# MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

# KÍSÉRLETES AKUT PANCREATITIS: A PATOGENEZIS ÉS TERÁPIÁS CÉLPONTOK VIZSGÁLATA



# Dr. Rakonczay Zoltán

Szegedi Tudományegyetem, ÁOK I. sz. Belgyógyászati Klinika

SZEGED

2011

# TARTALOMJEGYZÉK

1.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
2.	BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
	2.1. Az akut pancreatitis incidenciája, kórlefolyása	7
	2.2. Az akut pancreatitis etiológiája	7
	2.3. Az akut pancreatitis patomechanizmusa	8
	2.3.1. Agresszív faktorok	8
	2.3.1.1. A tripszinogén korai aktivációja	8
	2.3.1.2. Nukleáris faktor-κB aktiváció	9
	2.3.1.3. A gyulladásos infiltráció kialakulása a pancreasban	10
	2.3.1.4. Mitokondriális károsodás	10
	2.3.1.5. Oxidatív stressz.	11
	2.3.1.6. Az acinuskárosodás és a seithalál	
	2.3.2. Védő faktorok	
	2.3.2.1. Tripszin inhibítorok	
	2.3.2.2. Anti-inflammatorikus mediátorok: interleukin-10. szolubilis tumor nekrózis	
	faktor- $\alpha$ receptor interleukin-1 receptor-antagonista	13
	2 3 2 3 Pancreatitis-asszociált protein	13
	2.3.2.5. Fullerearting assessment protein	13
	2.3.2.5. Hő-sokk fehériék	15
	2.3.2.5. Ho sour fenerger $400^{-1}$ és folyadék szekréció	
	2.5.2.0. 1 unereas ductants 11003 es folyadek szekreető	10
	2.4. Experimentaris akut parereattismodenek	17 18
	2.4.1. Invaziv modellek	10
2		1) 22
Э. Л	ANVAGOK ÉS MÓDSZEREK	22 23
ч.	11 Anvagok	25 23
	A = 1 + A = A = A = A = A = A = A = A = A = A	25 23
	4.1.1. Analox	23
	4.1.2. Vegyszerek es oluatok	25 24
	4.2. Wouszerek.	24 24
	4.2.1. Kischen piolokollok leliasa	24
	4.2.1.1. Az L-arginin es közvetten metadontjaniak, varannit az L-msztidin es L-nzm	24
	4.2.1.2. A.z.L. arginin L. arnitin ill L. lizin indukélta algut paparaatitis időhali	24
	4.2.1.2. AZ L-arginin-, L-offittin-, III. L-IIZIII-Indukaita akut pancieatitis idobeli	24
	4.2.1.2. A z imputatilia arginézgétlé kazalég hatéga az L arginin indukélte alat	24
	4.2.1.5. AZ IITEVEIZIOITIS AIGITAZGALIO KEZELES HALASA AZ L-AIGITTI-IITUUKAILA AKUL	24
	particlearitiste	24
	4.2.1.4. Az 1-metilspermidin natasa az L-ornitin-indukaita akut pancreatitisre	24
	4.2.1.5. A pirronain-attiokarbamat es metripreanizoron elokezeres natasa az L-arginin-	25
	Indukalla akul pancreallusre	23
	4.2.1.6. A metilprednizoion elokezeles natasa a cholecystokinin-indukaita akut	25
	pancreatitisre	23
	4.2.2. Allatok felaldozasa, mintavetel	25
	4.2.3. Laboratoriumi parameterek merese	26
	4.2.3.1. Pancreas tomeg/testtomeg hanyados	26
	4.2.3.2. Amilaz-, lipaz- es aszpartat-aminotranszteráz aktivitás és glükóz-, Ca <sup>2</sup> -,	•
	triglicerid-, urea-, kreatinin-, arginin-, ornitin- és citrullin koncentrációk	26
	4.2.3.3. Pancreaticus tripszinogen és tripszin aktivitás	26
	4.2.3.4. Pancreaticus mieloperoxidáz aktivitás	26

4.2.3.5. Argináz aktivitás	27
4.2.3.6. Pancreaticus hő-sokk fehérje és IκB fehérje expresszió	27
4.2.3.7. Nukleáris fehérje extrakció és elektroforetikus "mobility shift assay"	28
4.2.3.8. Interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, tumor nekrózis faktor- $\alpha$ és tripszinogén	
aktivációs peptid koncentráció	29
4.2.3.9. Poliaminszintek, spermidin/spermin N <sup>1</sup> -acetiltranszferáz és ornitin-	
dekarboxiláz aktivitás	29
4.2.3.10. Pancreaticus genomikus DNS analízis	29
4.2.3.11. Pancreaticus nem-fehérje szulfhidril-csoport tartalom, glutation-peroxidáz,	
Mn- és Cu/Zn-szuperoxid-dizmutáz aktivitás, malondialdehid koncentráció,	
karbonil-protein szint	30
4.2.3.12. Mitokondrium izolálás, mitokondriális membránpotenciál és oxigénfogyaszt	ás. 30
4.2.4. Szövettani vizsgálatok	31
4.2.4.1. Fénymikroszkópia	31
4.2.4.1.1. Hisztopatológiai vizsgálat	31
4.2.4.1.2. NADH <sub>2</sub> diaforáz enzimhisztokémia	31
4.2.4.1.3. TdT-mediated dUTP Nick-End-labeling technika	31
4.2.4.2. Transzmissziós elektronmikroszkópia	31
4.2.5. Statisztikai analízis	32
5. EREDMÉNYEK	33
5.1. A nagy dózisú bázikus aminosavak és az L-arginin metabolitok intraperitonealis	
injekciójának hatása a pancreasra	33
5.2. Az intraperitonealis L-arginin-, L-ornitin- és L-lizin injekció dózis- és időfüggésének	
vizsgálata	36
5.2.1. Az L-arginin hatása	36
5.2.1.1. Pancreaticus nukleáris faktor-κB aktiváció	36
5.2.1.2. Pancreaticus proinflammatorikus citokin koncentrációk	36
5.2.1.3. Pancreaticus hő-sokk fehérje expresszió	38
5.2.1.4. Szérum arginin-, citrullin- és ornitin koncentrációk változása 3,5 g/kg L-	
arginin-HCl-dal i.p. injektált patkányban	39
5.2.2. Az L-ornitin hatása	40
5.2.2.1. 1-6 g/kg L-ornitin i.p. injekciójának hatása patkányokban	40
5.2.2.2. 3 g/kg L-ornitin i.p. hatásának vizsgálata	42
5.2.2.2.1. Makroszkópos elváltozások	42
5.2.2.2. Mikroszkópos elváltozások	42
5.2.2.2.3. Laborparaméterek változása	46
5.2.2.2.4. Pancreaticus hő-sokk fehérje 72 expresszió	47
5.2.2.2.5. Pancreaticus I $\kappa$ B- $\alpha$ és I $\kappa$ B- $\beta$ degradáció, interleukin-1 $\beta$ koncentráció	47
5.2.2.2.6. A pancreaticus apoptosis kvalitatív és kvantitatív meghatározása	47
5.2.2.2.7. Pancreaticus nem-protein szulfhidril-csoport tartalom, a glutation-	
peroxidáz- és a szuperoxid-dizmutáz aktivitások	49
5.2.2.2.8. Testtömeg, pancreas tömeg/testtömeg hányados	50
5.2.2.2.9. Szérum aszpartát-aminotranszferáz aktivitás és a glükóz-, Ca <sup>2+</sup> -, trigliceri	d-
, urea- és kreatinin koncentrációk	51
5.2.3. Az L-lizin hatása	52
5.2.3.1. 1-5 g/kg L-lizin i.p. injekciójának hatása patkányokban	52
5.2.3.2. 2 g/kg L-lizin injekció (i.p.) hatásának időbeli vizsgálata	52
5.2.3.2.1. Makroszkópos elváltozások	52
5.2.3.2.2. Mikroszkópos elváltozások	53
5.2.3.2.3. L-lizin-indukálta laborparaméter változások	59

5.2.3.2.4. Pancreaticus spermidin/spermin $N^1$ -acetiltranszferáz aktivitás és	(0
pollaminszintek	60
5.2.3.2.5. A pancreas oxidatív strasszára jellemző paramátarak	01
5.2.2.2. Jacobilt noncross és méi miteleondriumelt AN(m iénelt és evigénfeguesztégénelt	02
$5.2.5.5.1201$ and pancreas es maj mitokondriumok $\Delta \Psi m$ -janak es oxigemogyasztasának vizsgélata	63
5 3 Az argináz-gátlás hatása az I-arginin-indukálta akut pancreatitisre	05
5 3 1 A mái- a pancreas- a vese- és a tüdő argináz aktivitása	65
5 3 2 A (+)-S-2-amino-6-iodoacetamido-hexánsay hatása az argináz aktivitásra	66
5.3.3. Pancreas tömeg/testtömeg hányados, szérum- és pancreas amiláz- és pancreas	
tripszin aktivitás	67
5.3.4. Pancreatius mieloperoxidáz aktivitás	67
5.3.5. Pancreas nem-protein szulfhidril-csoport tartalom, glutation-peroxidáz- és	
szuperoxid-dizmutáz aktivitás	67
5.3.6. Pancreaticus hő-sokk fehérje expresszió	69
5.3.7. Hisztopatológiai vizsgálat	69
5.4. A poliaminok szerepe L-ornitin-indukálta akut pancreatitisben	71
5.4.1. Poliamin homeosztázis L-ornitin-indukálta akut pancreatitisben	71
5.4.2. Az 1-metilspermidin hatása az L-ornitin-indukálta akut pancreatitisre	74
5.4.2.1. Pancreas spermidin/spermin N <sup>1</sup> -acetiltranszferáz aktivitás, putreszcin-,	
spermidin-, metilspermidin-, és spermin tartalom	74
5.4.2.2. Hisztopatológiai vizsgálat	74
5.4.2.3. Szérum és pancreas amiláz-, szérum lipáz aktivitás, pancreas tömeg/testtömeg	70
hanyados	78
5.4.2.4. Pancreaticus hő-sokk tehérje/2 és IkB- $\alpha$ expresszió	79
5.4.2.5. Pancreaticus mieloperoxidaz aktivitas	79
5.4.2.6. Pancreas interleukin-1β koncentració	79
5.4.2./. Szerum kreatinin koncentracio es aszpartat-aminotranszferaz aktivitas	80
5.5. Nuklearis faktor-KB aktivacio-gatlas hatasa akut pancreatitisben	81
5.5.1. A pirrolidin-diflokarbamat es metilprednizoion elokezeles natasa az L-arginin-	01
Indukalla akul pancreallusre	81
5.5.1.1. Pancreaticus IKB-α degradacio es nuklearis taktor-KB DINS-Koto aktivitas	81
5.5.1.2. Panereas tämag/tasttämag hánvadas ás szárum amiláz aktivitás	01
5.5.1.4. Panereas amiláz trinszinogán ás DNS tartalom	ده ۸۷
5.5.1.5. Pancreaticus nem-protein szulfhidril-csonort tartalom linid nerovidáció és	04
karhonil-protein szintek	85
5 5 1 6 Pancreaticus mieloneroxidáz aktivitás	05
5 5 1 7 Hisztopatológiai vizsgálat	
5.5.2. A metilprednizolon előkezelés hatása cholecystokinin-indukálta akut pancreatitisre	88
5.5.2.1. Pancreas tömeg/testtömeg hányados, szérum amiláz aktivitás és tripszinogén	
aktivációs peptid koncentráció	88
5.5.2.2. Pancreaticus tumor nekrózis faktor- $\alpha$ és interleukin-6 koncentrációk	89
5.5.2.3. Pancreaticus nem-protein szulfhidril-csoport tartalom, lipid peroxidáció és	
karbonil-proteinek szintje	90
5.5.2.4. Pancreaticus mieloperoxidáz aktivitás	91
5.5.2.5. Hisztopatológiai vizsgálat	92
5.5.2.6. Nukleáris faktor-κB DNS-kötő aktivitás	92
5.5.2.7. IκB-α expresszió	93
6. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK	94

7. MEGBESZÉLÉS	96
7.1. A nagy dózisú i.p. adott bázikus aminosavak hatása a patkány pancreasra	96
7.1.1. Dózis-hatás vizsgálatok	96
7.1.2. L-arginin-, L-ornitin-, illetve L-lizin-indukálta akut pancreatitis időbeli vizsgálata	97
7.1.2.1. Pancreaticus tripszinogén aktiváció	97
7.1.2.2. A hő-sokk fehérjék és a nukleáris faktor-κB aktiváció	98
7.1.2.3. Oxidatív stressz a pancreasban	98
7.1.2.4. Acináris mitokondriális károsodás	98
7.1.2.5. Az acinussejtek apoptosisa és nekrózisa	99
7.1.2.6. Extrapancreaticus szervek károsodása	99
7.2. A bázikus aminosavakkal kiváltható akut pancreatitis patomechanizmusa	100
7.3. A bázikus aminosavakkal kiváltható akut pancreatitis hasznosíthatósága	101
7.4. A poliaminok szerepe akut pancreatitisben	101
7.5. Az argináz szerepe L-arginin-indukálta akut pancreatitisben	103
7.6. Nukleáris faktor-κB aktiváció és annak gátlása akut pancreatitisben	105
8. VIZSGÁLATAINK JELENTŐSÉGE ÉS JÖVŐBENI TERVEINK	110
9. IRODALOMJEGYZÉK	111
10. KÖZLEMÉNYJEGYZÉK	129
10.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	129
10.2. A Ph.D. fokozat megszerzését követő időszak egyéb közleményei	131
10.3. A Ph.D. értekezésben szereplő közlemények	136
11. SCIENTOMETRIAI ADATOK	138
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	140

# 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

$\Delta \Psi m$	mitokondriális membránpotenciál
ADP	adenozin-difoszfát
AIHA	(+)-S-2-amino-6-jodoacetamido-hexánsav
Arg	L-arginin
ASAT	aszpartát-aminotranszferáz
ATP	adenozin-trifoszfát
ССК	cholecystokinin
Citr	L-citrullin
COX-2	ciklooxigenáz-2
DNP	dinitro-fenol
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GSH-Px	glutation-peroxidáz
H&E	hematoxilin és eozin
His	L-hisztidin
HSP	hő-sokk fehérje
ICAM-1	inter-celluláris adhéziós molekula-1
IKK	IκB-kináz
IL	interleukin
i.m.	intramuscularis
i.p.	intraperitonealis(an)
<i>i.v</i> .	intravénás(an)
LD50	letális dózis, 50 %
Lys	L-lizin
MDA	malondialdehid
MeSpd	1-metilspermidin
MP	metilprednizolon
MPO	mieloperoxidáz
NF-ĸB	nukleáris faktor-κB
NO	nitrogén-monoxid
NOS	nitrogén-monoxid szintetáz

dc\_256\_11

NSG	nem-fehérje szulfhidril-csoport
ODC	ornitin-dekarboxiláz
Orn	L-ornitin
PAF	trombocita-aktiváló faktor
PAGE	poliakrilamid gél-elektroforézis
PAO	poliamin-oxidáz
PAP	pancreatitis-asszociált protein
PBS	foszfát pufferelt sóoldat
PDTC	pirrolidin-ditiokarbamát
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
PPARγ	peroxiszóma proliferátor–aktivált receptor $\gamma$
p.w./b.w.	pancreas tömeg / testtömeg hányados
RLM	patkány máj mitokondriumok
RPM	patkány pancreas mitokondriumok
SAM	S-adenozil-metionin
SAMDC	S-adenozil-metionin-dekarboxiláz
<i>S.C</i> .	subcutan
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SEM	standard hiba
SOD	szuperoxid-dizmutáz
SSAT	spermidin/spermin $N^1$ -acetiltranszferáz
TAP	tripszinogén aktivációs peptid
TNF-α	tumor nekrózis faktor-α
$\operatorname{TPP}^+$	tetrafenil-foszfónium-ion
TUNEL	TdT-mediated dUTP Nick-End-labeling

# 2. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

# 2.1. Az akut pancreatitis incidenciája, kórlefolyása

Az akut pancreatitis a hasnyálmirigy heveny gyulladásos betegsége, mely más távoli szerveket (tüdő, vese, máj) is érinthet. A betegség incidenciája 5-80/100.000 lakos/év<sup>(1)</sup>. A kórlefolyás az esetek közel 80 %-ában enyhe, 20 %-ban azonban a pancreatitis súlyos, a beteg életét is veszélyeztető állapothoz vezethet <sup>(2)</sup>. A pancreatitis mortalitása interstitialis pancreatitis esetén kb. 3 %, nekrotizáló kórforma esetén viszont jóval magasabb, akár 20 % is lehet. A betegség mortalitása jóval kedvezőtlenebb, ha a betegnek infektált, és nem steril nekrózisa van. Szerencsére az utóbbi években a fertőzött nekrózis prevalenciája 15-20 %-ra csökkent. A szervelégtelenség előfordulása nekrotizáló pancreatitis esetén gyakoribb (50 %), mint az interstitialis pancreatitis esetén (5-10 %). Nekrotizáló pancreatitisben, ha nincs szervelégtelenség – a mortalitás 0 %-hoz közeli érték, egyszervi elégtelenség esetén <10 %nál, többszervi elégtelenség esetén viszont már 35-40 %. A halálozásnak kb. a fele az akut pancreatitis első napjaiban következik be, ami a heveny szervelégtelenségnek köszönhető. A halálozás többi része hetekkel ezután történik, ami a fertőzött nekrózis miatti szervelégtelenségnek, ritkábban a szövődményes steril nekrózisnak tulajdonítható. A fenti adatokból is látszik, hogy a betegség oki kezelése (főként, ami a nekrotizáló pancreatitist illeti) a mai napig megoldatlan.

# 2.2. Az akut pancreatitis etiológiája

Az akut pancreatitis kialakulásáért nagyrészt (70-80 %-ban) az alkoholfogyasztás és az epekövesség felel, de számos más etiológiai tényező (pl. gyógyszerek, hipertrigliceridémia, pancreas vagy ampulla tumor, trauma, különböző mumps-, H1N1-, Coxsackie vírus, bakteriális infekciók) is ismert <sup>(2)</sup>. Az esetek 10-20 %-ában nem tudunk kiváltó okot azonosítani. Utóbbi hátterében sokszor microlithiasis vagy genetikai mutációk állhatnak (pl. a tripszinogén vagy a cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor génben). Epekövesség esetén az epehólyagból kimozduló epekövek migrációjuk során elakadhatnak az epevezeték rendszerben. Ez leggyakrabban a Vater-papillánál fordul elő. Az obstrukció a pancreas vezetékben megemelkedő intraductalis nyomás révén járul hozzá az akut pancreatitis kiváltásához. Az alkoholfogyasztás pontos pathogenetikai szerepe még nem teljesen tisztázott. Egyes kísérletek

szerint az etanol az Oddi sphincter spazmusát váltja ki, illetve növeli az acinussejtek cholecystokinin (CCK) iránti érzékenységét <sup>(3)</sup>. Saját *in vitro* eredményeink az előbbieket nem támasztják alá <sup>(4)</sup>. Az etanol és metabolitjai serkentik az inaktív zimogének korai, még az acinuson belüli aktiválódását. Ezen kívül acináris hiperszekréciót indukál, és befolyásolja a pancreasnedv összetételét. A viszkózus váladék miatt fehérjedugók alakulhatnak ki a kis vezetékekben, amelyek elzáródása hozzájárulhat a betegség kialakulásához. Megfigyelések szerint azonban az alkoholisták között csak kis százalékban fordul elő akut pancreatitis. Feltételezhető, hogy ezeknél a betegség patomechanizmusában <sup>(5)</sup>.

# 2.3. Az akut pancreatitis patomechanizmusa

Az akut pancreatitis kialakulásának mechanizmusa - főleg ami a kezdeti folyamatokat illeti - igencsak vitatott. Az eddigi kutatási adatok alapján még nem ismert teljeskörűen, hogy milyen molekuláris mechanizmusok játszanak szerepet az akut pancreatitis kialakulásában, illetve, hogy milyen fő triggerelő faktorok indítják be a betegséget. Általánosan elfogadott azonban, hogy a stresszhatások által kiváltott acináris toxikus Ca<sup>2+</sup> szignál következtében létrejövő korai tripszinogén aktivációnak <sup>(6,7)</sup>, a proinflammatorikus citokinek szintéziséért felelős transzkripciós faktornak, a nukleáris faktor-κB (NF-κB)-nek <sup>(8)</sup> és a mitokondriális károsodásnak <sup>(9)</sup> fontos szerepe van a pancreatitis kialakulásában. A folyamatok időbeli sorrendje és összefüggése azonban mindmáig tisztázatlan. A patomechizmusban résztvevő (agresszív- és védő-) faktorokat az alábbiakban részletezem.

## 2.3.1. Agresszív faktorok

### 2.3.1.1. A tripszinogén korai aktivációja

Élettani körülmények között a pancreas enzimek szintézise és tárolása a citoplazmától teljesen elkülönülve, inaktív formában, granulumokban, proteáz inhibítorok jelenlétében történik. E tényezők bármelyikének károsodása pancreatitis kialakulását eredményezheti. A jelenleg legszélesebb körben elfogadott teória szerint az acinust ért károsodás hatására gátlódik a zimogén granulumok kiürülése a ductalis térbe <sup>(10,11)</sup>. A granulumok felhalmozódnak a sejtben, fuzionálnak a lizoszómákkal, majd a granulumokból tripszinogén, míg a lizoszómákból katepszin B kerül a citoplazmába. Ezt követően a katepszin B hidrolizálja az

inaktív proteázt, azaz a tripszinogénből aktív tripszin keletkezik. Az aktív tripszin már önmaga is képes tripszinogént aktiválni (autoaktivácó). Ezt követően a tripszin aktiválja a többi pancreas enzimet is (pl. elasztáz, lipáz). A tripszinogén katepszin B-vel történő aktivációjához nélkülözhetetlen az alacsony pH (acidózis). Ennek legfőbb oka, hogy a pancreaticus tripszin inhibítorok aktivitása alacsony pH-n jelentősen csökken. Az acidózis mellett a Ca<sup>2+</sup> intracelluláris koncentrációjának emelkedése (Ca<sup>2+</sup> szignál) is együtt jár a tripszinogén autoaktivációjával, azonban a mai napig vitatott, hogy a Ca<sup>2+</sup> szignál gátlása önmagában kivédi-e a pancreatitis kialakulását <sup>(12)</sup>. Ugyanakkor meg kell jegyezni azt is, hogy katepszin B "knock-out" egerekben az akut pancreatitis indukciója során a korai tripszinogén aktiváció elleni védettség nem teljes <sup>(11)</sup>. A katepszin B mellett tehát más tényezők is szerepet játszanak az intrapancreaticus tripszinogén aktivációban (pl. a tripszinogén autoaktiváció, vagy más lizoszomális proteázok szerepe is szóba jöhet).

### 2.3.1.2. Nukleáris faktor-ĸB aktiváció

Az eddigi kutatások alapján világosan látszik, hogy a NF-kB fontos szerepet tölt be az akut pancreatitis patomechanizmusában <sup>(8)</sup>. A NF- $\kappa$ B egy pluripotens transzkripciós faktor, mely számos proinflammatorikus gén szabályozásában vesz részt <sup>(13)</sup>. E gének közé tartoznak az interleukinek, a kemokinek, az adhéziós molekulák, a receptorok és az enzimek, melyek termékei hozzájárulnak a gyulladásos betegségek patogeneziséhez (13). A NF-ĸB fehérjecsaládnak öt ismert képviselője van: NF-ĸB1 (p50/p105), NF-ĸB2 (p52/p100), RelA (p65), RelB, és c-Rel. A legtöbb sejtben a NF-κB fiziológiás körülmények között a citoplazmában szekvesztrált gátló fehérjékhez (IkB-k) asszociálva, inaktív formában van jelen <sup>(13)</sup>. Stimuláció hatására az IκB-k (pl. IκB-α és IκB-β) az IκB-kinázok (IKK-ok) révén foszforilálódnak, ubiquitinálódnak és a 26S proteaszómák által degradálódnak. E folyamat során felszabadul a NF-κB nukleáris lokalizációs szignálja, lehetővé téve a transzkripciós faktor transzlokációját a sejtmagba<sup>(13)</sup>. A sejtmagban a NF-κB specifikus (κB) szekvenciákhoz kötődik a gének promóter régiójában, transzaktiválja a "downstream" elhelyezkedő géneket [pl. interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), tumor nekrózis faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), trombocitaaktiváló faktor (PAF), inter-celluláris adhéziós molekula-1 (ICAM-1)]. A TNF-α a lokális és a szisztémás akut gyulladásos válasz egyik fő mediátora. Főleg makrofágok, neutrofil granulociták és endotélsejtek termelik, de az acinussejtek is képesek TNF- $\alpha$  szintézisére <sup>(14)</sup>. A NF-kB aktiváció két fő intracelluláris jelátviteli utat aktivál. Az egyik folyamat eredményeként beindul a citokin kaszkád, a másik során pedig a sejt apoptosisa. A szérumban illetve apancreasban található TNF- $\alpha$ - és az IL-1 $\beta$  koncentráció arányos az akut pancreatitis súlyosságának fokával.

### 2.3.1.3. A gyulladásos infiltráció kialakulása a pancreasban

Az acinussejtek az őket ért stresszhatásra citokineket és kemokineket termelnek, melyek neutrofil granulocitákat és makrofágokat vonzanak a pancreasba. A leukociták vándorlását a kapilláris endotéliumon keresztül a celluláris adhéziós molekulák (pl. P-szelektin, ICAM-1) mediálják. A gyulladásos sejtek "recruitment"-je további acinus károsodást és proinflammatorikus citokin szintézist fog eredményezni. A pancreaticus mieloperoxidáz (MPO) aktivitás a leukocita infiltráció mértékére jellemző paraméter, és a gyulladásos sejtek számának megfelelően változik.

