

Na⁺/H⁺ cserélő szabályozó faktor-1 és az Aquaporin-1 szerepe az experimentális akut pancreatitis patomechanizmusában

Ph.D. Tézis



Balla Zsolt

Témavezető:

Ifj. Prof. Dr. Rakonczay Zoltán MD., Ph.D., D.Sc.

Kórleletani Intézet,
Szegedi Tudományegyetem,
Szeged, Magyarország

Szeged

2019

A dolgozat témájához szorosan kapcsolódó cikkek:

- I. Pallagi P*, **Balla Z***, Singh AK*, Dósa S, Iványi B, Kukor Z, Tóth A, Riederer B, Liu Y, Engelhardt R, Jármay K, Szabó A, Janovszky A, Perides G, Venglovecz V, Maléth J, Wittmann T, Takács T, Gray MA, Gácser A, Hegyi P, Seidler U, Rakonczay Z Jr. The role of pancreatic ductal secretion in protection against acute pancreatitis in mice. *Crit Care Med.* 2014 [**IF**₂₀₁₄: **6.312**]; 42(3):e177-88. PMID: 24368347. *The first three authors contributed equally.
- II. Venglovecz V, Pallagi P, Kemény LV, Balázs A, **Balla Z**, Becskeházi E, Gál E, Tóth E, Zvara Á, Puskás LG, Borka K, Sandler M, Lerch MM, Mayerle J, Kühn JP, Rakonczay Z Jr, Hegyi P. The importance of aquaporin 1 in pancreatitis and its relation to the CFTR Cl(-) channel. *Front Physiol.* 2018 [**IF**₂₀₁₈: **3.201**]; 9:854. PMID: 30050452.

A dolgozat témájához szorosan nem kapcsolódó cikkek:

- I. Rumbus Z, Toth E, Poto L, Vincze A, Veres G, Czako L, Olah E, Marta K, Miko A, Rakonczay Z Jr, **Balla Z**, Kaszaki J, Foldesi I, Maleth J, Hegyi P, Garami A. Bidirectional Relationship Between Reduced Blood pH and Acute Pancreatitis: A Translational Study of Their Noxious Combination. *Front Physiol.* 2018 [**IF**₂₀₁₈: **3.201**]; 9:1360. PMID: 30327613.
- II. Balázs A, **Balla Z**, Kui B, Maléth J, Rakonczay Z Jr, Duerr J, Zhou-Suckow Z, Schatterny J, Sandler M, Mayerle J, Kühn JP, Tizslavicz L, Mall MA, Hegyi P. Ductal Mucus Obstruction and Reduced Fluid Secretion Are Early Defects in Chronic Pancreatitis. *Front Physiol.* 2018 [**IF**₂₀₁₈: **3.201**]; 9:632. PMID: 29896115.
- III. Katona M, Hegyi P, Kui B, **Balla Z**, Rakonczay Z Jr, Rázga Z, Tizslavicz L, Maléth J, Venglovecz V. A novel, protective role of ursodeoxycholate in bile-induced pancreatic ductal injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2016 [**IF**₂₀₁₆: **3.468**]; 310(3):G193-204. PMID: 26608189.
- IV. 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 [**IF**₂₀₁₅: **3.057**]; 10(2):e0117588. PMID: 25688985. *The first two authors contributed equally.

- V. Aranyi P, Turoczi Z, Garbaisz D, Lotz G, Geleji J, Hegedus V, Rakonczay Z, **Balla Z**, Harsanyi L, Szijarto A. Postconditioning in major vascular surgery: prevention of renal failure. *J Transl Med.* 2015 [**IF**₂₀₁₅: **3.691**]; 13:21. PMID: 25622967.
- VI. Maléth J, Balázs A, Pallagi P, **Balla Z**, Kui B, Katona M, Judák L, Németh I, Kemény LV, Rakonczay Z Jr, Venglovecz V, Földesi I, Petó Z, Somorác Á, Borka K, Perdomo D, Lukacs GL, Gray MA, Monterisi S, Zaccolo M, Sendler M, Mayerle J, Kühn JP, Lerch MM, Sahin-Tóth M, Hegyi P. Alcohol disrupts levels and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to promote development of pancreatitis. *Gastroenterology.* 2015 [**IF**₂₀₁₅: **18.187**]; 148(2):427-39.e16. PMID: 25447846.
- VII. Kui B, **Balla Z**, Végh ET, Pallagi P, Venglovecz V, Iványi B, Takács T, Hegyi P, Rakonczay Z Jr. Recent advances in the investigation of pancreatic inflammation induced by large doses of basic amino acids in rodents. *Lab Invest.* 2014 [**IF**₂₀₁₄: **3.676**]; 94(2):138-49. PMID: 24365745.
- VIII. Onody P, Stangl R, Fulop A, Rosero O, Garbaisz D, Turoczi Z, Lotz G, Rakonczay Z Jr, **Balla Z**, Hegedus V, Harsanyi L, Szijarto A. Levosimendan: a cardiovascular drug to prevent liver ischemia-reperfusion injury? *PLoS One.* 2013 [**IF**₂₀₁₃: **3.534**]; 8(9):e73758. PMID: 24040056.
- IX. Garbaisz D, Turóczi Z, Fülöp A, Rosero O, Arányi P, Ónody P, Lotz G, Rakonczay Z, **Balla Z**, Harsányi L, Szijártó A. [Postconditioning can reduce long-term lung injury after lower limb ischemia-reperfusion]. *Magy Seb.* 2013 [**IF**₂₀₁₈: **0.000**]; 66(3):146-54. PMID: 23782601.
- X. Garbaisz D, Turoczi Z, Fulop A, Rosero O, Aranyi P, Onody P, Lotz G, Rakonczay Z, **Balla Z**, Harsanyi L, Szijarto A. Therapeutic option for managing lung injury induced by infrarenal aortic cross-clamping. *J Surg Res.* 2013 [**IF**₂₀₁₃: **2.121**]; 185(1):469-76. PMID: 23751804.
- XI. Czigány Z, Turóczi Z, Bulhardt O, Hegedüs V, Lotz G, Rakonczay Z, **Balla Z**, Harsányi L, Szijártó A. [Remote ischemic conditioning: short-term effects on rat liver ischemic-reperfusion injury]. *Orv Hetil.* 2012 [**IF**₂₀₁₂: **0.000**]; 153(40):1579-87. Hungarian. PMID: 23022881.

