

**A KRÓNIKUS PANCREATITIS GENETIKAI HÁTTERE:
KOHORSZ ANALÍZIS ÉS PREKLINIKAI GYÓGYSZERVIZSGÁLAT**

Ph.D. Tézis

Dr. Pesei Zsófia Gabriella

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar,
Szegedi Tudományegyetem, Szeged
Orvosi Genetikai Intézet, Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ, Szegedi
Tudományegyetem, Szeged

Témavezetők:

Dr. Hegyi Eszter Ph.D.

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar,
Szegedi Tudományegyetem, Szeged
Transzlációs Medicina Intézet, Általános Orvostudományi Kar, Pécsi Tudományegyetem,
Pécs

Prof. Dr. Sahin-Tóth Miklós Ph.D.

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar,
Szegedi Tudományegyetem, Szeged
Division of General Surgery, Department of Surgery, David Geffen School of Medicine at
University of California Los Angeles, Los Angeles

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar,
Szegedi Tudományegyetem, Szeged

Szeged

2023

A tézis témájához kapcsolódó közlemények

I. **Zsófia Gabriella Pesei**, Zsanett Jancsó, Alexandra Demcsák, Balázs Csaba Németh, Sandor Vajda, Miklós Sahin-Tóth: Preclinical testing of dabigatran in trypsin-dependent pancreatitis. *JCI Insight*. 2022; 7(21), e161145. doi:10.1172/jci.insight.161145. **IF₂₀₂₁: 9.484, D1**

II. **Zsófia Gabriella Pesei***, Balázs Csaba Németh*, Eszter Hegyi, Ákos Szücs, Andrea Szentesi, Péter Hegyi, Mark E. Lowe, Miklós Sahin-Tóth: The common truncation variant in pancreatic lipase related protein 2 (*PNLIPRP2*) is expressed poorly and does not alter risk for chronic pancreatitis. *PloS One*. 2018;13(11), e0206869. doi:10.1371/journal.pone.0206869. **IF₂₀₁₈: 2.776, Q1**

*Egyenlő szerzői hozzájárulás.

A tézis témájához nem kapcsolódó közlemények

I. András Salamon, Rita Török, Evelin Sümegi, Fanni Boros, **Zsófia Gabriella Pesei**, Máté Fort Molnár, Gábor Veres, Dénes Zádori, László Vécsei, Péter Klivényi: The effect of physical stimuli on the expression level of key elements in mitochondrial biogenesis. *Neurosci Lett*. 2019; 698:13-18. doi: 10.1016/j.neulet.2019.01.003. **IF₂₀₁₉: 2.274, Q3**

II. Fanni Annamária Boros, Rita Török, Evelin Vágvolgyi-Sümegi, **Zsófia Gabriella Pesei**, Péter Klivényi, László Vécsei. Assessment of risk factor variants of LRRK2, MAPT, SNCA and TCEANC2 genes in Hungarian sporadic Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett*. 2019; 706:140-145. doi: 10.1016/j.neulet.2019.05.014. **IF₂₀₁₉: 2.274, Q3**

Összes közlemények száma:	4
Elsőszerzős közlemények száma:	2
Kumulatív impakt faktor:	16.808

BEVEZETÉS

A hasnyálmirigy gyulladós megbetegedésének három formája van: az akut, a rekurrens akut és a krónikus pancreatitis. Ezen klinikai megjelenési formák gyakran egymást követik és progresszív, recidiváló betegséggé alakulnak. A folyamat heveny hasnyálmirigy-gyulladással kezdődik, majd ezt követik a visszatérő akut gyulladós epizódok, melyek végül végstádiumú krónikus pancreatitishez vezetnek. Ezt a kórlefolyást egyrészt olyan általunk befolyásolható környezeti kockázati tényezők vezérlik, mint a krónikus alkoholfogyasztás vagy a dohányzás, másrészt pedig genetikai rizikófaktorok állhatnak a háttérben, amelyek főleg a hasnyálmirigy által termelt emésztő enzimeket kódoló génekben találhatóak. A betegség kialakulását meghatározó genetikai eltérések a hatásmechanizmus szerint különböző úgynevezett patológiai útvonalakra oszthatóak. Ezek: a kóros tripszin aktivitáson alapuló (tripszin-függő), a mutáns emésztőenzimek hibás feltekeredésén alapuló (miszfolding-függő) és a hasnyálmirigy kivezetőcsövek csökkent működésén alapuló (duktális) útvonalak. Jelen tézis a miszfolding-függő és a tripszin-függő útvonalakat érintő kísérleteket ismerteti.

A miszfolding-függő útvonalhoz olyan gének mutációi tartoznak, amelyek a pancreasban termelődő emésztőenzimek hibás feltekerődését váltják ki, és ezáltal endoplazmás retikulum stresszt okoznak a pancreas mirigysejtjeiben. Számos genetikai variáns, amely hibás fehérje-feltekerődést okoz lipáz géneket érint, például a karboxil észter lipáz (*CEL*) vagy a pankreatikus lipáz (*PNLIP*) génjét. Hasonlóan a *PNLIP*-hez, az annak rokonfehérjéjét kódoló *PNLIPRP2* génben lévő eltérések is növelhetik a krónikus hasnyálmirigy-gyulladásra való hajlamot. Egy gyakori, úgynevezett nonszensz *PNLIPRP2* variáns a p.W358X a fehérje megrövidülését okozza. HEK 293T sejtekben kifejezve a mutáns *PNLIPRP2* protein nem szecernálódik a sejtől és a sejten belül csapadékot formál, ami ER stresszt okoz. Ezen megfigyelések alapján a p.W358X variáns hajlamosíthat a krónikus pancreatitis kialakulására, azonban ezt megerősítő vizsgálat ezidáig nem történt.