A PAF központi szerepet játszik a vaszkuláris permeabilitás fokozásában és a gyulladásos infiltráció kialakításban. Konturek és mtsai. a CCK-indukálta ödémás pancreatitis modellen vizsgálta a PAF patomechanizmusban betöltött szerepét <sup>(15)</sup>. Eredményeik szerint a PAF a fehérvérsejtek migrációjának fokozásával, a pancreas vérellátásának csökkentésével és az érpermeabilitás növelésével befolyásolta a gyulladás és az interstitialis ödéma kialakulását. A PAF gátlása [a degradációjának fokozásával rekombináns PAF acetilhidrolázzal <sup>(16)</sup> vagy PAF antagonistákkal <sup>(17,18)</sup>] csökkentette az akut pancreatitis súlyosságát. A PAF antagonista lexipafant állatokban hatásosnak bizonyult, azonban a klinikai kísérletekben nem mérsékelte a pancreatitis súlyosságát <sup>(19)</sup>.

#### 2.3.1.4. Mitokondriális károsodás

Ismert, hogy a mitokondriális funkció (legfőképpen az ATP szintézis) nélkülözhetetlen a sejtek integritásának fenntartásában. E mellett, ezek az igen fontos organellumok a sejthalál mediálásában is részt vesznek. ATP hiányában a sejt nekrózissal pusztul el.

A szupramaximális koncentrációban adott CCK kifejezett mitokondriális membránpotenciál ( $\Delta\Psi$ m) depolarizációt okoz pancreas acinussejtekben <sup>(20)</sup>, melynek hatására valószínűleg csökken az ATP szintézis. A CCK által kiváltott  $\Delta\Psi$ m depolarizációt a citoszolikus Ca<sup>2+</sup> koncentráció-emelkedés mediálhatja <sup>(21)</sup>. Paradox módon a Ca<sup>2+</sup>-t felszabadító szekretagógok (mint pl. a cerulein) fokozták az ATP szintet a citoszolban és az egér acinussejtjeiből izolált intakt mitokondriumban <sup>(22)</sup>. A ceruleinnel kezelt patkányokból izolált mitokondriumokban a mitokondriális légzés gátlódott, és csökkent a  $\Delta\Psi$ m <sup>(23)</sup>. Ezek a változások azonban visszafordíthatók voltak extramitokondriális ADP adásával.

Mitokondriális diszfunkció esetén az acinussejtek intracelluláris szignalizációs rendszere is zavart szenved. Az intracelluláris  $Ca^{2+}$  szignál tovaterjedésének útjában a sejt subapicalis régiójában a zimogén granulumokat övező mitokondriumok és az endoplazmatikus retikulum egyfajta gátként szerepelnek: "felveszik" az arra haladó  $Ca^{2+}$ -t <sup>(24)</sup>. Amennyiben a mitokondriumok károsodnak, úgy a sejtek intracelluláris ATP koncentrációja is lecsökken. Ezáltal gátlódnak az ATP dependens folyamatok, mint pl. a  $Ca^{2+}$  endoplazmatikus retikulumba- (a SERCA pumpa által), illetve mitokondriumba való visszavétele, valamint a  $Ca^{2+}$  plazma membránon keresztüli kipumpálása (a plazma membrán  $Ca^{2+}$ -aktiválta ATP-áz által). Ezek a folyamatok mind szerepet játszhatnak a toxikus intracelluláris  $Ca^{2+}$  szignál kialakulásában <sup>(25)</sup>.

#### 2.3.1.5. Oxidatív stressz

A szervezet működéséhez nélkülözhetetlenek az oxigén molekulák, azonban ezek könnyen sejtkárosító hatásúak is lehetnek. A reaktív oxigén-gyökök az oxigénmolekula redukciójával enzimatikus (pl. NADPH oxidáz hatására makrofágokban), vagy nemenzimatikus úton (pl. a légzési lánc "melléktermékeként") képződhetnek <sup>(26)</sup>. Biológiailag a szuperoxid-anion-, a hidroxil-, és a nitrogén-monoxid (NO) gyököknek van jelentősége. A reaktív oxigén metabolitok erősen citotoxikus hatásúak; károsítják a sejtmembránt (a lipidek, illetve glikoproteinek peroxidációja), a sejtfehérjéket (karbonil-proteinek képződése), a DNS-t, a mitokondriumokat, vagy aktiválják a NF-kB-t. Az arachidonsav kaszkád stimulációjával fokozzák a szervezet gyulladásos reakcióját. Az eukarióta sejtek (beleértve a pancreas acinusokat is) számos enzimatikus és nem-enzimatikus (C- és E-vitamin, glutation, metallotionein, stb.) antioxidáns rendszerrel rendelkeznek. Előbbiek közül az endogén metalloprotein-szuperoxid-dizmutázok (SOD, a mitokondriális Mn-SOD és a citoplazmában elhelyezkedő Cu/Zn-SOD) az O<sub>2</sub> semlegesítésében, a katalázok és a glutation-peroxidáz (GSH-Px) enzimek pedig a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lebontásában játszanak döntő szerepet. Amennyiben a gyulladás és az oxidatív stressz súlyos, a pancreaticus antioxidáns enzimek aktivitása is megemelkedik. Az akut pancreatitis kezdeti szakaszában kimutatták, hogy a pancreasban lecsökken az endogén védő-hatású dizmutázok szintézise, illetve megnő a lipidek peroxidációjának végterméke (azaz megemelkedik a szabadgyökök szintje)<sup>(27)</sup>. Nemrégiben fejeztek be egy kettős vak, randomizált, prospektív klinikai tanulmányt, melyben az antioxidáns hatású N-acetilcisztein, a szelén, és a C-vitamin terápiát vizsgálták akut pancreatitisben <sup>(28)</sup>. Sainos a kezelés nem eredményezett szignifikáns javulást a betegekben. A

sikertelen próbálkozások azt igazolják, hogy a pancreatitis egy multifaktoriális megbetegedés, melyben egyes káros reakciók szeparált gátlásával nem feltétlenül lehet eredményt elérni.

#### 2.3.1.6. Az acinuskárosodás és a sejthalál

Az acinussejtek elhalása kulcsfontosságú szerepet tölt be a nekrotizáló akut pancreatitis lezajlásában <sup>(29)</sup>. A folyamat végbemehet spontán (nekrózis), vagy a sejt által programozott úton (apoptosis és autofágia). A pancreas nekrózis mértéke meghatározó a betegség kimenetelében. A sejt apoptoticus elhalása (a nekrózissal szemben) csökkenti a pancreatitis súlyosságát. Az apoptosis során az endogén proteázok hatására a sejt zsugorodni kezd, kromatin állománya kondenzálódik és elhal, de az organellumok nem jutnak ki az extracelluláris térbe. Az elhalt sejteket a makrofágok bekebelezik. Kiemelendő, hogy az apoptosist csak minimális gyulladás kíséri. Az apoptosis kialakulásában az egyik legjelentősebb endogén proteáz a kaszpáz. Kísérletes akut ödémás pancreatitisben kimutatták a kaszpáz-3 és a kaszpáz-8 aktivitás fokozódását <sup>(20)</sup>. Ezen proteázok csökkentik a nekrózist, illetve az intracelluláris tripszinogén aktivációt. Egyes transzkripciós faktorok intraacináris aktivációja (pl. NF-κB, p53) szintén fokozza az apoptosist <sup>(29)</sup>. Ezzel ellentétben a neutrofil granulociták aktivációja elsősorban a nekrózis felé tolja el a sejthalált. A sejthalál típusa alapvetően a sejt ATP koncentrációjától függ, amit nagyrészt a mitokondriális diszfunkció befolyásol. A mitokondrium a sejtet érő direkt stresszhatások vagy kaszpázok rendszerén keresztül is sérülhet.

## 2.3.2. Védő faktorok

#### 2.3.2.1. Tripszin inhibítorok

Fiziológiásan számos mechanizmus akadályozza a pancreas önemésztődését <sup>(30)</sup>. Az emésztőenzimek - így a tripszin is - inaktív zimogénként termelődnek. A tripszin inhibítorok semlegesítik az aktív termékeket. Egészséges emberben a pancreas enzimek többnyire a duodenumban aktiválódnak enterokináz hatására. A pancreasban termelődő tripszin inhibítoron kívül a szérumban és a szövetekben is találhatók egyéb gátló faktorok (α1-antitripszin, α2makroglobulin, antikimotripszin), melyek megkötik és komplexet alkotnak a feleslegben aktiválódott enzimekkel. A komplexeket a retikuloendotelialis rendszer fagocitálja és vonja ki a keringésből.

2.3.2.2. Anti-inflammatorikus mediátorok: interleukin-10, szolubilis tumor nekrózis faktor- $\alpha$  receptor, interleukin-1 receptor-antagonista

Az interleukin-10 (IL-10, korábbi elnevezés szerint: citokinszintézis gátló-faktor) elsősorban a gyulladásos sejtek (monociták, B és T lymphocyták) által termelt mediátor, mely gátolja más citokinek szintézisét <sup>(31)</sup>. Az anti-inflammatorikus mediátorok közül eddig csak az IL-10-ről sikerült kétséget kizárólag kimutatni, hogy csökkenti az akut pancreatitis súlyosságát <sup>(32,33,34)</sup>.

A gyulladásos kaszkádban fontos szerepet játszó TNF- $\alpha$ -nak és az IL-1-nek létezik a szervezetben természetes gátlószere is (a szolubilis TNF- $\alpha$  receptor, illetve az IL-1 receptorantagonista). A szolubilis TNF- $\alpha$  receptor megköti a TNF- $\alpha$ -t, így az nem tud a sejtmembránban található aktív TNF- $\alpha$  receptorhoz kapcsolódni. Az IL-1 receptor antagonista pedig elfoglalja a citokin kötőhelyét a receptoron. Mind a TNF- $\alpha$  receptor, mind az IL-1 receptor, mind az IL-1 receptor-antagonista alkalmazása szignifikánsan javította a túlélést kísérletes akut pancreatitisben <sup>(35)</sup>.

#### 2.3.2.3. Pancreatitis-asszociált protein

A pancreatitis-asszociált protein (PAP) egy 16 kD molekulatömegű szekretoros fehérje, mely strukturálisan a C-típusú lektinekkel mutat rokonságot <sup>(36)</sup>. A PAP az acinussejteket ért károsodás hatására fejeződik ki. Expressziójának gátlása rontja, míg indukciója javítja a pancreatitis súlyosságát.

#### 2.3.2.4. Poliaminok

A poliaminoknak (putreszcin, spermidin és spermin) nélkülözhetetlen szerepük van a sejtek normális működésében és túlélésében <sup>(37)</sup>. A poliaminok pozitív töltéssel rendelkeznek, melyek a DNS-sel, az RNS-sel, a fehérje- és foszfolipid struktúrákkal is képesek kölcsönhatásba lépni. A poliaminok több membránhoz kötött fehérje regulációjában is részt vesznek, mint például az ioncsatornák és az adenilát cikláz esetén. Ezen kívül antioxidáns hatással is rendelkeznek. Fiziológiásan a poliaminok L-argininből (L-ornitinen keresztül) és L-metioninból (S-adenozilmetioninon keresztül) szintetizálódnak. Metabolizmusukat 3 fő enzim szabályozza <sup>(38)</sup> (1. ábra). A poliamin bioszintézist az ornitin-dekarboxiláz (ODC) és az *S*-adenozil-metionin-dekarboxiláz (SAMDC) mediálja, míg a poliamin katabolizmus rate-limitáló kulcsenzime a spermidin/spermin  $N^1$ -acetiltranszferáz (SSAT).





1. ábra. A poliamin metabolizmus főbb enzimei. Az ornitin-dekarboxiláz (ODC) és az S-adenozilmetionin (SAM)-dekarboxiláz (SAMDC) a poliamin bioszintézist mediálják, míg a poliamin katabolizmust a spermidin/spermin  $N^1$ -acetiltranszferáz (SSAT) szabályozza. DcSAM: dekarboxilált SAM; PAO: poliamin-oxidáz.

Érdekes módon emlősökben a pancreas tartalmazza a spermidint a legnagyobb koncentrációban, de ennek jelentősége nem igazán ismert <sup>(39,40)</sup>. Mindenesetre a poliaminok fontosságát a pancreasban jól mutatja az a tény, hogy a poliamin katabolizmus aktivációja a SSAT enzimen keresztül súlyos akut pancreatitist hoz létre transzgenikus patkányokban <sup>(41)</sup>. A pancreaticus SSAT-aktivációt és az ennek következtében kialakuló poliamin katabolizmust több akut pancreatitismodellben és humán akut pancreatitises hasnyálmirigy szövetből is kimutatták <sup>(42,43,44)</sup>.

#### 2.3.2.5. Hő-sokk fehérjék

A hő-sokk fehérjék (HSP-k) - vagy más néven dajkafehérjék - mind a prokarióta, mind az eukarióta élőlényekben megtalálhatók, melyek nélkülözhetetlen szerepet töltenek be a különböző organizmusok túlélésében. A HSP-k nevüket onnan kapták, hogy a sejtek növekedési hőmérsékletétől eltérő hő-sokk hatásra termelődésük szignifikánsan nő. Fontos megjegyezni, hogy a hő-sokkon kívül még számos behatás indukálja e fehérjék szintézisét <sup>(45)</sup>. A HSP-k osztályozása közelítőleges molekulatömegük (kD) alapján történik, így emlősökben a főbb HSP-k közé tartozik a HSP110, -90, -70, -60, -47, -32, -28 és -10 <sup>(46)</sup>.

A HSP-knek nélkülözhetetlen szerepük van egyes stresszhatások, betegségek kivédésében, túlélésében, ill. az okozott károsodás mérséklésében. A HSP-k felismerik a károsodott, részben vagy teljesen denaturálódott fehérjéket. Hozzájuk csatlakozva stabilizálják

őket, és visszaállítják natív konformációjukat. Az irreverzibilisen roncsolódott fehérjéket megjelölik, és a proteoszómákba "irányítják". A HSP-k sejtvédő szerepét támasztja alá, hogy mennyiségük növelésével (pl. indukcióval, túltermeléssel) a sejtek stressztűrő képessége javítható, míg génjeik teljes vagy részleges deléciója esetenként a sejtek halálához, de mindenképpen csökkent stressz toleranciához vezet <sup>(45,46)</sup>. Fontos megemlíteni, hogy a HSP-k a normál körülmények között növekvő sejtek fehérjéinek is 5-10 %-át teszik ki. Az előbb említetteken kívül a különböző fehérjék bioszintézisében, transzportjában és transzlokációjában is részt vesznek.

A HSP-k expressziójáról és szerepéről a pancreasban csak keveset tudunk, és a meglévő adatok is ellentmondásosak. A pancreasban a főbb HSP-k közül a HSP90, -70, -60 és -20 állandóan jelen van vagy indukálható (pl. hő-sokkal) <sup>(47,48)</sup>. Az alapvetően mitokondriális fehérjének tartott HSP60-at a pancreasban az acinussejtek szekretoros granulumaiban is kimutatták <sup>(49)</sup>. A HSP60 valószínűleg a szekretoros fehérjék idő előtti autoaktivációját akadályozza meg <sup>(49,50)</sup>. Hasonló tripszinogén aktivációgátló hatást mutattak ki a HSP72 esetén is. Ez igen különös, hiszen a HSP72 egy citoplazmatikus fehérje <sup>(51)</sup>.

Irodalmi adatok alapján nem teljesen egyértelmű a HSP-k expressziójának változása akut pancreatitisben. Cerulein-indukálta pancreatitisben a HSP60 és HSP72 szint fokozódását (52,53,54) és csökkenését (55,56) is leírták. Weber és mtsai. szerint a szupramaximális dózisú ceruleinnel indukált pancreatitis és a hyperthermia is fokozza a HSP70 szintézisét a pancreasban<sup>(54)</sup>. A cerulein-indukálta pancreatitisben képződő HSP72 sejtvédő hatását Bhagat és mtsai. antiszenz HSP72 oligonukleotidok felhasználásával bizonyították <sup>(57)</sup>. Strowski és mtsai, a HSP60 és -70 szintek csökkenését észlelték cerulein stimulációt követően <sup>(55)</sup>. Ethridge és mtsai. kimutatták, hogy ceruleines pancreatitisben a HSP-k szintézisének szabályozásáért felelős transzkripciós faktor: a hő-sokk faktor. Ennek aktivációja a HSP27 és -70 indukciójához vezet egerekben<sup>(53)</sup>. O'Reilly és mtsai. kimutatták, hogy a hő-sokk faktor (csakúgy, mint a NF-κB) humán akut pancreatitisben is szisztémásan aktiválódik <sup>(58)</sup>. Nagy dózisú L-argininnel kiváltott pancreatitis a HSP27 és HSP72 expresszióját is fokozta <sup>(59)</sup>. Akut pancreatitisben több HSP expressziója is fokozódik. Ezek közül az acinus-károsodás legérzékenyebb indikátorának a HSP72 bizonyult <sup>(47)</sup>. A HSP72 fontos szerepére utal Balog és mtsai-nak vizsgálata is, mely szerint a HSP70 gén polimorfizmusa fokozta a súlyos akut pancreatitis előfordulásának gyakoriságát<sup>(60)</sup>.

Wagner és mtsai. <sup>(61)</sup> igazolták, hogy amikor a patkányok testhőmérsékletét fokozatosan 42 °C-ra emelték, és ezen a hőfokon tartották 20 percig, akkor több különböző molekulatömegű pancreas fehérje szintje is emelkedett (90-, 72-, 59-, 58- és 30 kD). A 72 kD

méretű protein a HSP70 indukálható formájának bizonyult. Az indukálható HSP70 (HSP72) mellett a konstitutív HSP70 forma (HSP73) szintén jelen volt, és hypertermiás kezeléssel a szintje emelkedett. Wagner és mtsai. <sup>(61)</sup>, Lee és mtsai. <sup>(50)</sup>, Frossard és mtsai. <sup>(62,63)</sup>, Otaka és mtsai. <sup>(64,65)</sup>, Bhagat és mtsai. <sup>(52,57)</sup> és saját kísérleteink is <sup>(66)</sup> bizonyították, hogy a hő-sokk előkezelés (prekondicionálás), és ezáltal a HSP indukció csökkenti az ezután létrehozott ceruleines/CCK-es pancreatitis súlyosságát. A protektív hatást a japán <sup>(64,65)</sup>, ill. amerikai <sup>(52,57,62,63)</sup> kutatócsoport a hidegvizes előkezeléssel indukált HSP60-nak, míg a német kutatócsoport <sup>(61)</sup> a teljestest melegítés után szintetizálódott HSP70-nek tulajdonította. Szerintük a HSP70 expressziójának időbeli lefutása jól korrelált a ceruleines pancreatitis elleni védő hatással. A vita még korántsem eldöntött, abban viszont minden kutatócsoport egyetért, hogy a HSP60 és HSP70 protektív hatása valószínűleg a fehérjék chaperon funkciójának tulajdonítható. Frossard és mtsai. azt is kimutatták, hogy a jótékony hatású hyperthermiás előkezelés a HSP70 indukció mellett NF-κB aktiváció gátlást is előidézett cerulein-indukálta akut pancreatitisben <sup>(62)</sup>. Weber és mtsai-nak vizsgálatai szerint a HSP70-nek a ceruleines pancreatitismodell mellett a dibutilin-dikloriddal kiváltott panreatitisben is védő hatása van<sup>(67)</sup>.

Az állatok testhőmérsékletének mesterséges változtatása a HSP-ken kívül más faktorokat is befolyásolhat, éppen ezért fontos kiemelni, hogy a nem-termális HSP indukciónak is védő hatása van az akut pancreatitisszel szemben <sup>(63,68)</sup>. A HSP-k sejtvédő szerepét bizonyítják Kubisch és mtsai-nak eredményei is, akik kimutatták, hogy a HSP27-et overexpresszáló egerekben kisebb fokú volt a cerulein-indukálta akut pancreatitis súlyossága <sup>(69)</sup>.

A HSP-k expresszióját többnyire káros behatások indukálják. Az igazi kihívás abban rejlik, hogy oly módon fokozzuk a HSP-k szintézisét, hogy az a lehető legkevésbé legyen toxikus a szervezetre. Az előbbiekből következően nem nehéz belátni, hogy a HSP termelést indukáló gyógyszerekben újszerű terápiás lehetőségek rejlenek. Nem véletlen, hogy számos nagy gyógyszergyár is jelentős energiát és pénzt áldoz e vegyületek kutatására.

A HSP indukció lehetséges terápiás alkalmazását pancreatitisben a Ph.D. disszertációmban <sup>(70)</sup> és az ahhoz kapcsolódó közleményekben <sup>(66,68,71,72,73)</sup> korábban már részletesen diszkutáltam, éppen ezért jelen dolgozatban ezzel a témával nem kívánok bővebben foglalkozni.

## 2.3.2.6. Pancreas ductalis HCO3<sup>-</sup> és folyadék szekréció

A ductalis HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> és folyadék szekréció alapvető fontosságú a pancreas integritásának megőrzésében <sup>(74)</sup>. Az intakt ductalis hám fontos szerepet tölt be a pancreas enzimek kóros

szöveti diffúziójának megakadályozásában, és mintegy barrierként védi az acinussejteket. A pancreasvezeték-obstrukció megemelkedett intraductalis nyomást okozva hozzájárul a ductalis barrier sérüléséhez. Ennek következtében az aktív emésztőenzimek szétterjednek a pancreas szövetben, és tovább súlyosbítják a kórfolyamatot.

A ductalis szekréció károsodása (pl. cisztás fibrózis esetén) önmagában is képes pancreatitist indukálni. Az utóbbi években derült ki, hogy az akut pancreatitis kialakulásában szerepet játszó faktorok (pl. epesavak, etanol) fokozzák a pancreas ductalis sejtek HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> és folyadék szekrécióját <sup>(75,76)</sup>. Valószínűleg a ductalis sejtek ezáltal próbálják meg kimosni a pancreasból a toxikus faktorokat (pl. aktiválódott emésztő enzimeket). A hiperszekréció a Vater papilla obstrukció miatt visszaáramló epesavak károsító hatása ellen is véd <sup>(77)</sup>. A HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréció alkalizálja a lument, csökkenti a tripszinogén aktivációját, patológiás körülmények között az aktív tripszin kimosásában játszhat szerepet. A luminális pH jelentőségére Freedman és mtsai. <sup>(78)</sup>, illetve Noble és mtsai. <sup>(79)</sup> kitűnően rávilágítottak. A luminális pH korrekciója cisztás fibrózisos egerekben helyreállította az acinussejtek membrán-transzportjának defektusait <sup>(78)</sup>. A poszt-endoszkópos retrográd cholangiopancreatographia-indukálta akut pancreatitis súlyossága szignifikánsan nagyobb volt a pH 6-os kontrasztanyag használata esetén a pH 6,9-es vagy a 7,3-as oldatokhoz képest <sup>(79)</sup>. Összességében tehát megállapítható, hogy a fokozott ductalis HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> és folyadékszekréció védő hatású lehet akut pancreatitisben.

# 2.4. Experimentális akut pancreatitismodellek

Az állatkísérletes vizsgálatok lehetőséget nyújtanak a pancreas betegségek modellezésére, a patomechanizmus tanulmányozására és a pancreatitis kivédésében szerepet játszó vegyületek tesztelésére <sup>(80)</sup>. Talán nem nagy felelőtlenség kijelenteni, hogy az akut pancreatitis patomechanizmusának közvetlen tanulmányozására többnyire csak állatkísérletes modellek során van lehetőség. Az experimentális modellek előnye, hogy tetszőleges számban ismételve nagy egyedszámú homogén csoportokon vizsgálhatók az akut pancreatitis kiváltó faktorai, izolált, önálló részletei a pancreatitis kiváltását követő első pillanattól kezdődően. Ahhoz, hogy egy modell megfelelően használható legyen, jól kell reprezentálnia a humán betegség jellegzetességeit, laboratóriumi eltéréseit és szövettani elváltozásait. Fontos megemlíteni, hogy az elérhető akut pancreatitismodellek nem teljes egészében reprezentálják a humán betegséget. Például ismert az a tény, hogy az akut pancreatitis leggyakoribb etiológiai tényezője az alkoholfogyasztás és a choledocholitiasis. Ezért elsőként alkohollal és

epesavakkal folytak kísérletek az akut pancreatitis kiváltására. Azonban az etanol tartós és/vagy nagy dózisú adagolásával rágcsálókban nem lehet pancreatitist indukálni.

Az enyhe ödémás akut pancreatitis patomechanizmusa jól vizsgálható az általánosan elfogadott CCK-es/ceruleines-modellben patkányban. A nekrotizáló akut pancreatitis patomechanizmusának- és a kezelési alternatívák tanulmányozására több állatmodell is rendelkezésünkre áll. Ezek nagy része invazív (pl. epesavak retrográd injekciója a hasnyálmirigy vezetékbe<sup>81</sup>, illetve a zárt duodenum kacs módszer<sup>82</sup>), vagy a pancreas károsodásának mértéke nem jól reprodukálható, illetve inhomogén eloszlású (pl. a kolindeficiens etioninnal kiegészített diétával kiváltott pancreatitis esetén<sup>83</sup>). A nem-invazív beavatkozás, a reprodukálhatóság vagy a homogenitás ugyanakkor kívánatos kritériumok egy experimentális állatmodell esetén.

Az akut pancreatitismodellek indukciója invazív és nem-invazív módszerekkel történik. A betegség indukciójához számos állatfaj (pl. patkány, egér, kutya, oposszum), anyag és technika bizonyult használhatónak. A nagyszámú modellre való tekintettel a következőkben csak a fontosabb invazív és nem-invazív pancreatitismodelleket tekintem át.

## 2.4.1. Invazív modellek

Invazív modellek esetén a pancreatitis-indukció minden esetben műtéti eljárás segítségével történik. A ductus choledochusban elakadt epekő obstrukcióját (ami az epe és a pancreas emésztőenzimek elfolyási akadályát, megemelkedett intraductalis nyomást és esetlegesen biliopancreaticus refluxot eredményez) a duodenum lekötésével Pfeffer és mtsai. modellezték elsőként kutyákban<sup>(84)</sup>. A duodenum zárt kaccsá alakítása után 24 órán belül akut hemorrhagias pancreatitis alakul ki patkányokban (82). A zárt duodenumkacs képzésen alapuló invazív modellekben a kórkép jellegzetességei nagyon hasonlítanak a Billroth II. típusú gyomorműtéten átesett betegek pancreatitiséhez (85). A technikát Chetty és mtsai. azzal egészítették ki, hogy az elzárt bélkacsba epesavat injektáltak <sup>(86)</sup>. Eredményeik alátámasztották, hogy a biliaris reflux is szerepet játszik az akut pancreatitis kialakulásában. Több kísérlet során kutyákban<sup>(87)</sup>, patkányokban<sup>(81)</sup> és újabban egerekben<sup>(88)</sup> is megfigyelhető a retrográd ductalis injekció nekrotizáló akut pancreatitist kiváltó hatása. Leggyakrabban epesavakat használnak az injekcióhoz, de epével vagy aktivált pancreas enzimekkel is kiváltható a betegség. Az akut pancreatitis súlyossága az injektált anyag természetétől, az oldat koncentrációjától, volumenétől és az injektálási nyomástól függően változik. Újabban a G-proteinhez kapcsolt sejtfelszíni epesav receptor, a Gpbar1 kritikus szerepét is leírták a betegség patogenezisében

<sup>(89)</sup>. A vascularis modellekben a pancreas artériás vagy vénás keringésének akadályozása vezet a gyulladás kialakulásához <sup>(90,91)</sup>.

