok minimum (MIN) és maximum (MAX) intenzitásának kiválasztásával értékeltük. A sejtpusztulás százalékos arányát minden egyes időpontban a következő képlet segítségével számoltuk ki: $[(\text{intenzitás} - \text{MIN}) / (\text{MAX} - \text{MIN})] \times 100$.

Neutrofil granulociták izolálása és H₂O₂ termelésük mérése

A FS-tal, LO-nel vagy LO + 300 mg/kg SZR-72-vel kezelt patkányokból 24 órával az akut pankreatitisz indukcióját követően Ficoll-Hypaque sűrűséggradiens centrifugálással izoláltuk a neutrofil granulocitákat. A vért EDTA-val bevont csövekbe gyűjtöttük minden állatból külön, és óvatosan összekevertük azonos térfogatú 3%-os dextrans oldattal, majd 40 percig hagytuk ülepedni. A leukocitákban gazdag plazmát óvatosan a Ficoll Hypaque tetejére rétegeztük. Centrifugálás után polimorfonukleáris és vörösvérsejt-pelletet kaptunk. Az vörösvértesteket 0,2%-os NaCl-oldattal lizáltuk. A granulocitákat 10 mM glükózt tartalmazó PBS-ben reszuszpendáltuk. A sejtek számát $1,5 \times 10^4 / 100 \mu\text{l}$ -re állítottuk be. A H₂O₂-termelődést Fluorostar Optima platereaderrel (BMG Labtech, Ortenberg, Németország) mértük Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit segítségével.

Hasnyálmirigy acinus sejtek IL-1 β termelésének mérése

Az izolált hasnyálmirigy acinus sejteket 6 lyukú lemezekbe helyeztük, és 6 órán keresztül kezeltük őket médiummal, LO-nel (20 mM), KYNA-val (250 μ M), SZR-72-vel (250 μ M) vagy LO és KYNA/SZR-72 kombinációjával. 200 μ l homogenizáló puffer hozzáadása után a sejteket felkapartuk a lyuk aljáról. A sejteket két lyukból egy mikrocentrifugacsőbe pooloztuk. Szonikációt követően a homogenátumból az IL-1 β szintjét az R&D Systems kereskedelmi ELISA-kitjével mértük a gyártó által leírtak szerint.

Statisztikai elemzés

Az adatokat átlag \pm SEM formában adtuk meg. A kísérleteket egyutas ANOVA-val, majd Holm-Sidak post hoc teszttel vagy kétutas ANOVA-val, majd Bonferroni post hoc teszttel értékeltük (SPSS, IBM, Armonk, NY, USA). A $p < 0,05$ értéket fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

A KYNA és az SZR-72 dózisfüggően csökkenti az akut hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságát

A KYNA három különböző dózist vizsgáltuk, hogy meghatározzuk az LO-indukált akut pankreatitiszre gyakorolt hatását. Az LO önmagában nekrotizáló pankreatitist hozott létre, míg 300 mg/kg KYNA jelentősen csökkentette az általa kiváltott szöveti károsodást a hasnyálmirigyben. Az LO-nel kezelt csoportban a kontrollhoz képest a pankreatikus ödéma jelentős növekedését észleltük, míg a KYNA legnagyobb dózisa (300 mg/kg) szignifikánsan csökkentette azt. A hasnyálmirigy fehérvérsejtes

beszűrődése és a szöveti MPO aktivitás is jelentősen megnőtt a pankreatitises csoportban a kontrollhoz képest. Ahogy az ödéma esetében is látható volt, a KYNA 300 mg/kg-os dózisa szignifikánsan csökkentette mind a leukocita-infiltrációt, mind az MPO-aktivitást, miközben a KYNA alacsonyabb dózisa hatástalanok voltak. A hasnyálmirigy-gyulladás legfontosabb mérőszáma a szövetkárosodás (nekrózis), amely a LO-kezelés hatására igen súlyos volt, de a 300 mg/kg-os KYNA csoportban szignifikánsan csökkent. A szérum amiláz aktivitás is megnőtt a LO-kezelt csoportban, míg 150 és 300 mg/kg KYNA szignifikánsan csökkentette az enzimaktivitást. Összességében a KYNA két alacsonyabb dózisa (75 és 150 mg/kg) nem befolyásolta jelentősen a legtöbb mért értéket, de 300 mg/kg KYNA számottevően csökkentette a pankreatitisz súlyosságát.