A tripszin-függő útvonalhoz olyan gének mutációi tartoznak, amelyek pancreas emésztőenzimeket vagy egy tripszingátlószert kódolnak, ezzel szabályozva az intrapancreatikus tripszinaktivitást. Ezek a genetikai eltérések úgy vezetnek hasnyálmirigy-gyulladáshoz, illetve annak progressziójához, hogy megnövelik az emésztésért felelős enzimprekursorok, a tripszinogének az ektópiás, intrapancreatikus átalakulását annak aktív formájává, a tripszinné. A humán kationos tripszinogént kódoló szerin proteáz 1 (*PRSSI*) génben lévő úgynevezett funkcionyeréses mutációk hatására vagy a tripszinogén lebomlása gátlődik vagy a tripszinogén autoaktivációja fokozódik. A szerin proteáz inhibitor Kazal típus

1 (*SPINK1*) és kimotripszin C (*CTRC*) génekben előforduló úgynevezett funkcióvesztéses mutációk károsítják a fokozott tripszinaktivitás elleni védelmet, úgy, mint a tripszinogén *CTRC* által történő lebontását vagy a tripszinaktivitás *SPINK1* által megvalósuló gátlását. A tripszinogén patogén szerepe a krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban számos, a Sahin-Tóth laboratórium által kifejlesztett egérmodellen keresztül is bizonyítást nyert. Ezek az egértörzsek az egér kationos tripszinogén T7-es izoformájában hordoznak mutációkat. A *T7D23A* és *T7K24R* egerek a p.D23A, illetve a p.K24R mutációkat hordozzák a tripszinogén aktivációs peptidjében. A mutációk hatására a tripszinogén autoaktivációja jelentősen felgyorsul, ami 50-szeres (*T7D23A*), illetve 5-szörös (*T7K24R*) fokozódást jelent. A heterozigóta *T7D23A* egérben már fiatalon spontán akut pancreatitis lép fel, amely rövid időn belül krónikus betegségbe progrediál. A homozigóta *T7K24R* egerekben nem alakul ki spontán betegség, azonban kísérletesen, a bélhormon analóg cerulein felhasználásával kiváltott pancreatitisük sokkal súlyosabb, mint a vad típusú *C57BL/6N* egereknél. Az is megfigyelhető, hogy a *T7K24R* egerekben az akut pancreatitis rohamosan idült gyulladássá alakul, míg a *C57BL/6N* egerekben a heveny gyulladással epizód rövid időn belül meggyógyul. Ezen úgynevezett knock-in egérmodelleken kívül, Dr. Baoan Ji laboratóriuma a Mayo Klinikán számos transzgen egérvonalat fejlesztett ki, amelyek a humán tripszinogén géneket, illetve azok mutáns formáját hordozzák. Összességében elmondható, hogy ezek az egérmodellek lehetővé teszik a preklinikai gyógyszeresztelést krónikus pancreatitisben.

A genetikai, a biokémiai és az állatmodell kísérletek által nyújtott bizonyítékok a tripszint egyértelmű terápiás célpontként azonosítják krónikus pancreatitisben. Bár a tripszininhibitorok korai preklinikai tesztelése rágszálakon ígéretes eredményeket hozott, a betegeken végzett klinikai vizsgálatok nem támasztották alá egyértelműen a hatásosságukat. Dr. Baoan Ji laboratóriuma 2019-ben közölte, hogy a véralvadásgátló dabigatran etexilát meggyógyította, illetve visszafordította a ceruleinnel kiváltott pancreatitist olyan transzgen egerekben, amelyek a humán *PRSSI* gént hordozták az örökletes krónikus pancreatitisben leggyakrabban előforduló p.R122H mutációval. A dabigatran etexilát (Pradaxa) egy világszerte alkalmazott szájon át szedhető reverzibilis trombin inhibitor, amelyet pitvarfibrillációban alkalmaznak hosszútávú antikoagulálás végett. A béltraktusból történő felszívódása után a dabigatran etexilátot a vérben nonspecifikus észterázok alakítják át az aktív hatóanyaggá, dabigatranná. Dr. Ji és munkatársai úgy vélték, hogy a dabigatran hatásossága a hasnyálmirigy-gyulladás kezelésében a véralvadásgátlás révén magyarázható. Ugyanakkor, a dabigatran egy benzamidin származék, és korábbi tanulmányok kimutatták, hogy gátolja a marha tripszint 50,3 nM-os inhibitoros

konstanssal (K_i). Ezért azt feltételeztük, hogy a dabigatran terápiás hatása a *PRSSI* p.R122H mutációt hordozó transzgen egerekben inkább a tripszingátlásnak köszönhető a pancreasban, mintsem a trombingátlásnak a keringésben.

CÉLKITŰZÉSEK

Célkitűzés 1. *A PNLIPRP2 gén c.1074G>A (p.W358X) variánsának vizsgálata krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban.* Célkitűzésünk volt azon hipotézis vizsgálata, hogy a *PNLIPRP2* gén p.W358X mutációja növeli a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásának az esélyét.

Célkitűzés 2. *A dabigatran preklinikai vizsgálata krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban.* Célkitűzésünk volt, hogy az új típusú antikoaguláns gyógyszer, a dabigatran tripszingátló hatását vizsgáljuk egér és humán tripszin izoformákon, továbbá, hogy a dabigatran etexilát terápiás hatékonyságát teszteljük a *T7K24R* és *T7D23A* egértörzsek segítségével tripszin-függő pancreatitisben.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A PNLIPRP2 gén c.1074G>A (p.W358X) variánsának vizsgálata krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban

Nómenklatúra

A nukleotidok számozása a kódoló DNS számozást követi. A transzláció start kodonjának, az ATG-nek, az első nukleotidját jelöltük mint +1. Az aminosavak számozása a *PNLIPRP2* elsődleges transzlációs termékének lánckezdő metioninjával kezdődik. A *PNLIPRP2* NCBI genomi referencia szekvenciája (NC_000010.11, Homo sapiens chromosome 10, GRCh38.p12 primary assembly) és az NCBI kódoló referencia szekvenciája (NM_005396.4) a minor, a csonka fehérjét kódoló allélt jelöli referenciaként. Számunkra a teljes hosszúságú *PNLIPRP2* szekvencia szolgált referenciaként a *PNLIPRP2* variánsok megjelölésére. Ennek értelmében esetünkben a nonszensz, csonka fehérjét eredményező p.W358X variáns válik a minor alléllá, és ezáltal a variáns biológiailag jobban értelmezhető lesz.