### 2.4.2. Nem-invazív modellek

Az akut pancreatitis kutatásban talán a leggyakrabban használatos akut pancreatitismodellt CCK-nel, illetve annak analógjával, ceruleinnel váltják ki. A parenterálisan [intravénásan (*i.v.*), intraperitonealisan (*i.p.*) vagy szubkután (*s.c.*)] adott CCK/cerulein dózisfüggő módon serkenti a pancreas enzimszekrécióját. Szupramaximális dózisban azonban már gátolja a szekréciót, és akut pancreatitist okoz. A cerulein patkányban enyhe ödémás-<sup>(92)</sup>, egerekben súlyos nekrotizáló pancreatitist indukál <sup>(93)</sup>, malacokban viszont nem indukál betegséget <sup>(94)</sup>.

Ígéretes modellnek indult egerekben a kolin-hiányos etionin-kiegészített diétával kiváltott súlyos haemorrhagias akut pancreatitis <sup>(83)</sup>. A mortalitás 0-100 %-ig változik a kolindeficiens diéta hosszúságától függően <sup>(95)</sup>. A modell a humán pancreatitishez hasonló kórszövettani képpel, ascitessel, acidózissal és hipoxiával jár. Komoly hátránya a modellnek, hogy csak a nőstény állatokban okoz elváltozásokat, és nem jól reprodukálható. A reprodukálhatósághoz fontos az állatok korát, testtömegét és az ételbevitel mennyiségét minél pontosabban egyeztetni <sup>(95)</sup>. További hátránya a modellnek, hogy a speciális diéta a parotist, a májat és az agyat is károsítja.

Bár önmagában az alkoholfogyasztás nem indukál pancreatitist, egyes kísérletek alapján az alkohol (mintegy szenzitizálva a pancreast) más módszerekkel kombinálva hozzájárul a betegség kiváltásához. Wedgwood és mtsai. szerint a pancreas ductus permeabilitását a *per os* adagolt alkohol növeli <sup>(96)</sup>. Vizsgálataik szerint az etanolos tejjel itatott macskákban a pancreaskanülön bejuttatott aktív emésztőenzimek hatására ödémás pancreatitis alakult ki, míg a kontroll állatokban nem találtak gyulladásos jeleket a pancreasban. Patkányokban az etanolos előkezelés után alkalmazott CCK súlyosabb pancreatitist eredményezett a kontroll csoportban (csak CCK-nel kezelt állatok) kialakuló betegséghez képest. Ennek hátterében az etanoldiéta által kiváltott fokozott acináris CCK érzékenység állhat <sup>(97)</sup>. További kísérletek szerint az *i.v.* adott alkoholos infúzió csökkenti a hasnyálmirigy vérellátását kutyákban <sup>(98)</sup>. Weber és mtsai. elképzelése szerint a pancreasban keletkező szabadgyökök és aktivált antioxidáns rendszerek aránytalansága fontos szerepet játszik a dibutiltin-diklorid/etanol-indukálta interstitialis pancreatitis patomechanizmusában<sup>(67)</sup>.

A bázikus aminosavak (L-arginin és L-lizin) pancreast károsító hatása régóta ismert <sup>(99,100,101)</sup>. Az *i.p.* injektált nagy dózisú L-arginin akut pancreatitist vált ki patkányokban <sup>(99,102,103)</sup> és egerekben <sup>(104)</sup>. Az L-arginin-indukálta pancreatitis vizsgálatának nagy hagyománya van a SZTE, ÁOK, I. sz. Belklinika Pancreas Laboratóriumának kutatásaiban (ld. pl. <sup>105,106,107</sup>). Az arginines pancreatitis indukciójának patomechanizmusa a mai napig sem teljesen ismert, de feltételezhető, hogy az oxigén szabadgyökök <sup>(105)</sup>, a gyulladásos faktorok <sup>(106)</sup>, az endoplazmatikus retikulum stressz <sup>(108)</sup>, a NO <sup>(109)</sup> és a poliaminok <sup>(42)</sup> is egyaránt fontos szerepet játszanak ebben. Az L-arginin több útvonalon keresztül metabolizálódhat <sup>(110)</sup>. Ezen folyamatok két kulcsenzime a NO szintetáz (NOS), illetve az argináz (2. ábra). A NOS (melynek három izoformája ismert: a konstitutív endoteliális és -neuronális, illetve az indukálható forma) az L-arginin átalakulását katalizálja L-citrulliné NO képződésével <sup>(111)</sup>. Az argináz enzim az L-arginint L-ornitinné és ureává hidrolizálja. Az argináz I izoforma a citoszolban található. Legmagasabb szöveti expressziót a májban mutat, míg a mitokondriális argináz II számos extrahepaticus szövetben megtalálható.

Az L-lizin pancreast károsító hatásáról igen kevés információ van a szakirodalomban. Kitajima és Kishino <sup>(101)</sup>, illetve Kishino és mtsai. <sup>(100)</sup> vizsgálata szerint az *i.p.* adott 4 g/kg Llizin injekció kiterjedt szövetkárosodást, acináris mitokondriális duzzadást és ellentmondásosan gyulladásos beszűrődés nélküli sejtnekrózist okozott.



**2. ábra. Az L-arginin metabolizmusa.** A nitrogén-monoxid (NO) szintáz az L-arginin konverzióját katalizálja NO-dá és L-citrullinné. Az argináz az L-arginint L-ornitinné és ureává hidrolizálja.

Az akut pancreatitismodellek többsége invazivitásuk, kivitelezési nehézségük (pl. retrográd ductalis epesav injekció, duodenum kacs lekötés), vagy nem megfelelő reprodukálhatóságuk miatt nehezen használhatók. A szakirodalomban hiányzik egy olyan egyszerű, nem invazív, reprodukálható és homogén eloszlású nekrotizáló pancreatitis állatmodell, amely hasonlít a humán betegség laboratóriumi és morfológiai elváltozásaira. Egy ilyen "ideális" modell kitűnően hasznosítható lenne az akut pancreatitis patogenezisének vizsgálatára. Ezáltal olyan új gyógyszer támadáspontokat lehetne azonosítani, ahol beavatkozhatnánk a betegség kórlefolyásába.

# 3. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink során célul tűztük ki az experimentális akut pancreatitis patomechanizmusának vizsgálatát, különös tekintettel a bázikus aminosavak által kiváltott nekrotizáló kórformára. Célunk volt olyan kulcsfontosságú célpontok azonosítása is, melyek a betegség terápiájában meghatározóak lehetnek.

Részletesebb céljaink a következőek voltak:

Megvizsgálni:

A.) a nagy dózisban *i.p.* adott L-arginin és különböző metabolitjainak, valamint az L-lizin és az L-hisztidin hatását a pancreasra.

- B.) az akut pancreatitis patogenezisében részt vevő
  - a.) NF-kB transzkripciós faktor,
  - b.) HSP-k,
  - c.) poliaminok
  - d.) argináz és
  - e.) szabadgyökös mechanizmusok szerepét.

# 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Anyagok

## 4.1.1. Állatok

Kísérleteinkhez standard körülmények között tartott 180-300 g tömegű hím Wistar patkányokat használtunk az állatvédelmi- és etikai szabályoknak megfelelően. Az állatokat a Szegedi Tudományegyetem, ÁOK, Domaszéki Állatházától szereztük be. A kísérletek kezdete előtt legalább egy hétig az I. sz. Belgyógyászati Klinika Állatházában szobahőmérsékleten, 12 órás sötét-világos ciklusokkal tartottuk őket. A patkányoknak szabad hozzáférésük volt vízhez és standard laboratóriumi táphoz (Biofarm, Zagyvaszántó). Az állatkísérleteket a SZTE, Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság és a Csongrád Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóságának engedélye alapján végeztük.

## 4.1.2. Vegyszerek és oldatok

A laboratóriumi vegyszereket a Sigma-Aldrich Kft-től (Budapest, Magyarország) rendeltük. A (+)-S-2-amino-6-jodoacetamido-hexánsavat (AIHA) az Alexis Biochemicals-tól (San Diego, CA, USA), a Boc-Gln-Ala-Arg-7-amino-4-metilkumarint a Bachemtől (Weil am Rhein, Németország) vásároltuk. A nyúl anti-HSP72 ellenanyagot Dr. Kurucz Istvántól, a nyúl anti-IkB- $\alpha$ , a kecske anti-IkB- $\beta$  és anti-HSP27 ellenanyagot a Santa Cruz Biotechnology-tól (Santa Cruz, CA, USA), a tormaperoxidáz enzimmel konjugált másodlagos ellenanyagokat a Dako-tól (Glostrup, Dánia) szereztük be. A poli(dIdC)-t az Amersham Pharmacia-tól, a [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP-t az Izotóp Intézet Kft.-től (Budapest, Magyarország) vettük. Az aprotinint (Gordox) a Richter Gedeon NyRt.-től (Budapest) kaptuk ajándékba. A poliamin analóg 1-metilspermidint (MeSpd) 3-aminobutanolból egy orosz kutatócsoport szintetizálta számunkra <sup>(112)</sup>. Az aminosavak többségét (L-arginin-HCl, L-ornitin-HCl, L-citrullin és L-lizin) 1,424 M/l koncentrációban, fiziológiás sóoldatban oldottuk fel. Az oldatok pH-ját 7,4-re állítottuk be NaOH-dal vagy HCl-val. Az L-hisztidin-HCl az előbbi aminosavakhoz képest fiziológiás sóoldatban jóval kisebb mértékben oldódik, így azt alacsonyabb koncentrációban (61 mg/ml, pH = 7,4) tudtuk csak oldani.

4.2. Módszerek

## 4.2.1. Kísérleti protokollok leírása

4.2.1.1. Az L-arginin és közvetlen metabolitjainak, valamint az L-hisztidin és L-lizin dózisfüggő hatásának vizsgálata

A patkányokat (n = 4-12) 1–5 g/kg L-arginin-HCl-dal, L-ornitin-HCl-dal, D-ornitin-HCl-dal, L-citrullinnel és/vagy a NO donor nitroprusszid-nátriummal, illetve L-hisztidin-HCl-dal vagy L-lizinnel oltottuk be *i.p.*, majd 24 óra elteltével feláldoztuk őket.

4.2.1.2. Az L-arginin-, L-ornitin-, ill. L-lizin-indukálta akut pancreatitis időbeli lefolyásának vizsgálata

Az előző kísérlet eredményei alapján az időbeli lefolyás vizsgálatához a 3-4 g/kg L-arginin-HCl, 3 g/kg L-ornitin-HCl, illetve 2 g/kg L-lizin dózist használtuk az állatok (n = 5-10) *i.p.* injekciójához. A méréseinkhez szükséges mintavételt az állatok beoltását követően 0,5-96 órával, 1 héttel, illetve 1 hónappal végeztük el.

4.2.1.3. Az irreverzibilis arginázgátló kezelés hatása az L-arginin-indukálta akut pancreatitisre

A patkányokat 15 mg/kg AIHA-val vagy annak vivőanyagával kezeltük *i.p.* 1 órával a fiziológiás sóoldat vagy a 3,5 g/kg L-arginin-HCl *i.p.* injekciója előtt (n = 6). A patkányokat az L-arginin injekció után 24 órával dolgoztuk fel.

#### 4.2.1.4. Az 1-metilspermidin hatása az L-ornitin-indukálta akut pancreatitisre

A patkányokat hat csoportra osztottuk. Az *O24* csoportban (n = 8) a patkányokat 4 órával az L-ornitin injeckció (3 g/kg, *i.p.*) előtt (n = 4) vagy után (n = 4) fiziológiás sóoldattal oltottuk *i.p.* Az *MO24* csoportban (n = 6) a patkányokat 50 mg/kg MeSpd-nel kezeltük *i.p.* 4 órával a 3 g/kg L-ornitin (*i.p.*) injekció előtt. Az *OM24* (n = 6) csoportban a patkányok 50 mg/kg MeSpd-t kaptak *i.p.* 4 órával a 3 g/kg L-ornitin injekció után. Az *O48* (n = 5) csoportban az állatokat 3 g/kg L-ornitinnel injektáltunk *i.p.*, és fiziológiás sóoldattal kezeltük 4 és 24 órával a pancreatitis indukcióját követően. Az *OM48* csoportban (n = 5) a patkányokat az L-ornitin (3 g/kg) injekció után 4 és 24 órával *i.p.* 50 mg/kg MeSpd-nel kezeltük. A csoportok jelölésében a *24* és a *48* az L-ornitin injekciótól számított feláldozás időpontját jelenti órában.

4.2.1.5. A pirrolidin-ditiokarbamát és metilprednizolon előkezelés hatása az L-argininindukálta akut pancreatitisre

Az állatokat pirrolidin-ditiokarbamáttal (PDTC-tal) (1-, 10-, 100 mg/kg *i.p.*) vagy metilprednizolonnal (MP-nal) (1-, 10-, 30 mg/kg *i.m.*) kezeltük 1 órával az akut pancreatitis indukciója előtt (3 g/kg L-arginin-HCl *i.p.*) (n = 6). A patkányok egy másik csoportja (n = 6) az L-arginin injekció előtt fiziológiás sóoldatot kapott *i.p.* a MP vagy a PDTC helyett. Teszteltük a PDTC és a MP hatását is önmagában (L-arginin kezelés nélkül); ez esetben az állatok fiziológiás sóoldatot kaptak *i.p.* L-arginin helyett. Az állatokat 24 órával az L-arginin/fiziológiás sóoldat injekciója után véreztettük ki.

4.2.1.6. A metilprednizolon előkezelés hatása a cholecystokinin-indukálta akut pancreatitisre

A MP előkezelés (2 x 30 mg/kg *i.m.* 12 órás időközzel adva) hatását CCK-indukálta akut pancreatitisben (2x100  $\mu$ g/kg *s.c.* 1 órás időközzel adva) is megvizsgáltuk (n = 6). Az állatok másik csoportja a MP vivőanyagát kapta *i.m.* a CCK injekciók előtt (n = 6). Az állatokat a második CCK oltás után 30 perccel, illetve 1-, 2-, 3- és 4 órával áldoztuk fel.

## 4.2.2. Állatok feláldozása, mintavétel

Az állatok feláldozása minden esetben *i.p.* adott 44 mg/kg pentobarbitallal való altatás után az aorta abdominalison keresztüli exsanguinációval történt. Az abszolút kontroll csoportokban a patkányok minden esetben *i.p./s.c./i.m.* fiziológiás sóoldat/vivőanyag kezelésben részesültek (n = 6). Exsanguinálásuk 24 óra elteltével történt. Az állatok hasnyálmirigyét abdominális feltárás után kipreparáltuk, és 4 °C-on megtisztítottuk a nyirokcsomóktól és a zsírtól. A pancreas tömegét megmértük, majd folyékony nitrogénes fagyasztás után felhasználásig -80 °C-on tároltuk. Egyes kísérletek esetén az állatok májából, veséjéből és tüdejéből is vettünk mintákat. Az aorta abdominalisból nyert vérmintákat 2.500g-vel 20 percig centrifugáltuk, majd a szérumot -25 °C-on tároltuk a mérések elvégzéséig.

## 4.2.3. Laboratóriumi paraméterek mérése

#### 4.2.3.1. Pancreas tömeg/testtömeg hányados

A pancreas tömeg/testtömeg hányados (p.w./b.w.) a gyulladásos ödéma mértékéről ad információt. A hányadost a kipreparált, megtisztított hasnyálmirigy és az állatok tömegének lemérésése után határoztuk meg.

4.2.3.2. Amiláz-, lipáz- és aszpartát-aminotranszferáz aktivitás és glükóz-, Ca<sup>2+</sup>-, triglicerid-, urea-, kreatinin-, arginin-, ornitin- és citrullin koncentrációk

A fenti laboratóriumi paramétereket - az aminosavak kivételével - standard kitek segítségével határoztuk meg (Dialab, Bécs, Ausztria illetve Diagnosticum, Budapest, Magyarország). Az aminosav koncentrációkat Chase és mtsai. módszere alapján határoztuk meg tömegspektrometriás eljárással, szűrőpapíron szárított szérum mintákból <sup>(113)</sup>.

#### 4.2.3.3. Pancreaticus tripszinogén és tripszin aktivitás

A pancreas tripszinogén mennyiségét Nagy és mtsai-nak a módszere szerint határoztuk meg <sup>(114)</sup>. A pancreast 9-szeres térfogatú jéghideg 0,02 M Tris-HCl (pH = 7,8), 0,15 M NaCl és 0,1 % Triton X-100 pufferben homogenizáltuk. Az enzimaktivitás mérését a szupernatáns frakcióból centrifugálás (20.000g, 30 perc) után végeztük. A tripszinogén aktivitást 200-szoros hígítású homogenátumból enterokinázzal való aktivációt követően 80 mM Tris-HCl (pH = 8), 25 mM CaCl<sub>2</sub> és 100 µg/ml bovin szérum albumin oldatban (37 °C, 120 perc) határoztuk meg egy para-nitroaniliddel konjugált szubsztrát segítségével.

A pancreas tripszin aktivitását fluoriméterrel mértük <sup>(115)</sup>. Röviden összefoglalva: a pancreas mintákat először jégen homogenizáltuk 5 mM MES-t (pH = 6,5), 1 mM MgSO<sub>4</sub>-ot, és 250 mM szukrózt tartalmazó pufferben. 25 µl homogenizátumot 37 °C-on 5 percig inkubáltuk a következő összetételű puffer hozzáadásával: 50 mM Tris (pH = 8), 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1 mg/ml marhaszérum albumin és 0,1 mM Boc-Gln-Ala-Arg-7-amino-4-metilkumarin (utóbbi anyag a tripszin specifikus szubsztrátja). Az aktív tripszin a szubsztrátot hasítja, melynek következtében 440 nm-en emittáló 7-amino-4-metilkumarin termék keletkezik.

### 4.2.3.4. Pancreaticus mieloperoxidáz aktivitás

A pancreaticus mieloperoxidáz (MPO) aktivitás vizsgálata Kuebler és mtsai. leírása alapján történt <sup>(116)</sup>. A méréshez mesterséges szubsztrátot (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin)

használtunk, ami az MPO által katalizált redoxireakció során kék színűvé vált. Az egységnyi idő alatt keletkezett termék mennyiségét Hitachi U-2900-as spektrofotométer segítségével határoztuk meg, így következtettünk a MPO aktivitás mértékére.

### 4.2.3.5. Argináz aktivitás

A kontroll állatokból nyert máj, pancreas, vese és tüdő egy részét 9-szeres térfogatú (tömeg/térfogat) jéghideg pufferben [50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM fenil-metil-szulfonilfluoriddal (PMSF), 4 mM benzamidin, 100 U/ml aprotinin] Ultra-Turrax homogenizáló (IKA-Labortechnik, Staufen, Németrország) segítségével 2 x 30 másodpercig homogenizáltuk. A homogenátumokat 25.000g-n 30 percig (4 °C-on) centrifugáltuk, és a szupernatánsokból hőaktiválást (60 °C, 20 perc) követően az argináz aktivitást exogén L-arginin hozzáadásával kolorimetriás módszerrel mértük az urea felszabadulás mennyiségi meghatározásával <sup>(117)</sup>. Röviden: 20 mM L-arginin-HCl szubsztrát- (pH = 9,7), 0,2 mM MnCl<sub>2</sub>–ot és a mintát 250 μl össztérfogatban vegyítettük, és 37 °C-on 5-15 percig inkubáltuk. A reakciókat 250 μl 1 M HClO<sub>4</sub> hozzáadásával állítottuk le. A centrifugálást követően az urea meghatározáshoz 140 μl felülúszót használtunk 1,36 ml diacetil-monoximetio-szemikarbazid reagens hozzáadásával Coulombe és Favreau módszere szerint <sup>(118)</sup>. A 0-120 μM AIHA argináz aktivitás gátló hatását patkánymáj-homogenátumon, illetve tisztított marhamáj arginázon néztük. A patkányok teljes víztér nagyságát 80 %-nak véve, a 60 μM AIHA 15 mg/kg *in vivo* dózissal equimolaris.

#### 4.2.3.6. Pancreaticus hő-sokk fehérje és IkB fehérje expresszió

A pancreaticus HSP72, HSP27, I $\kappa$ B- $\alpha$  és I $\kappa$ B- $\beta$  fehérje-expresszió mértékét Western blot analízis segítségével határoztuk meg. A pancreas mintákat Dounce homogenizátorral lizáltuk, centrifugáltuk, majd meghatároztuk a homogenizátumok citoplazmatikus frakciójának fehérjekoncentrációját. A 8 %-os nátrium-dodecilszulfát-poliakrilamid gél zsebeibe 40-40 µg fehérjét vittünk fel, és a mintákat elektroforetizáltuk <sup>(119)</sup>. A fehérjemennyiség ellenőrzésére a gélt Coomassie Brilliant Blue R250-nel festettük meg. A gélen megfuttatott fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk (1 óra alatt 100 V-on). A membránt Ponceau S oldattal festettük (a transzfer ellenőrzésére), majd 1 órán keresztül 5 % zsírmentes tejben (Biorad, Bécs, Ausztria) inkubáltuk. Ezt követően a membránt 1 órán át, szobahőmérsékleten 1:10.000 hígítású nyúl anti-HSP72 <sup>(120)</sup>, 1:500 hígitású nyúl anti-I $\kappa$ B- $\alpha$  vagy kecske anti-I $\kappa$ B- $\beta$ ellenanyaggal hibridizáltuk. A membránhoz 1:10.000 hígításban tormaperoxidáz enzimmel konjugált nyúl- vagy kecske-ellenes immunglobulint adtunk, és egy órán át inkubáltuk. Az

immunreaktív fehérjéket erősített kemilumineszcenciás módszerrel Fuji RX röntgenfilmen detektáltuk. A fehérjecsíkok mennyiségi elemzését ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA) segítségével végeztük.

## 4.2.3.7. Nukleáris fehérje extrakció és elektroforetikus "mobility shift assay"

A sejtmagi fehérjéket lényegében Dignam és mtsai. módszere alapján preparáltuk <sup>(121)</sup>. 250-300 milligramm pancreas mintát hipotóniás *A* pufferben [kiegészítve 1 mM PMSF-dal 4 mM benzamidinnel, 100 IU/ml aprotininnel és 1 mM ditiotreitollal (DTT)] üveg Dounce homogenizálóban lizáltunk. Ezt követően a homogenátumot 25 percig 4 °C-on rotáltuk, majd 0,3-0,4 %-os végkoncentrációban Nonidet P-40-et adtunk hozzá. A mintát röviden vortexeltük, és 2 percig jégen inkubáltuk. A nukleáris pellet-et centrifugálással összegyűjtöttük (13.000g, 50 s, 4 °C). A felülúszót (citoszolikus frakció) megtartottuk Western blot analízisre (HSP60, HSP72, I $\kappa$ B- $\alpha$  és I $\kappa$ B- $\beta$ ), valamint IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  meghatározásra. A pelletet 1 mM DTTvel, 1,5 mM PMSF-dal, 4 mM benzamidinnel, és 100 IU/ml aprotininnel kiegészített *C* pufferben szuszpendáltuk. A minták rotálása után (4 °C, 30-45 perc) a nukleáris membránokat mikrocentrifugával ülepítettük (20.000g, 10 perc), majd a felülúszót (nukleáris extrakt) szétporcióztuk, és –80 °C-on tároltuk. A minták fehérjekoncentrációját Goa módszerével határoztuk meg<sup>(122)</sup>.

A NF- $\kappa$ B konszenzus régióját (aláhúzva) tartalmazó 21 bázispár hosszúságú oligunukleotid szekvenciáját 5'–GGCAGA<u>GGGGACTTTC</u>CGAGA–3' a komplementer oligonukleotiddal (az 5' végeken egy túlnyúló G bázissal) hibridizáltuk, hogy egy kétszálú DNS próbát kapjunk. A DNS végeit T<sub>4</sub> polinukleotid kináz segítségével [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-zal jelöltük. Az izotóppal jelölt oligonukleotidokat a [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP–től poliakrilamid elektroforézissel választottuk el. A NF- $\kappa$ B DNS-kötő aktivitását 15 µg nukleáris protein felhasználásával, 10 mM HEPES (pH = 7,9), 50 mM KCl, 1 mM etiléndiamin-tetraecetsav (EDTA), 1 mM DTT, 10 % glicerin és 4,5 µg poli(dI/dC) oldatban határoztuk meg. A kötési reakciót 5-8.000 cpm aktivitású duplaszálú DNS hozzáadásával indítottuk el, és az elegyet 30-40 percig jégen inkubáltuk. A NF- $\kappa$ B kötődés specificitását kompetíciós kísérletekben teszteltük. A "hideg" kompetíciós kísérletekben a jelölt próba mellé 20- vagy 100-szoros mennyiségű specifikus jelöletlen vad-típusú vagy mutáns oligonukleotidot adtunk a reakcióelegybe. A mutáns oligonukleotidban a  $\kappa$ B szekvenciát <u>GGccACTaaC</u>-ra cseréltük. A DNS-fehérje komplexeket gélelektroforézissel választottuk szét 4 °C-on nem-denaturáló 4,5 %-os poliakrilamid gélen, 6,7 mM Tris-bázis (pH = 7,5), 3,3 mM nátrium-acetát, és 1 mM EDTA puffer felhasználásával. A

géleket vákuummal kiszárítottuk, és a fehérje-DNS komplexeket Fuji RX filmeken tettük láthatóvá egy erősítő ernyő felhasználásával -70 °C-on. A csíkok denzitását Scanpack Image Analysis Program (Biometra GmBH, Göttingen, Németország) segítségével határoztuk meg.