A KYNA-hoz hasonló eredményeket kaptunk, amikor analógja, az SZR-72 különböző dózisainak hatását vizsgáltuk. Az SZR-72 300 mg/kg-os dózisa szignifikánsan csökkenteni tudta a hasnyálmirigy ödémáját és a leukocita-infiltrációját LO-kezelt állatokban. Ezeket az eredményeket a hasnyálmirigy víztartalmának és MPO-aktivitásának mérése is alátámasztotta. A pankréász szöveti károsodását is jelentősen mérsékelte az SZR-72 legnagyobb dózisa. A szérum amiláz aktivitás megemelkedett pankreatitiszben, amit mindhárom SZR-72 dózis csökkentett. Összességében az akut hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságát jellemző paraméterek 300 mg/kg SZR-72 kezelés hatására nagymértékben csökkentek.

A KYNA és az SZR-72 kezelés hatása a mikrocirkulációra és a hemodinamikai paraméterekre akut hasnyálmirigy-gyulladásban

Az akut pankreatitisz szignifikánsan növelte a perctérfogatot és az artéria carotis áramlást a kontroll állatokhoz képest. Az LO-nel kezelt patkányok perctérfogata mind a KYNA, mind az SZR-72 hatására a kontroll szintre csökkent, míg az artéria carotis áramlás csökkenése csak az SZR-72 esetében volt szignifikáns. Az artériás középnyomás tekintetében nem volt különbség a kísérleti csoportok közt. Érdekes módon a hasnyálmirigy-gyulladás szignifikánsan csökkentette a szerv mikrocirkulációját (RBCV) a kontrollcsoporthoz képest. A KYNA-val vagy SZR-72-vel történő előkezelés azonban képes volt jelentősen javítani a keringést. A pankreatitisz az artériás vér pH-jának és bikarbonát koncentrációjának jelentős csökkenését is okozta, ami metabolikus acidózist eredményezett, de ezt a KYNA és az SZR-72 előkezelés is visszaállította a kontroll szintre. Ugyanakkor az artériás pCO₂-ban nem volt kimutatható különbség a vizsgált csoportok között.

A KYNA és az SZR-72 kezelés hatása a hasnyálmirigy IL-1 β és HSP72 szintjére

A KYNA és az SZR-72 önmagában nem befolyásolta a hasnyálmirigy IL-1 β expresszióját egészséges állatokban. Az IL-1 β mennyisége azonban szignifikánsan megnövekedett, amikor akut hasnyálmirigy-gyulladást indukáltunk. A KYNA-val vagy SZR-72-vel kezelt pankreatitises állatokban az IL-1 β mennyisége azonban a kontroll szintjére csökkent. Megvizsgáltuk, hogy a KYNA és SZR-72 kezelés hogyan befolyásolja a hasnyálmirigy HSP72 szintjét fiziológiai körülmények között és pankreatitisz során. A KYNA és az SZR-72 már önmagában is számottevően növelte a HSP72 expresszióját a kontrollcsoporthoz képest, és az SZR-72 hatása erőteljesebb volt. A hasnyálmirigy-gyulladás is jelentősen megemelte pankréász HSP72 szintjét a kontrollcsoporthoz képest. Amikor azonban a pankreatitises

állatok KYNA vagy SZR-72 előkezelést is kaptak, a HSP72 mennyisége még ennél is szignifikánsabban magasabb volt.

Az NMDAR1 és a GPR35 expressziója a hasnyálmirigyben

Az NMDAR1 expresszióját RT-PCR és immunhisztokémia, a GPR35 expressziót RT-PCR segítségével vizsgáltuk. Mindkét módszer esetében pozitív kontrollként agyszövetet használtunk. A *Gpr35* génextpresszió közel azonos volt az agyban és a hasnyálmirigyben, míg az *nmdar1* génextpresszió sokkal alacsonyabb volt a hasnyálmirigyben. Ezt az immunhisztokémia is megerősítette, ahol az agy NMDAR1 festődése jól látható volt. A kontroll hasnyálmirigy képe alacsony NMDAR1-expressziót mutatott, jól strukturált amidáz festődéssel. A hasnyálmirigyből 2 és 24 órával az LO beadása után mintát vettünk, hogy láthatóvá tegyük, van-e különbség az NMDAR1 festődésben attól függően, hogy a gyulladás milyen előrehaladott állapotban van. Az NMDAR1 festődés 2 órával a pankreatitisz indukciója után kifejezettebbnek bizonyult, a legerősebb festődést azonban 24 óra elteltével figyeltük meg. Ezzel párhuzamosan az amidáz festődés a gyulladás előrehaladtával elvesztette strukturális integritását.