Vizsgálati alanyok

Vizsgálatunkhoz a Magyar Hasnyálmirigy Munkacsoport által összegyűjtött genomi DNS mintákat használtunk (etikai engedélyszám: TUKEB 22254-1/2012/EKU; biobank engedélyszám: IF702-19/2012). Összesen 256 krónikus pancreatitisben szenvedő beteget vontunk be, melyből 152 alkoholos, 104 pedig nem alkoholos pancreatitisben szenved.

Továbbá 200, pancreas betegségre negatív kontroll személyt vontunk be. Az általunk használt pancreas cDNS minták és a hozzájuk tartozó genomi DNS minták (n=9) a Szegedi Tudományegyetem kadáver donoraiból származtak.

DNS szekvenálás

A vizsgálni kívánt DNS szakaszt PCR módszerrel amplifikáltuk és Sanger-féle szekvenálás segítségével analizáltuk. Szekvenáló primerként a PCR-hez használt primerek szolgáltak.

A dabigatran preklinikai vizsgálata krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban

A dabigatran-tripszin kötődés szerkezeti modellezése

A dabigatran kémiai szerkezetét a PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), a humán mezotripszin 1H4W szerkezetét a Protein Data Bank (PDB) adatbázisából töltöttük le. A homológia alapú modellezés a ClusPro LigTBM (<https://ligtbm.cluspro.org/>) dokkoló szerver segítségével történt.

Enzimkinetikai mérések

Humán és egér tripszinogéneket rekombináns módon állítottuk elő *Echerichia coli* BL21(DE3) baktériumban, majd ecotin affinitás kromatográfiával tisztítottuk meg. A tripszinoldatok koncentrációját úgynevezett aktív-hely titrálással, ecotin segítségével határoztuk meg. A vizsgált tripszin izoformák Michaelis-Menten enzimkinetikai paramétereit GPR-pNA kromogén szubsztráttal határoztuk meg. A K_m és k_{cat} értékek meghatározásához a reakciósebességet a szubsztrátkoncentráció függvényében ábrázoltuk és a telítődési görbét a Prism (GraphPad) számítógépes program segítségével illesztettük.

Ceruleinnel kiváltott hasnyálmirigy-gyulladás a *T7K24R* egerekben

Az állatkísérletek kivitelezése a University of California Los Angeles-en történt (UCLA), az Állatjóléti Bizottság engedélyével. Az *T7K24R* és *C57BL/6N* egerekben a hasnyálmirigy gyulladást 8, óránkénti intraperitonealis cerulein injekcióval (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) váltottuk ki. Az állatokat 96 óra múlva áldoztuk fel, és pancreas illetve vérmintát gyűjtöttünk további vizsgálatokhoz. A tripszin- és kimotripszin-aktivitást *C57BL/6N* és *T7K24R* egerek frissen elkészített pancreas kivonatából mértük.

Dabigatran etexilát-kezelés *T7D23A* és *T7K24R* egerekben

A *T7D23A* és *T7K24R* egereket kétféle módszerrel kezeltük dabigatran etexiláttal; *per os*: 100 vagy 200 mg/kg dózisban intragasztrikus gavage módszerével, vagy 10 mg/g koncentrációban prodrugot tartalmazó szilárd táppal. A kontroll állatok vagy gyógyszermentes vivőanyagot

kaptak vagy standard tápot. A dabigatran plazmakoncentráció-mérés a HEMOCLOT Thrombin Inhibitor Kit segítségével történt.

Statisztika

Az átlagok közti különbséget a Prism 8 (GraphPad) statisztikai program segítségével, két csoport összehasonlítása esetén kétmintás t-próbával, több csoport összehasonlítása esetén ANOVA módszerével elemeztük, Tukey-Kramer post hoc analízissel. Statisztikai szignifikanciát $P < 0,05$ értéknél állapítottunk meg.

EREDMÉNYEK

A PNLIPRP2 gén c.1074G>A (p.W358X) variánsának vizsgálata krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban

Vizsgálatunk során a Magyar Hasnyálmirigy Munkacsoport által összegyűjtött 104 nem alkoholos és 152 alkoholos krónikus pancreatitisben szenvedő beteget, és 200 kontroll alanyt genotipizáltunk. Az általunk amplifikált, a 11-es exonban és az azt közrefogó intronikus régióknak megfelelő 793 bázispáros szakaszban 3 intronikus variánst (c.1070-379delG, c.1070-321T>C és c.1181+55A>C), egy szinonim variánst (c.1161G>A, p.S387=), egy misszensz variánst (c.1084G>A, p.V362I) és a trunkációs c.1074G>A (p.W358X) variánst azonosítottuk. A gyakoribb variánsok, a 1070-321T>C, a p.W358X, a p.V362I, a p.S387= és a c.1181+55A>C konzervált haplotípust alkottak (CAAAC). Egy másik gyakori haplotípus (CGGAA) pedig a c.1070-321T>C és p.S387= variánsokat tartalmazta. Az allélfrekvenciákat tekintve a variánsok megoszlása a beteg és a kontrollcsoport között nem mutatott szignifikáns különbséget. Nem-alkoholos és alkoholos alcsoportonként vizsgálva a betegpopulációt sem találtunk összefüggést a variánsok jelenléte és a betegség között. Genotípuselemzés domináns vagy recesszív modellek alapján sem mutatott szignifikáns eltérést a genotípusok gyakorisága a betegek és a kontrollok között, akár az összes beteget, akár a nem-alkoholos vagy alkoholos betegcsoportokat vizsgáltuk. A három haplotípus a krónikus pancreatitiszes csoportban a kontrollcsoportéhoz hasonlítva nem mutatott jelentős különbséget a CGGAA haplotípust kivéve, amely a nem alkoholos betegcsoportban a kontrollokhoz képest halmozottan fordult elő (OR 1,6, P 0,04). Ezt az összefüggést a limitált elemszám okozta fals asszociációnak véljük.