# 4.2.3.8. Interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, tumor nekrózis faktor- $\alpha$ és tripszinogén aktivációs peptid koncentráció

A pancreas IL-1 $\beta$ , IL-6 és TNF- $\alpha$  koncentrációját a homogenizált minták citoplazmájából enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kittel (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA és Bender Medsystems, Bécs, Ausztria) határoztuk meg a gyártó utasításai szerint. A plazma tripszinogén aktivációs peptid (TAP) koncentrációját a Biotrin (Dublin, Írország) által forgalmazott ELISA kittel mértük.

4.2.3.9. Poliaminszintek, spermidin/spermin  $N^{l}$ -acetiltranszferáz és ornitindekarboxiláz aktivitás

A spermidin-, spermin-, putreszcin- és MeSpd szinteket magas nyomású folyadékkromatográfiával Hyvönen és mtsai. módszere szerint határoztuk meg <sup>(123)</sup>. A pancreaticus ODC és a SSAT aktivitás meghatározását Jänne és Williams-Ashman <sup>(124)</sup>, illetve Bernacki és mtsai. <sup>(125)</sup> módszere szerint végeztük.

#### 4.2.3.10. Pancreaticus genomikus DNS analízis

Az apoptosis egyik jellegzetessége a DNS szabályszerű degradálódása az internukleoszomális helyeken, mely a DNS létraszerű mintázatát (180 bázispár és annak többszöröse) eredményezi az agaróz gélelektroforézis során. A genomikus DNS degradáció kvalitatív meghatározására a patkány pancreas egy részét folyékony nitrogén alatt porítottuk, majd Dounce homogenizálóban 1,5-4-szeres térfogatú extrakciós pufferben (50 mM Tris-HCl [pH = 8], 50 mM EDTA, 0,5 % SDS és 0,2 mg/ml proteináz K) homogenizáltuk. A homogenátokat Eppendorf csőbe helyeztük át, és 55 °C-on egy éjszakán keresztül rotáltuk. A DNS-t Tris-EDTA-val telített fenollal kétszer, 1:1 Tris-EDTA-telített fenol-kloroform eleggyel valamint kloroformmal egyszer extraháltuk. A DNS-t 0,1-szeres térfogatú 3 mol/l nátriumacetát (pH = 5,5) és kétszeres térfogatú 96 % etanol hozzáadásával extraháltuk. A DNS precipitátumot centrifugálással gyűjtöttük össze (13.000*g*, 10 perc), majd 70 %-os etanollal mostuk. Ezt követően vákuum alatt szárítottuk, 100-200 µl Tris-EDTA pufferben oldottuk fel, majd a mintákat 1 órán keresztül 37 °C-on DNáz-mentes RNázzal inkubáltuk. 15-20 µg DNS-t elektroforetikusan frakcionáltunk 0,5 µg/ml etidium-bromidot tartalmazó 1,8 %-os agaróz

gélen. Az apoptosis mennyiségi meghatározását TdT-mediated dUTP Nick-End-labeling (TUNEL) technikával végeztük (ld. később).

4.2.3.11. Pancreaticus nem-fehérje szulfhidril-csoport tartalom, glutation-peroxidáz, Mn- és Cu/Zn-szuperoxid-dizmutáz aktivitás, malondialdehid koncentráció, karbonil-protein szint

Az oxidatív stresszre jellemző laborparaméterek méréséhez a pancreas mintákat 4szeres térfogatú jéghideg 100 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM KCl, 100 mM EDTA (pH = 7,4) pufferben homogenizáltunk Ultra-turrax homogenizátor (IKA-Labortechnik, Staufen, Németrország) segítségével. A homogenátumból a malondialdehid (MDA) koncentrációt tiobarbitursavas reakcióval határoztuk meg Placer és mtsai. módszere szerint korrigálva a szövet fehérjetartalmára <sup>(126)</sup>. A maradék homogenátumot 3.000g-vel 10 percig centrifugáltuk. A pancreaticus nem-fehérje szulfhidril-csoport (NSG) tartalmat, a GSH-Px, illetve a Mn- és Cu/Zn-SOD aktivitást <sup>(105)</sup> valamint a karbonil-protein szintet <sup>(127)</sup> a felülúszóból mértük.

#### 4.2.3.12. Mitokondrium izolálás, mitokondriális membránpotenciál és oxigénfogyasztás

A patkány pancreas mitokondiumokat (RPM) és a -máj mitokondriumokat (RLM) fiziológiás sóoldattal kezelt, illetve 1 vagy 4 órával a 2 g/kg L-lizin *i.p.* injekcióját követően izoláltuk Odinokova és mtsai. módszere szerint <sup>(128)</sup>. A mitokondriális membránpotenciált ( $\Delta\Psi$ m) és oxigénfogyasztást RPM és RLM szuszpenzióban tetrafenil-foszfónium-ion (TPP<sup>+</sup>)-, illetve Clark elektródák segítségével mértük. A  $\Delta\Psi$ m emelkedése mitokondriális TPP<sup>+</sup> felvételt és ezáltal TPP<sup>+</sup> koncentráció csökkenést eredményez a médiumban. A mitokondriális oxigénfogyasztás mérésénél a szubsztrát 10 mM szukcinát volt. Az izolált mitokondriumok minőségére az oxigénfelvétel mértékéből 20  $\mu$ M adenozin-difoszfát (ADP) hiányában és jelenlétében következtettünk [normálisan az oxigénfogyasztási ráta megemelkedik az ADP adásának hatására az adenozin-trifoszfát (ATP) szintézis következtében]. A mitokondriumok elektrokémiai grádienst használnak energiaként a  $\Delta\Psi$ m-on keresztül, hogy ATP-ot tudjanak termelni. Más szóval a mitokondriumok  $\Delta\Psi$ m-t használnak az ATP szintéziséhez ADP-ből. A folyamat lezajlása után a  $\Delta\Psi$ m visszatér az eredeti szintre.

## 4.2.4. Szövettani vizsgálatok

#### 4.2.4.1. Fénymikroszkópia

4.2.4.1.1. Hisztopatológiai vizsgálat

A szövettani mintákat 6 (V/V) %-os formaldehid oldatban fixáltuk. Paraffinos beágyazást követően 4 µm-es metszetek készültek, festésükhöz hematoxilint és eozint (H&E) használtunk. A pancreatitis során bekövetkező hisztopatológiai változásokat: az interstitialis ödémát, a vaszkuláris kongeszciót, a leukocita adhéziót és infiltrációt, az acinussejtek "habos degenerációját"/vacuolumok képződését, az acinussejtek apoptosisát és nekrózisát, a regeneráció jeleit (mitózis, ductuloacinaris struktúrák) patológus kollégák szemikvantitatívan értékelték. A pontozási rendszer a kiértékelt pancreatitismodell függvényében változott (129,130,131,132)

### 4.2.4.1.2. NADH<sub>2</sub> diaforáz enzimhisztokémia

A NADH<sub>2</sub> diaforáz enzimhisztokémiával az acináris mitokondriumok morfológiáját vizsgáltuk (<sup>133</sup>). A vizsgálathoz fagyasztott pancreasokból 10  $\mu$ m vastag metszeteket készítettünk. A szövetek szobahőmérsékletre való felmelegedését követően 40 percen keresztül, 37 °C-on inkubáltuk 0,2 mg/ml nitro-blue-tetrazoliumot, 0,125 mg/ml NADH<sub>2</sub>–t és 1,4 mg/ml KCN-ot tartalmazó 0,1 M Tris-HCl pufferben (pH = 7,0). Az eljárás lényege, hogy a mitokondriális légzési lánc "melléktermékeként" képződő szuperoxid-anion reakcióba lép a nitro-blue-tetrazolium festékkel, melynek során a kicsapódott kék farmazánsó megfesti a mitokondriumokat.

### 4.2.4.1.3. TdT-mediated dUTP Nick-End-labeling technika

Az apoptosis mértékének kvantifikálását a TUNEL technikán alapuló a Roche *In Situ* Cell Death Detection Kit-jének segítségével végeztük. Az apoptoticus sejteket egy 0,5 mm<sup>2</sup>–es pancreas szövetdarabon számoltuk meg. Az eredményeket a kontroll metszet azonos méretű területén található összes nukleuszok számára vonatkoztatva adtuk meg. Ez a fajta számítási módszer ödémás pancreas szövetben alulbecsüli az apoptosis rátát.

#### 4.2.4.2. Transzmissziós elektronmikroszkópia

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz az állatokból eltávolított pancreas egy kis darabját (kb. 1-1 mm<sup>3</sup>) azonnal 3 %-os foszfát-pufferelt glutáraldehid oldatban fixáltuk, majd 1

%-os OsO<sub>4</sub>-ban utófixálást végeztünk. A preparátumokat desztillált vizes öblítés és alkoholos dehidratálást követően TAAB műgyantába (TAAB Laboratories, Reading, Anglia) ágyaztuk be. A mikrotommal készített ultravékony metszeteket uranil-acetát- és ólom-citrát oldatokkal kontrasztoztuk, és Philips elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

## 4.2.5. Statisztikai analízis

A dolgozatban bemutatott adatokat átlag  $\pm$  standard hiba (SEM) formájában tüntettem fel (n = kísérletek száma). A statisztikai kiértékeléshez variancia analízist használtunk. Szignifikánsnak a p < 0,05 értéket fogadtuk el.

# 5. EREDMÉNYEK

# 5.1. A nagy dózisú bázikus aminosavak és az L-arginin metabolitok intraperitonealis injekciójának hatása a pancreasra

Egy előkísérletben megvizsgáltuk az *i.p.* adott 3,5 g/kg L-arginin-HCl és közvetlen metabolitjainak (ekvimoláris dózisokban adva), illetve a 3 g/kg L-hisztidin-HCl és a 2 g/kg Llizin hatását a szérum amiláz aktivitásra, a p.w./b.w.-ra, a pancreaticus MPO aktivitásra (3. ábra) és a hisztológiára (4. ábra, 1. táblázat) 24 órával az injekciót követően (n = 3-5). A 2,8 g/kg L-ornitin-HCl *i.p.* injekciója súlyosabb pancreatitist okozott az L-argininhez képest. A 2,8 g/kg L-ornitin-HCl-dal kiváltott pancreatitis súlyossága nem különbözött szignifikánsan a 3 g/kg L-ornitin-HCl-dal kiváltottétól, így az egyszerűség kedvéért a későbbiekben az utóbbi dózist használtuk. A 3 g/kg D-ornitin i.p. injekciója az előbbiekkel szemben nem okozott pancreas károsodást (n = 5, ezen eredményeket nem demonstráltam az ábrán). A 2,9 g/kg Lcitrullinnal, ill. 3 g/kg L-hisztidin-HCl-dal kezelt állatok labor- és szövettani paraméterei szintén nem különböztek szignifikáns mértékben a fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll csoporttól (3-4. ábra, 1. táblázat). A nátrium-nitroprussziddal *i.p.* kezelt állatok (4,95 g/kg önmagában vagy L-citrullinnal kombinálva) az injekciót követően nem sokkal letargiássá váltak, és másnap reggelig elpusztultak. Ezekben a patkányokban a boncolás nem mutatott pancreatitisre utaló elváltozásokat. Az állatok valószínűleg a gyógyszer által kiváltott vaszkuláris komplikációba halhattak meg (hypotensio). Az L-argininhez és L-ornitinhez hasonlóan az L-lizin kezelés is súlyos nekrotizáló akut pancreatitist váltott ki (3-4. ábra, 1. táblázat). Összességében elmondhatjuk, hogy míg az alifás oldallánccal rendelkező bázikus aminosavak akut pancreatitist váltanak ki, addig az imidazol oldallánccal rendelkező L-hisztidinnek nincs ilyen hatása.





Az intraperitonealis nagy 3. ábra. dózisú L-hisztidin, L-arginin, L-ornitin, L-citrullin ill. L-lizin kezelés hatása a szérum amiláz aktivitásra, pancreas tömeg/testtömeg a hányadosra és a pancreaticus mieloperoxidáz aktivitásra. A patkányokat intraperitonealisan (i.p.) fiziológiás sóoldattal (kontroll, 0), L-hisztidin-HCldal (His, 3 g/kg), L-arginin-HCl-dal (Arg, 3,5 g/kg), L-ornitin-HCl-dal (Orn, 2,8 g/kg), L-citrullinnal (Citr, 2,9 g/kg) vagy L-lizinnel (Lys, 2 g/kg) kezeltünk, majd 24 óra múlva feláldoztuk őket. Az oszlopdiagramokon a (A) szérum amiláz aktivitást, a (B) pancreas tömeg/testtömeg hányadost (p.w./b.w.) és a (C) pancreaticus mieloperoxidáz (MPO) aktivitást ábrázoltuk. Az adatokat átlag ± SEM formában tüntettük fel (n = 3-5). Szignifikáns különbség (p < 0,05) a \* kontroll csoporthoz (0) illetve az \*\* L-argininnel kezelt csoporthoz képest.

1. táblázat. A patkányok pancreas károsodásának szövettani értékelése 24 órával a fiziológiás sóoldat (kontroll, 0), az L-hisztidin-HCl (His, 3 g/kg), az L-lizin (Lys, 2 g/kg), ill. equimolaris Lcitrullin (Citr, 2,9 g/kg), az L-arginin (Arg, 3,5 g/kg) vagy az L-ornitin (Orn, 2,8 g/kg) *i.p.* injekciója után. A pontszámok 3-5 állat átlagát reprezentálják.

	Kontroll	His	Citr	Arg	Orn	Lys
Interstitialis ödéma	0	0	0	1	3	3
Vascularis congestio	0	0	0	1	1	1
Leukocita adherencia	0	0	0	1	3	3
Leukocita infiltráció	0	0	0	1	3	3
Vacuolisatio	0	0	0	1	1	0
Apoptosis	0	0	0	1	2	2
Nekrózis	0	0	0	3	4	4


# 5.2. Az intraperitonealis L-arginin-, L-ornitin- és L-lizin injekció dózis- és időfüggésének vizsgálata

### 5.2.1. Az L-arginin hatása

#### 5.2.1.1. Pancreaticus nukleáris faktor- KB aktiváció

A NF-κB nukleáris transzlokációját az IκB fehérjék szabályozzák. A 3 g/kg L-arginin-HCl *i.p.* injekciója után 12-36 órával IκB-α degradációt figyeltünk meg a pancreasban (5/A. ábra). Ezzel párhuzamosan az előbbi időpontokban erős NF-κB DNS-kötő aktivitásfokozódást tapasztaltunk (5/B. ábra). A 4 g/kg L-arginin-HCl nem okozott IκB-α degradációt és NF-κB aktivációt (az adatokat nem mutatom be az ábrán). Az L-arginin kezelés tehát dózisfüggő módon befolyásolta a NF-κB aktivációját. A NF-κB kötés specificitását hidegkompetíciós kísérletekben mutattuk ki vad-típusú és mutáns oligonukleotidok segítségével. Az izotóppal nem jelölt vad-típusú kétszálú oligonukleotidok koncentrációjának növelésével csökkent a DNS-kötő aktivitás, a mutáns oligonukleotidnak viszont nem volt ilyen hatása (5/C. ábra).

#### 5.2.1.2. Pancreaticus proinflammatorikus citokin koncentrációk

A nagy dózisú L-arginin-HCl (3 vagy 4 g/kg) a kezelést követő 1 óra múlva szignifikánsan csökkentette a pancreas IL-1 $\beta$  koncentrációját (6. ábra). Az L-arginin kezelés után 12 órával az IL-1 $\beta$  szintje szignifikánsan emelkedett a kontrollhoz képest. Az IL-1 $\beta$  koncentráció 24 óra elteltével volt a legmagasabb, ezután csökkent. A pancreas TNF- $\alpha$  koncentrációja már 6 órával az injekció után emelkedett volt, a csúcsát 18 órával a kezelés után érte el, azután nagyjából egy szinten stabilizálódott. Megjegyzendő, hogy a TNF- $\alpha$  koncentrációja már a NF- $\kappa$ B DNS-kötő aktivitásának növekedése előtt emelkedni kezdett. Valószínű, hogy a TNF- $\alpha$  szintézisét a NF- $\kappa$ B-n kívül más transzkripciós faktorok is befolyásolhatják, illetve nem csak transzkripciós szinten szabályozódik a citokin expressziója.

dc\_256\_11



5. ábra. A 3 g/kg L-arginin-HCl injekció hatása a pancreaticus IκB-α szintekre és a nukleáris faktor-κB (NFκB) DNS-kötő aktivitására. A patkányokat *i.p.* oltottuk be L-arginin-HCl-dal (3 vagy 4 g/kg), majd az állatokat 0,5-96 órával az injekció után az aorta abdominalison keresztüli exsanguinatioval feláldoztuk. A kontroll állatokat (0) fiziológiás sóoldattal oltottuk be *i.p.* és 24 óra eltelte után áldoztuk fel őket. A NF-κB transzlokációját az IκB fehérjék regulálják. (A) A pancreaticus citoszolikus frakció IκB-α analízisét Western blot segítségével vizsgáltuk. A 3 g/kg L-arginin-HCl 12-36 órával az injekció beadása után IκB-α degradációt okozott. (B) A nukleáris protein extraktokat elektroforetikus "mobility shift assay"-jel (EMSA) vizsgáltuk. Az ábrán egy reprezentatív EMSA kép látható. A NF-κB csíkok denzitását Scanpack Image Analysis Program (Biometra GmBH, Göttingen, Germany) segítségével határoztuk meg. Az értékeket (átlag ± SEM, n = 4) a vonaldiagramon tüntettük fel. Az L-arginin kezelés szignifikánsan növelte a pancreaticus NF-κB DNS-kötő aktivitást 12-48 órával az injekció után. (C) A NFκB kötés specificitását hideg-kompetíciós kísérletekben mutattuk ki vad-típusú és mutáns oligonukleotidok segítségével. A nukleáris extraktok inkubálása izotóppal jelölt vad-típusú kétszálú oligonukleotiddal, illetve 20vagy 100-szoros mennyiségű jelöletlen oligonukleotiddal gátolta a DNS-kötő aktivitást, míg a mutáns oligonukleotidnak nem volt ilyen hatása. \* Szignifikáns eltérés (p < 0,05) a fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll csoporthoz (0 h) képest.

dc\_256\_11



6. ábra. A 3 és 4 g/kg L-arginin-HCl injekció hatása a pancreaticus IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  koncentrációra. Az (A) IL-1 $\beta$ - és a (B) TNF- $\alpha$  koncentrációkat a pancreaticus citoszól frakciókból határoztuk meg ELISA kitek segítségével. Az adatokat átlag ± SEM formában tüntettük fel (n = 4). \* Szignifikáns eltérés (p < 0,05) a fiziológiás sóoldattal kezelt csoporthoz képest.

#### 5.2.1.3. Pancreaticus hő-sokk fehérje expresszió

Az L-arginin adminisztráció dózisfüggő HSP60 és HSP72 expresszió fokozódást okozott (7. ábra). A HSP72 expresszió 2 órával a 3 g/kg L-arginin-HCl injekció után már szignifikánsan magasabb volt a kontrollhoz képest, a csúcsát a 18. óránál érte el és 96 óráig magas szinten maradt. A HSP60 szintje nem emelkedett meg ennyire, a csúcsát csak későbbi időpontokban (48-60. h) érte el. A 4 g/kg L-arginin-HCl injekció ugyan nagyobb mértékű pancreas károsodást okozott, a HSP indukció mértéke azonban kisebb fokú volt a 3 g/kg dózis esetén észleltekhez képest. A HSP60 expresszió a 12 – 48. óráig szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz képest. A HSP72 szintézis a 24. óráig enyhén emelkedett, majd a csúcsát 48 óra múlva érte el.



**7. ábra. Az L-arginin-HCl kezelés hatása a pancreaticus HSP60 és HSP72 szintézisre.** Az ábrán reprezentatív Western immunoblot analízisek képei láthatók. (A, C) HSP60 és (B, D) HSP72 expresszió a (A, B) 3- vagy (C, D) 4 g/kg L-arginin-HCl *i.p.* injekciója után az eltelt idő függvényében (0-96. h). Az L-arginin adminisztráció dózisfüggő módon fokozta a pancreaticus HSP60- és HSP72 expressziót.

5.2.1.4. Szérum arginin-, citrullin- és ornitin koncentrációk változása 3,5 g/kg Larginin-HCl-dal i.p. injektált patkányban

A 3,5 g/kg L-arginin-HCl *i.p.* injekcióját követően a szérum arginin-, citrullin- és ornitin koncentrációk (n = 5) szignifikánsan emelkedtek a kontroll csoport értékeihez képest (8. ábra). Fontos kiemelni, hogy a szérum ornitin koncentráció a szérum citrullin koncentrációhoz képest szignifikánsan nagyobb mértékben emelkedett. Ezen eredmények arra utalnak, hogy az L-arginin metabolizmusában az argináznak van fő szerepe.





8. ábra. A 3,5 g/kg L-arginin-HCl-dal *i.p.* kezelt patkányok szérum arginin-, citrullin- és ornitin koncentrációja az idő függvényében. Az L-arginin injekció után 2 órával a szérum (A) arginin koncentráció kb. 25-szörösére, a (B) citrullin koncentráció kb. 3-szorosára, az (C) ornitin koncentráció kb. 54-szeresére nőtt. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában tüntettük fel (n = 5). \* Szignifikáns különbség (p < 0,05) a kontroll csoporthoz (0) képest.

5.2.2. Az L-ornitin hatása

#### 5.2.2.1. 1-6 g/kg L-ornitin i.p. injekciójának hatása patkányokban

Az 1- vagy 2 g/kg L-ornitin-HCl-dal oltott állatokban nem volt detektálható pancreas lézió (n = 6, ezen eredmények nincsenek bemutatva az ábrán). A 3 g/kg L-ornitin-HCl-dal oltott állatokban súlyos akut pancreatitis alakult ki az alább részletezettek szerint: a 4-6 g/kg L-ornitin-HCl-dal beoltott patkányok (n = 6) az oltás után néhány órával letargiássá váltak, különböző neurológiai és neuromuszkuláris tüneteket produkáltak (tremor, konvulzió és közülük néhányan össze-vissza ugráltak a ketrecben).



**9.** ábra. A pancreasban észlelhető hisztopatológiai elváltozások 3 g/kg L-ornitin-HCl intraperitonealis adagolásának hatására. (A) 2. óra: nincs jelentősebb elváltozás. (B) 6. óra: az acinussejtek "habos degenerációja" (csillag); a nyílhegyek apoptoticus testekre mutatnak. (C) 24. óra: az acinussejtek jeletős fokú nekrózisa (csillag) és sok apoptoticus test (nyílhegy) látható. (D) 72. óra: az elpusztult acinusok helyén ductuloacinaris struktúrák (nyíl) jelentek meg; fibroblasztok, makrofágok és néhány neutrofil granulocita látható az interstitiumban. (E) 1. hét: néhány regenerálódott acinus (nyíl) mitotikus figurákkal (+). (F) 1. hónap: az acinusok esetén mitotikus figurák (+) és regeneratív atípia észlelhető. Néhány ductuloacináris struktúra atrofizált (nyíl), a károsodott sejtek egy részét zsírsejtek foglalták el (csillag).

#### 5.2.2.2. 3 g/kg L-ornitin i.p. hatásának vizsgálata

5.2.2.1. Makroszkópos elváltozások

A patkányok hasüregében 4-6 óra elteltével hasűri folyadék és adhéziók voltak megfigyelhetők. Az állatok pancreasa a 18-36. óráig kifejezetten ödémássá vált, mely a 24. órában volt a legkifejezettebb. A 24-72. órában esetenként a belek között és a retroperitoneumban zsírnekrózisra utaló fehéres plakkok jelentek meg. A vékony- és vastagbelek dilatációja a 72. órától 1 hétig volt megfigyelhető, ami paralyticus ileusra utalt.

**2. táblázat. A szövettani károsodás kiértékelése 2-168 órával illetve 1 hónappal a 3 g/kg L-ornitin-HCl intraperitonealis injekciója után.** A pontértékek 4 állat átlagából adódtak.

	2 h	4 h	6 h	9 h	12 h	18 h	24 h	36 h	48 h	72 h	168 h	1 hó
Hyperemia Interstitialis ödéma Leukocita adherencia Leukocita infiltráció Vacuolisatio Nekrózis Apoptosis Pogoperáció	0 0 0 0 0	0 1 0 1 1 1 0	$ \begin{array}{c}   1 \\   1 \\   0 \\   0 \\   2 \\   3 \\   1 \\   0 \\   0 \\   2 \\   3 \\   1 \\   0 \\   0 \\   0 \\   2 \\   3 \\   1 \\   0 \\   0 \\   2 \\   3 \\   1 \\   0 \\   0 \\   2 \\   3 \\   1 \\   0 \\   0 \\   2 \\   3 \\   1 \\   0 \\   0 \\   0 \\   2 \\   3 \\   1 \\   0 \\   0 \\   0 \\   2 \\   3 \\   1 \\   0 \\ $		1 3 2 3 3 0	2 1 3 1 3 4	3 3 1 2 4	2 1 2 4 0 2 3	1 1 4 0 1 3	0 1 0 4 0 1 0	0 1 3 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0

#### 5.2.2.2. Mikroszkópos elváltozások

**0-6. h.** A pancreasban nem észleltünk változást 2 órával az L-ornitin injekcióját követően (9/A. ábra, 2. táblázat). Négy órával az oltás után enyhe interstitialis ödéma, az acinussejtek "habos degenerációja" és vasularis congestio volt megfigyelhető. A hatodik órában az apoptoticus testek száma jelentősen nagyobb volt, és az acinussejtek fokális nekrózisát (<10 %) láttuk (9/B. ábra). A transzmissziós elektronmikroszkópos képen ugyanezen időpontban zimogén granulumokat, myelin figurákat és mitokondriális maradványokat tartalmazó nagy autofág vacuolumok voltak láthatók (10. ábra). A "habos" vacuolisatio a közepes denzitású zsírcseppeknek felelhet meg a sejtek bazális részében. Összességében a "tight junction"-ok, mitokondriumok és az endoplazmatikus retikulum megtartottak voltak. Néhány acinussejtben a kromatin kondenzálódott a nukleáris membrán alatt, a nukleoluszok eltűntek, a citoplazma pedig zsugorodott (zajló apoptosis). Ezekben a sejtekben a mitokondriális kriszták és a durva felszínű endoplazmatikus retikulum enyhén dilatáltak voltak, a riboszómák részben leváltak az utóbbi struktúrákról.