A KYNA, az SZR-72, és az NMDA hatása az LO-indukálta sejtoxicitásra *in vitro*

Vizsgáltuk a KYNA és az SZR-72 hatását az LO által kiváltott sejtoxicitásra *in vitro* kísérletekben. Mivel mindkét vegyület NMDAR-antagonista, NMDA-t is alkalmaztunk annak megállapítására, hogy a KYNA vagy az SZR-72 NMDAR-on keresztül fejt-e ki a hatását. Először a KYNA, az SZR-72 és az NMDA biztonságos koncentrációit határoztuk meg izolált hasnyálmirigy acinus sejteken. Az SZR-72 500 μM koncentrációig biztonságosan adagolható, de az e feletti koncentrációk toxikusnak bizonyultak az acinus sejtekre. Mivel *in vivo* a KYNA 300 mg/kg-os dózisa bizonyult hatásosnak, a KYNA és az NMDA ennek megfelelő, ekvimoláris (250 μM) és annak tízszeres (2500 μM) koncentrációit vizsgáltuk az acinusokon. Sem a KYNA, sem az NMDA nem befolyásolta a hasnyálmirigy acinusok életképességét még 2500 μM koncentrációban sem. Az SZR-72 esetében a további életképességi vizsgálatokban csak a 250 μM -os koncentrációt használtuk, mivel a tízszer magasabb koncentráció már bizonyítottan toxikus.

Ezután megmértük az LO kezelés hatását a sejtek életképességére, és azt, hogy a KYNA, az SZR-72 vagy az NMDA befolyásolja-e azt. Az LO erősen toxikusnak bizonyult a hasnyálmirigy acinus sejtekre. A KYNA azonban mind 250, mind 2500 μM koncentrációban csökkentette az LO toxikus hatását, és a sejtek életképessége a kontrollcsoportéhoz hasonló volt. A 250 μM SZR-72-vel történő kezelés szintén jelentősen csökkentette az LO által kiváltott toxicitást. Az NMDA egyik koncentrációban sem befolyásolta az LO toxicitását. Végül megvizsgáltuk, hogy a KYNA és az SZR-72 kedvező hatásait felfüggesztheti-e az NMDA hozzáadása. Az acinus sejtek az LO mellett 250 μM KYNA-t vagy SZR-72-t és növekvő dózísú NMDA-t (25, 250, 2500 μM) kaptak. Az NMDA-val történő együttes kezelés nem volt hatással a sejtek életképességére. A KYNA és az SZR-72 még mindig képes volt jelentősen csökkenteni a toxicitást a LO csoporthoz képest. Sőt, a KYNA kezelés a sejtek toxicitását a kontrollcsoporttal egyenlő szintre csökkentette.

Az SZR-72 csökkenti az izolált neutrofil granulociták H₂O₂ termelését, de nem befolyásolja a hasnyálmirigy acinus sejtek IL-1 β expresszióját

A neutrofil granulociták H₂O₂ termelése jellemzi aktivitásukat. Ezek a sejtek fontos szerepet játszanak a pankreatitisz kialakulásában, ezért meghatároztuk az SZR-72 hatását a neutrofilek funkciójára. A granulociták H₂O₂-termelését vizsgáltuk miután izoláltuk őket kontroll, LO-nel és LO + SZR-72-vel kezelt állatokból. A kontroll neutrofilek esetében a H₂O₂ termelés a kísérlet során végig a kiindulási szinten maradt. Ezzel szemben az pankreatitiszos állatokból származó neutrofilek megnövekedett mennyiségű H₂O₂-t termeltek, amelynek szintje már 20 perctől kezdve szignifikánsan különbözött a kontroll csoportétól. Amikor azonban az LO mellett SZR-72-t is kaptak az állatok, a granulociták H₂O₂ termelésének szignifikáns csökkenését figyeltük meg a 70. perctől kezdve.