- XII. Biczó G, Hegyi P, Dósa S, **Balla Z**, Venglovecz V, Iványi B, Wittmann T, Takács T, Rakonczay Z Jr. Aliphatic, but not imidazole, basic amino acids cause severe acute necrotizing pancreatitis in rats. *Pancreas*. 2011 [**IF₂₀₁₁: 2.386**]; 40(3):486-7. PMID: 21412124.

Összes publikáció:	14
Összesített impakt faktor:	56.038

1 BEVEZETÉS

1.1 A hasnyálmirigy szerkezete, alapvető működése

A hasnyálmirigy exokrin és endokrin részekből tevődik össze. Az exokrin hasnyálmirigy naponta megközelítőleg 2 l izotóniás nedvet szekretál, amely bikarbonátban (HCO_3^-) gazdag folyadék és tartalmazza az emésztőenzimeket. Az exokrin hasnyálmirigy két fő sejt típusa: a mirigyállomány jelentős részét kitevő acináris sejtek (az emésztőenzimek termeléséért felelősek), valamint a kisebb részét alkotó dukális sejtek (a bikarbonát és a folyadék szekréciónak és a hasnyálmirigy nedv továbbításáért felelős). A dukális sejtek egy komplex, cső alakú hálózatot képeznek, amelyek az egész mirigyen végighaladnak és egy végső vezetékben (ductus Wirsungianus) egyesülnek.

1.2 Duktális bikarbonát és folyadék szekréciónak

A hasnyálmirigy dukális sejtek fő szerepe a HCO_3^- szekréciónak. A HCO_3^- szekréciónak az első lépése, a HCO_3^- felvétele a sejtbe, az extracelluláris térből. Ez a folyamat a bazolaterális membránon keresztül történik: a $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ kotranszporteren át, vagy a CO_2 diffúziójával, melyet ezután a szénsav-anhidráz szénsavvá (H_2CO_3) alakít. Az ebből származó protonokat a Na^+/H^+ cserélők vagy a H^+ pumpák juttatják ki a sejtéből. A H_2CO_3 -ból származó, sejtekben lévő HCO_3^- pedig transzportereken keresztül szekretálódik. Ezt követi a HCO_3^- szekréciónak második lépése: a CFTR-on és a solute carrier anioncserélőkön (SLC26A3, vagy más nevén down regulated in adenoma, DRA; illetve SLC26A6, putative anion transporter-1, PAT-1) keresztül jut ki a dukális sejtekből a bikarbonát a lumenális térbe.

Az emésztőenzimek szerepe már igen jól tisztázott, azonban a hasnyálmirigy elektrolit szekréciónak funkciói, és folyamatai már kevésbé ilyen pontosan leírta, az biztos, hogy segítik az inaktív enzimek transzportját a vékonybél felé, valamint részt vesznek a gyomorsav semlegesítésében és megemelik a duodenumban a pH-t az emésztőenzimeknek szükséges optimális szintre. Ez azért jelentős, mert az acináris sejtek membrádinamikájához és ennek következtében a zymogén granulák exocitóziséhoz rendkívül fontos a semleges vagy lúgos lumenális pH fenntartása. Korábbi vizsgálatokból

már kiderült, hogy az alacsonyabb extracelluláris pH fokozza a szekretagóg által indukált zymogén aktivációt az acináris sejtekben. A legutóbbi vizsgálatok pedig kimutatták –a szegedi munkacsoport eredményeként–, hogy a megfelelő HCO_3^- szekréció elengedhetetlen a tripszin korai autoaktivációjának megakadályozásához, a duktális fában. Sőt mi több, maga a tripszin, az apikális proteínáz-aktivált receptor-2 aktiválásával képes csökkenteni a duktális sejtekben CFTR-függő HCO_3^- szekréciót, ami még további tripszin autoaktiváláshoz vezet. Így tehát a duktális HCO_3^- szekréció csökkenése kiemelten fontos a hasnyálmirigy megóvása érdekében.

1.2.1 A CFTR és a NHERF-1 szerepe a duktális szekrécióban

A CFTR expressziója kifejezett a duktális sejtek apikális membránjában, ám nincs jelen az acináris sejtekben, és megfelelő működése elengedhetetlen a mirigy elektrolit- és folyadékszekréciójának szempontjából. Ennek fontosságát jól mutatja a cisztás fibrózisban (CF) betöltött szerepe, ahol kimutatták, hogy a CFTR-függő folyadékszekréció hiánya a CF-ban szenvedő emberek 85 %-ánál születéskor a mirigy közel teljes pusztulásához vezet.

Az interkalált és/vagy intralobuláris és interlobuláris duktális sejtek expresszálják a CFTR-t (fajoktól függően különböző mértékben), és felelősek annak izotóniás, erősen lúgos, 140 mM NaHCO_3^- tartalmú folyadék kiválasztásáért. A szekréció összetétele azonban az egyes fajokban változó lehet az áramlási sebességtől függően. A maximális sebesség mellett HCO_3^- koncentráció a legtöbb fajnál körülbelül 140mM, kivéve a patkányt és az egeret, ahol a maximum körülbelül 70 mM.

A Na^+/H^+ cserélő szabályozó faktor-1 (NHERF-1, úgy is ismert, mint ezrin kötő fehérje-50, EBP50) egy citoszolikus regulátor fehérje. A NHERF-1 szerepe a hasnyálmirigyben még nem igazán tisztázott. Azonban a NHERF-1 deléciója a CFTR súlyos áthelyeződési zavarát eredményezte, ami jelentősen csökkentette a hasnyálmirigy duktális folyadék- és a bikarbonát szekréciót.