Ahhoz, hogy a *PNLIPRP2* teljes hosszúságú és csonka alléljainak relatív mRNS expresszióját megítéljük, kadáver donorból származó cDNS és genomi DNS mintákat vizsgáltunk. A 9 vizsgált genomi DNS minta között a trunkációs allélt tekintve 5 heterozigóta és 1 homozigóta

igazolódott. A heterozigóta genomi szekvenciák elektroferogramja két, megközelítőleg azonos méretű jelet mutatott a p.W358X és p.V362I pozícióban. A heterozigóta cDNS minták szekvenálása során azonban egy, a teljes hosszúságú allélnak megfelelő jelet észleltünk ugyanezen pozíciókban, de a minor csonka allélnak megfelelő jelek nem volt detektálhatók. A trunkációs allélra homozigóta cDNS PCR amplifikációja alátámasztotta az mRNS expresszió hiányát, miután gélelektroforézis során nem volt kimutatható mennyiségű PCR termék látható. Ezzel a megfigyeléssel egybevág, hogy a Genotype-Tissue Expression (GTEx) Portal adatai szerint a csonka haplotípus variánsai mind csökkent *PNLIPRP2* mRNS expresszióval társulnak.

A dabigatran preklinikai vizsgálata krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban

Hipotézisünkben azt vetettük fel, hogy a dabigatran etexilát terápiás hatása a hasnyálmirigy-gyulladás kezelésében a dabigatran tripszingátló hatásával függ össze. Mivel a dabigatran egy benzamidin származék, ezért várható, hogy a tripszint és tripszinszerű enzimeket kompetitíven gátolja. Tudomásunk szerint azonban ezt a gátló hatást humán és egér tripszin izoformákon ezidáig még nem vizsgálták.

A dabigatran tripszingátló hatásának igazolására először homológia alapú szerkezeti modellezéssel mutattuk be, hogy a dabigatran képes kötődni a tripszin szubsztrátkötő zsebéhez. Modellünkön látható, hogy a dabigatran a humán mezotripszinhez (1H4W szerkezet, PDB) kötődik, ahol a dabigatran amidin része kölcsönhatásba lép a tripszin szubsztrátkötő zsebében az Asp194 oldallánccal, és a benzamidint, a disztális piridin gyűrűt, illetve a propánsav véget összekötő N-metil-benzimidazol váz az enzim katalitikus triádja fölött helyezkedik. A dabigatran benzamidin része átfedésben van az 1H4W mezotripszinhez kötött benzamidinnel.

Annak érdekében, hogy összehasonlítsuk a benzamidin és a dabigatran gátló hatásának mértékét, enzimkinetikai méréseket végeztünk 3 humán tripszin izoformán (PRSS1, PRSS2, PRSS3) és 4 egér tripszin izoformán (T7, kationos tripszin és T8, T9, T20, anionos tripszinek). A benzamidin esetében mikromoláris K_i értékeket mértünk (3,3–20,6 μM és 4,2–22,6 μM , egyéni illesztések átlagolása, illetve a teljes adatsor globális illesztése alapján), míg a dabigatran körülbelül 200–400-szor erősebb gátlószernek bizonyult, nanomoláris K_i értékeket mutatva (10–65 nM és 10,3–78,9 nM, egyéni illesztés átlagolása, illetve a teljes adatsor globális illesztése alapján). A benzamidin az anionos tripszin izoformák aktivitását a kationos tripszinek aktivitásánál némileg erősebben gátolta, ám ez a tendencia a dabigatran esetében kevésbé volt szembetűnő. A dabigatran korábban marha tripszinen mért és közölt K_i értéke és az általunk mért érték lényegében megegyeztek. A dabigatran a humán tripszineket legalább olyan mértékben, de inkább erősebben gátolta, mint az egértripszineket, ami arra utal, hogy a

preklinikai egérkísérletek eredményei felhasználhatók lesznek a későbbi klinikai vizsgálatok tervezésében. Kísérleteink azt mutatják, hogy a benzamidin származékok, mint pl. a dabigatran, általánosan hatásosak többféle tripszin ellen és gátló hatásuk sokkal erősebb, mint az anyavegyületé.

Megmértük C57BL/6N egerekben a dabigatran plazmakoncentrációját dabigatran etexilát orális adminisztrációját követően. Először az intragasztrikus gavage módszerét alkalmaztuk, mely során 1x100 mg/kg dózisu dabigatran etexilát után követtük az egérplazma hatóanyag szintjét 8 órán keresztül. A dabigatran szint a gavage-t követően 30 percen belül meredek emelkedésnek indult, majd maximumát 1 óra múlva érte el, ami után gyorsan csökkent, és a 4 és 8 órás mérési pontokban már csak igen alacsony dabigatran szint volt detektálható. Fontos megjegyeznünk, hogy a csúcskoncentrációk több, mint két nagyságrenddel a tripszingátlás K_i értékei felett voltak. Második kísérletünkben az egereket 10 mg/g koncentrációan dabigatran etexilátot tartalmazó szilárd táppal etettük egy héten keresztül, majd megmértük a plazma hatóanyag koncentrációját. A hosszútávú etetés alacsonyabb, de állandóbb plazmakoncentrációt eredményezett, a mért értékek túlnyomó része a 600-800 nM-os tartományba esett. Ez a gyógyszer szint még mindig 10-szer magasabb, mint a dabigatran K_i értéke, amelyet az egértripszinek esetében mértünk. A harmadik kísérlet során 3 hetes T7D23A és C57BL/6N egerek dabigatran plazmaszintjét vizsgáltuk, miután 1 héten keresztül dabigatran etexilátot tartalmazó tápot (10 mg/g) fogyasztottak. A C57BL/6N és T7D23A egerek plazmaszintje között nem észleltünk szignifikáns különbséget, amely azt bizonyítja, hogy a két egértörzs hasonlóképpen fogyasztott a gyógyszer tartalmazó tápból, illetve, hogy a T7D23A egerekben spontán kialakuló krónikus pancreatitis nem befolyásolta a dabigatran hasznosulását a szervezetükben.