Izolált acinus sejtek IL-1 β fehérje expresszióját mértük 6 órás LO, KYNA és/vagy SZR-72 kezelés után *in vitro*. Az LO nem okozott változást az acinusok IL-1 β expressziójában a kontrollocsoporthoz képest. Továbbá a KYNA, az SZR-72 vagy ezek LO-nel történő kombinációja sem befolyásolta a proinflammatorikus citokin termelődését.

A BQ-nak nincs szignifikáns hatása az akut hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságára

A BQ két beadási módját vizsgáltuk (i.p., i.t.). A BQ önmagában adva nem okozott szövettani eltéréseket a hasnyálmirigyben. Az i.p. BQ a vizsgált dózisokban (2 \times 0,1; 2 \times 0,5; 2 \times 1 mg/kg) nem befolyásolta a LO által kiváltott pankreatikus sejtkárosodást és leukocita-infiltrációt, illetve a szérum amiláz aktivitását. A hasnyálmirigy víztartalmát azonban a 2 \times 1 mg/kg dózisu BQ enyhén megnövelte. Az i.t. beadási módnál a 3 \times 3 mg/kg BQ nem befolyásolta egyik mért paramétert sem, míg a magasabb, 3 \times 6 mg/kg dózis csökkentette a pankreatikus leukocita-infiltrációt.

MEGBESZÉLÉS

Mivel a heveny hasnyálmirigy-gyulladás olyan betegség, amelynek nincs specifikus terápiája, fontos, hogy megtaláljuk a kezelésének lehetőségeit. Patofiziológiája több sejtípust és folyamatot érint. Pankreatitisz során a triptofán metabolizmusa egyértelműen zavart szenved, ami a kinurenin-3-monooxygenáz enzim túlműködését és a pro-inflammatoros 3-HK fokozott termelését eredményezi. Jelen tanulmányban az endogén triptofán anyagcsere metabolitja, a KYNA, illetve annak szintetikus származéka, az SZR-72 lehetséges alkalmazását vizsgáltuk a kísérletes akut pankreatitisz kezelésében. Ezzel kapcsolatos új eredményeink a következők: a KYNA és az SZR-72 (1) dózisfüggően csökkentették a betegség súlyosságát; (2) *in vivo* csökkentették a pro-inflammatoros IL-1 β expresszióját; (3) növelték a HSP72 szintézisét; (4) csökkentették a metabolikus acidózis mértékét; (5) helyreállították a hasnyálmirigy mikrokeringését; (6) gátolták a neutrofil granulociták működését. (7) Ezenkívül hatásuk valószínűleg független volt az acináris NMDAR-tól. Az SZR-72 képes átjutni a vér-agy gáton, míg az a KYNA-ra impermeabilis. Ezért az SZR-72 a központi idegrendszerben is kifejtheti hatását. Mivel az SZR-72-vel és a KYNA-val kapott eredmények hasonlóak voltak, nem valószínű, hogy az SZR-72 lehetséges központi idegrendszeri hatásai szerepet játszanak a hasnyálmirigy-gyulladás elleni védelemben. Kimutattuk, hogy a KYNA és az SZR-72 300 mg/kg dózisa erős gyulladáscsökkentő hatást fejt ki. Csáti és munkatársai

ugyanebben a dózisban KYNA-t és kinurénsavamid-2-t adtak i.p. patkányoknak, és a ganglion trigeminale ingerlése által kiváltott gyulladás sikeres gátlását figyelték meg. Hasonló eredményeket kaptak ugyanezzel a modellel, amikor SZR-72-t alkalmaztak (i.p. 300 mg/kg), amely gyulladáscsökkentő hatást fejtett ki. Ezen dózisok kevesebb, mint a tizede is hatásosnak bizonyult patkány colitisben. Továbbá Juhász és munkatársai sikeresen alkalmazták a KYNA-t (2×15 mg/kg) és az SZR-72-t ($2 \times 23,5$ mg/kg) szepszis modellben. Ezen eredmények alapján úgy tűnik, hogy a KYNA és az SZR-72 hatékony dózisa magától a betegségmodellől is függ.