1.2.2 Az SLC26A3/A6 szerepe a duktális bikarbonát szekrécióban

Az SLC26A6-ot (putative anion transporter-1, PAT-1) eredetileg klorid transzporterként azonosították, ám a későbbi vizsgálatok kimutatták, hogy $2\text{HCO}_3^-/1\text{Cl}^-$ cserélőként működik. Néhány laboratóriumban azonban megvizsgálták a HCO_3^- transzport tulajdonságait az SLC26a6 KO egerekből izolált ép hasnyálmirigy-duktális sejtekben,

azonban további vizsgálatokra van szükség az SLC26 anioncserélők szerepének bizonyítására a dukális folyadék és a HCO_3^- szekrécióban.

1.2.3 Az aquaporinok szerepe a dukális folyadékszekrécióban

Az aquaporinok (AQP) olyan kis membránfehérjék, amelyek elsődleges feladata a vízmolekulák szállításának segítése. A legújabb kutatások kiemelik ezek lényeges szerepét bizonyos szabályozási folyamatokban is. Az emlősökben 13 AQP izoformát azonosítottak eddig, és néhányuk expressziós, fajspecifikus mintázatot mutat a hasnyálmirigyben. A humán hasnyálmirigyben az AQP1, -5, -8 és -12 is jelen van. Az AQP1 az első leírt AQP, amely kizárólag a víz számára átjárható. Az AQP1 jelenlétét már igazolták korábban a centroacináris sejtek apikális és laterális plazmamembránjában, valamint az interkaláris és intralobularis dukális sejtek apikális és bazolaterális membránjában. Az AQP5-ről bebizonyították, hogy egy aquaglyceroporin, amely a glicerint, karbamid és más kis oldott anyagok mellett a víz szállítását is segíti. Az AQP5 expresszióját a centroacináris sejtekben nem, csak az interkalált duktusok apikális plazmamembránján mutatták ki. Különösen érdekes, hogy az AQP1 és -5 a CFTR csatornával kolokalizálva található a duktusok apikális membránján, ezzel is igazolva azt, hogy a csatornák befolyásolják egymás működését.

1.3 Acut pancreatitis

Az acut pancreatitis (AP) a hasnyálmirigy heveny gyulladása, melynek súlyossága meglehetősen széles határok között mozog az enyhe formától a súlyos, nemritkán letális kimenetelűig.

1.3.1 Klinikai jellemzők

1.3.1.1 Előfordulásai gyakorisága és etiológiája

Az AP incidenciája országonként eltérő. A nyugati típusú társadalmakban átlagosan 15-45/100.000 lakos/év, jelenleg is kismértékű növekvő tendenciát mutat. Ez az USA-ban évente 200 ezer kórházi felvételt jelent, amely 2-2.5 milliárd dollárral terheli az egészségügyi ellátórendszert.

Az acut pancreatitis kialakulásáért a legtöbb esetben (70-80 %-ban) az alkoholfogyasztás és az epekövesség a felelős. Azonban számos más etiológiai tényező (pl.

gyógyszerek, hipertrigliceridemia, pancreas- vagy Vater papilla tumor, trauma, különböző mumpsz-, H1N1-, Coxsackie vírus, bakteriális infekciók) is ismert. Az esetek 10-20 %-ban azonban nem tudunk igazi kiváltó okot azonosítani.

1.3.1.2 Felosztás

Az AP minél pontosabb diagnosztikájához, súlyossági besorolásához, klasszifikációjához 2011-ben megalkották az átdolgozott Atlanta- klasszifikációt. Ennek alapján megkülönböztetünk enyhe, középsúlyos, valamint súlyos heveny hasnyálmirigy-gyulladást. Az esetek körülbelül 75-80 %-a enyhe, 15-20 %-a középsúlyos, míg kb. 10 %-a súlyos kimenetelű. Enyhe AP esetén lokális vagy távoli szövődmény nem fordul elő. Az enyhe AP esetén a betegek mortalitása mindössze 1 % alatti, középsúlyos pancreatitisben 5 % körüli, míg a súlyos AP során a betegség halálhozása a 30-50 %-os értéket is elérheti.

1.3.1.3 Klinikai tünetek és kezelés

Az AP egyik leggyakoribb tünete a hasi fájdalom, ez többnyire az epigastrium területén érződik, mely a hát felé sugárzódik. A betegen alkalmazott kezelések elsősorban, főként tüneti jellegűek, pl. folyadékpótlás, táplálás, fájdalomcsillapítás, szükség esetén a hasnyálmirigy szekretoros funkcióinak csökkentése és a megfelelő indikációban antibiotikum adása. Az enterális táplálás történhet nasogastricus (jelenleg is vizsgálatok tárgyát képezi), vagy nasojejunalis (klasszikusan elfogadott táplálási mód) úton.

1.3.2 Patomechanizmus

A betegség patomechanizmusa nem teljesen tisztázott, így sajnos specifikus terápia ez idáig nem ismert. Éppen ezért új terápiás célpontok keresése, a gyulladás experimentális és klinikai vizsgálata rendkívül fontos a betegség mortalitásának csökkentése érdekében is. A gyulladás kialakulásának patomechanizmusára több teória is létezik és ismert, amely mechanizmusokat *in vivo* és *in vitro* kísérletekből sikerült megismerni. Valószínűleg ezek mindegyike bizonyos mértékig szerepet játszik a humán heveny hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásában.

A hasnyálmirigyben különböző agresszív és/vagy protektív folyamatok játszanak szerepet a kimenetel súlyosságában. A különböző etiológiai faktorok által inicializált folyamat valószínűsíthetően több paralel szálon fut, amelyek végül a hasnyálmirigy

gyulladásához, súlyos esetben akár sejthalálhoz is vezethetnek. Ezek a folyamatok: tripszinogén korai aktivációja, a nukleáris faktor kappa-B (NF- κ B) aktivációja, korai acináris mitokondrium károsodás, hősokkfehérjék (pl. HSP-72), fehérvérsejtek, oxidatív stressz, gyulladásos mediátorok, valamint a duktális szekréció szerepe.