A T7K24R egértörzs a p.K24R mutációt hordozza a kationos egértripszinogénben (T7 izoforma), amely megfeleltethető a hasnyálmirigy-gyulladással asszociált humán p.K23R mutációnak a PRSSI génben. Ismert, hogy a T7K24R egerekben a ceruleinnel kiváltott hasnyálmirigy-gyulladás progresszív lefolyású, mivel egyetlen akut epizód után kifejezett, fibrózissal és makrofág beszűrődéssel társuló mirigysejt-sorvadás alakul ki a pancreasban. Mielőtt a dabigatran hatását teszteltük ezen egérmodellen, megvizsgáltuk az egerek intrapancreatikus tripszin és kimotripszin aktivitását 8, óránként beadott cerulein vagy fizioológias sóoldat intraperitoneális injektálása után. A proteázok aktivitását a cerulein beadásától számított 1 óra múlva, illetve 1, 2 és 3 nap múlva mértük meg. A ceruleinnel oltott C57BL/6N egerekhez képest a T7K24R egerekben a hasnyálmirigyben lévő tripszin aktivitása

legalább 10-szer olyan magas volt, amely érték az 1. és 2. napon is fennmaradt, majd végül a 3. napon a mirigysejtek sorvadásával egyidőben csökkent le. A kimotripszin-aktivitás szintén magasabb volt a *T7K24R* egerekben. Az 1. napon 20-szor magasabb értéket mutatott, mint C57BL/6N egerekben, majd meredeken zuhant a 2. és 3. napon. Ahogyan az várható volt, a sóoldattal kezelt egerekben nem volt mérhető intrapancreaticus proteázaktivitás. A ceruleinnel kezelt *T7K24R* egerekben mért magas tripszinaktivitás alátámasztotta, hogy a tripszingátló terápia hatásos lehet a pancreatitis kezelésére ebben az egérmodellben. Így kísérleteink során hasnyálmirigy-gyulladást váltottunk ki *T7K24R* egerekben 8, óránként intraperitonálisan beoltott cerulein injekcióval, majd 96 órával később feláldoztuk az állatokat. A dabigatran etexilát teszteléséhez intragasztrikus gavage-t alkalmaztunk, amit az egerek 30 perccel az utolsó injekció után kaptak meg. Negatív kontrollként olyan *T7K24R* egerek szolgáltak, amelyekben nem váltottunk ki gyulladást, a pozitív kontroll csoportba pedig gyógyszermentes vivőanyaggal kezelt, ceruleinnel oltott *T7K24R* egerek tartoztak. Amikor összehasonlítottuk az egerek testsúlyát a kísérlet elején és végén, a gyógyszerrel nem kezelt, pancreatitisben szenvedő egerek súlya enyhe mértékben csökkent. Ez a jelenség a gyors mirigysorvadásal összefüggésbe hozható átmeneti emésztési zavarának köszönhető. Ezzel ellentétben, a dabigatran etexiláttal kezelt, pancreatitisben szenvedő *T7K24R* egerek súlya nem változott, amely megfigyelés a gyógyszer protektív hatását támaszthatja alá. A vivőanyaggal kezelt beteg egerek pancreassúlya szignifikánsan lecsökkent, majdnem a normál pancreassúly felére. A szerv atrófiás súlycsökkenése azután is kimagasló mértékű maradt, miután azt az egerek testsúlyához viszonyítva ábrázoltuk. A pancreas súlya a dabigatran etexiláttal kezelt egereknél jelentős mértékben magasabb volt, sőt, néhány esetben a normál pancreassúlyhoz közeli értékeket észleltünk, ami arra utalt, hogy a gyógyszer kivédte vagy visszafordította az acinusok jelentős mértékű sorvadását. A kezeletlen, pancreatitiszes *T7K24R* egerek plazmájában alacsony amilázaktivitást mértünk 4 nappal a cerulein oltások után, ami hasonló volt a kontroll, pancreatitisben nem szenvedő egerek plazmájában mért amilázaktivitáshoz. Érdekes módon, a dabigatran etexiláttal kezelt 15 állatból 4 esetében több, mint 3-szor magasabb plazma amilázaktivitást mértünk, ami fennálló acinussejt károsodásra utalhat. A 15 gyógyszerrel és 10 gyógyszermentes vivőanyaggal kezelt egér hasnyálmirigyének szövettani elemzése az intakt mirigysejtek nagymértékű veszteségét mutatta a gyógyszermentes vivőanyaggal kezelt csoportban. Az állatok majdnem felében a dabigatran kiemelkedő, egyes esetekben teljes gyógyuláshoz vezető terápiás hatást fejtett ki. Jelentős, ám nem teljes (30-50% intakt acinussejt) terápiás hatást észleltünk az egerek körülbelül 20%-ában, míg az állatok 30%-ában a kezelés hatása korlátozott mértékű volt, beleértve 2 esetet, ahol egyáltalán nem értünk el

hatást. A 4, emelkedett plazma amilázaktivitást mutató, gyógyszerrel kezelt egér hasnyálmirigyének szövettani elemzése részleges hatást mutatott, 13%, 15%, 35%, illetve 45%-nyi látható ép mirigysejttel. Összeségében elmondható, hogy az ép acinusok száma a dabigatran etexiláttal kezelt csoportban szignifikánsan magasabb volt a kizárólag vivőanyagot kapott kontrollcsoporthoz képest, amely arra enged következtetni, hogy a dabigatran a tripszin-függő pancreatitis ezen modelljében hatásos.