Eredményeink azt mutatják, hogy akut pankreatitisz esetén ahhoz, hogy az állat képes legyen fenntartani a létfontosságú szervek vérellátását, azaz az artériás középnyomást, jelentősen meg kell növelnie a perctérfogatót. Ennek legfontosabb eszköze a szívfrekvencia növelése, mivel a teljes perifériás ellenállás a pankreatitisz okozta gyulladással mielőtt nem növelhető megfelelően. Amikor azonban az állatokat LO mellett KYNA-val vagy SZR-72-vel is kezeltük, az artériás középnyomás még normális perctérfogató mellett sem csökkent. Vagyis a vegetatív idegrendszernek nem kellett beavatkoznia a keringés fenntartása érdekében. Ez arra utal, hogy a KYNA és az SZR-72 megelőzi a hasnyálmirigy-gyulladás okozta életveszélyes hemodinamikai egyensúlyzavart. Valószínűleg védelmet nyújtanak olyan mennyiségű pro-inflammatorikus mediátor és citokin felszabadulásával szemben, amely a hasnyálmirigy-gyulladásban várható súlyos vazodilatációhoz, intravaszkuláris volumen deplációhoz, és hipoperfúzióhoz vezetne. A teljes perifériás ellenállás helyreállítása mellett a KYNA/SZR-72 kezelés szerepet játszhat a pulzus csökkentésében is. Hasonló eredményeket találtak Badzynska és mtsai spontán hipertóniás patkányokban, ahol a 25 mg/kg/nap KYNA-kezelés csökkentette a szívfrekvenciát. A pankreatitisz során megemelkedő pulzusra magyarázatként szolgálhat a fájdalom, mivel a pankreatitisz elkerülhetetlen tünete, és közvetlenül befolyásolja a szívfrekvenciát. Az NMDA-antagonisták az analgetikumok egy külön csoportját alkotják, ezért *in vivo* kísérleteink egyik kézenfekvő magyarázata a KYNA és az SZR-72 fájdalomcsillapító hatása lehet. A GPR35 receptort fontosnak tartják a nociceptív jelátvitelben, és ezen a receptoron keresztül a KYNA csökkentheti a fájdalmat, ami hozzájárulhat a csökkent szívfrekvenciához is.

Részben ez adta az ötletet, hogy külön az analgészia hatását is vizsgáljuk kísérletes akut hasnyálmirigy-gyulladásban. Az opioidokat gyakran alkalmazzák fájdalomcsillapításra a pankreatitiszben szenvedő betegeknel, bár a betegség progressziójára gyakorolt hatásuk még nem teljesen ismert. Tanulmányunkban a BQ, mint parciális opioid receptor agonista hatását vizsgáltuk LO-indukált akut hasnyálmirigy-gyulladásban. A BQ alkalmazásának nem volt számottevő szövődménye; csak a hasnyálmirigy szöveti víztartalma emelkedett meg a legmagasabb i.p. dózis után. Az alacsonyabb i.t. dózis egyik mért paraméterre sem volt hatással, és nem befolyásolta a betegség súlyosságát. A magasabb i.t. dózis azonban jelentősen csökkentette a pankréász leukocita-infiltrációját. Kísérleteink során mi alkalmaztunk először spinálisan BQ-t és mutattuk ki hatását az akut hasnyálmirigy-gyulladásra. Intravénásan Na-taurokolát-indukált modellben nem befolyásolta a pankreatitisz súlyosságát, míg cerulein által kiváltott modellben szubkután beadva csökkentette a pankréász acinusok zymogéntartalmát

és fehérjeszintézisét. Eredményeink és a szakirodalom alátámasztja, hogy a BQ jótékony fájdalomcsillapító lehet akut pankreatitiszben.

Az akut pankreatitisz a szisztémás és a hasnyálmirigy keringés károsodását okozza, ami a betegség korai jelei közé tartozik. Kísérletes hasnyálmirigy-gyulladás során szignifikánsan csökkent RBCV-t mutattunk ki a pancreaszban, ami KYNA és SZR-72 adásával is nagyrészt helyreállt. A csökkent mikrocirkuláció hozzájárul az iszkémiához és a szervek elégtelenségéhez, nemcsak a hasnyálmirigyben, hanem például a vesében vagy a tüdőben is. Ezért a KYNA és az SZR-72 enyhítheti a betegség súlyos formájánál jelentkező tartós többszervi elégtelenség tüneteit. Ráadásul Zhang és munkatársai megállapították, hogy súlyos akut pankreatitisz következtében másodlagosan csökken a bélmikrocirkuláció, ami a nyálkahártya barrier integritását károsítja, ezáltal növelve a fertőzés, a szepszis és a halálozás kockázatát. Mindezek alapján a KYNA és az SZR-72 mikrokeringésre gyakorolt kedvező hatása releváns, és érdemes tovább vizsgálni. Érdekes módon a KYNA helyreállította az ileum keringését egy szepszis modellben, míg az SZR-72 hatástalan volt. Ebben a modellben azonban az SZR-72 javította a mitokondriális légzést, így serkentve az ADP ATP-vé történő átalakulását, azonban a saját kutatásunkban nem a mitokondriumfunkció vizsgálata volt fókuszban. Mindazonáltal a mitokondriális működési zavar gyakori akut pankreatitiszben, és súlyos következményekkel jár, ezért további vizsgálatokra van szükség annak feltárására, hogy a KYNA vagy származékai hogyan modulálják azt.