2 CÉLKITŰZÉSEK

Tudományos vizsgálataim során az alábbi célkitűzéseim voltak:

- megvizsgálni a NHERF-1 fehérje szerepét akut experimentális pancreatitisben
- megvizsgálni az AQP-1 csatorna szerepét akut experimentális pancreatitisben

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Etikai engedélyek és állatok

Az állatkísérleteket a laboratóriumi állatok gondozásáról és felhasználásáról szóló útmutató (2010/63/EU irányelv) szerint végeztük. Ezen túlmenően a kísérleti protokollt a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága és az Állatkísérletek Országos Tudományos Etikai Bizottsága (Budapest, Magyarország) jóváhagyta.

Az egereket előírásoknak megfelelő állatházban, szokásos műanyag ketrecekben tartottuk szobahőmérsékleten (23 ± 1 °C), ahol mesterséges 12 órás megvilágítást biztosítottunk. A rágcsálók az ivóvízhez, valamint a laboratóriumi táphoz szabadon hozzáférhettek. A kísérleteket megelőzően minden egeret genotipizáltunk. A kísérleteket 12-16 hetes vad típusú (WT), és NHERF-1 vagy AQP1 knock out (KO) hím egereken végeztük.

3.2 Az akut pancreatitis indukciója

3.2.1 Cerulein által kiváltott pancreatitis

Az akut pancreatitist (AP) egerekben óránkénti intraperitoneális (i.p.) cerulein injekcióval (7–10-szer) indukáltuk, a ceruleint (50 µg/kg) dózisban alkalmaztuk. A kontroll egereknek fiziológiás sóoldatot (PS) (0,9 % NaCl) adtunk az i.p. cerulein helyett. Kettő órával az utolsó injekció beadása után az egereket pentobarbitál túladagolással (85 mg/kg i.p.) eutanáziában részesítettük. Az egerektől vért vettünk a vena cava inferioron (NHERF-1 kísérletek) keresztül, vagy szív punkciójával (AQP1 kísérletek), és a hasnyálmirigyet azonnal eltávolítottuk. A pancreast jégen tartva, zsírtól és nyirokszövettől megtisztítottuk. A hasnyálmirigy szövetének körülbelül egynegyedét 6 %-os semleges formaldehid oldatba helyeztük, a másik háromnegyedét folyékony nitrogénbe tettük és felhasználásig -80 °C-on tároltuk. Az összegyűjtött vért 4 °C-on 2500 RCF-fel 15 percig centrifugáltuk, és a szérumot felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

3.2.2 Nátrium-taurokolát által kiváltott akut pancreatitis

A nátrium-taurokolátot intraduktálisan (i.d.) alkalmaztuk, amint azt korábban Perides és mtsai. már leírták. Mindez röviden: az érzéstelenítést i.p. ketamin (125 mg/kg) és xilazin (12,5 mg/kg) koktél beadásával végeztük. Medián laparotómiával a duodenumot egy 0,4 mm átmérőjű tűvel lyukasztottuk ki, mely tű másik vége egy polietilén csőhöz csatlakoztatott. A Na-taurokolát szivárgását a biliopancreaticus ductusz átmeneti ligálásával értük el, míg a proximálisan lévő epevezetékét szintén ideiglenesen egy mikroszipesszel zártuk le. A 4% -os nátrium-taurokolátot vagy PS-oldatot infúziós pumpával (10 µl/perc) pumpáltuk 5 percen át. Az infúzió befejezése után eltávolítottuk a mikroszipeszt, megszüntettük a lekötést és a tűt is eltávolítottuk. Rövid ideig monitoroztuk a lehetséges vérzést, majd a hasfalat és a bőrt összevarrtuk. Az állatok testhőmérsékletét a végleges felébredésükig figyeltük és 37 °C-on tartottuk. Az egereket 24 órával az i.d. injekció után túlaltattuk és a vena cava inferioron keresztül vért vettünk. Az ezt követő összes eljárást a cerulein-indukálta pancreatitis esetén leírtak szerint hajtottuk végre. Az egyetlen különbség az volt, hogy ebben az esetben az összes hasnyálmirigy szövetet 6 %-os semleges formaldehid oldatba tettük a szövettani meghatározásokhoz.

3.3 Vizsgálatok és szöveti analízis

Az amiláz aktivitását általánosan használt kolorimetrikus kittel mértük, melyhez mikroplate-olvasót használtunk 405 nm-es hullámhosszúságú fényvel. A hasnyálmirigy acinus sejteinek életképességét 0,4 %-os tripánkék festési módszerrel határoztuk meg. A hasnyálmirigy IL-1 β koncentrációját ELISA segítségével mértük. A hasnyálmirigy HSP-72, I κ B- α és I κ B- β expressziójának meghatározásához Western-blot analízist végeztünk. A hasnyálmirigy mieloperoxidáz (MPO) aktivitását, mint a szöveti leukocita infiltráció markerét, Kuebler és mtsai. által leírt módszer szerint végeztük.

A hasnyálmirigy károsodásának a mértékét az intersticiális ödéma, a leukocita infiltráció, a nekrosis és Na-taurokolát modell esetén a bevérzés mértékének szemikvantitatív osztályozásával értékeltük. A sejtkárosodás (%) mértékét az ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) szoftverrel végzett elemzés is igazolta. A formalinban fixált hasnyálmirigyeket paraffinblokkokba ágyasztuk és 3 μ m vastag szeletekre vágtuk, majd a szokásos hematoxin-eozin festési technikát alkalmazva a metszeteket fénymikroszkóppal elemeztük. A korábban leírtak szerint egy szemikvantitatív pontozási rendszert (0–3) használtunk az AQP1 kísérleteknél. Ödéma (0: nincs, 1: foltos interlobuláris; 2: diffúz interlobuláris; 3: diffúz interlobuláris és interacináris), leukocita infiltráció (0: nincs, 1: foltos interlobuláris; 2: diffúz interlobuláris; 3: diffúz interlobuláris és interacináris). A nekrosis mértékét a teljes elemzett hasnyálmirigy-terület százalékában fejeztük ki.