A dabigatran etexilát terápiás hatását vizsgáltuk egy spontán pancreatitisben szenvedő egérmodellben is. A *T7D23A* egértörzs a p.D23A mutációt hordozza a kationos egértripszinogénben (T7-es izoforma), amely megfeleltethető a humán *PRSSI* génben található hasnyálmirigy-gyulladással asszociált p.D22G mutációnak. Ezen mutáció a tripszinogén autoaktivációját 50-szeresére növeli és már fiatal egerekben (3-5 hetes korban) spontán kialakuló, progresszív hasnyálmirigy-gyulladásához vezet. Az első kísérlet során 3 hetes *T7D23A* egereket kezeltünk két héten keresztül különböző dózisu dabigatran etexiláttal napi egyszeri 100 mg/kg, napi kétszeri 100 mg/kg és napi egyszeri 200 mg/kg intragasztrikus gavage-t alkalmazva. Kontrollként kezeletlen *T7D23A* egereket és *C57BL/6N* egereket használtunk. Az egereket 5 hetes korban áldoztuk fel. Ezen életkorra a *T7D23A* egereknél korai krónikus hasnyálmirigy-gyulladás alakul ki. A kísérleti időszakban mindkét egértörzs súlya gyarapodott, tehát a gavage nem befolyásolta az étkezésük minőségét, a súlygyarapodás mértéke enyhén volt csak alacsonyabb a *T7D23A* egerekben a *C57BL/6N* egerekhez képest. A kezeletlen *T7D23A* egerek hasnyálmirigy tömege a kezeletlen *C57BL/6N* egerekéhez viszonyítva sokkal alacsonyabb volt, amely a korai krónikus pancreatitisben kialakuló masszív pancreas sorvadásnak köszönhető, s ez a különbség az értékek testsúlyhoz történő normalizálása után is kifejezett maradt. A *T7K24R* egerekben megfigyelt hatással ellentétben, a *T7D23A* egerekben a dabigatran etexilát kezelés nem javított a pancreas súlyokon, sőt, egyértelmű romló tendenciát mutatott a pancreas súlycsökkenés mértéke a növekvő dabigatran etexilát dózissal, bár a mért különbségek a statisztikailag szignifikáns szintet nem érték el. A plazma amilázaktivitás alacsony volt a kezeletlen *T7D23A* egerekben a *C57BL/6N* egerekhez képest, de szignifikáns különbség nem volt kimutatható a két csoport között ebben az esetben sem. A kisebb pancreassúlynak megfelelően a kezelt *T7D23A* egerekben alacsonyabb volt a plazma amilázaktivitás a kezeletlen *T7D23A* kontrollokhöz képest. A pancreas szövettani elemzése hasonló súlyosságú krónikus pancreatitis képét mutatta mindkét *T7D23A* csoportban, míg a *C57BL/6N* kontroll állatok hasnyálmirigye normális morfológiájú volt. Ezen kísérlet eredményei azt mutatják, hogy a dabigatran etexilát intragasztrikus gavage-zsal történő

adagolása nem védi ki vagy gyógyítja meg a *T7D23A* állatokban kialakuló spontán hasnyálmirigy gyulladást. Feltételezzük, hogy *T7D23A* egérmodell esetében egyenletes, folyamatos gyógyszerkoncentrációra van szükség a plazmában ahhoz, hogy létrejöjjön a teljes mértékű tripszingátlás a pancreasban és ezáltal a betegséget hatékonyan kezelni tudjuk.

Következésképpen megvizsgáltuk milyen hatást érünk el akkor, ha a szilárd tápba kevert dabigatran etexiláttal (10 mg/g) etetjük a *T7D23A* egértörzset. Háromhetes egereket 1 héten keresztül tápláltunk a gyógyszert tartalmazó táppal, majd 4 hetesen feláldoztuk őket. 4 vizsgálati csoportot különböztettünk meg a kísérlet során: kezelt és kezeletlen C57BL/6N kontrollokat, illetve kezelt és kezeletlen *T7D23A* egereket. Az összes csoportban az egerek súlya ugyanolyan mértékben gyarapodott az egyhetes kezelés alatt, amely azt mutatja, hogy kielégítő mértékben fogyasztottak a gyógyszertartalmú tápból. A gyógyszerrel kezelt *T7D23A* egerekben a hasnyálmirigy súlyának kismértékű növekedése volt megfigyelhető. Mivel hasonló mértékű pancreas súly növekedést láttunk C57BL/6N egerekben is, arra következtettünk, hogy ez a jelenség nem áll összefüggésben a pancreatitis-szel. Ismert, hogy a tripszininhibitorok hosszútávú alkalmazása egereknél a pancreas tömegének növekedését okozza egy a kolecisztokininhez kötött visszacsatolási mechanizmussal. Kísérleteinkben is ennek lehettünk tanúi. A plazmában mért amilázaktivitás hasonló mértékű volt mind a 4 csoportban. A szövettani képek normál pancreas hisztológiai képét mutatták C57BL/6N egerekben és korai fázisú krónikus pancreatitist *T7D23A* egerekben, a dabigatran etexilát kezelésnek nem volt látható hatása. Összeségében elmondhatjuk, hogy az *T7D23A* egerek dabigatran etexilátot tartalmazó táppal történő kezelésének eredményei azt mutatják, hogy a gyógyszer nem befolyásolta a spontán hasnyálmirigy-gyulladás kialakulását.

DISZKUSSZIÓ

Munkánk során egy potenciális genetikai rizikó faktort vizsgáltunk krónikus pancreatitisben és preklinikai vizsgálatokat végeztünk egy olyan gyógyszeren, amely ígéretes lehet, mint az örökletes pancreatitis terápiája.

A PNLIPRP2 gén c.1074G>A (p.W358X) variánsának vizsgálata krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban

Ezen tanulmányunkban megvizsgáltuk, hogy egy gyakori genetikai variáns a *PNLIPRP2* génben megnöveli-e a krónikus pancreatitis kialakulásának esélyét. A p.W358X variáns egy korai stop kodont hoz létre a fehérjét kódoló génben, amely a transzlációt leállítja és ezáltal egy

rövidebb, csonka PNLIPRP2 fehérjét eredményez. A p.W358X variáns és a krónikus pancreatitis kialakulása között nem találtunk összefüggést sem a teljes beteg kohorszban, sem pedig az alkoholos vagy a nem alkoholos csoportokat külön vizsgálva. Megállapíthatjuk tehát, hogy a variáns nem rizikófaktora a krónikus hasnyálmirigy-gyulladásnak. Korábbi irodalmi adatok szerint a p.W358X variáns megnövelheti a betegség kialakulásának esélyét, amennyiben a hibás feltekeredés miatt ER stresszt vált ki és ez korai mirigysejthalálhoz vezetne. Ez a forgatókönyv azonban csak akkor lépne érvénybe, ha a *PNLIPRP2* elég nagy mértékben fejeződne ki ahhoz, hogy az ER fehérje feltekerő kapacitását túlterhelje. Kísérleteinkben megvizsgáltuk a p.W358X allél expresszióját a teljes hosszúságú, vad típusú *PNLIPRP2* allélhoz képest. Ehhez PCR-rel amplifikáltunk olyan humán pancreasból származó cDNS-eket, amelyek heterozigóta vagy homozigóta formában hordozzák a *PNLIPRP2* p.W358X variánst, majd a PCR termékek analíziséből következtettünk az mRNA expresszió mértékére. Eredményeink alapján a p.W358X variáns a *PNLIPRP2* génben drámaian lecsökkentette az mRNA expressziót a teljes hosszúságú allélhoz képest. Minden bizonnyal, a p.W358X variánst kódoló mRNA egy degradációs mechanizmuson, az úgynevezett nonszensz mediált mRNA lebontáson megy keresztül. Az általunk végzett vizsgálatok adatai alapján az mRNA expresszió a csonka variáns esetében elhanyagolható mértékű. Az alacsony mRNA expresszióra való tekintettel nem valószínű, hogy a csonka variáns funkciónyerés révén okozna krónikus pancreatitist vagy megnövelné a betegség kialakulásának kockázatát, mint ahogyan arra korábbi, transzfektált sejttenyészetben végzett tanulmányok utaltak.