A hasnyálmirigy-gyulladást gyakran kíséri sav-bázis eltolódás, és összefüggés van a betegség súlyossága és a metabolikus acidózis között. A klinikai vizsgálatok metaanalízise megerősítette, hogy a pankreatitisz súlyossága korrelál a metabolikus acidózis mértékével. Sőt, akut pankreatitisz indukálásával tovább súlyosbítható a már meglévő sav-bázis egyensúlyzavar. A hasnyálmirigy-gyulladás során több tényező felelős a metabolikus acidózis kialakulásáért: bikarbonátban gazdag hasnyálmirigynedv veszteség hasnyálmirigy-fisztulán vagy -drenázon keresztül; sokk vagy szepszis okozta laktát felszaporodás. Lényeges megfigyelésünk volt, hogy mind a KYNA, mind az SZR-72 hatékonyan állította helyre a csökkent plazma pH-t és HCO_3^- koncentrációt. A sav-bázis egyensúlyra gyakorolt hatásuk pontos mechanizmusa nem ismert, de ez a hatás is hozzájárulhat a betegség súlyosságának csökkentéséhez.

A HSP72 egy indukálható chaperon, melynek expressziója fokozódhat stressz, például gyulladás hatására. Korábban megállapítást nyert, hogy a hőstressz által kiváltott HSP72-emelkedés védelmet nyújthat akut hasnyálmirigy-gyulladás ellen, és a HSP72 farmakológiai indukciója BRX 220-szal szintén jelentősen javította az experimentális pankreatitisz kimenetelét. Továbbá a HSP72 transzgenikus egerekben történő túltermelése elősegítette a pankreatitiszből való felépülést. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a KYNA és az SZR-72 kezelés önmagában is szignifikánsan növelte a pancreász HSP72 expresszióját. LO-nel kiváltott pankreatitiszben tovább emelkedett a HSP72 szintje. Amikor azonban a hasnyálmirigy-gyulladásban szenvedő állatokat KYNA-val vagy SZR-72-vel előkezeltük, a HSP72 expresszió a legmagasabb mért szintet érte el. Az SZR-72 lényegesen erősebb HSP72 induktor volt, mint a KYNA. A KYNA és az SZR-72 hőszokkfehérjére gyakorolt hatása lehet az egyik mechanizmus, amellyel a pankreatitisz ellen védenek.

NMDAR1 fiziológias körülmények között is jelen volt a hasnyálmirigy-szövetben. Meglepő módon az NMDAR1 fehérje expressziója a pankreatitisz progressziójával megnőtt. Ez a jelenség három okkal magyarázható: (1) a hasnyálmirigy sejtei (pl. acinusok, duktális- és béta sejtek) növelték az NMDAR1 expressziójukat; (2) az infiltráló leukociták expresszálják a receptort; vagy (3) az előző kettő együtt. Ezért megvizsgáltuk, hogy a KYNA és az SZR-72 az NMDAR-on keresztül fejti-e ki hatását. Izolált hasnyálmirigy acinus sejteken végeztünk *in vitro* LO-toxicitási mérések azt mutatták, hogy a KYNA és az SZR-72 védőhatása valószínűleg nem az NMDAR-hoz köthető. A receptor agonista NMDA ugyanis még tízszer nagyobb koncentrációban sem függesztette fel a KYNA és az SZR-72 antagonistá hatását. Ebből pedig arra következtethetünk, hogy esetleg egy másik receptoron, például a GPR35-ön keresztül hatnak. A GPR35 receptor jelen van a makrofágokon, eozinofil és bazofil granulocitákon, hízósejteken, természetes ölü T-sejteken és az emésztőrendszer számos sejtjén. Aktiválódása az intracelluláris ciklikus adenosin-monofoszfát és Ca^{2+} szignálok csökkenését, valamint a foszfatidilinozitol-3-kináz/protein-kináz B és a mitogén-aktivált protein kináz útvonalak gátlását eredményezi. A KYNA-GPR35 interakció ezekkel a lépésekkel mozdítja elő az immunszuppressziót. Kísérleteinkben ugyan nem volt célunk a KYNA és az SZR-72 GPR35 által közvetített hatásainak vizsgálata, de ez a témakör további kutatásra érdemes.