3.4 Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzést a SigmaPlot (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA) program segítségével végeztük. Az adatokat átlag \pm SEM formájában ábrázoltuk. Mind a parametrikus (egy- vagy kétirányú varianciaanalízis (ANOVA), mind a nem-parametrikus (Kruskal-Wallis) tesztek az adatok eloszlásának normalitása alapján alkalmaztuk (a Shapiro-Wilk teszttel elemeztük). Használtunk post hoc analízist (Dunn- vagy Bonferroni tesztet), melyet a SigmaPlot ajánlásai szerint végeztünk. χ^2 -teszttel határoztuk meg a csoportok közötti különbségeket az elhullott egerek arányában. A $P < 0,05$ értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük.

4 EREDMÉNYEK

4.1 A Cerulein-indukálta acut pancreatitis súlyosabb a NHERF-1 knock-out egerekben

Annak meghatározására, hogy a hasnyálmirigy-szekréciónak csökkentése befolyásolhatja-e az AP kialakulását, WT vagy NHERF-1 KO egereket 10 órán keresztül szupramaximális dózisu cerulein, vagy PS (kontroll) i.p. injekcióval kezeltük.

A kontroll állatok szövettani képe megegyezett a normális hasnyálmirigy-szövettani állapottal. I.p. alkalmazott cerulein injekciók súlyos hasnyálmirigy károsodást okoztak, a nekrozis és az apoptózis aránya is jelentősen magasabb volt a NHERF-1 KO és a WT egerek között. Ugyanakkor szignifikáns különbségeket nem figyeltünk meg az intersticiális ödéma ($2,0 \pm 0,11$ WT vs. $2,2 \pm 0,2$ KO) és a leukocita infiltráció mértékében ($1,72 \pm 0,08$ WT vs. $1,95 \pm 0,13$ KO esetén, $p=0,08$) a ceruleinnel kezelt csoportok között.

A szérumban az amiláz aktivitás szignifikánsan megnőtt a ceruleinnel kezelt és kontroll WT, valamint *NHERF-1-KO* egerekben. Fontos kiemelni, hogy az amiláz aktivitás szignifikánsan magasabb volt a ceruleinnel kezelt *NHERF-1-KO* egerekben. A hasnyálmirigy MPO-aktivitása szignifikánsan emelkedett a ceruleinnel kezelt csoportokban a kontroll csoportokhoz képest, ám a ceruleinnel kezelt WT egerekben az értékek nem különböztek szignifikánsan a ceruleinnel kezelt KO egerekhez képest. A hasnyálmirigy HSP-72 expressziója szignifikánsan növekedett a ceruleinnel kezelt csoportokban a kontroll csoportokhoz hasonlóan, illetve szignifikáns különbségeket figyeltünk meg a ceruleinnel kezelt WT és *NHERF-1-KO* csoportok között.

Az AP patogenezisének kulcsfontosságú eseményei közé tartozik a hasnyálmirigy tripszinogén korai aktiválódása és az NF- κ B proinflammatorikus transzkripciós faktor aktiválása is. Annak érdekében, hogy kizárjuk a NHERF-1 deléciójának a korai tripszinogén és NF- κ B aktivációjára (szabályozott I κ B-k) gyakorolt lehetséges hatását, megmértük a hasnyálmirigy által termelt tripszin aktivitását és az I κ B-k expresszióját i.p. $1 \times 50 \mu\text{g/kg}$ ceruleinnel kezelt egerekben. A cerulein injekció után fél órával a tripszin aktivitása körülbelül 4-szeresére nőtt a kontroll csoportokhoz képest; azonban a WT és az

NHERF-1-KO egerek között nem volt szignifikáns különbség. Az I κ B- α expresszióját tekintve a ceruleinnel kezelt csoportokban sem volt szignifikáns különbség a WT és az *NHERF-1-KO* állatok között.

A hasnyálmirigy I κ B- β expressziója azonban szignifikánsan magasabb volt az *NHERF-1-KO* egerekben a WT kontroll egerekhez képest, ám a ceruleinnel kezelt WT és *NHERF-1-KO* csoportok között nem volt különbség. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az AP súlyosságának a különbsége a WT és az *NHERF-1-KO* egerek között független a hasnyálmirigy tripszinogén és NF- κ B aktivációjától.

A proinflammatorikus citokin IL-1 β expressziója szignifikánsan megemelkedett a ceruleinnel kezelt hasnyálmirigyben a kontroll WT és *NHERF-1-KO* egerekhez képest, de az eltérés nem volt szignifikáns a ceruleinnel kezelt WT és *NHERF-1-KO* egerek között.

Figyelemre méltó, hogy i.p. 7x50 μ g/kg cerulein alkalmazása WT és *NHERF-1-KO* egerekben hasonló hatást váltott ki a vizsgált szövettani és laboratóriumi paraméterekben csakúgy, mint azt a magasabb dózisú cerulein esetén láthattuk. Összességében eredményeink egyértelműen azt mutatják, hogy a cerulein-indukált AP súlyossága alacsonyabb az *NHERF-1*-et expresszáló egerekben.

Az *NHERF-1* deléciónak a kolecisztokinin-receptor funkciójára gyakorolt esetleges káros hatásainak kizárása érdekében megvizsgáltuk a pancreas acinus sejtjeinek cerulein-érzékenységét is. Az acináris sejtek amiláz szekréciója WT és *NHERF-1-KO* állatokból nem mutatott szignifikáns különbséget a cerulein stimulációjára.

4.2 A nátrium-taurokolát intraduktális alkalmazása a *NHERF-1-KO* állatokban nagyobb mértékű acináris sejthalált okoz, mint a vad típusú egerekben

Azt is megvizsgáltuk, hogy az *NHERF-1-KO* egerek eltérően reagálnak-e az i.d. 4%-os Na-taurokolát infúzióval kiváltott AP-re mint a WT egerek. A posztoperatív mortalitás a Na-taurokolát alkalmazása után, a KO egerekben (2/14 állat) nem mutatott szignifikáns különbséget a WT állatokhoz képest (0/10 állat).

A PS i.d. infúziója nem okozott posztoperatív mortalitást, de a szövettani elemzés során enyhe hasnyálmirigy-ödéma és gyulladás volt észlelhető, jelentősebb nekrosis nélkül.