**9-12. h.** A kilencedik órában interstitialis ödémát, neutrofil és monocita adherenciát és fokális infiltrációt detektáltunk. A pancreas szövetben nagyszámú autofág vacuolumot és apoptoticus testet találtunk. Az acinus nekrózis mértéke 15-25 % körül volt. A tizenkettedik

órában diffúz közepes fokú monocita és neutrofil infiltrációt láttunk, az acinussejt nekrózis mértéke 26-50 % volt.

18-24. h. Tizennyolc órával az L-ornitin beoltása után a pancreaticus ödéma igen kifejezett volt, az autofág vacuolumok száma csökkent az előző időponthoz képest. Az acinussejtek kb. 51-75 %-a nekrotizált. A legsúlyosabb ödémát a 24. óránál észleltük (9/C. ábra). Utóbbi időpontban az elektronmikroszkópos vizsgálat súlyos, zonális acinussejt károsodást mutatott (10. ábra). A károsodott, nekrotikus sejtek elsősorban az acinusok közepére lokalizálódtak, az acinusok bazális részén kevésbé károsodtak a sejtek. A nagy autofág vacuolumok zimogén szemcséket, mylein figurákat és/vagy granuláris elektrondenz anyagot tartalmaztak. A zimogén granulumok száma jelentős mértékben, bizonyos területeken nullára csökkent. Alapvetően két fő típusú sejtkárosodás volt megfigyelhető a metszeteken: a nukleáris membrán alatt (az utóbbi ritkábban). A nukleoluszok eltűnése a citoplazma zsugorodásával, vagy anélkül is jellemző volt. Az acinussejtek bazális kompartmentjében közepes denzitású lipid cseppek voltak megfigyelhetők. A mitokondriumok nem tűntek kórosnak, de a durva felszínű endoplazmatikus retikulum kitágult, a riboszómák leváltak róla. Az interstitialis térben számos neutrofil és monocita sejt volt megfigyelhető.

**36-48. h.** A harminchatodik órában a pancreas ödémája még mindig súlyos volt. A monocita és neutrofil sejtek adherenciája csökkent, de masszív neutrofil infiltrációt láttunk; az acinussejtek nekrózisa 26-50 % volt. A pancreas lobularis struktúrája megbomlott. Az interstiumban fibroblasztok jelentek meg. Ezekben a metszetekben már a regeneráció jelei is megfigyelhetők voltak: a pancreas perifériás zónájában differenciálatlan, ductuloacinaris struktúrák szórványos citoplazmával és bazofil nukleusszal. A negyvennyolcadik órában a szövettani képet a diffúz, súlyos monocita/makrofág, fibroblaszt és neutrofil granulocita infiltráció uralta.

A **72. órá**ban már nem volt interstitialis ödéma, de a diffúz gyulladásos infiltráció még mindig megfigyelhető volt (9/D. ábra). A lobulusokban és a ductuloacinaris struktúrák körül enyhe fokú kollagéndepozíció volt. A ductuloacinaris struktúrák a tubularis luminából eredtek. A metszetekben mitotikus figurákat és kisfokú apoptoticus aktivitást láttunk.

Egy héttel az L-ornitin injekció után még mindig diffúz, közepes mértékű fibroblasztés makrofág infiltráció volt megfigyelhető, a neutrofilok száma csökkent a pancreas szövetben (9/E. ábra). A lobulusokon belül és a ductuloacinaris struktúrák körül enyhe fokú kollagén depozíciót láttunk. A destruált lobulusok egy részének helyét zsírszövet töltötte ki. A ductuloacinaris struktúrákból ductulusok és acinusok képződtek, néhány acinussejtben már

zimogén granulumok is voltak. A kis ductusok és ductulusok dilatáltak voltak, és olykor eozinofil anyagot tartalmaztak. Az alacsony nagyítású elektronmikroszkópos képeken több ductuloacinaris struktúra, kapilláris, mononukleáris sejt és interstitialis kollagén depozíció volt látható (10/G., H. ábra). Néhány megnagyobbodott sejt sok kicsi elektrondenz granulumot tartalmazott, ami ductoendokrin proliferációra utal.

**1 hónap**pal az L-ornitin kezelés után a pancreas-szövet már hasonlított a kontrollhoz, a károsodott parenchyma egy részét azonban zsírszövet töltötte ki (9/F. ábra). Az acinusban nagyfokú mitotikus aktivitás és regeneratív atípia volt megfigyelhető. A fibroblasztok és makrofágok eltűntek a pancreas szövetből. A 4 állatból 1-nél fokális limfocitákból, makrofágokból és eozinofilokból álló periductalis infiltrációt láttunk.

A pancreas ductalis sejtjeiben, a Langerhans szigetek sejtjeiben és a májban nem láttunk elváltozást a H&E metszeteken. Egy állatban azonban igen nagyfokú Langerhans sziget hiperpláziát észleltünk egy hónappal az L-ornitin kezelés után. A vesében a 9-36. órában a tubulusok lumenében eozinofil cilindereket láttunk a proximális tubulusok dilatációjával együtt. Egyes esetekben a microvillusok leválását találtuk enyhe peritubularis capillaritis kíséretében. Az utóbbi elváltozások enyhe fokú akut tubuláris nekrózisra utalnak. Ugyanebben az idő-intervallumban a tüdőben kismértékű alveolaris megvastagodás volt látható neutrofil infiltrációval, esetenkénti bevérzéssel. Utóbbi elváltozások enyhe fokú légzési disztressz szindrómára utalnak.



**10. ábra. A patkány pancreas elektronmikroszkópos vizsgálata 0- (A, B), 6- (C, D), 24 órával (E, F) és 1 héttel (G, H) az L-ornitin-HCl (3 g/kg i.p.) adminisztrációját követően.** A képen a következő struktúrák figyelhetők meg: **(A)** sejtmag (nyílhegy) és nukleolusz (csillag). **(B)** Mitokondrium (nyílhegy), durva felszínű endoplazmatikus retikulum (csillag) és zimogén granulumok (kereszt) (skála = 1 µm). **(C)** A mitokondriumok nem tűntek károsodottnak (betét); autofág vacuolumok (nyilak) és zsírcseppek (nyílhegy) jelentek meg. **(D)** Autofág vacuolumok zimogén granulumokkal (nyilak), myelin figurák (csillag) és mitokondriális maradványok (nyílhegy). **(E)** Nukleusz lízise (nyilak); a mitokondriumok nem voltak érintve (betét). Helyenként kromatin kondenzációt figyeltünk meg a citoplazma zsugorodásával (nyílhegy) (skála = 5 µm). **(F)** Kitágult az endoplazmatikus retikulum (csillag); perifériásan kompaktálódott a kromatin (nyíl). **(G)** A kapillárisok (csillag) és fibroblasztok körül ductuloacinaris struktúrák (nyilak) jelentek meg (skála = 10 µm). **(H)** A ductuloacinaris struktúrák (nyíl) zimogén granulumokat tartalmazó acinussejtekké differenciálódtak (nyílhegy) (skála = 5 µm). A skálák mérete 2 µm, kivéve, ahol másként tüntettük fel.

#### 5.2.2.3. Laborparaméterek változása

A szérum amiláz aktivitások a 9-24. óráig szignifikánsan növekedtek, azután (48. órában) a kontroll érték alá csökkentek (n = 4-10, 11/A. ábra). A pancreas amiláz aktivitása a 24. órától szignifikánsan csökkent, a 72. és a 168. óra között szinte alig volt detektálható (n = 4-8, 11/B. ábra). Az L-ornitin injekció után 24 órával a hasüregből kinyert ascites amiláz aktivitása rendkívül magas (98.096  $\pm$  25.590 U/l, n = 7) volt. A pancreaticus tripszin aktivitás 9-48 órával a 3 g/kg L-ornitin-HCl beadását követően szignifikánsan emelkedett (11/C. ábra). A gyulladásos mediátorok hatására a pancreasban megjelenő leukociták infiltrációjának mértékét a MPO aktivitás meghatározásával kvantifikáltuk (11/D. ábra). A gyulladásos beszűrődésnek két jól elkülöníthető fázisa volt. Az első fázis az amiláz aktivitás csúcsával (9-36. h) esett egybe, a második jóval később (a 72. órában) következett be.



11. ábra. A szérum amiláz aktivitás és a pancreas amiláz-, tripszin- és mieloperoxidáz aktivitás alakulása az idő függvényében 3 g/kg L-ornitin-HCl *i.p.* injekcióját követően. A vonaldiagramok a (A) szérum amiláz- és pancreaticus (B) amiláz-, (C) tripszin- és (D) MPO aktivitást ábrázolják. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában tüntettük fel (n = 4-10). \* Szignifikáns különbség (p < 0,05) a kontroll csoporthoz (0) képest.

#### 5.2.2.2.4. Pancreaticus hő-sokk fehérje 72 expresszió

A fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll csoportban nem lehetett HSP72 expressziót kimutatni (12/A. ábra). Az L-ornitin injekciója után 4 órával a HSP72 expresszió szignifikánsan nőtt, a 18. órában volt a csúcsa, és 1 hónap elteltekor is emelkedett maradt. A HSP72 expressziójának fokozódása már igen korán jelzi a pancreas válaszreakcióját a károsító ágenssel szemben.

#### 5.2.2.2.5. Pancreaticus IκB-α és IκB-β degradáció, interleukin-1β koncentráció

Az L-ornitin injekció hatására a pancreaticus I $\kappa$ B szintek a 9. órától kezdve szignifikánsan csökkentek (12/B-C. ábra). Az I $\kappa$ B- $\alpha$  szintje (12/B. ábra) 36 órával az L-ornitin injekciót követően normalizálódott, az I $\kappa$ B- $\beta$  szintje azonban 168 órával a beadás után is alacsony maradt (12/C. ábra). Az I $\kappa$ B degradációval összhangban - és a NF- $\kappa$ B aktiváció következtében - a pancreaticus IL-1 $\beta$  szintézis a 9. órától kezdve szignifikánsan nőtt (12/D. ábra).

#### 5.2.2.2.6. A pancreaticus apoptosis kvalitatív és kvantitatív meghatározása

Genomikus DNS analízis. A pancreasból 0-, 9- és 24 órával az L-ornitin adminisztrációja után genomikus DNS-t izoláltunk. A 13/A. ábrán látható, hogy 9 órával az L-ornitin injekciója után az agaróz gélelektroforézis létraszerű mintázatot mutatott, ami nagyfokú apoptoticus aktivitásra utal. 24 órával az L-ornitin injekciót követően a DNS nemspecifikus degradációra jellemző (smear) képet mutatott, ami nagymértékű nekrózis jelenlétére utal. A 24. órában a sejtek apoptosisa helyett a nekrózis uralta a képet, mely egybevág a szövettani vizsgálatnál tapasztaltakkal.



12. ábra. Az L-ornitin-HCl adminisztráció (3 g/kg *i.p.*) hatása a pancreas HSP72-, az I $\kappa$ B- $\alpha$ -, az I $\kappa$ B- $\beta$ - és az IL-1 $\beta$  expressziójára az idő függvényében. (A-C) Pancreas protein lizátumok reprezentatív Western immunoblot analízise 0-168 órával és 1 hónappal az L-ornitin injekció után. Az ábrán a (A) HSP72-, az (B) I $\kappa$ B- $\alpha$ - és az (C) I $\kappa$ B- $\beta$  expresszió látható. (D) A vonaldiagram a citoszol frakcióból meghatározott IL-1 $\beta$  koncentrációját mutatja. Az adatokat átlag ± SEM formában tüntettük fel (n = 4-6). \* Szignifikáns különbség (p < 0,05) a kontroll csoporthoz (0) képest.

dc\_256\_11



13. ábra. A pancreaticus apoptosis jelentősen nő 3 g/kg L-ornitin-HCl-dal (*i.p.*) kezelt patkányokban. A patkányok hasnyálmirigyéből genomikus DNS-t izoláltunk 0-, 9- és 24 órával az L-ornitin injekciót követően (n = 3). (A) 15-20  $\mu$ g DNS-t elektroforetikusan frakcionáltunk 1,8 % agaróz gélen. MSM: molsúly marker, bp: bázispár. (B) Az apoptoticus sejtek %-os arányát a pancreas metszeteken TUNEL technikával határoztuk meg. Az adatokat átlag ± SEM formában tüntettük fel (n = 4). \* Szignifikáns különbség (p < 0,05) a kontroll csoporthoz (0) képest.

*TUNEL technika*. A szövettani analízis szerint 6 órával az L-ornitin injekció után az apoptoticus sejtek száma nagymértékben fokozódott. Ahhoz, hogy ezt pontosan kvantifikálni tudjuk, megszámoltuk az apoptoticus sejteket 0 és 48 órával az L-ornitin injekciót követően. Ahogy az a 13/B. ábrán is látszik, az apoptoticus sejtek %-os aránya nagymértékben megnőtt az L-ornitin kezelés hatására. Az apoptosis ráta 6-9 órával a kezelés után volt a legnagyobb (n = 4).

5.2.2.2.7. Pancreaticus nem-protein szulfhidril-csoport tartalom, a glutationperoxidáz- és a szuperoxid-dizmutáz aktivitások

A NSG tartalom a kontroll csoporthoz képest szignifikánsan növekedett 6 órával az L-ornitin injekciót követően, majd fokozatosan csökkent (14/A. ábra). A GSH-Px- (14/B. ábra) és Cu/Zn-SOD (14/C. ábra) aktivitások a 24. óra után sziginifikásan emelkedtek. Ezzel ellentétben a Mn-SOD aktivitás (14/D. ábra) a 24. órában szignifikánsan alacsonyabb, a 48. órában szignifikánsan magasabb volt a kontrollhoz képest. Összességében ezek az eredmények arra utalnak, hogy az L-ornitin kezelés hatására oxidatív stressz alakul ki a pancreasban.



14. ábra. Az L-ornitin-HCl (3 g/kg *i.p.*) injekció oxidatív stresszt vált ki a pancreasban. A vonaldiagramok a pancreaticus (A) nem-fehérje szulfhidril-csoport (NSG) tartalmat, a (B) glutation-peroxidáz (GSH-Px)-, a (C) Cu/Zn- és a (D) Mn-szuperoxid-dizmutáz (SOD) aktivitásokat ábrázolják. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában tüntettük fel (n = 5-6). \* Szignifikáns különbség (p < 0,05) a kontroll csoporthoz (0 h) képest.

#### 5.2.2.2.8. Testtömeg, pancreas tömeg/testtömeg hányados

A patkányok testtömege az L-ornitin injekciót követő első naptól 1 hónapig szignifikánsan csökkent a kontroll állatokéhoz képest (n = 5-10, 15/A. ábra). Az L-ornitin injekciót követően a 18-48. óráig a p.w./b.w. szignifikánsan emelkedett, majd a 168. órától 1 hónapig szignifikánsan csökkent (15/B. ábra). A p.w./b.w. emelkedés az ödémának, a csökkenés a nekrózisnak a következménye.



15. ábra. A testtömeg, pancreas tömeg/testtömeg hányados, a szérum aszpartát-aminotranszferáz aktivitás és a glükóz koncentráció változása *i.p.* adott 3 g/kg L-ornitin injekciót követően. (A) Testtömeg (b.w.), (B) p.w./b.w., a szérum (C) aszpartát-aminotranszferáz (ASAT) aktivitás és a (D) glükóz koncentráció. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában tüntettük fel (n = 4-10). \* Szignifikáns különbség (p < 0,05) a kontroll csoporthoz (0) képest.

5.2.2.2.9. Szérum aszpartát-aminotranszferáz aktivitás és a glükóz-,  $Ca^{2+}$ -, triglicerid-, urea- és kreatinin koncentrációk

A szérum aszpartát-aminotranszferáz (ASAT) aktivitás 24 és 48 órával az L-ornitin injekciót követően szignifkánsan nőtt (15/C. ábra), ami máj-érintettségre utal. A szérum glükóz koncentráció a 24. és a 72. óra között szignifikánsan csökkent (feltehetőleg az anorexia miatt), majd 1 héttel az L-ornitin kezelést követően a kontroll értékre tért vissza (15/D. ábra). A szérum triglicerid koncentráció csak a 72. óránál tért el szignifikáns mértékben a kontroll csoporttól (0,40  $\pm$  0,03 mM/l vs 0,71  $\pm$  0,18 mM/l). A Ca<sup>2+</sup>-, urea- és kreatinin koncentráció nem különbözött szignifikánsan a kontroll csoporthoz képest (ezeket az eredményeket nem mutatom be az ábrán).

#### 5.2.3. Az L-lizin hatása

#### 5.2.3.1. 1-5 g/kg L-lizin i.p. injekciójának hatása patkányokban

A 0-2 g/kg dózisú injekció hatására egyetlen állat sem pusztult el (n = 6-12). A 2,5 g/kg-os dózis a patkányok 43 %-ánál (n = 7), a 3 g/kg-os 54 %-nál (n = 13), a 3,5 g/kg-ps 80 %-nál (n = 5), a 4-5 g/kg-os dózis valamennyi állatnál (n = 4-9) halálos volt. Összességében tehát megállapítható, hogy patkányok esetén az *i.p.* adott L-lizin LD50 értéke 2,5-3 g/kg között van. Az elhullott állatok neurológiai és neuromuszkuláris tüneteinek (letargia, konvulzió, remegés) megjelenését követően az L-lizin injekció után 2-3 órán belül pusztultak el. *Post mortem* feldolgozásuk során kizárható volt a pancreatitis kialakulása.

Az 1 g/kg L-lizin injekció hatására az állatok pancreasa teljesen ép maradt, míg a nagyobb dózisok morfológiai károsodást eredményeztek. A szövettani kép az 1,5 g/kg dózis esetén 6 állatból 1, 2 g/kg-os injekciónál 12-ből 10, míg 3-3,5 g/kg használata során mindegyik az akut nekrotizáló pancreatitisre jellemző elváltozásokat mutatotta.

A 2-3,5 g/kg L-lizin hatására a pancreatitises állatokban a preparálás során az idő előrehaladtával fokozatosan váltak láthatóvá a betegség jelei. A pancreas mérete megnagyobbodott, a szerv körül foltos kalcifikációt észleltünk, a hasüregben ascites képződött.

Eredményeink alapján az L-lizin indukálta akut pancreatitis időbeli lefolyásának vizsgálatához a 2 g/kg dózist választottuk.

# 5.2.3.2. 2 g/kg L-lizin injekció (i.p.) hatásának időbeli vizsgálata

#### 5.2.3.2.1. Makroszkópos elváltozások

A 2 g/kg L-lizin *i.p.* injekcióját követően az állatok vizsgálata előre meghatározott időpontokban történt. A kísérlet közben megfigyeltük az állatok viselkedését. Az oltás után a legfeltűnőbb változás az volt, hogy a fiziológiásan nagy mozgásigényű patkányok egyre kevesebbet mozogtak, és nem táplálkoztak. Az idő előrehaladtával aktivitásuk egyre csökkent, egymástól elkülönültek, a szőrük felborzolódott. Az elaltatott állatok hasüregének megnyitásával a pancreatitis során kialakult jellegzetes szervi elváltozások voltak megfigyelhetők. Az L-lizin injekció után 18-24 órával a hasnyálmiriggyel érintkező szervek között adhéziók alakultak ki, majd a 24-72. órában olykor a szervek felszínén, a mesenteriumban és a retroperitonealis zsírszövetben kalcifikációt láttunk. A pancreas tömege megnagyobbodott, az ödéma mértéke az injekciót követő 24. órában volt a legkifejezettebb. A vékony- és vastagbelek dilatációja a 48. órától 1 hétig volt megfigyelhető, ami paralyticus ileusra utal.

5.2.3.2.2. Mikroszkópos elváltozások

A 2 g/kg L-lizin *i.p.* injektálását követően a patkányok hasnyálmirigyében zajló gyulladás lépései leglátványosabban a H&E-os szövettani képeken követhetők nyomon (16. ábra). A szövettani pontértékek a 3. táblázatban láthatók. **2 órá**val az L-lizin injekció után az acinussejtek szerkezete megváltozott, vacuolisalódtak (16/B. ábra.). Az idő előrehaladtával a világosan festődő vacuolumok mérete egyre nagyobb lett, és több acinussejtben is megjelent. Az L-lizin kezelést követő **6. órá**ban a "habos degeneráció" már az acinusok zömét érintette, és néhány apoptoticus test is látható volt (16/C. ábra). Az apoptosis mértéke 6 órával az L-lizin injekciót követően (0,44  $\pm$  0,07 %) szignifikánsan nőtt a kontroll értékhez (0,13  $\pm$  0,01 %) képest. A szöveti hyperaemia és a leukocitáknak a kapillárisok falára való kitapadása egyaránt fokozódott.

12 órával az L-lizin injekció után a sejtek "habos degenerációja" megszűnt, de az apoptoticus testek száma nőtt (1,02  $\pm$  0,19 %), az acinusok közel 25 %-a nekrotizált. A 24. órára a nekrotizált acinussejtek aránya már 50-75 %-os, az apoptosis mértéke 0,58  $\pm$  0,05 % volt. Az interstitialis ödéma kiterjedése fokozódott, a gyulladásos sejtek (monociták és neutrofil granulociták) száma is nőtt (16/D. ábra).



54

16. ábra (az előző oldalon). Hisztopatológiai változások 2 g/kg *i.p.* L-lizinnel indukált akut pancreatitisben. A 2 g/kg *i.p.* L-lizinnel kezelt patkányok hematoxilinnel és eozinnal (H&E) festett pancreas metszetei: (A) 0. óra: kontroll pancreas. (B) 2. óra: az L-lizin injekció után az acinussejtek "habos degenerációja" látható (csillag). (C) 6. óra: masszívabb "habos degeneráció" (kinagyítva a bal felső sarokban láthatók az acinusokban képződött világosabban festődő vacuolumok) és apoptoticus testek (nyíl). (D) 24. óra: az acinussejtekben nekrózis (csillag) és nagyfokú apoptosis (nyíl) van jelen. (E) 48. óra: súlyos nekrózis, gyulladásos sejtes beszűrődés és kiterjedt interstitialis ödéma látható. (F) 72. óra: a károsodott acinusok helyén a regeneráció jeleként ductuloacinaris struktúra jelenik meg (nyíl). (G) 1. hét: ductuloacinaris struktúrák (csillag) mellett néhány mitotikus aktivitást mutató (háromszög), regenerálódott acinus (nyíl) található. (H) 1. hónap: regenerálódott acinusok (nyíl) mitózissal (háromszög). A károsodott acinusok egy részének helyét zsírsejtek (csillag) foglalják el. A skála mérete 100 μm.

**3. táblázat. A szövettani károsodás kiértékelése 2-168 órával, illetve 1 hónappal a 2 g/kg L-lizin intraperitonealis injekciója után.** A hisztopatológiai pontértékek két patológus konszenzusából adódtak (n = 5-6). A kontroll állatok (melyek fiziológiás sóoldattal voltak beoltva L-lizin helyett) értékei 0-k voltak.

	2 h	4h	6 h	9h	12 h	18h	24 h	48 h	72 <i>h</i>	168h	1 hó
Hyperemia	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Interstitialis ödéma	1	1	1	2	1	2	3	3	1	1	0
Leukocita adherencia	0	1	1	2	2	3	3	3	3	3	0
Leukocita infiltráció	0	0	0	1	2	2	4	4	4	4	0
Vacuolisatio	3	4	4	4	2	0	0	0	0	0	0
Nekrózis	0	0	0	0	1	2	4	2	1	0	0
Apoptosis	0	0	1	2	2	1	2	1	2	1	0
Regeneráció	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0

**48 órá**val az injekció után a leukocita infiltráció mértéke elérte maximumát. Az apoptoticus testek és a nekrotizáló acinussejtek száma, továbbá az ödéma mértéke csökkenést mutatott. Ugyanekkor a regeneráció jeleként az interstitiumban fibroblasztok és a pancreas perifériáján ductuloacinaris struktúrák jelentek meg (16/E. ábra).

72 órával az injekció után ödéma már nem volt megfigyelhető a pancreasban. Az apoptosis még sok sejtet érintett (1,59  $\pm$  0,05 %), a gyulladásos sejtek száma is magas volt. A fibroblasztok diffúzan infiltrálták a szövetet, a ductuloacinaris struktúrák körül kollagén depozitumok alakultak ki (16/F ábra).

1 héttel az injekció után még mindig diffúz, mérsékelt fokú gyulladásos beszűrődés volt látható; egy-egy ductuloacinaris struktúrából új acinusok és ductusok képződtek (16/G. ábra). Az apoptosis mértéke  $1,39 \pm 0,18$  % volt. A károsodott parenchyma egy részét zsírsejtek foglalták el.

**1 hónap**pal az L-lizin kezelést követően a pancreas hisztológiai képe a fiziológiáshoz volt hasonló. Fibroblasztok és gyulladásos sejtek már nem voltak jelen, a parenchyma struktúrája rendezetté vált, benne több ép és regeneratív atípiát mutató acinussal. A károsodott acinusok egy részének helyét zsírszövet foglalta el (16/H. ábra).

Fontos megemlíteni, hogy a Langerhans szigetekben és a körülöttük elhelyezkedő acinusokban nem találtunk jelentős patomorfológiai eltérést a betegség lefolyása alatt. A betegség a ductusok morfológiai képét sem befolyásolta.

A H&E képek alapján felmerült, hogy az L-lizines pancreatitismodellben a "habos degeneráció" mitokondriumoknak felelhet meg. Ismert, hogy a NADH<sub>2</sub> diaforáz enzimhisztokémiával ezek a sejtstruktúrák jól megjeleníthetők. A kontroll pancreas szövetben a mitokondriumok sötétkéken festődtek, főleg perinukleárisan helyezkedtek el. Formájuk apró pálcikához hasonló, hosszuk  $0,94 \pm 0,03 \mu m$  (n = 43) (17/A. ábra). Két órával az *i.p.* L-lizin injekció után a mitokondriumok nagy része világoskék vezikula lett, a hosszuk megnőtt (1,45 ± 0,06  $\mu m$ , n = 42) (17/B. ábra). A H&E-os metszeteken ugyanebben az időpontban észleltük a világosabban festődő vacuolumokat. Valószínű tehát, hogy az acinusok "habos degenerációja" a mitokondriumok duzzadásával (hidropikus degeneráció) magyarázható. 24 órával az L-lizin injekció után az acinussejtekben már alig találtunk mitokondriumot, az apoptosis jeleként több sejtmag is összezsugorodott (17/C. ábra).