A *PNLIPRP2* p.W358X allél igen magas prevalenciája (48%-os allélfrekvencia) az átlagos populációban arra utal, hogy ez a variáns közvetlenül nem lehet felelős semmilyen emberi kórkép kialakulásáért. Elképzelhető azonban, hogy a fehérje lipázfunkciójának elvesztése mégis hatással van az emberek egészségügyi állapotára, pl. befolyásolja a táplálék hasznosításának a hatékonyságát és ezáltal a növekedést. Felmerül annak a lehetősége is, hogy a p.W358X variáns embereknél egy teljesen jóindulatú funkcióvesztéssel járó genetikai elváltozás, aminek hatását más lipázok teljes mértékben kompenzálják.

A dabigatran preklinikai vizsgálata krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban

Tanulmányunk egyik fő célja volt a tripszin gátlásának lehetséges terápiás vagy preventív szerepét feltárni krónikus pancreatitisben. Főként azon hipotézisünket szerettük volna vizsgálni, mely szerint a dabigatran etexilát nemrégiben publikált terápiás hatékonysága transzgén egerekben létrehozott kísérletes pancreatitis esetén a gyógyszer tripszingátló hatásának volt köszönhető. Először, a dabigatran molekula tripszinhez való kötődését

modelleztük homológia-alapú dokkolással és igazoltuk a dabigatran kötődését a tripszin szubsztrátkötő zsebéhez. Kísérletesen megerősítettük, hogy a dabigatran az összes általunk vizsgált tripszin izoformát hasonlóképpen és mértékben gátolja, illetve, hogy többszázszorosan erősebb kompetitív inhibitor, mint kiindulási vegyülete, a benzamidin. Kísérleteink megmutatták, hogy az olyan benzamidin származékokkal, mint a dabigatran, igen erős tripszingátlóhatást lehet elérni és ezek a vegyületek hatásosak a különböző tripszinfajták ellen. Egérkísérletekkel bizonyítottuk, hogy a dabigatran etexilát szájon át történő adagolása olyan mértékű plazmakoncentrációt eredményez, amely teljesen gátolhatja a tripszint a pancreasban. Ezzel a gyógyszerelési módszerrel azonban a dabigatran szint a vérben viszonylag gyorsan csökkent és a gyógyszer pár órán belül szinte teljesen eliminálódott a plazmából. Amikor a dabigatran etexilátot szilárd tápba keverve (10 mg/g) adagoltuk az egereknek, alacsonyabb, de egyenletesebb plazmaszintet tudtunk elérni (~300-400 ng/mL), amely még mindig 10-szer magasabb volt, mint a tripszin izoformákkal mért K_i értékek.

Azért, hogy jellemezzük a dabigatran-etexilát hatását tripszin-függő pancreatitisben, két, a Sahin-Tóth laboratórium által nemrégiben kifejlesztett egérmodellt használtunk, a homozigóta *T7K24R* egereket és a heterozigóta *T7D23A* egereket. A *T7K24R* egereken végzett kísérleteink eredményei megerősítették a dabigatran etexilát korábban publikált hatásosságát cerulein által kiváltott, progresszív krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban. Megállapítottuk, hogy egyetlen, az utolsó cerulein injekció után nem sokkal adott dabigatran etexilát gavage elegendő volt a terápiás hatás eléréséhez. Érdekes módon némi variabilitás volt látható a terápiás hatásra vonatkozóan. Úgy sejtjük, hogy a tripszin teljes mértékű gátlásához a pancreasban nem mindig elegendő a dabigatran plazmaszintje, amit egyrészt befolyásolhat a gavage sikeressége, másrészt pedig a béltraktusból történő felszívódás mértéke. A plazma dabigatran koncentrációja egy adag gavage beadása után 1 óra múlva érte el csúcspontját, amely szintén azt a nézőpontunkat erősíti, hogy a gyógyszerfelszívódás és a vérkoncentráció kritikus pontjai a terápiás hatékonyság mértékének.

Más kísérletekben a spontán, gyorslefordulású krónikus pancreatitisben szenvedő *T7D23A* egereket vizsgáltuk. A dabigatran etexilát hatását korai életkorban, a pancreatitis kezdetén teszteltük 1 és 2 hetes gyógyszerdozírozási sémákat alkalmazva. Az egereket naponta kivitelezett gavage-zsal kezeltük, vagy gyógyszert tartalmazó szilárd táppal etettük. Meglepő módon egyik módszer sem bizonyult hatásosnak. Úgy véljük, hogy a *T7D23A* egerek vérében elért dabigatran koncentráció nem volt elegendő a terápiás tripszingátlás kiváltásához. Feltehetően a gavage által elért, rövid ideig fennálló csúcskoncentráció lehetett volna elégséges

ehhez, de a gyógyszeres táppal csak ennél jelentősen alacsonyabb szintet tudtunk a vérben elérni. Megjegyezzük, hogy a *T7K24R* egerekhez képest a *T7D23A* egerek egy sokkal erősebb hatást kiváltó, ezáltal agresszívebb fenotípusos megjelenést okozó tripszinogén mutációt hordoznak. Ebből kifolyólag feltételezhető, hogy a *T7D23A* egerek sokkal magasabb dabigatran vérkoncentrációt igényelnek a tripszinaktivitás sikeres gátlásához a hasnyálmirigyben. A dózis függés mellett szól az a megfigyelésünk is, hogy a legnagyobb hatást a napi kétszer adott gavage-nál figyeltük meg.