A leukocita infiltráció mértéke szignifikánsan nagyobb volt a PS-tal kezelt *NHERF-1-KO* egerekben, mint a WT állatokban. A hasnyálmirigy duktuszába infundált 4%-os Na-taurokolát nekrotizáló AP-t indukált a feji részen, de a hasnyálmirigy farki régiójában ez nem volt megfigyelhető. Ez utóbbi megállapítás tökéletes összhangban áll más kutatók eredményeivel. Ezért a későbbiekben csak a hasnyálmirigy feji régióját használtuk a szövettani elemzéseinkhez. Az acináris sejtek körülbelül 24%-a volt nekrotikus a WT-ban és körülbelül 47%-a a *NHERF-1-KO* egerekben. Összegezve a különböző csoportok kórszövettani elváltozásait: szignifikánsan magasabb leukocita infiltrációt észleltünk a Na-taurokoláttal kezelt WT csoportokban a PS-tal kezelthez képest. Ezzel szemben nem volt szignifikáns különbség a leukocita infiltrációban a Na-taurokoláttal kezelthez képest a PS kezelésű *NHERF-1-KO* csoportokban és a Na-taurokolát-kezelt *NHERF-1-KO* és WT csoportok között.

A szérum amiláz aktivitása szignifikánsan magasabb volt összehasonlítva a kontroll és a Na-taurokoláttal kezelt csoportokban a kontroll csoportokhoz képest mind a WT, mind a *NHERF-1-KO* egerek esetében, de a Na-taurokoláttal kezelt *NHERF-1-KO* és a WT egerek között nem volt különbség. Nem tapasztaltunk szignifikáns különbségeket a hasnyálmirigy MPO aktivitásában a WT és az *NHERF-1-KO* egerek között az i.d. PS infúzió alkalmazása esetén. Ugyanakkor az MPO-aktivitás növekedett a Na-taurokoláttal kezelt *NHERF-1-KO* csoportban a kontroll egerekhez hasonlóan. A hasnyálmirigy IL-1 β expressziója megemelkedett a Na-taurokoláttal kezelt WT és *NHERF-1-KO* egerekben, szemben a kontroll csoportokkal. A Na-taurokoláttal kezelt WT és *NHERF-1-KO* állatok IL-1 β szintjében azonban nem volt szignifikáns különbség.

Ezek az adatok is azt mutatják, hogy az *NHERF-1* expressziója csökkenti a Na-taurokolát által kiváltott hasnyálmirigy sérülést, ám ez nem feltétlenül befolyásolja a betegség egyéb laboratóriumi paramétereit.

4.3 Az akut pancreatitis súlyossága fokozódik az aquaporin-1 KO egereknél

A hasnyálmirigy szövettani vizsgálata során megállapítható volt, hogy mind a WT, mind az *AQP1* KO állatokban a normálisnak megfelelő struktúrát tapasztaltunk. Annak a hipotézisnek a tesztelésére, hogy az *AQP1* részt vehet a pancreatitis patomechanizmusában,

megvizsgáltuk a cerulein által indukált AP (10x50 µg / kg i.p.) súlyosságát WT és AQP1 KO egerekben. A cerulein injekciók kiterjedt sejtkárosodást okoztak mind a WT, mind a KO állatokban. A hasnyálmirigy-elhalás mértéke jelentősen nagyobb volt az AQP1 KO-ban, mint ($25 \pm 2,8\%$) a WT egerekben ($12,1 \pm 3,2\%$), míg az ödéma mértékében és a gyulladásos sejtek beszivárgásában nem volt szignifikáns különbség.

A hasnyálmirigy szöveti nekrozisa kiterjedtebb volt az *AQP1* KO egerekben, mint a WT egerek csoportjában. Valamint a szérum amiláz aktivitása is szignifikánsan magasabb volt a KO csoportban (1605 ± 6 U/l), mint a WT egerekben (1285 ± 51 U/l) az AP indukciója után. Összességében ezek az eredmények azt mutatják, hogy AQP1 expressziójának hiányában a pancreatitis lefolyása súlyosabb kimenetelű.

5 MEGBESZÉLÉS

Egészen a közelmúltig nem fordítottak komolyabb figyelmet a hasnyálmirigyben található vezetéksejtek AP-ben betöltött patofiziológiai jelentőségének az AP-ben. Általában azt feltételezték, hogy az összes stresszfaktor elsődleges célja az acináris sejtekre korlátozódik, mivel ezek az AP minden formájában megsérülnek. Ugyanakkor mind a klinikai, mind a kísérleti adatok arra utalnak, hogy a hasnyálmirigy duktális sejtjeinek alapvető szerepe van az AP kialakulásában. A hasnyálmirigy folyadék szekréciója jelentősen megnövekszik az AP kezdetén. Ezenkívül az AP-t indukáló ágensek, például etanol, epesavak vagy vírusok in vitro beadása a hasnyálmirigy-csatorna sejtekbe stimulálja a bikarbonát szekréciót. Hipotézisünk tehát az volt, hogy a duktális szekréció a hasnyálmirigy védelmére szolgál, mivel mérgező szereket –például aktivált emésztő enzimeket– mos ki, amikor NHERF-1 fehérje van jelen. Ha ez a duktális védelmi mechanizmus nem kielégítő, akkor a duktális szekréció gátlódik, és a „káros” enzimek nem hagyhatják el a hasnyálmirigyét, így súlyosabb AP-hez vezetnek. A duktális folyadék túlzott szekréciójának kedvező hatását az a tény jelzi, hogy a szekretin, amely a hasnyálmirigy duktális szekréciójának fő közvetítője, védelmet nyújt a cerulein által indukált AP ellen. Ma már összegző bizonyítékok vannak továbbá arra vonatkozóan is,

hogy a hasnyálmirigyben lecsökkent folyadék szekréció szerepet játszik a hasnyálmirigygyulladás patomechanizmusában.

Ebben a tanulmányban megvizsgáltuk az NHERF-1 és az AQP1 szerepét (mindkettő alapvető feladatot lát el a hasnyálmirigy duktális szekréciójában) a kísérleti AP-ben.