17. ábra. A 2 g/kg L-lizin injekció a pancreaticus mitokondriumok korai hidropikus degenerációját eredményezi. A mitokondriumokat diaforáz enzimhisztokémiával jelenítettük meg. A csillagok az acinussejtek nukleuszát, a nyilak a mitokondriumokat jelzik. (A) A kontroll szövetben a mitokondriumok sötétkéken festődtek, és főleg perinukleárisan helyezkedtek el. (B, C) A 2 g/kg L-lizinnel (*i.p.*) kezelt állatból származó minták. (B) 2 órával az injekció után világosabb, megduzzadt mitokondriumok is látszanak. (C) A 24. órában olyan kiterjedt volt a pancreas károsodás, hogy alig találtunk a metszeten mitokondriumot. A skála mérete 6  $\mu$ m.

A pancreas minták elektronmikroszkópos képén 6-, 24 óra és 1 hét múlva a 2 g/kg L-lizin injekció után bekövetkező mikroszkópos elváltozások láthatók (18. ábra). Az L-lizin kezelés után **6 órá**val az acináris mitokondriumok megduzzadtak, hosszuk 2-4 µm volt. Néhánynak a mérete a nukleuszét is megközelítette (18/C-D. ábra). Több sejtmag széli részében az apoptosis jeleként a kromatinállomány kondenzálódott. Az endoplazmatikus retikulum és a zimogén granulumok szerkezete viszont intakt maradt. A rutin hisztológiánál

jobb felbontású elektronmikroszkópos kép megerősítette a H&E-os metszeteken látott acináris vacuolisatiot és a diaforáz enzimhisztokémiával készült mintákon észlelt világoskék gömbszerű vezikulák eredetét. Ezek az elváltozások a mitokondriumok hidropikus degenerációjával magyarázhatók. A **24. órá**ban az acinusok súlyosan károsodtak (18/E-F. ábra). A sejtek zsugorodtak, kromatinállományuk tömörült, a nukleoluszok eltűntek, a mitokondriumok száma lecsökkent. A citoplazmát mielin figurákat-, zsírcseppeket- és zimogén szemcséket tartalmazó nagy autofág vacuolumok töltötték ki. A durva felszínű endoplazmatikus retikulum ciszternái kitágultak, a felületét kevesebb riboszóma borította. Az interstitialis teret gyulladásos sejtek szűrték be. Az injekciót követő **1. hét**en a pancreas-szövet regenerációja megkezdődött (18/G-H. ábra). A sejtek között kollagéndepozitumok, néhány mononukleáris sejt és tekervényes ductuloacinaris struktúra volt megtalálható, melyből ép acinusok és ductusok differenciálódtak.



**18.** ábra (az előző oldalon). A 2 g/kg L-lizin *i.p.* injekció az acinussejtek károsodását, a mitokondriumok hidropikus degenerációját okozza patkányokban. Az elektronmikroszkópos képeken a kontroll (A, B), illetve az L-lizinnel kezelt patkányok pancreas elváltozásait lehet megfigyelni 6- (C, D), 24 órával (E, F) és 1 héttel (G, H) az injekciót követően. (A) Az acinusok zimogén granulumokat (nyíl) tartalmaznak, sejtmagjuk ép szerkezetű (nyílhegy) (skála = 2  $\mu$ m). (B) Nagyobb nagyításban az ép mitokondriumok (nyíl), zimogén granulumok (kereszt) és durva endoplazmatikus retikulum (csillag) (skála = 0,2  $\mu$ m). (C) A mitokondriumok hidropikusan degenerálódnak (nyíl), néhánynak (nyílhegy) a mérete a nukleoluszét (csillag) közelíti meg. (skála = 2,5  $\mu$ m) (D) Durva endoplazmatikus retikulum (csillag). A duzzadt mitokondriumokban (kereszt) a kriszták (nyílhegy) is sérülnek. (skála = 0,4  $\mu$ m) (E) Az összetőmörült kromatin (csillag) a sejtmag szélére szorul. Az autofág vacuolumokban mielin (nyílhegy) és lipidcseppek (nyíl) láthatók. (skála = 2,5  $\mu$ m) (F) Nagyobb nagyításban lipidcseppek (nyíl) és a durva endoplazmatikus retikulum kitágult ciszternái (csillag) látszanak. (skála = 0,6  $\mu$ m) (G) Az új acinussejtek a ductuloacinaris struktúrákból (nyíl) alakulnak ki. Kapilláris az interstitiumban (csillag). (skála = 7  $\mu$ m) (H) A regenerált acinusban több új zimogén granulum (kereszt) is látható (skála = 3  $\mu$ m).

#### 5.2.3.2.3. L-lizin-indukálta laborparaméter változások

Az L-lizin hatására a p.w./b.w. kétfázisú emelkedést követően a kontroll érték alá csökkent (20/A. ábra). A p.w./b.w. kezdetben (2-9. h) fokozódott, majd (12. h) visszatért a kontroll szintre. Ez a kinetika jól korrelált az acinussejtek "habos degenerációjának" (mitokondriális duzzanat) megjelenésével és eltűnésével. A p.w./b.w. ezután (18-48. h) szignifikánsan nőtt a pancreas ödéma következtében, majd (az acinusok szinte teljes destrukciója miatt) a kontroll érték alá csökkent.

Az emésztőenzimek akut pancreatitisben kijutnak a károsodott acinussejtekből, ezért a szérum amiláz- és szérum lipáz aktivitása a betegség kezdetén megnő. Kísérletünkben 12-24 órával az *i.p.* L-lizin injekció után a szérum amiláz- és -lipáz aktivitás szignifikánsan megemelkedett (a kontroll állatok értékeihez képest) (20/B-C. ábra). Az injekció után 24 óra – 1 héttel a pancreasban az amiláz aktivitása a nagyfokú acinussejt nekrózis miatt szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest (20/D. ábra).

Érdekes, hogy az akut pancreatitis egyik fő patogenetikai tényezőjeként ismert pancreaticus tripszin aktivitás a betegség korai fázisában nemhogy nem nőtt, hanem 0,5–2 órával az L-lizin injekciót követően szignifikánsan csökkent. Ezután a tripszin aktivitás 12-24 órával a kezelés után szignifikáns növekedést mutatott (20/E ábra).

A MPO aktivitás az L-lizin kezelést követően lassan emelkedett, és a 24–72. órában vált szignifikánsan magasabbá (20/F. ábra). A regeneráció során csökkent a gyulladásos beszűrődés, a MPO aktivitás a 168. órára visszatért a kiindulási szintre.



**20. ábra. A 2 g/kg L-lizin kezelés a súlyos akut nekrotizáló pancreatitisre jellemző laborparaméterek változását eredményezi. (A)** A p.w./b.w. a 2 g/kg L-lizin *i.p.* beadása után bifázisosan nőtt, legmagasabb értékét 24 óra múlva érte el. A kiterjedt pancreas szövetpusztulás következtében a 168. órára a kontroll érték alá csökkent. A szérum (B) amiláz- és (C) -lipáz aktivitás szignifikánsan megemelkedett a 12-24. órában, míg a (D) pancreas amiláz aktivitása a 24. órától szignifikánsan csökkent. (E) A tripszin aktivitás 0,5-2 óra között a betegség kezdetén szignifikánsan fokozódott, majd a 12. órától nőtt. (F) A pancreaticus MPO aktivitás a 24–72. órában szignifikánsan fokozódott, majd a 168. órára visszatért a kontroll szintre. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában tüntettük fel (n = 5-6). \* Szignifikáns eltérés (p < 0,05) a kontroll csoporthoz (0 h) képest.

5.2.3.2.4. Pancreaticus spermidin/spermin  $N^1$ -acetiltranszferáz aktivitás és poliaminszintek

A pancreaticus SSAT aktivitás az L-lizin kezelés hatására bifázisos emelkedést mutatott (21/A. ábra). Az első csúcsot a 12. óránál, a másodikat a 48-72. óránál láttuk. Ezzel párhuzamosan 24-168 órával az L-lizin injekciót követően a spermidin szint szignifikánsan csökkent a kontroll értékhez képest (21/B. ábra). A spermin szint nem változott az L-lizin kezelés hatására; putreszcint nem tudtunk kimutatni (ezeket az eredményeket nem mutatom be az ábrán).



**21. ábra. Az intraperitonealis L-lizin kezelés (2 g/kg) poliamin katabolizmust okoz a pancreasban.** A vonaldiagramok a pancreaticus **(A)** spermidin/spermin  $N^1$ -acetiltranszferáz (SSAT) aktivitást és a **(B)** spermidin szinteket mutatják. Az adatokat átlag ± SEM formában tüntettük fel (n = 5-6). \* Szignifikáns eltérés (p < 0,05) a kontroll csoporthoz (0 h) képest.

5.2.3.2.5. Pancreaticus hő-sokk fehérje72 és IκB-α expresszió

A kontroll állatokból izolált pancreasban nem volt detektálható HSP72 expresszió, míg a pancreatitis kialakulásával párhuzamosan a HSP72 szintézise fokozódott (22/A. ábra). A 2 g/kg L-lizin injekció után 4 órával a HSP72 kifejeződése szignifikánsan nőtt, maximumát az injekció után 12-18 órával érte el és a 72. óráig emelkedett maradt.

A pancreas I $\kappa$ B- $\alpha$  mennyisége az L-lizin injekciót követő 24-168. órában a kontrollhoz képest szignifikánsan csökkent (22/B. ábra). Ezzel párhuzamosan az L-lizin injekció után 24-72 órával a pancreaticus IL-1 $\beta$  expresszió szignifikánsan nőtt (22/C. ábra). Öszességében ezek az eredmények fokozott NF- $\kappa$ B aktivációra utalnak.



**22. ábra. A 2 g/kg L-lizin** *i.p.* injekciója pancreaticus HSP72 és IL-1β expresszió fokozódást, illetve IκB-α degradációt okoz. (A) A reprezentatív Western blot képen látszik, hogy a HSP72 expressziója ép és a regenerálódott pancreas szövetben (0. óra, 1. hó) nem detektálható. Az L-lizin injekcióját követően a HSP72 expressziója a 4. órától nőtt, maximumát a 12-18. órára érte el. (B) Az IκB-α szintje a 18-168. óra között csökkent, mellyel párhuzamosan a 24-72. óra között az (C) IL-1β szintézise is szignifikánsan megemelkedett. Az adatokat átlag ± SEM formában tüntettük fel (n = 6). \* Szignifikáns eltérés (p < 0,05) a kontroll csoporthoz (0 h) képest.

#### 5.2.3.2.5. A pancreas oxidatív stresszére jellemző paraméterek

A NSG tartalom, a GSH-Px- és a SOD aktivitás egyaránt bizonyítják az oxidatív stressz kialakulását a pancreasban (23. ábra). A NSG tartalom (23/A. ábra) a 2 g/kg L-lizin injekció után 24-48 órával, míg a GSH-Px aktivitás (23/B. ábra) a 24-72. órában volt szignifikánsan nagyobb a kontroll csoport értékeihez képest. A Mn-SOD aktivitása (23/C. ábra) 18 órával a L-lizin injekció után szignifikánsan nőtt, míg 1 hét múlva szignifikánsan csökkent. A Cu/Zn-SOD aktivitása (23/D. ábra) a 18-24. óra között volt szignifikánsan magasabb. Az oxidatív stressz kialakulása tehát ebben a pancreatitismodellben is megfigyelhető.



23. ábra. A 2 g/kg L-lizin injekció (*i.p.*) oxidatív stresszt okoz a pancreasban. Az L-lizin kezelés hatására a patkányok pancreasában a (A) NSG koncentráció, a (B) GSH-Px aktivitás, a (C) Mn-, illetve a (D) Cu/Zn-SOD aktivitásának változása az oxidatív stresszre jellemző eltéréseket okozott. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában tüntettük fel (n = 6). \* Szignifikáns eltérés (p < 0,05) a kontroll csoporthoz (0 h) képest.

5.2.3.3. Izolált pancreas és máj mitokondriumok ΔΨm-jának és oxigénfogyasztásának vizsgálata

Az L-lizin hatásának vizsgálatára kétféle megközelítést használtunk. Először nagy koncentrációjú exogén L-lizin jelenlétében mértük a  $\Delta\Psi$ m-t és az oxigénfogyasztást kontroll állatokból izolált mitokondrium szuszpenziókon. Az előbbi paramétereket 2 g/kg L-lizinnel *i.p.* kezelt patkányokból izolált mitokondriumokon is megmértük.

A kontroll állatokból (n = 3) izolált RPM és RLM stabil  $\Delta\Psi$ m-t és oxigénfogyasztást mutatott (24. ábra). Az exogén ADP hozzáadásával stimuláltuk az oxidatív foszforilációt RPMban (24/A. ábra) és RLM-ban (az eredményeket nem mutatom be az ábrán), melynek hatására csökkent a  $\Delta\Psi$ m és fokozódott a légzési ráta. Mikor az ADP elfogyott, a  $\Delta\Psi$ m és az oxigénfogyasztás is visszaállt a kezdeti szintre. A DNP-t hozzáadva a rendszerhez lecsökkent a  $\Delta\Psi$ m. A 30-60 mM L-lizin nem befolyásolta a RPM (24/B. ábra) és RLM (24/C. ábra) oxigénfogyasztását, és csak kismértékben csökkentette a  $\Delta\Psi$ m-t. Az exogén adott L-lizin

viszont az ADP elfogyasztása után szignifikánsan gátolta a  $\Delta \Psi$ m regenerációját RPM-ban (24/B. ábra). Hasonló  $\Delta \Psi$ m regeneráció-gátlás volt megfigyelhető az ADP adását követően RPM-ben 1 órával (24/D. ábra) és 4 órával (24/E. ábra) az L-lizin injekciót követően. A hatás kifejezettebb volt az L-lizin kezelés után 4 órával. Az oxigénfogyasztás még az ATP szintézis befejezése után is magas szinten maradt az L-lizinnel kezelt RPM-ban. Az adatok arra utalnak, hogy az L-lizin gátolja az elektrontranszport láncot, és zavart okoz mind az ATP szintézisében, mind a hidrolízisében. Fontos kiemelni, hogy az L-lizin nem befolyásolta a RLM ADP adását követő  $\Delta \Psi$ m és oxigénfogyasztásának regenerációját (24/C. és 24/F. ábra), ami a RPM-ok szelektív károsodására utal.



24. ábra. Az L-lizin gátolja a pancreaticus mitokondriális membránpotenciál regenerációját az ADP adása után. A patkány pancreas mitokondriumokat (RPM) és a -máj mitokondriumokat (RLM) (A-C) 0-, (D) 1- vagy (E-F) 4 órával a 2 g/kg L-lizin *i.p.* injekcióját követően Odinokova és mtsai. módszere szerint izoláltuk <sup>(128)</sup>. A mitokondriumok membránpotenciál változását ( $\Delta\Psi$ m, piros vonal) és oxigénfogyasztását (zöld vonal) RPM és RLM szuszpenzióban tetrafenil-foszfónium-ion (TPP<sup>+</sup>)- és Clark elektródákkal mértük. A mitokondriumokat (RPM vagy RLM), ADP-t (20 µM), L-lizint (30-60 mM) és a mitokondriális szétkapcsolószer dinitro-fenolt (DNP, 5 µM) a jelölések szerint adtuk a rendszerhez. A mitokondriumok stabil  $\Delta\Psi$ m-t és oxigénfogyasztást mutattak. Az ADP hozzáadása a (A) RPM-hoz és RLM-hoz csökkentette a  $\Delta\Psi$ m-t, fokozta az oxigénfogyasztást, melyek idővel visszatértek a kontroll szintre. A (B) 2x30 mM vagy (C) 1x60 mM L-lizin nem befolyásolta az oxigénfogyasztást (B) RPM-ban és (C) RLM-ban, de kicsit csökkentette a  $\Delta\Psi$ m-t. Az L-lizin szignifikánsan gátolta a  $\Delta\Psi$ m regenerációs rátáját (B) RPM-ban, de nem befolyásolta azt (C) RLM-ban. 2 g/kg L-lizinnel oltott patkányokból az injekciót követő (D) 1- vagy (E) 4 órával izolált RPM-ban a  $\Delta\Psi$ m regenerációs rátája 20 µM ADP hozzáadását követően szignifikánsan csökkent. (F) A  $\Delta\Psi$ m regeneráció normálisan lezajlott RLM-ban 4 órával az L-lizin injekciót követően. A görbék 3 független kísérlet eredményeit reprezentálják.

# 5.3. Az argináz-gátlás hatása az L-arginin-indukálta akut pancreatitisre

#### 5.3.1. A máj-, a pancreas-, a vese- és a tüdő argináz aktivitása

A legmagasabb argináz aktivitás a májban volt megfigyelhető, de a többi szervben is tudtunk detektálni aktivitást (25. ábra). Feltételezhető, hogy az *i.p.* adott L-arginin nagy részét is a májban található argináz metabolizálja.



26. ábra. A (+)-S-2-amino-6-jodoacetamido-hexánsav (AIHA) gátolja a patkánymájhomogenátum-, illetve a tisztított marhaargináz aktivitását. Kísérleteinkben a 0-120  $\mu$ M AIHA hatását vizsgáltuk (A) patkánymáj-homogenátumon, ill. (B) tisztított marhamáj arginázon. A 60-120  $\mu$ M AIHA szignifikánsan (\*, p < 0,05) gátolta az argináz aktivitást a vivőanyaggal kezelt (0  $\mu$ M) mintákhoz képest (n = 5-6).

5.3.2. A (+)-S-2-amino-6-jodoacetamido-hexánsav hatása az argináz aktivitásra

Az AIHA dózisfüggő módon gátolta a patkánymáj-homogenátum, illetve a tisztított marhaargináz aktivitását *in vitro* (26. ábra). A 60 μM AIHA (mely ekvimoláris az *in vivo* alkalmazott 15 mg/kg dózissal) a máj argináz aktivitását szignifikánsan kb. 25 %-kal gátolta.



27. ábra. Az AIHA előkezelés hatása a laborparaméterekre L-arginin-indukálta akut pancreatitisben. A patkányokat 15 mg/kg AIHA-val (AIHA, +) vagy annak vivőanyagával (AIHA, -) kezeltük *i.p.* 1 órával a fiziológiás sóoldat (Arg, -), vagy 3,5 g/kg L-arginin-HCl (Arg, +) injekciót megelőzően. Az állatokat 24 órával az L-arginin vagy fiziológiás sóoldattal való kezelés után áldoztuk fel. Az oszlopdiagramok a (A) p.w./b.w.-t, a (B) szérum amiláz-, a pancreas (C) amiláz-, illetve a (D) tripszin aktivitást mutatják. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában tüntettük fel (n = 5-8). Szignifikáns különbség (p < 0,05) a \* kontroll illetve \*\* AIHA-val nem kezelt L-arginines csoporthoz képest.

5.3.3. Pancreas tömeg/testtömeg hányados, szérum- és pancreas amiláz- és pancreas tripszin aktivitás

A p.w./b.w. szignifikánsan nőtt a L-arginin adminisztráció hatására (27/A. ábra). Az AIHA előkezelés szignifikánsan csökkentette ezt a p.w./b.w. emelkedést. A szérum amiláz aktivitás egyik csoportban sem változott szignifikáns mértékben (27/B. ábra). A pancreas amiláz aktivitása az L-arginin kezelés hatására szignifikánsan csökkent (27/C. ábra). Az AIHA előkezelés nem befolyásolta a pancreas amiláz aktivitását az L-argininnel oltott csoportokban. A pancreas tripszin aktivitása szignifikánsan nőtt az L-argininnel kezelt csoportban (27/D. ábra). Az AIHA előkezelés szignifikánsan gátolta ezt a tripszin aktivitás-fokozódást.

#### 5.3.4. Pancreatius mieloperoxidáz aktivitás

A pancreaticus MPO aktivitás szignifikánsan nőtt az L-arginin injekció után 24 órával (28. ábra). Az AIHA előkezelés szignifikánsan csökkentette az MPO aktivitást (ami kisebb fokú gyulladásos infiltrációra utal) az L-arginin-indukálta pancreatitises csoportban.



28. ábra. Az AIHA előkezelés hatása a pancreaticus mieloperoxidáz aktivitásra L-arginin-indukálta akut pancreatitisben. A patkányokat a 27. ábra leírása szerint kezeltük. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában tüntettük fel (n = 5-8). Szignifikáns különbség (p < 0,05) a \* kontroll, ill. \*\* AIHA-val nem kezelt L-arginines pancreatitises csoporthoz képest.

5.3.5. Pancreas nem-protein szulfhidril-csoport tartalom, glutationperoxidáz- és szuperoxid-dizmutáz aktivitás

A NSG tartalom és a GSH-Px aktivitás szignifikánsan nőtt 24 órával az L-arginin injekciója után (29/A-B. ábra). Az AIHA előkezelés nem befolyásolta a NSG tartalom változását, de szignifikánsan csökkentette a GSH-Px aktivitást. A Cu/Zn- és Mn-SOD

aktivitások nem változtak az AIHA előkezelés hatására az L-arginin-indukálta akut pancreatitises csoportokban (29/C-D. ábra).



**29.** ábra. Az AIHA előkezelés hatása a pancreaticus oxidatív stresszre L-arginin-indukálta akut pancreatitisben. Az ábrán a pancreas (A) NSG tartalom, a (B) GSH-Px-, a (C) Cu/Zn- és a (D) Mn-SOD aktivitásokat tüntettük fel. A patkányokat a 27. ábra leírása szerint kezeltük. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában tüntettük fel (n = 5-8). Szignifikáns különbség (p < 0,05) a \* kontroll illetve \*\* AIHA-val nem kezelt L-arginines csoporthoz képest.

# 5.3.6. Pancreaticus hő-sokk fehérje expresszió

Az AIHA és/vagy L-arginin adminisztráció a pancreaticus HSP27 és HSP72 szintézist fokozta a fiziológiás sóoldattal kezelt abszolút kontroll csoporthoz képest (30. ábra). Az AIHA kezelés tehát önmagában adva is stresszválaszt okozott a pancreasban. Az AIHA kezelés nem befolyásolta a HSP-k expresszióját az L-arginin-indukálta pancreatitises csoportokban.



**30. ábra. Az AIHA előkezelés hatása a pancreaticus hő-sokk fehérjék szintézisére L-arginin-indukálta akut pancreatitisben.** A reprezentatív Western blot analízis képe a HSP27 és a HSP72 expresszióját mutatja. A patkányokat a 27. ábra leírása szerint kezeltük.

#### 5.3.7. Hisztopatológiai vizsgálat

A 3,5 g/kg L-arginin *i.p.* injekció súlyos akut nekrotizáló pancreatitist hozott létre patkányokban (31. ábra, 4. táblázat). Az AIHA injekció önmagában is enyhe hiperémiát és enyhe gyulladásos reakciót okozott a pancreasban. Az AIHA előkezelés azonban szignifikánsan csökkentette a pancreas károsodását L-arginin-indukálta pancreatitisben.



Kontroll

AIHA



L-Arginin

AIHA+L-Arginin

**31. ábra. Az AIHA előkezelés hatása a pancreaticus morfológiai károsodására L-argininindukálta akut pancreatitisben.** A H&E-nal festett pancreas metszetek kontroll, illetve AIHA-val (15 mg/kg *i.p.*), L-argininnel (3,5 g/kg *i.p.*) vagy AIHA és L-arginin kombinációjával kezelt patkányokból készültek. Az eredeti nagyítás 200-szoros volt. A szövettani paraméterekre adott pontértékek a 4. táblázatban találhatók meg.

4. táblázat. Az AIHA előkezelés hatása a szövettani paraméterekre L-arginin-indukálta aku
pancreatitisben. A patkányokat a 27. ábra leírása szerint kezeltük. Az adatokat átlag ± SEM formába
tüntettük fel (n = 5-8). Szignifikáns különbség (p < 0,05) az * abszolút kontroll (a táblázatban nind
feltüntetve) vagy az + L-argininnel kezelt csoporthoz képest.

	AIHA	L-Arginin	AIHA + L-Arginin
Hyperemia	$0.0 \pm 0.0$	$1.0 \pm 0.0*$	$1.0 \pm 0.0*$
Leukocita adherencia	$0.0 \pm 0.0$	$2.5 \pm 0.3*$	$1.5 \pm 0.3^{*\dagger}$
Interstitialis ödéma	$0.0 \pm 0.0$	$2.3 \pm 0.5*$	$1.7 \pm 0.4*$
Leukocita infiltráció	$0.3 \pm 0.2$	$2.7 \pm 0.2*$	$1.7 \pm 0.2^{*\dagger}$
Vacuolisatio	$0.0 \pm 0.0$	$1.5 \pm 0.3*$	$0.5\pm0.4^{\dagger}$
Nekrózis	$0.3 \pm 0.2$	$3.5 \pm 0.4*$	$1.5 \pm 0.4^{*\dagger}$
Apoptosis	$0.0 \pm 0.0$	$1.0 \pm 0.0*$	$1.0 \pm 0.0*$
Regeneráció	$0.0 \pm 0.0$	$0.5 \pm 0.3$	$0.2 \pm 0.2$
Össz károsodás	$0.5 \pm 0.4$	$15.0 \pm 1.5*$	$9.0 \pm 1.3^{*\dagger}$

# 5.4. A poliaminok szerepe L-ornitin-indukálta akut pancreatitisben

#### 5.4.1. Poliamin homeosztázis L-ornitin-indukálta akut pancreatitisben

*Pancreas:* a spermidin tartalom szignifikánsan csökkent 24-168 órával a 3 g/kg L-ornitin-HCl *i.p.* injekciót követően, míg a spermin tartalom a 72. órában szignifikáns mértékben emelkedett (1,6-szorosára) (32/A-B. ábra). Figyelembe véve a spermidin és spermin mennyiségi (nagyságrendi) különbségét, az összpoliaminszint jelentős deplécióját figyeltük meg 24-168 órával az L-ornitin injekciója után.