A KYNA és az SZR-72 jelentősen csökkentette a hasnyálmirigy IL-1 β expresszióját *in vivo*. Ez a hatás azonban úgy tűnik, hogy független az acinus sejtektől. Ezért a vizsgált vegyületek valószínűleg a fehérvérsejtekre hatnak, ezzel csökkentve a hasnyálmirigyszövetből történő citokinfelszabadulást. A neutrofil granulociták az első gyulladásos sejtek, amelyek pankreatitisz során elérik a hasnyálmirigyet. A neutrofilek nagy mennyiségben termelnek ROS-t, például H_2O_2 -t, amelynek mennyisége arányos a sejtek aktivitásával. Eredményeink azt mutatták, hogy az SZR-72 kezelés csökkentette a LO-indukált hasnyálmirigy-gyulladásban szenvedő állatokból izolált neutrofil granulociták H_2O_2 termelését. A pankreatitisz során végbemenő gyulladásos kaszkád létrejöttében a neutrofileknek nagy szerep jut. Következésképpen, ha a KYNA és az SZR-72 mérsékli ezen sejtek aktiválódását, az részben magyarázhatja az általunk megfigyelt jótékony hatásokat hasnyálmirigy-gyulladásban.

KÖVETKEZTETÉSEK

Leírtuk az NMDAR jelenlétét az exokrin hasnyálmirigy acinus sejtjein. Kimutattuk, hogy az endogén triptofán-metabolit, a KYNA és szintetikus analógja, az SZR-72 csökkentette a kísérletes akut hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságát. Mindkettő dóziszfüggő védelmet nyújt a LO által kiváltott pankreatitisz, valamint *in vitro* acinus sejt toxicitás ellen, amely hatás valószínűleg független a pankreatikus NMDAR-októl. Több mechanizmus is közvetítheti ezt a védőhatást. Mind a KYNA, mind az SZR-72 javította a sav-bázis egyensúlyt, a kardiovaszkuláris paramétereket és a hasnyálmirigy mikrocirkulációt akut pankreatitisz alatt. Az SZR-72 csökkentette a hasnyálmirigy-gyulladásban szenvedő patkányokból izolált neutrofil granulociták emelkedett H_2O_2 -termelését is, elnyomva aktiválódásukat. A KYNA és szintetikus származéka befolyásolja a citokinek mennyiségét (csökkentette a hasnyálmirigy IL-1 β expresszióját), a szervezet önvédelmi mechanizmusát (fokozta a hasnyálmirigy

HSP72 expresszióját) és a leukocita funkciót, ami immunmoduláló szerepet sejtet kísérletes heveny hasnyálmirigy-gyulladásban. Összességében e vegyületek adása előnyös lehet akut pankreatitisz során.

Ezenkívül azt is kimutattuk, hogy a BQ-kezelés enyhén csökkentheti a kísérletes akut hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságát, de hatása nagymértékben függ a dózistól, az időzítéstől és a beadás módjától, ami arra utal, hogy a fájdalomkezelés jól megtervezett stratégiája kulcsfontosságú.

ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEGZÉSE

- A KYNA és az SZR-72 dózisfüggő módon csökkenti az LO-indukált kísérletes akut hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságát
- A KYNA és az SZR-72 helyreállítja a kardiovaszkuláris paramétereket és a hasnyálmirigy mikrokeringését LO-indukált kísérletes akut hasnyálmirigy-gyulladás során
- NMDAR1 fehérje- és mRNS expressziót mutattunk ki a hasnyálmirigy acinus sejtjein
- A KYNA és az SZR-72 csökkenti az LO izolált hasnyálmirigy acinus sejtekre kifejtett toxikus hatását *in vitro*
- Az SZR-72 csökkenti az akut pankreatitiszes patkányokból izolált neutrofil granulociták H₂O₂ termelését
- A KYNA és az SZR-72 jótékony hatásai valószínűleg nem a hasnyálmirigy NMDA receptorokon keresztül mediálódnak
- Az i.t. alkalmazott BQ szignifikánsan csökkenti a hasnyálmirigy fehérvérsejtes beszűrődését LO-indukált kísérletes akut pankreatitisz során