5.1 Az NHERF-1 szerepe kísérletes acut pancreatitisben

A kapcsolódó cikkben kimutattuk, hogy az NHERF-1 mRNS nagymértékben expresszálódik az egér hasnyálmirigy-vezetékeiben. Ezen túlmenően az *NHERF-1* genetikai deléciója nagymértékben lecsökkentette a CFTR expresszióját a vezetéksejtek luminális membránjában, és csökkentette mind *in vitro*, mind *in vivo* a hasnyálmirigy hidrogén-karbonát és folyadékszékrecióját is. Ez feltehetőleg hozzájárulhat az acut nekrotizáló pancreatitis súlyosbodásához *NHERF-1* KO egerekben két különálló modellben is. Fontos és érdekes megemlíteni, hogy az AP-szel kapcsolatos korai acináris eseményeket, mint például a tripszinogén és az NF- κ B aktiváció, az NHERF-1 genetikai deléciója nem változtatta meg. Azonban a későbbi események, mint például az apoptózis és nekrozis értékei már megemelkedtek a KO állatokban. Megjegyzendő, hogy az *NHERF-1* genetikai deléciója nem volt káros hatással az acinusok és a gyulladásos sejtek működésére, ezzel is jelezve, hogy a betegség fokozott súlyossága pontosan a csökkent duktális szekréciónak köszönhető.

Vizsgálatunk során nem tettünk különbséget, hogy a HCO_3^- és folyadék szekréció a CFTR csatorna zavara miatt csökkent, vagy a CFTR és más szekrécióban résztvevő transzporterek („solute carrier family 26” (SLC26) anioncserélők) közötti zavar miatt. A CFTR csökkent expressziója az apikális membránban a NHERF 1 KO hasnyálmirigy duktális rendszerében tehát valószínűleg csökkenti a PAT-1 és a DRA aktivitását is.

Több munkacsoport is bebizonyította, hogy a CFTR kötődése az NHERF-hez szabályozhatja a CFTR aktivitását. Az NHERF-1 és a CFTR szokatlanul magas expressziója a hasnyálmirigy duktuszokban meglehetősen különbözik a vékonybélben előforduló expressziós mintázattól. Ezek az eredmények is azt kell, hogy sugallják számunkra, hogy a CFTR és a NHERF-1 kölcsönhatása kulcsfontosságú lehet a hasnyálmirigy duktális szekréciójában.

Vizsgálatunk lenyűgöző megállapítása az volt, hogy a cerulein által kiváltott acut nekrotizáló pancreatitis súlyossága szignifikánsan magasabb volt azokban az állatokban, ahol a NHERF-1 hiányzott (és itt a hasnyálmirigy duktális szekréciója is csökkent), ami arra utal, hogy a WT egerek normális duktális szekréciója védi az acinus sejteket a nekrozistól és apoptózistól egyaránt. Ez a hatás azonban független volt az acinus sejtek cerulein érzékenységében bekövetkezett változásoktól, és azt mutatja, hogy az NHERF-1 expressziója nem szükséges a kolecisztokinin receptor működéséhez. Ez nem meglepő, mivel a *CFTR*-KO egerek a proinflammatorikus citokineket folyamatosan túlzott mértékben expresszálják. Az eredményeink tényének megerősítésére, hogy a csökkent szekréció AP súlyosságára gyakorolt hatása nem volt specifikus a cerulein-indukált modellben, a klinikai szempontból is releváns Na-taurokolát modellben is karakterizáltuk a betegség súlyosságát. A cerulein-indukálta pancreatitis modellben megfigyelt eredményekhez hasonlóan a Na-taurokoláttal indukált AP-ben az acináris sejtkárosodás szignifikánsan nagyobb volt az *NHERF-1*-KO-ban, mint a WT-egerekben. Adataink tehát azt mutatják, hogy a KO állatok még érzékenyebbek lehetnek a megnövekedett duktális nyomásra.

Fontos szempont tehát, hogy az NHERF-1 expressziója nem befolyásolta a sejtkárosodás mértékét, amelyet az izolált acinusokban a cerulein vagy a nátrium-taurokolát magas koncentrációja okozott. Ezek az adatok azt jelzik, hogy az NHERF-1 általános deléciója nem befolyásolja az utóbbi hatóanyagok által okozott acináris károsodást. Ezért valószínűsítjük, hogy a cerulein vagy a nátrium-taurokolát acinus sejtekre gyakorolt közvetlen hatásain kívüli tényezők felelősek a WT és az *NHERF-1*-KO egerek AP-ben lévő súlyosságbéli különbségekért.

5.2 Az aquaporin-1 csatorna szerepe a kísérletes acut pancreatitisben

Az AQP1 egy vízcsatorna, amelyet kiterjedten expresszálnak a hasnyálmirigyben lévő acináris és duktális sejtek, melyek mindegyike részt vesz a folyadék szekréciójában. Az AQP-ok megváltozott expressziója vagy lokalizációja kapcsolatba hozható a különféle gasztrointesztinális rendellenességekkel, például gastritis vagy hasmenés; ezért számos tanulmány készült már az AQP izoformák sajátos szerepének meghatározására. Bár az

AQP1 alapvető szerepet játszik a hasnyálmirigy élettanában, kóros körülmények közötti működése mindeddig nem volt ismert. Az AQP1 csatorna AP-béli szerepének meghatározásához *AQP1* KO egereket használtunk. Ebben a tanulmányban kimutattuk tehát, hogy az AQP1 csökkent expressziója a hasnyálmirigy duktális sejtjeiben súlyosabb AP-t okoz cerulein-indukálta AP modellben.

Ellentmondásos adatok állnak rendelkezésünkre, melyek a korábbi megfigyelésekkel részben ellentétesek. Ezek az adatok azt mutatták, hogy az AQP1 expressziójának a hibája csak kis mértékben, de nem szignifikánsan csökkenti a stimulált hasnyálmirigyben történő folyadék kiválasztás sebességét. Érdekes módon ez az eltérés a folyadék mérésére alkalmazott különféle módszerekkel magyarázható, ennek ellenére más tanulmányok azt mutatták, hogy az AQP1 csökkent expressziója vagy funkciója drámai módon csökkenti a duktális folyadék szekrécióját. Megjegyzendő még, hogy az AQP-ok és a CFTR közötti közvetlen interakciót megfigyelték már a Sertoli-sejtjeiben is.