32. ábra. A pancreas poliamin homeosztázis változása a 3 g/kg L-ornitin-HCl *i.p.* adminisztrációját követően. Az oszlopdiagramok a pancreas (A) spermidin- és (B) spermin szinteket, az (C) ornitin-dekarboxiláz (ODC)- és a (D) SSAT aktivitásokat ábrázolják az injekció után eltelt idő függvényében. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában tüntettük fel (n = 5-6). \* Szignifikáns különbség (p < 0,05) a kontroll csoporthoz (0 h, szürke oszlop) képest.
Az ODC aktivitás a 24. órában szignifikánsan fokozódott a kontrollhoz képest (32/C. ábra). A SSAT aktivitás az előbbi időpontban szintén magasabb volt a kontrollhoz képest, a 72. órában csúcsosodott ki (a normális közel tízszeres aktivitásával) és a 168. óráig emelkedett maradt (32/D. ábra). Meglepő módon a pancreasban nem tudtunk putreszcint detektálni, noha az ODC- és a SSAT aktivitás-fokozódások következtében mindenképpen ez várható lenne (amennyiben a poliamin szintézis nem múlja felül a katabolizmust).

*Máj:* a hepaticus putreszcin szint a kontrollhoz képest 26-szor volt nagyobb 6 órával az Lornitin injekciót követően, azután a kontroll szintre esett vissza (33/A. ábra). A hepaticus spermidin szint a 6-72. óráig szignifikánsan nagyobb volt (33/B. ábra). A spermin tartalom szintén magasabb volt a kontroll értékhez képest a 24. és 72. óra között (33/C. ábra).

*Tüdő*: a májban észleltekhez hasonlóan a tüdő putreszcin szint 6 órával az injekciót követően csúcsosodott, majd visszatért a kontroll szintre (33/D. ábra). A tüdő spermidin tartalma szignifikánsan csökkent 6-, 72- és 168 órával az L-ornitin kezelést követően (33/E. ábra). A tüdő spermin tartalma viszont egyik vizsgált időpontban sem változott szignifikáns mértékben a kontroll csoporthoz képest (33/F. ábra).



**33.** ábra. Poliaminszintek változása a májban és tüdőben 3 g/kg L-ornitin-HCl intraperitonealis injekciót követően. Az oszlopdiagramok a hepaticus (A) putreszcin-, (B) spermidin- és (C) spermin szinteket, valamint a tüdő (D) putreszcin-, (E) spermidin- és (F) spermin szintjeit ábrázolják. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában tüntettük fel (n = 5-6). \* Szignifikáns különbség (p < 0,05) a kontroll csoporthoz (0 h, szürke oszlop) képest.

#### 5.4.2. Az 1-metilspermidin hatása az L-ornitin-indukálta akut pancreatitisre

5.4.2.1. Pancreas spermidin/spermin  $N^1$ -acetiltranszferáz aktivitás, putreszcin-, spermidin-, metilspermidin-, és spermin tartalom

A MeSpd mind az előkezelés (MO24: 4,53 ± 1,79 nmol/mg protein), mind az utókezelés (OM24: 10,42 ± 1,35 nmol/mg protein, OM48: 8,74 ± 1,18 nmol/mg protein) hatására felhalmozódott a pancreas szövetben. A pancreas spermidin tartalma szignifikánsan csökkent az L-ornitinnel kezelt csoportokban (34/A. ábra), míg a spermin tartalom nem változott (34/B ábra). A pancreas SSAT aktivitása szignifikánsan, négyszeresére emelkedett az L-ornitin injekció hatására a 24. órában és több mint hétszeresére a 48. órában (34/C. ábra). Putreszcint egyik csoportban sem tudtunk kimutatni. A MeSpd adminisztráció nem befolyásolta ezeket a paramétereket.

#### 5.4.2.2. Hisztopatológiai vizsgálat

Az L-ornitin injekciót követően 24 és 48 órával interstitialis ödéma, vaszkuláris congestio, leukocita adherencia és -infiltráció, valamint az acináris sejtek nekrózisa volt megfgyelhető a pancreasban (35. ábra). A MeSpd adminisztráció nem befolyásolta a vizsgált szövettani paramétereket (35. ábra, 5. táblázat).





34. ábra. Az 1-metilspermidin adminisztráció hatása a pancreas poliamin homeosztázisára L-ornitin-indukálta akut pancreatitisben. A patkányokat i.p. oltottuk 3 g/kg L-ornitinnel (Orn +) vagy fiziológiás sóoldattal (Orn -), és nem kezeltük (MeSpd -), előkezeltük (MeSpd EK) vagy utókezeltük (MeSpd UK) 50 mg/kg 1-metilspermidinnel (MeSpd-nel) i.p.. Az oszlopdiagramok a pancreaticus (A) spermidin-, (B) spermin szinteket és a (C) SSAT aktivitásokat mutatják a különböző csoportokban. A fehér és szürke oszlopok az L-ornitin vagy a fiziológiás sóoldat injekció után 24 vagy 48 órával levágott állatok értékeit mutatják. A részletes protokoll a 4.2.1.4. fejezetben található meg. Az adatokat átlag ± SEM formában tüntettük fel (n = 5-8). \* Szignifikáns különbség (P < 0.05) a kontroll csoporthoz (Orn -, MeSpd -) képest.



**35.** ábra. A MeSpd hatása a pancreas morfológiai károsodására L-ornitin-indukálta akut pancreatitisben. Az ábrán reprezentatív H&E-nal festett pancreas metszetek szövettani képe látható. A patkányokat (A) fiziológiás sóoldattal vagy (B-F) 3 g/kg L-ornitinnel oltottuk be, amelyeket (A, B, E) nem kezeltünk, (C) előkezeltünk vagy (D, F) utókezeltünk (F esetén kétszer) 50 mg/kg MeSpd-nel *i.p.*. A patkányokat az L-ornitin vagy a fiziológiás sóoldat injekció után (A-D) 24 órával vagy (E-F) 48 órával áldoztuk fel. Eredeti nagyítás: 200-szoros.

5. táblázat. Az MeSpd kezelés hatása a szövettani paraméterekre L-ornitn-indukálta akut pancreatitisben. A patkányokat a 34. ábra leírása szerint kezeltük. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában tüntettük fel (n = 5-8). \* Szignifikáns különbség (p < 0,05) a megfelelő kontroll csoporthoz képest.

MeSpd	_	EK	UK	_	UK
Feláldozás, h		24	48		
Hyperemia	$0.6 \pm 0.2*$	$1.0 \pm 0.0*$	$0.8 \pm 0.2*$	0.8 ± 0.2*	$1.0 \pm 0.0*$
Leukocita adherencia	$3.0 \pm 0.0*$	$3.0 \pm 0.0*$	$2.7 \pm 0.2*$	$2.8 \pm 0.2*$	$2.8 \pm 0.2*$
Interstitialis ödéma	$2.8 \pm 0.2*$	$3.0 \pm 0.0*$	$2.8 \pm 0.2*$	$3.0 \pm 0.0*$	$2.8 \pm 0.2*$
Leukocita infiltráció	$2.9 \pm 0.5*$	$2.8 \pm 0.3*$	$3.5 \pm 0.3*$	$4.0 \pm 0.0*$	$3.4 \pm 0.2*$
Vacuolisatio	$0.3 \pm 0.2$	$0.0 \pm 0.0$	$0.0 \pm 0.0$	$0.0 \pm 0.0$	$0.2 \pm 0.2$
Nekrózis	$4.0 \pm 0.0*$	$4.0 \pm 0.0*$	$3.8 \pm 0.2*$	$0.0 \pm 0.0$	$0.0 \pm 0.0$
Apoptosis	$1.8 \pm 0.5*$	$1.7 \pm 0.4*$	$1.3 \pm 0.5*$	$0.0 \pm 0.0$	$0.2 \pm 0.2$
Regeneráció	$0.0 \pm 0.0$	$0.0 \pm 0.0$	$0.0 \pm 0.0$	$1.8 \pm 0.2*$	$2.0 \pm 0.0*$
Össz károsodás	$15.3\pm0.5\texttt{*}$	$15.5\pm0.6\texttt{*}$	$15.0\pm0.8\texttt{*}$	$12.4 \pm 0.2*$	$12.4 \pm 0.5*$



36. ábra (az előző oldalon). A MeSpd hatása a szérum- és pancreas emésztőenzimek aktivitására és a pancreas tömeg/testtömeg hányadosra L-ornitin-indukálta akut pancreatitisben. Az oszlopdiagramok a (A) szérum- és (B) pancreas amiláz, (C) a szérum lipáz aktivitásokat és a (D) p.w./b.w.-t ábrázolják a különböző csoportokban. Az oszlopok jelölése a 34. ábra leírásában található meg. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában tüntettük fel (n = 5-8). Szignifikáns különbség (p < 0,05) a \* kontroll (Orn -, MeSpd -) vagy az \*\* Orn 24 (Orn +, MeSpd -, fehér oszlop) csoporthoz képest.

# 5.4.2.3. Szérum és pancreas amiláz-, szérum lipáz aktivitás, pancreas tömeg/testtömeg hányados

Ebben a kísérletsorozatban a szérum amiláz aktivitás 24 órával az L-ornitin injekció után nem változott szignifikánsan a kontrollhoz képest. A MeSpd utókezelés hatására az *OM24* csoportban a szérum amiláz aktivitás szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz és az O24 csoporthoz képest (36/A. ábra). A pancreas amiláz aktivitása az L-ornitinnel kezelt csoportokban szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest, az *OM24* csoportot kivéve (36/B. ábra). A szérum lipáz aktivitás az *OM24* csoportban szignifikánsan magasabb volt az *O24* csoporthoz képest (36/C. ábra). A p.w./b.w. szignifikánsan emelkedett 24 órával a 3 g/kg L-ornitin kezelést követően (36/D. ábra). A MeSpd adminisztráció a 24. és a 48. órában sem befolyásolta a pw./b.w. változását.



**37. ábra. A MeSpd kezelés hatása a pancreaticus HSP72- és IκB-α expresszióra L-ornitinindukálta akut pancreatitisben.** Az ábrán a fiziológiás sóoldattal, L-ornitinnel és/vagy MeSpd-nel kezelt patkányok pancreas extraktjából készült reprezentatív Western blot analízis eredményei láthatók. A csoportok jelölése a 34. ábra leírása szerint történt. Az állatokat a fiziológiás sóoldat vagy az L-ornitin kezelés után 24 vagy 48 óra után áldoztuk fel.

#### 5.4.2.4. Pancreaticus hő-sokk fehérje72 és IκB-α expresszió

A 3 g/kg L-ornitin *i.p.* injekció szignifikánsan fokozta a HSP72 szintézist 24 órával a betegség indukciója után (37. ábra). Az I $\kappa$ B- $\alpha$  szint szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz képest 24 és 48 órával az L-ornitin injekció után (37. ábra). A MeSpd kezelés nem befolyásolta a HSP72 és I $\kappa$ B- $\alpha$  expresszióját.

#### 5.4.2.5. Pancreaticus mieloperoxidáz aktivitás

A pancreaticus MPO aktivitás az L-ornitinnel kezelt csoportokban nagymértékben nőtt a kontroll csoporthoz képest (38/A. ábra). A MeSpd adminisztráció egyik csoportban sem befolyásolta a MPO aktivitást (azaz a gyulladásos infiltráció mértékét).

#### 5.4.2.6. Pancreas interleukin-1β koncentráció

Az I $\kappa$ B degradációval párhuzamosan és a NF- $\kappa$ B aktiváció következtében a pancreaticus IL-1 $\beta$  szintézis szignifikánsan fokozódott 24 és 48 órával az L-ornitin injekciót követően (38/B. ábra). A MeSpd elő- és utókezelésnek nem volt hatása a gyulladásos citokin szintekre. Bár a MeSpd utókezelés az IL-1 $\beta$  expressziót tendenciózusan csökkentette, ez az eltérés azonban nem volt szignifikáns.



38. ábra. A MeSpd hatása a pancreaticus gyulladást illetve extrapancreaticus-érintettséget jelző paraméterekre L-ornitin-indukálta akut pancreatitisben. Az oszlopdiagramok a pancreaticus (A) MPO aktivitásokat, az (B) IL-1 $\beta$  szinteket, a szérum (C) kreatinin koncentrációkat és az (D) ASAT aktivitásokat mutatják. Az oszlopok jelölése a 34. ábra leírásában található meg. Az adatokat átlag ± SEM formában tüntettük fel (n = 5-8). \* Szignifikáns különbség (p < 0,05) a kontroll csoporthoz (Orn -, MeSpd -) képest.

#### 5.4.2.7. Szérum kreatinin koncentráció és aszpartát-aminotranszferáz aktivitás

A szérum kreatinin koncentráció szignifikánsan magasabb volt az *O24* és *OM24* csoportokban a kontroll csoporthoz képest (38/C. ábra). A szérum ASAT aktivitások szignifikánsan magasabbak voltak 24 és 48 órával az L-ornitin injekciót követően (38/D. ábra). A MeSpd adminisztráció nem befolyásolta az ASAT aktivitást.

# 5.5. Nukleáris faktor-κB aktiváció-gátlás hatása akut pancreatitisben

# 5.5.1. A pirrolidin-ditiokarbamát és metilprednizolon előkezelés hatása az L-arginin-indukálta akut pancreatitisre

#### 5.5.1.1. Pancreaticus IκB-α degradáció és nukleáris faktor-κB DNS-kötő aktivitás

Az 1- és 10 mg/kg dózisban adott PDTC előkezelés szinte teljesen kivédte az I $\kappa$ B- $\alpha$  degradációt és a NF- $\kappa$ B DNS-kötő aktivitás-fokozódást 24 órával az L-arginin injekcióját követően (39. ábra). A 100 mg/kg dózisban adott PDTC viszont nem védte ki a NF- $\kappa$ B DNS-kötő aktivitását. Meg kell említeni, hogy a PDTC-nak nagy dózisban már toxikus hatásai voltak a patkányokban. A legtöbb állat az injekció után letargiássá vált. Egy patkány el is pusztult nem sokkal az injekció beadása után. Ezzel ellentétben a MP előkezelésnek egyik alkalmazott dózisban sem volt szembeötlő toxikus mellékhatása. Az I $\kappa$ B- $\alpha$  degradációt és a NF- $\kappa$ B DNS-kötő aktivitást a MP mindegyik dózisban csökkentette.

#### 5.5.1.2. Pancreas citokin koncentráció

A nagy dózisú L-arginin kezelés szignifikánsan fokozta a pancreaticus IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  koncentrációkat a kontrollhoz képest (40. ábra). A proinflammatorikus citokin szinteket az 1és 10 mg/kg PDTC vagy 1-, 10- és 30 mg/kg MP szignifikánsan csökkentette a vivőanyaggal kezelt L-arginines csoporthoz képest.



**39.** ábra. A pirrolidin-ditiokarbamát (PDTC) és metilprednizolon (MP) előkezelés hatása a pancreaticus IκB-α szintekre és a NF-κB DNS-kötő aktivitásra L-arginin-indukálta akut pancreatitisben. A patkányokat PDTC-tal (1-, 10-, 100 mg/kg *i.p.*) vagy MP-nal (1-, 10-, 30 mg/kg *i.m.*) kezeltük 1 órával az akut pancreatitis indukciója előtt (3 g/kg L-arginin-HCl *i.p.*) (n = 6). Más patkányok az L-arginin injekció előtt fiziológiás sóoldatot kaptak a MP vagy a PDTC helyett (sötétszürke oszlop). A PDTC és a MP hatását önmagában (L-arginin kezelés nélkül) is teszteltük; ez esetben az állatok fiziológiás sóoldatot kaptak *i.p.* az L-arginin helyett. Az abszolút kontroll állatok a MP vagy a PDTC és az L-arginin helyett fiziológiás sóoldatot kaptak (világosszürke oszlop). Az állatokat az L-arginin/fiziológiás sóinjekció után 24 órával áldoztuk fel. A PDTC dózisfüggő módon gátolta a (A) pancreaticus IκB-α degradációt és a (B) NF-κB DNS-kötő aktivitását L-arginin-indukálta pancreatitisben. A MP előkezelés mindegyik dózisban hatásosan csökkentette a vizsgált paraméterek változását. Az oszlopdiagram a NF-κB csíkok optikai denzitását mutatja. Az adatokat átlag ± SEM formájában tüntettük fel.



40. ábra. A PDTC és a MP előkezelés hatása a pancreas IL-1 $\beta$ - és TNF- $\alpha$  koncentrációjára L-arginin-indukálta akut pancreatitisben. A patkányokat a 39. ábra leírása szerint kezeltük. A 3 g/kg L-arginin-HCl-dal (Arg) oltott állatok pancreaticus (A) IL-1 $\beta$ - és (B) TNF- $\alpha$  koncentrációi szignifikánsan nőttek a kontroll csoporthoz képest. A proinflammatorikus citokin koncentrációk szignifikánsan csökkentek a 1- vagy 10 mg/kg PDTC illetve 1-, 10- vagy 30 mg/kg MP előkezelés hatására. Az adatokat átlag ± SEM formájában tüntettük fel (n = 5-6). A fekete csillag a kontroll csoporthoz képest, a fehér csillag a fiziológiás sóoldattal előkezelt pancreatitises csoporthoz képest jelöl szignifikáns (p < 0,05) eltérést.

#### 5.5.1.3. Pancreas tömeg/testtömeg hányados és szérum amiláz aktivitás

A 3 g/kg L-arginin-HCl adminisztrációja szignifikánsan növelte a szérum amiláz aktivitást és a p.w./b.w.-t a kontroll csoporthoz képest (41. ábra). Az 1 mg/kg PDTC illetve 10-vagy 30 mg/kg MP szignifikánsan csökkentette a p.w./b.w.-t (azaz a gyulladásos ödéma mértékét) 24 órával az L-arginin injekcióját követően. Ugyan volt egy tendencia arra vonatkozóan, hogy a PDTC illetve a MP előkezelés L-arginin-indukálta akut pancreatitisben csökkentse a szérum amiláz aktivitást, ez azonban nem érte el a szignifikáns mértéket.



**41. ábra. A PDTC és MP előkezelés hatása a p.w./b.w.-ra és a szérum amiláz aktivitásra L-arginin-indukálta akut pancreatitisben.** A patkányokat a 39. ábra leírása szerint kezeltük. A 3 g/kg L-arginin-HCl *i.p.* adminisztrációja szignifikánsan növelte a **(A)** szérum amiláz aktivitást és a **(B)** p.w./b.w.-t a kontroll csoporthoz képest. Az 1 mg/kg PDTC illetve a 10- vagy 30 mg/kg MP szignifikánsan csökkentette a p.w./b.w.-t 24 órával az L-arginin injekcióját követően. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formájában tüntettük fel (n = 5-6). A fekete csillag a kontroll csoporthoz képest, a fehér csillag a fiziológiás sóoldattal előkezelt pancreatitises csoporthoz képest jelöl szignifikáns (p < 0,05) eltérést.

#### 5.5.1.4. Pancreas amiláz-, tripszinogén és DNS tartalom

Az L-arginin injekció szignifikánsan csökkentette a pancreas amiláz- és tripszinogén aktivitását (42. ábra), de nem befolyásolta a DNS tartalmat (utóbbi eredményeket nem mutatom az ábrán) a kontrollhoz képest. A patkányok PDTC-tal, illetve MP-nal való előkezelése szignifikánsan mérsékelte ezeket a változásokat (42. ábra).



42. ábra. A PDTC és a MP előkezelés hatása a pancreas amiláz- és tripszinogén aktivitásra L-arginin-indukálta akut pancreatitisben. A patkányokat a 39. ábra leírása szerint kezeltük. Az L-arginin injekció az abszolút kontroll csoporthoz képest szignifikánsan csökkentette a pancreas (A) amiláz- és (B) tripszinogén aktivitását. A PDTC, illetve a MP előkezelés szignifikánsan mérsékelte az aktivitás csökkenéseket. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában tüntettük fel (n = 5-6). A fekete csillag a kontroll csoporthoz képest, a fehér csillag a fiziológiás sóoldattal előkezelt pancreatitises csoporthoz képest jelöl szignifikáns (p < 0,05) eltérést.

5.5.1.5. Pancreaticus nem-protein szulfhidril-csoport tartalom, lipid peroxidáció és karbonil-protein szintek

Az L-arginin injekció szignifikánsan fokozta a pancreas NSG tartalmát, a MDA és a karbonil-proteinek szintjét a kontrollhoz képest (43. ábra). A legtöbb esetben ezek a változások az 1- vagy 10 mg/kg PDTC, illetve az 1-, 10- vagy 30 mg/kg MP kezelés hatására szignifikánsan kisebbek voltak.



#### 5.5.1.6. Pancreaticus mieloperoxidáz aktivitás

A pancreaticus MPO aktivitás L-arginin-indukálta akut pancreatitisben szignifikánsan nőtt a kontrollhoz képest (44. ábra). Az 1- vagy 10 mg/kg PDTC, illetve az 1-, 10- vagy 30 mg/kg MP szignifikánsan csökkentette ezt a paramétert.

dc 256 11



44. ábra. A PDTC és a MP előkezelés hatása a mieloperoxidáz aktivitására pancreaticus L-arginin-indukálta akut pancreatitisben. A patkányokat a 39. ábra leírása szerint kezeltük. Az L-arginin injekció az abszolút kontrollhoz képest szignifikánsan növelte a pancreaticus MPO aktivitást. A PDTC, illetve a MP előkezelés dózisfüggő módon szignifikánsan csökkentette a MPO aktivitás-fokozódást a pancreatitises csoportokban. Az adatokat átlag ± SEM formájában tüntettük fel (n = 5-6). A fekete csillag a kontroll csoporthoz képest, a fehér fiziológiás sóoldattal előkezelt csillag а pancreatitises csoporthoz képest jelöl szignifikáns (p < 0.05) eltérést.

#### 5.5.1.7. Hisztopatológiai vizsgálat

A szövettani vizsgálat szerint a 3 g/kg L-arginin-HCl injekció súlyos akut pancreatitist okozott. A pancreas morfológiai károsodása az 1- vagy 10 mg/kg PDTC, illetve az 1-, 10- vagy 30 mg/kg MP kezelés esetén szignifikánsan kisebb volt a fiziológiás sóoldattal kezelt kontrollhoz viszonyítva (45. ábra). A szövettani károsodás pontértékeit a 6. táblázat tartalmazza.



**45. ábra. A PDTC és a MP előkezelés hatása a pancreaticus morfológiai károsodásra L-argininindukálta akut pancreatitisben.** A patkányokat a 39. ábra leírása szerint kezeltük. A 3 g/kg L-arginin-HCl adminisztrációja súlyos nekrotizáló pancreatitist okozott. A pancreaticus morfológiai károsodás (interstitialis ödéma, leukocita infiltráció és az acinussejtek nekrózisa) mértéke szignifikánsan csökkent az (A) 1- vagy 10 mg/kg PDTC-vel, illetve az 1-, 10- vagy 30 mg/kg MP-nal előkezelt csoportokban (n = 5-6) a (B) fiziológiás sóoldattal előkezelt L-arginines csoporthoz (n = 6) képest. A szövettani paraméterekre adott pontértékeket a 6. táblázatban tüntettem fel. (H&E festés, eredeti nagyítás 400szoros).

6. táblázat. A PDTC és a MP előkezelés hatása a pancreas morfológiai károsodására L-argininindukálta akut pancreatitisben. A patkányokat fiziológiás sóoldattal (PS) *i.p./i.m.*, PDTC-tal *i.p.* vagy MP-nal *i.m.* kezeltük 1 órával a 3 g/kg L-lizinnel való *i.p.* oltás után. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formájában tüntettük fel (n = 5-6). \* Szignifikáns különbség (p < 0,05) a PS-tal előkezelt csoporthoz képest.

	Előkezelés						
	PS PDTC (mg/kg)				MP (mg/kg)		
	0	1	10	100	1	10	30
Interstitialis ödéma Vascularis congestio Gyulladás Nekrózis <b>Össz károsodás</b>	$\begin{array}{c} 1.33 \pm 0.12 \\ 0.75 \pm 0.19 \\ 1.67 \pm 0.24 \\ 2.17 \pm 0.42 \\ 5.84 \pm 0.81 \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.83 \pm 0.12^{*} \\ 0.67 \pm 0.12 \\ 0.75 \pm 0.24^{*} \\ 0.92 \pm 0.34^{*} \\ 3.17 \pm 0.69^{*} \end{array}$	$\begin{array}{c} 1.00 \pm 0.16 \\ 0.70 \pm 0.12 * \\ 1.00 \pm 0.16 * \\ 1.30 \pm 0.20 * \\ 4.00 \pm 0.71 * \end{array}$	$\begin{array}{c} 1.25 \pm 0.13 \\ 0.92 \pm 0.09 \\ 1.33 \pm 0.34 \\ 1.67 \pm 0.51 \\ 5.25 \pm 0.94 \end{array}$	$\begin{array}{c} 1.00 \pm 0.20 \\ 0.75 \pm 0.13 \\ 0.92 \pm 0.30^* \\ 1.17 \pm 0.31^* \\ 3.83 \pm 0.85^* \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.90 \pm 0.10^{*} \\ 0.80 \pm 0.12 \\ 0.80 \pm 0.12^{*} \\ 1.10 \pm 0.24^{*} \\ 3.60 \pm 0.37^{*} \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.83 \pm 0.12 * \\ 0.75 \pm 0.13 \\ 0.83 \pm 0.24 * \\ 1.00 \pm 0.14 * \\ 3.42 \pm 0.39 * \end{array}$

5.5.2. A metilprednizolon előkezelés hatása cholecystokinin-indukálta akut pancreatitisre

5.5.2.1. Pancreas tömeg/testtömeg hányados, szérum amiláz aktivitás és tripszinogén aktivációs peptid koncentráció

A 2 x 100 µg/kg CCK *s.c.* adminisztrációja a szérum amiláz aktivitást, a p.w./b.w.-t és a plazma TAP koncentrációját szignifikáns mértékben fokozta a kontroll csoporthoz képest (46/A,B. ábra). A MP kezelés szignifikánsan csökkentette a p.w./b.w.-t (3 és 5 órával az első CCK injekció után) és a szérum amiláz aktivitást (5 órával az első CCK injekció után). A MP dózisfüggő módon csökkentette a plazma TAP koncentrációját 5 órával az első CCK injekciót követően (46/C. ábra).