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-2.3.2-15-2016-00034, NKFIH PD129114, NKFIH K119938); a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (BO/00866/20/5), az ÚNKP Ösztöndíj (ÚNKP-20-5-SZTE-163) és a Szegedi Tudományegyetem Open Access Támogatás (Grant No. 5304) pénzügyi támogatása nélkül.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, **Prof. Dr. Rakonczay Zoltánnak** és **Dr. Kiss Lórándnak** (Szegedi Tudományegyetem, Kórélettani Intézet). Irányításuk és támogatásuk nélkül ez a doktori értekezés nem jöhetett volna létre.

Hálás vagyok **Prof. Dr. Hegyi Péternek** (Simmelweis Egyetem, Pécsi Tudományegyetem), **Prof. Dr. Takács Tamásnak** (Szegedi Tudományegyetem, Belgyógyászati Klinika) és **Prof. Dr. Vécsei Lászlónak** (Szegedi Tudományegyetem, Neurológiai Klinika), akik tudása és szorgalma példaértékű volt számomra. Köszönetet szeretnék mondani továbbá **Prof. Dr. Szabó Gyulának**, a Kórélettani Intézet korábbi vezetőjének, valamint **Prof. Dr. Lengyel Csabának**, **Prof. Dr. Ábrahám Györgynek** és **Prof. Dr. Wittmann Tibornak**, az I. számú Belgyógyászati Klinika jelenlegi és korábbi vezetőinek, akik lehetőséget biztosítottak számomra, hogy intézetükben dolgozhassak.

Külön köszönöm **Dr. Balla Zsoltnak**, hogy a laborban töltött első napom óta mellettem állt és segített.

Köszönetet mondok minden kollégám és barátom, **Mihalekné Fűr Gabriella**, **Bálint Emese Réka**, **Dr. Kui Balázs**, **Orján Erik Márk**, **Dr. Maléth József**, **Dr. Venglovecz Viktória**, **Dr. Pallagi Petra**, **Dr. Végh Eszter Teréz**, **Dr. Tóth Emese**, **Dr. Fanczal Júlia**, **Madácsy Tamara**, **Dr. Katona Máté**, **Dr. Hegyi Eszter**, **Dr. Szentesi Andrea**, **Dr. Csabafi Krisztina**, **Dr. Szakács Júlia**, **Dr. Ibos Katalin**, **Dr. Jászberényi Miklós**, **Dr. Bagosi Zsolt**, **Dr. Mezei Zsófia**, **Dr. Pataki Imre**, **Dr. Gece Árpád** biztatásáért és tanácsáért, amivel olyan sokat segítettek az évek során.

Ez a dolgozat nem valósulhatott volna meg **Magyarné Pálfi Edit**, **Pritz Tünde**, **Fritz Rea**, **Árva Miklósné**, **Fuks Zoltánné**, **Kocsispéter Zoltán**, **Tóth Zsolt**, **Laurinyecz Magdolna**, **Kiss Gusztáv**, **Pál Ágnes** és **Romhányi Veronika** segítsége és támogatása nélkül. Külön szeretném kiemelni **Ancsányi Kittit** és **Dallos-Szilágyi Erzsébetet**, akiknek köszönöm mindig precíz és kedves segítségüket.

Végül pedig jöjjenek azok, akiknek a legtöbbet köszönhetek. Hálás vagyok férjemnek, **Budai Lászlónak** a végtelen türelméért és támogatásáért. Nélküle már régen felhagytam volna a kutatással. Köszönöm gyermekeimnek, **Richárdnak**, **Eriknek** és **Ottónak** a sok szeretetet és boldog pillanatot, amivel nap mint nap tartották bennem a lelket. Mindig hálás leszek bátyámnak, **Zénónak** az elapadhatatlan bátorításáért. Végül köszönetet mondok **édesanyámnak**, aki tudom, hogy nagyon boldog és büszke lenne. Ezt a doktori disszertációt az ő emlékének ajánlom.

“Ha tudnánk, hogy mit csinálunk, nem neveznénk kutatásnak, igaz?” –Albert Einstein