Maga az AQP1 deléciója nem károsítja a hasnyálmirigyét, és nem is okoz pancreatitist egerekben, ami vélhetően az AQP5 kompenzáló hatásának következménye lehet; ugyanakkor érdekes, hogy a betegség előrehaladása sokkal súlyosabb. Az AQP1 szerepét a pancreatitis patofiziológiájában már korábban felvetették. Az AQP1 jelentőségét az exokrin elválasztású hasnyálmirigyben az is megerősíti, hogy ezt a vízcsatornát bőségesen expresszálják az acináris sejtek zymogén granulumai, és alapvető szerepet játszik annak zymogén duzzanatában és feltehetően a szekrécióban is. Mindezen korábbi megfigyelések is azt mutatják, hogy az AQP1 alapvető szerepet játszik mind a duktális, mind az acináris funkcióban, és a hasnyálmirigyét is érzékenyebbé teszi az AP-re.

6 AZ ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. A NHERF-1 és az AQP1 is hatást gyakorolnak az acut pancreatitis kimenetelére.
2. Az AP súlyossága, különösen az acináris nekrozis és az apoptózis magasabb volt az *NHERF-1*-KO egerekben, mint a WT állatokban.
3. Megállapítottuk, hogy az *AQP1* delécioja a hasnyálmirigyét érzékenyebbé teszi a pancreatitisre.

7 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani minden embernek, aki segített nekem és inspirált a doktori tanulmányaim során.

Szeretnék őszinte köszönetet mondani **Prof. Dr. Rakonczay Zoltánnak**, a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Kórélettani Intézet tanszékvezetőjének. Kiemelkedő felügyelete nélkül ez a Ph.D. értekezés nem szülehetett volna meg. Szeretnék szintén köszönetet mondani **Prof. Dr. Hegyi Péternek**, a Pécsi Tudományegyetem Transzlációs Medicina Intézet vezetőjének és **Prof. Dr. Takács Tamásnak** a (Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar I.sz. Belgyógyászati Klinika) az iránymutatásukért és a folyamatos támogatásukért. Széles körű tudásuk és logikus gondolkodásmódjuk nagy értékű és segítségű volt számomra. Megértésük és támogatásuk jó alapot nyújtott a tézisemhez.

Hálás vagyok **Prof. Dr. Szabó Gyulának**, a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Kórélettani Intézet korábbi tanszékvezetőjének, **Prof. Dr. Lengyel Csabának**, **Prof. Dr. Ábrahám Györgynek** és **Prof. Dr. Wittmann Tibornak** a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar I.sz. Belgyógyászati Klinika jelenlegi és korábbi vezetőinek, valamint **Prof. Dr. Varró Andrásnak** a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai- és Farmakoterápiai Intézet korábbi vezetőjének, aki lehetőséget adott számomra az intézeteikben történő munkavégzésre.

Szeretnék köszönetet mondani kollégáimnak és barátaimnak, **Dr. Kui Baláznak, Dr. Kormányos Eszternek, Dr. Katona Máténak, Dr. Németh Istvánnak, Dr. Hegyi Eszternek, Dr. Balázs Anitának, Dr. Maléth Józsefnek, Dr. Farkas Klaudiának, Dr. Czepán Mátyásnak, Dr. Németh Baláznak, Dr. Pallagi Petrának, Fűr Gabriellának, Bálint Emese Rékának, Madácsy Tamarának, Dr. Kunstár Évának, Dr. Geisz Andreának, Dr. Schnúr Andreának, Dr. Biczó Györgynek, Gál Nórának, Tóth Emesének, Fanczal Júliának, Molnár Andreának, Gyömbér Zsuzsannának, Varga Árpádnak, Molnár Rékának, Dr. Laczkó Dorottyanak, Dr. Végh Eszter Teréznek, Dr. Venglovecz Viktóriának, Dr. Becskeházi Eszternek, Ébert Attilának, Dr. Szentesi Andreának, Dr. Gálfi Mártának, Dr. Radács Mariannának, Dr. Jászberényi Miklósnak, Dr. Mezei-Leprán Zsófiának, Dr. Bagosi Zsoltnak, Dr. Pataki Imrének, Dr. Csabafi Krisztinának, Dr. Szakács Júliának, Dr. Kiss Lórándnak, Dr. Ibos Katalinnak, Dr. Gecse Árpádnak** minden segítségükért, bátorításukért a nehéz időkben, amelyek nélkül most nem lennék itt.

Tézisemhez a munkákat nem lehetett volna elvégezni a mindenben kész segítségük és támogatásuk nélkül: **Magyarné Pálfi Edit, Pritz Tünde, Fritz Rea, Árva Miklósné, Fuksz Zoltánné†, Dr. Zsilák-Urbán Mihály, Kocsispéter Zoltán, Tóth Zolt, Laurinyecz Magdolna, Kiss Gusztáv, Pál Ágnes, Romhányi Veronika, Ancsányi Kitti, Dallos-Szilágyi Erzsébet és Váczai Sándor.**

Elismeréssel adózom a pénzügyi támogatásért, amelyet a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Irodától (OTKA K116634, K119938, GINOP-2.3.2-15-2016-00015), az Emberi Kapacitások Minisztériumától (EFOP-3.6.2-16-2017-00006) kaptam, valamint az MTA-SZTE Lendület Pályázatnak (LP2014-10/2014).

Végül, de nem utolsósorban, a legnagyobb köszönettel tartozom **szüleimnek** és ami a legfontosabb feleségemnek, **Bába Mártnak**, valamint **gyermekeimnek, Eszternek és Áronnak** minden szeretetükért, támogatásukért, a végtelen türelemükért és bátorításukért. Ezt a dolgozatot nekik szenteltem.

“Per aspera ad astra” (Latin phrase)