Kísérleteink célja annak igazolása volt, hogy a dabigatran etexilát alkalmazása a dabigatran tripszingátló hatása révén fejt ki terápiás hatást pancreatitisben. Bár az eredményeink nagy része támogatja ezt a hipotézist, itt kell megemlítenünk, hogy a dabigatran más élettani folyamatokat is befolyásol, amelyek hatással lehetnek a pancreas gyulladásának mértékére vagy elősegíthetik a szerv regenerációját. Dr. Baoan Ji közleményében azt vetette fel, hogy a gyógyszer véralvadásgátló hatása lehet felelős vagy legalábbis hozzájárul a pozitív terápiás hatáshoz. Figyelemre méltó azonban, hogy kísérleteik során a tripszingátló hatással nem rendelkező Xa faktort gátló apixaban (100 mg/kg) nem befolyásolta a pancreatitis súlyosságát. Ezzel ellentétben, amikor apixabant és a szerin proteáz gátló camostatot (200 mg/kg) egyszerre alkalmazták kezelés gyanánt, igen kedvező hatást értek el, míg kizárólag camostat adásával csak részleges hatás volt megfigyelhető. Ennek lehetséges magyarázata az, hogy a véralvadásgátló apixaban elősegíti a tripszingátló camostatnak a bejutását a pancreas szövetbe, ezzel növelve annak terápiás hatásosságát. Korábbi rágcsálókön végzett, illetve klinikai kohorsz tanulmányok is kimutatták, hogy az antikoaguláns terápia előnyös lehet pancreatitisben, mert feltehetően a fibrindepozitumok eltávolítása révén javítja a szöveti mikrokeringést és ezáltal az oxigénellátást.

Kísérletes eredményeinket összefoglalva, úgy érezzük, hogy bizonyítottuk a koncepciónkát, miszerint a tripszinaktivitás gátlása pancreatitisben terápiás jelenetőséggel bírhat. Kimutattuk, hogy a benzamidin származékok, mint pl. a dabigatran, hatékony tripszingátlók és ezáltal egy ígéretes terápiás lehetőséget jelentenek a hasnyálmirigy-gyulladás kezelésében. Ezen preklinikai eredmények alapján a jövőbeni humán klinikai vizsgálatok tervezése a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás olyan formáira kell fókuszáljon, amiben a tripszin kiemelkedő szerepet játszik, mint pl. a tripszinogén mutációk által okozott örökletes pancreatitis.

ÖSSZEGZÉS ÉS ÚJ MEGFIGYELÉSEK

A PNLIPRP2 gén c.1074G>A (p.W358X) variánsának vizsgálata krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban

1. A genetikai asszociációs eset-kontroll vizsgálatunk során nem találtunk összefüggést a *PNLIPRP2* gén p.W358X variánsa és a krónikus pancreatitis között.
2. Megállapítottuk, hogy a *PNLIPRP2* gén p.W358X alléljának mRNS expressziója nem kimutatható a humán hasnyálmirigyben a teljes hosszúságú, vad típusú *PNLIPRP2* allélhoz viszonyítva, amelyből arra következtetünk, hogy a variáns mRNS lebomlik a nonszensz mutáció miatt.

A dabigatran preklinikai vizsgálata krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban

1. Bizonyítottuk, hogy a véralvadásgátló dabigatran gátolta mind a humán, mind az egér tripszin izoformák aktivitását.
2. Igazoltuk, hogy a dabigatran etexilát orális alkalmazása gavage módszerével vagy szilárd tápba keverve potenciálisan terápiás dabigatran koncentrációt eredményezett a vérben.
3. Kimutattuk, hogy egy tripszin-függő pancreatitis egérmodell, a *T7K24R* törzs esetében egyetlen adag dabigatran etexilát elengedő a ceruleinnel kiváltott akut hasnyálmirigy-gyulladás progressziójának a megelőzéséhez és a szövettanilag igazolt pancreas gyógyuláshoz.
4. Megállapítottuk, hogy a spontán, tripszin-függő krónikus pancreatitis kialakulására *T7D23A* egerekben nincs hatással a hosszantartó, szájon át történő dabigatran etexilát kezelés. A hatástalanság oka feltételezhetően az egerek erős gyulladásoz fenotípusa, illetve az elégtelen dabigatran koncentráció a hasnyálmirigyben.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném hálámat kifejezni témavezetőimnek és mentoraimnak, Prof. Dr. Sahin-Tóth Miklósnak és Dr. Hegyi Eszternek, akik lehetőséget teremtettek számomra, hogy dolgozzak, tanuljak és fejlődjek doktoranduszi éveim alatt. Őszinte szívvel értékelem és tisztelem a végtelen támogatásukat és a nélkülözhetetlen szakértelmüket, amely vezetett ezen évek alatt és lehetővé tette a kutatói munkám elvégzését.

Szeretném kifejezni külön köszönetemet Dr. Németh Balázsnak, aki mindig instruált, bátorított és feltétel nélkül támogatott mind egyetemi tanulmányaim, mind doktoranduszi éveim során, bevezetett a kutatás alapvető módszereinek elsajátításába és megtanította számomra tudományos hozzáállás fontosságát.

Szeretném megköszönni Dr. Janszó Zsanettnek és Dr. Demcsák Alexandrának az értékes közreműködésüket, tanácsaikat és segítségüket, amelyet munkám során nyújtottak az Egyesült Államokban.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Hegyi Péternek és a Magyar Hasnyálmirigy Munkacsoport Munkatársainak, akik támogatására és segítségnyújtására mindig számíthattam.

Ezen dolgozatot a csodálatos családomnak és barátaimnak ajánlom, főként szüleimnek, Horváth Beatrixnak és Pesei Zsolt Lászlónak, illetve nővéremnek, Pesei Fruzsina Beatrixnak, akik a hittek bennem és arra tanítottak, hogy soha ne adjam fel.