46. ábra. A MP előkezelés hatása a (A) tömeg/testtömeg hányadosra pancreas (p.w./b.w.), a (B) szérum amiláz aktivitásra és plazma TAP koncentrációkra **(C)** a cholecystokinin(CCK)-oktapeptiddel-indukált akut pancreatitisben. Hím Wistar patkányokat 12 órás időközzel 2 x 30 mg/kg MP-nal (+) vagy a vivőanyagával (-) kezeltünk i.m., majd 12 óra múlva az állatokat 2 x 100 µg/kg CCK-nel oltottuk be s.c. 1 órás időközzel. Az állatokat az első CCK injekció után 3 (világosszürke oszlopok) vagy 5 órával (fekete oszlopok) áldoztuk fel. A kontroll állatokat (üres vagy szürke oszlopok) MP-nal vagy a vivőanyagával oltottuk be *i.m.*, illetve fiziológiás sóoldattal s.c. Az eredményeket átlag ± SEM formában tüntettük fel (n = 6). A fehér csillag szignifikáns változást (p < 0,05) jelez a megfelelő vivőanyaggal kezelt csoporthoz-, a fekete csillag pedig a kontroll csoporthoz képest.

#### 5.5.2.2. Pancreaticus tumor nekrózis faktor- $\alpha$ és interleukin-6 koncentrációk

A CCK injekciók fokozták a pancreas TNF- $\alpha$  és IL-6 koncentrációját az idő függvényében (47. ábra). A MP önmagában is csökkentette a bazális proinflammatorikus citokinek koncentrációját az abszolút kontrollhoz képest. A MP előkezelés szignifikáns módon csökkentette a pancreaticus proinflammatorikus citokinek szintjét CCK-indukálta pancreatitisben a vivőanyaggal kezelt csoporthoz képest.



47. ábra. A MP hatása a pancreas tumor nekrózis faktor- $\alpha$  és interleukin-6 koncentrációjára cholecystokinin-indukálta akut pancreatitisben. A patkányokat a 46. ábra leírásában részletezettek szerint kezeltük. A pancreas (A) TNF- $\alpha$  és (B) IL-6 koncentrációkat a citoszolikus frakcióból határoztuk meg ELISA kitek segítségével. Az adatokat átlag ± SEM formában tüntettük fel (n = 6). Szignifikáns eltérés (p < 0,05) a fiziológiás sóoldattal kezelt- (szürke csillag), a vivőanyaggal kezelt-(fehér csillag), illetve a kontroll csoporthoz képest (fekete csillag).

5.5.2.3. Pancreaticus nem-protein szulfhidril-csoport tartalom, lipid peroxidáció és karbonil-proteinek szintje

A CCK kezelés szignifikánsan csökkentette a pancreas NSG tartalmát és fokozta a MDA és a karbonil-protein szintjét (48. ábra). A MP adminisztráció 2 órával a második CCK injekció után szignifikánsan mérsékelte a NSG tartalom csökkenését (48/A. ábra). A MP előkezelés 2 és 4 órával az utolsó CCK injekció után csökkentette az emelkedett MDA szinteket (48/B. ábra). A karbonil-proteinek szintjének fokozódását szintén mérsékelte a MP előkezelés 2 órával az utolsó CCK injekciót követően (48/C. ábra).





48. ábra. A MP előkezelés hatása a pancreas (A) NSG tartalmára, a (B) malondialdehid (MDA) szintre és a (C) karbonil-protein tartalomra cholecystokinin-oktapeptiddel-indukált akut pancreatitisben. A patkányokat a 46. ábra leírásában részletezettek szerint kezeltük. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában tüntettük fel (n = 6). Szignifikáns eltérés (p < 0,05) a vehikulummal kezelt- (fehér csillag), és a kontroll csoporthoz képest (fekete csillag).

#### 5.5.2.4. Pancreaticus mieloperoxidáz aktivitás

A pancreaticus MPO aktivitás CCK-indukálta akut pancreatitisben szignifikánsan megemelkedett a kontroll csoporthoz képest. A MP előkezelés szignifikánsan csökkentette a MPO aktivitást 4 órával az utolsó CCK injekciót követően (49. ábra).



**49 ábra. A MP előkezelés hatása a pancreaticus mieloperoxidáz aktivitásra.** A patkányokat a 46. ábra leírásában részletezettek szerint kezeltük. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában tüntettük fel (n = 6). Szignifikáns eltérés (p < 0,05) a vehikulummal kezelt- (fehér csillag), illetve a kontroll csoportokhoz képest (fekete csillag).

#### 5.5.2.5. Hisztopatológiai vizsgálat

A szövettani vizsgálat igazolta a CCK-indukálta akut pancreatitis kialakulását. A pancreas morfológiai károsodása mindegyik MP-nal előkezelt csoportban kisebb volt a vivőanyaggal kezelt CCK-es csoporthoz képest. A pontértékek a 7. táblázatban vannak feltüntetve.

7. táblázat. A metilprednizolon előkezelés hatása a CCK-indukálta akut pancreatitisre. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában tüntettük fel (n = 6). \* Szignifikáns különbség (p < 0,05) a respektív vehikulummal (Veh) kezelt csoporthoz képest.

Feléldozás 2. CCK Injekció után (h)	2	2	2	۲	4	4
Kezelések	Veh+CCK	30 mg/kg MP + CCK	2:30 mg/kg MP +CCK	Veh+CCK	30 mg/kg MP +CCK	2x30 mg/kg MP +CCK
Interstitialis ödéma Leukocita infitráció Hyperemia Vacuolisatio Nokrózis (0.4) Apoptosis Bazofi lamellatio <b>Össz károsodás</b>	$1.44 \pm 0.23 \\ 0.35 \pm 0.07 \\ 0.44 \pm 0.10 \\ 0.38 \pm 0.05 \\ 0.56 \pm 0.09 \\ 0.42 \pm 0.07 \\ 0.35 \pm 0.08 \\ 3.94 \pm 0.47$	$\begin{array}{c} 0.73 \pm 0.12^{*} \\ 0.15 \pm 0.07^{*} \\ 0.27 \pm 0.06 \\ 0.21 \pm 0.03^{*} \\ 0.21 \pm 0.08^{*} \\ 0.15 \pm 0.02^{*} \\ 0.33 \pm 0.12 \\ 2.04 \pm 0.26^{*} \end{array}$	$\begin{array}{c} 1.04 \pm 0.12^{*} \\ 0.23 \pm 0.07 \\ 0.13 \pm 0.04^{*} \\ 0.23 \pm 0.07 \\ 0.21 \pm 0.07^{*} \\ 0.29 \pm 0.16 \\ 0.21 \pm 0.06 \\ 2.48 \pm 0.43^{*} \end{array}$	$\begin{array}{c} 1.50 \pm 0.13 \\ 1.38 \pm 0.39 \\ 0.63 \pm 0.25 \\ 0.46 \pm 0.10 \\ 0.48 \pm 0.10 \\ 0.67 \pm 0.09 \\ 0.54 \pm 0.09 \\ 5.65 \pm 0.79 \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.96 \pm 0.09^{*} \\ 0.68 \pm 0.38^{*} \\ 0.70 \pm 0.16 \\ 0.27 \pm 0.07^{*} \\ 0.27 \pm 0.07^{*} \\ 0.23 \pm 0.06^{*} \\ 0.17 \pm 0.05^{*} \\ 2.38 \pm 0.25^{*} \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.71 \pm 0.12^{*} \\ 0.37 \pm 0.20^{*} \\ 0.60 \pm 0.13 \\ 0.40 \pm 0.11 \\ 0.23 \pm 0.08^{*} \\ 0.21 \pm 0.07^{*} \\ 0.25 \pm 0.05^{*} \\ 2.50 \pm 0.31^{*} \end{array}$

#### 5.5.2.6. Nukleáris faktor-ĸB DNS-kötő aktivitás

NF-κB DNS kötődést a kontroll csoportokban szinte alig tudtunk kimutatni (50. ábra). A CCK injekciók az idő előrehaladtával fokozták a NF-κB DNS-kötő aktivitást, melynek

maximumát a 2. órában figyeltük meg. A 2 x 30 mg/kg MP előkezelés egyik időpontban sem befolyásolta a NF-κB DNS-kötő aktivitását.



50. ábra. A MP előkezelés hatása a pancreaticus NF-κB DNS-kötő aktivitásra és az IκB-α szintekre CCK-indukálta akut pancreatitisben. Az (A) ábrán egy reprezentatív pancreaticus NF-κB EMSA képe látható. NF-κB DNS-kötő aktivitást alig tudtunk kimutatni a kontroll csoportban. A CCK injekciók az idő előrehaladtával fokozták a NF-κB DNS-kötő aktivitást. A MP előkezelés nem befolyásolta a NF-κB DNS-kötő aktivitását. (B) Az IκB-α expresszió meghatározása Western blot technikával történt. Az IκB-α mennyisége már 30 perccel a második CCK injekció után szignifikánsan csökkent, de 4 óra elteltével visszatért a kezdeti szintre. (C) Az A. panelen látható NF-κB csíkok intenzitását denzitometriás eljárással határoztuk meg. Az értékeket átlag ± SEM formában tüntettük fel (n = 3-6).

#### 5.5.2.7. IκB-α expresszió

A IκB-α expressziója már az első vizsgált időpontban (30. perc) szignifikánsan csökkent (50/B. ábra), de 4 órával az utolsó CCK injekció után már visszaállt a kontroll szintre. A nagy dózisú MP előkezelés nem befolyásolta az IκB-α degradáció mértékét.

# 6. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

6.1. Igazoltuk, hogy a bázikus aminosavak közül az L-arginin <sup>(102,130,134)</sup> mellett az L-ornitin <sup>(131,135)</sup> és az L-lizin <sup>(132)</sup> is képes nagy dózisban nekrotizáló akut pancreatitist kiváltani patkányban, míg a D-ornitinnek <sup>(131)</sup> és az L-hisztidinnek <sup>(136)</sup> nincs gyulladást indukáló hatása. A nagy dózisban *i.p.* adott equimoláris L-ornitin az L-argininnél is súlyosabb pancreatitist váltott ki, ugyanakkor az L-citrullin és a NO donor nitroprusszid-nátrium nem okozott hasnyálmirigy károsodást.

6.2. Elsőként jellemeztük az L-ornitin-, illetve az L-lizin-indukálta súlyos nekrotizáló akut pancreatitismodellt patkányban. A bázikus aminosavakkal kiváltott pancreatitis nem invazív, könnyen kivitelezhető és jól reprodukálható <sup>(131,132)</sup>. A bázikus aminosavakkal kiváltott akut pancreatitisben kimutattuk a betegségre jellemző főbb elváltozásokat: a tripszinogén- és NF-κB aktivációt, a citokin szintézist, a HSP expressziót, az oxidatív stresszt és a laborparaméterek változását. A patológiai vizsgálat szintén igazolta az akut pancreatitis jellegzetes szövettani eltéréseit (pl. interstitialis ödéma, gyulladásos sejtek beszűrődése és acinussejtek vacuolisatioja, nekrózisa, apoptosisa).

6.3. Kimutattuk, hogy az L-lizin kezelés a pancreas acináris mitokondriumok szelektív és korai funkcionális és morfológiai károsodását okozza. A mitokondriális károsodás megelőzte a pancreaticus tripszinogén- és NF-κB aktivációját <sup>(132)</sup>.

6.4. Megállapítottuk, hogy az L-arginines pancreatitis kezdeti időszakában (2. h) a szérum ornitin koncentráció nagyobb mértékben emelkedett az argininhez képest <sup>(131)</sup>. Kísérleteink felvetették az argináz szerepét az L-arginin metabolizmusában, melyet egy irreverzibilis argináz-gátló felhasználásával igazoltunk. Az AIHA előkezelés csökkentette az L-arginin-indukálta akut pancreatitis súlyosságát <sup>(137)</sup>.

6.5. Kimutattuk, hogy a pancreaticus SSAT aktiváció és a következményes spermidin katabolizmus – más pancreatitismodellekhez hasonlóan – az L-ornitin- <sup>(131)</sup> és az L-lizinindukálta <sup>(132)</sup> akut pancreatitisben is kialakul. Ezek az elváltozások azonban relatíve késői események, ráadásul a stabil poliamin analóg MeSpd adminisztráció sem elő-, sem utókezelésben nem volt hatásos az L-ornitin-indukálta pancreatitis kivédésére/súlyosságának csökkentésére <sup>(135)</sup>.

6.6. Kísérleteink igazolták, hogy az L-arginin-indukálta akut pancreatitisben aktiválódik a NF-κB transzkripciós faktor <sup>(130)</sup>. A NF-κB aktiváció gátlása az antioxidáns és gyulladásgátló PDTC, illetve a MP előkezeléssel jótékony hatású volt L-arginin-indukálta akut pancreatitisben.

6.7. Vizsgálataink szerint a MP előkezelés nem befolyásolta a pancreaticus NF-κB DNS kötődését CCK-indukálta akut pancreatitisben, de csökkentette a gyulladásos választ és ezen keresztül a betegség kialakulását <sup>(129)</sup>. A MP jótékony hatását valószínűleg a NF-κB DNS-kötődése után fejti ki.

# 7. MEGBESZÉLÉS

# 7.1. A nagy dózisú i.p. adott bázikus aminosavak hatása a patkány pancreasra

#### 7.1.1. Dózis-hatás vizsgálatok

Az *i.p.* adott bázikus aminosavak pancreast károsító hatása dózisfüggő: kisebb dózisban (1 g/kg) nem váltanak ki pancreas károsodást, míg egy viszonylag szűk tartományban (aminosavtól függően 2-4 g/kg) súlyos akut nekrotizáló pancreatitist okoznak. Ennél nagyobb dózisban (4-6 g/kg) néhány órán belül megölik az állatokat.

Vizsgálataink szerint az L-arginin 3-4 g/kg-os, az L-ornitin 3 g/kg-os, az L-lizin pedig 2 g/kg-os dózisban alkalmazva akut pancreatitist indukál patkányban. Az esetek egy részében (17%) az *i.p.* 2 g/kg L-lizin kezelés nem okozott pancreas károsodást. Utóbbira nem tudjuk a magyarázatot, bár technikai probléma lehetősége is felmerül (pl. bélbe oltás). Hasonló jelenséget észleltek azonban Bohus és mtsai. L-arginin-indukálta akut pancreatitisben is <sup>(138)</sup>. A Sprague-Dawley patkányok kb. 15%-a csak gyengén "válaszolt" a nagy dózisú L-arginin kezelésre, és nem fejlődött ki bennük pancreatitis. Ezekben az állatokban az L-arginin kiválasztása a vizeletben jóval kisebb volt a reszponderekhez képest. Mindez arra utalhat, hogy a non-reszponderek hatásosabban detoxifikálhatják az aminosavakat az urea cikluson és transzaminázokon keresztül.

Eredményeinkkel összhangban az L-arginin nagy dózisa (>5 g/kg *i.p.*) hamar megölte a patkányokat <sup>(102,103)</sup>. A halálozás feltehetően valamilyen metabolikus komplikációból adódik. Az *i.p.* adott L-lizin hatását korábban Kitijama és Kishino <sup>(101)</sup>, illetve Kishino és mtsai. <sup>(100)</sup> már vizsgálta patkányokon. A japán kutatócsoport mtsai. 4 g/kg L-lizin-HCl injekciót követően a pancreasban gyulladásos sejtes beszűrődés nélküli acinussejt nekrózist figyeltek meg <sup>(100,101)</sup>. Ez nem csak azért furcsa, mert jelen tudásunk szerint sejtnekrózis nem alakulhat ki gyulladás nélkül, hanem azért is, mert a mi kísérleteink szerint ez a dózis mindegyik patkányt megölte. A kísérleti elrendezésekben mindössze annyi különbséget tudtunk felfedezni, hogy Kitajima és Kishino a hím Wistar patkányok *i.p.* beoltásához 20 %-os L-lizin-HCl oldatot használt, mi pedig 30 %-os L-lizin oldatot. Ezért jelen tudásunk szerint nem tudunk magyarázatot adni az észlelt eredmények különbözőségére.

7.1.2. L-arginin-, L-ornitin-, illetve L-lizin-indukálta akut pancreatitis időbeli vizsgálata

Az L-arginin, L-ornitin és L-lizin által indukált súlyos akut pancreatitismodellekben feltérképeztük a betegség patogenezisében kulcsszerepet játszó tényezőket: a gyulladásos mediátorokat (pl. citokinek), illetve az azok szintéziséért felelős géneket szabályozó NF-κB transzkripciós faktort, a HSP-ket, és a szabadgyökös mechanizmusokat. Az equimoláris dózisú (11,7 ml/kg 1,424 M/l) L-arginin metabolitok: az L-citrullin, az L-ornitin és a nitroprusszidnátrium közül az L-ornitin okozott pancreas károsodást, míg a másik kettő nem. Fontosnak tartom kiemelni, hogy az L-ornitin-indukálta pancreatitis szignifikánsan súlyosabb volt, mint az L-arginin indukálta kórforma, ami felvetette az argináz és az L-ornitin szerepét az L-argininindukálta akut pancreatitisben.

Sokáig úgy tűnt, hogy bázikus aminosavakkal egérben nem lehet akut pancreatitist kiváltani. Az utóbbi időben kiderült, hogy jóval nagyobb (a patkányok esetén már halálos) dózisok felhasználásával egerekben is indukálható a betegség. Elsőként Dawra és mtsai. igazolták egereken az *i.p.* adott L-arginin akut pancreatitist kiváltó hatását <sup>(104)</sup>. Ezt azóta több tanulmány is igazolta. Az egy órás időközzel beadott 2 x 4 g/kg *i.p.* L-arginin injekció nekrotizáló pancreatitist indukált az állatokban. Érdekes módon az egy órás időközzel kétszer *i.p.* injektált 4 g/kg L-lizin oldat viszont nem okozott pancreas károsodást az egerekben. Elképzelhető, hogy nagyobb L-lizin dózisokkal kiváltható lenne a pancreatitis.

#### 7.1.2.1. Pancreaticus tripszinogén aktiváció

Az akut pancreatitis patomechanizmusáról leginkább elterjedt elmélet szerint a betegség egyik iniciáló faktora a tripszinogén acinussejteken belüli aktivációja és a pancreas szövet következményes önemésztődése. Bázikus aminosavakkal kiváltott pancreatitis esetén ez nem feltétlenül van így. Az L-ornitin-, illetve az L-lizin-indukálta akut pancreatitisben <sup>(131,132)</sup> a pancreas tripszin aktivitás szignifikáns növekedése csak az injekció után 9-48 órával következett be. Eredményeinkkel összhangban az L-argininnel kezelt rágcsálókban a pancreas tripszin aktivitása csak a betegség kialakulásának későbbi fázisában nőtt meg szignifikánsan <sup>(104)</sup>. Figyelemre méltó az is, hogy 0,5-2 órával az L-lizin *i.p.* beadása után a pancreas tripszin aktivitása szignifikánsan kisebb volt a kontroll állatokban mért értékhez képest. A csökkenés magyarázata lehet, hogy a fehérjék és aminosavak adagolása elsősorban a proteázok szekrécióját, illetve a fehérjeszintézis gátlását fogja eredményezni. A fehérjék és metabolitjaik ráadásul a CCK és a kolinerg reflexek útján növelik a proteázok szintézisét, transzportját és

szekrécióját, míg a többi enzim aránya csökkenni fog a zimogén szemcsékben és a szekrétumban.

#### 7.1.2.2. A hő-sokk fehérjék és a nukleáris faktor-ĸB aktiváció

A citoprotektív HSP-k szintézise a sejteket károsító stresszhatásra fokozódik <sup>(46)</sup>. Ez a jelenség a nagy dózisú L-arginin, L-ornitin és L-lizin *i.p.* adminisztrációja esetén is megfigyelhető volt. A HSP-k szintézise az alkalmazott dózis és az idő függvényében változott, és már a betegség korai fázisában (a beoltást követő 2-4. órában) fokozódott. A HSP-k expressziójának változásáról más akut pancreatitismodellekben már a bevezetésben részletesen említést tettem.

A humán és az experimentális akut pancreatitis patomechanizmusában számos gyulladásos faktor vesz részt. Ezen faktorok szabályozásáért nagyrészt a NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor a felelős <sup>(8)</sup>. A pancreaticus I $\kappa$ B- $\alpha$  degradáció és ezzel párhuzamosan a NF- $\kappa$ B aktivációja proinflamatorikus citokinek (pl. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) szintéziséhez vezet. Összességében megállapítható, hogy a bázikus L-arginin-, L-ornitin- és L-lizin-indukálta akut pancreatitisben az említett gyulladásos paraméterek változása a betegség későbbi fázisában (legkorábban a 9. órától) figyelhető meg (ld. még később).

#### 7.1.2.3. Oxidatív stressz a pancreasban

A bázikus aminosavakkal kiváltott akut pancreatitismodellek egyik közös jellemzője az oxidatív stressz kialakulása is. Nagy valószínűség szerint ez inkább következménye, mint oka a pancreatitisnek, hiszen jellemzően a pancreatitis kialakulása során jött létre. Az oxidatív stressz azonban súlyosbíthatja a betegség lefolyását, hiszen a sejtstruktúrák károsításán kívül NF-κB aktivációt okoz. A jelenségek sorrendisége az akut pancreatitis kutatásban is vita tárgya <sup>(139)</sup>.

#### 7.1.2.4. Acináris mitokondriális károsodás

Eredményeink szerint az L-lizinnel kiváltott pancreatitis korai fázisában (1 órával az L-lizin injekció után) mitokondriális diszfunkció jön létre a pancreasban. Két órával az L-lizin kezelést követően az acinusokban vacuolumok jelentek meg. Az elektronmikroszkóppal vizsgált mintákban a mitokondriumok mérete és morfológiája megváltozott, hidropikus degenerációjuk volt látható. Ismert, hogy a mitokondriális diszfunkciónak kiemelt szerepe van a sejthalálban. A károsodás következtében a sejt kevesebb ATP-t termel az intracelluláris biokémiai folyamatok elvégzéséhez, ami sejtelhaláshoz vezet. Kitajima és Kishino vizsgálatában az L-lizin injekciót követő 1-6. órában az acináris mitokondriumokban

megemelkedett a Ca<sup>2+</sup> koncentráció, továbbá a mátrixban Ca<sup>2+</sup> depozitumok alakultak ki <sup>(101)</sup>. A mitokondriumok megduzzadtak, de gyulladásos sejtek a pancreas károsodásának későbbi fázisaiban sem jelentek meg. A labororatóriumi eredményeket összegezve elmondhatjuk, hogy az L-lizin-indukálta akut pancreatitisben a mitokondriumok károsodása megelőzte a korai acináris tripszinogén- és NF- $\kappa$ B aktivációt.

#### 7.1.2.5. Az acinussejtek apoptosisa és nekrózisa

Az L-arginin, az L-ornitin és az L-lizin a ductusokat és a Langerhans szigeteket megkímélve szelektíven csak az acinusokat károsította. A bázikus aminosav kezelést követően 12-48 órával a nekrózis dominált a pancreas szövetben, ezen kívül számos apoptoticus testet is Érdekes módon megfigyeltünk. az acinussejtek nagyfokú apoptosisa (melyet fénymikroszkópos, elektronmikroszkópos és molekuláris biológiai módszerekkel is validáltunk) már az L-ornitin és az L-lizin injekciót követően néhány órával kimutatható volt. Az apoptosis ráta szintén emelkedett volt L-arginin-indukálta (2,5 vagy 4 g/kg *i.p.*) pancreatitisben <sup>(108)</sup>. Kubish és mtsai-nak vizsgálata szerint az apoptosis hátterében (legalábbis részben) az endoplazmatikus retikulum stressz állhat (108). Az L-ornitinnel végzett kísérleteinkben az apoptosis az L-arginines kísérletekhez képest hamarabb kimutatható volt. Ez magyarázható azzal, hogy az apoptosist L-arginin-indukálta pancreatitisben is az L-ornitin mediálja (ugyanis az L-argininnek metabilizálódnia kell). Az L-ornitininnel, illetve az L-lizinnel kezelt állatokból preparált pancreas minták elektronmikroszkópos képén dezorganizált endoplazmatikus retikulumokat láttunk, melyhez hasonlót az L-arginin-indukálta pancreatitisben is megfigyeltek <sup>(108)</sup>. Kutatásaink során azt találtuk, hogy a 2 g/kg *i.p.* L-lizin kezelés a szérum amiláz aktivitás megemelkedésével, pancreaticus tripszinogén aktivációval, gyulladásos beszűrődéssel és az acinusok apoptoticus és nekrotikus sejtelhalásával járó akut nekrotizáló pancreatitist vált ki. Ezzel ellentétben Kitijama és Kishino (101), illetve Kishino és mtsai. <sup>(100)</sup> 4 g/kg dózis esetén csak acinussejt nekrózist láttak gyulladásos infiltráció nélkül. Utóbbi megfigyelésre nem tudunk magyarázatot adni.

#### 7.1.2.6. Extrapancreaticus szervek károsodása

Az L-ornitin- és L-lizin-indukálta akut pancreatitisben az extrapancreaticus károsodás (a pancreas károsodás mértékéhez képest) meglepő módon igen kisfokú volt, ami morfológiailag főleg a vesét és a tüdőt (a májat nem) érintette. A laborparaméterekben az ASAT aktivitás-fokozódás is megfigyelhető volt. Elder és mtsai. ugyanúgy enyhe tüdőelváltozásokat találtak L-arginin-indukálta pancreatitisben <sup>(140)</sup>. A komolyabb

tüdőkárosodás hiánya több (súlyos) akut pancreatitismodell esetén is megfigyelhető. A pulmonáris szövődmény humán nekrotizáló akut pancreatitisben igen lényeges és jellegzetes komplikáció, ami a betegek halálozásának is a nagy részét okozza. Mindezek tükrében talán nem meglepő, hogy a bázikus aminosavakkal beoltott pancreatitises állatok (a nagyfokú pancreas nekrózis ellenére) szinte mindegyike túlélte a betegséget.

# 7.2. A bázikus aminosavakkal kiváltható akut pancreatitis patomechanizmusa

A bázikus aminosavak által kiváltott akut pancreatitis patomechanizmusa nem ismert, bár reményeim szerint a dolgozatban foglaltak hozzájárultak a folyamat megértéséhez. Az L-arginines pancreatitismodell esetén korábban is felmerült a szabadgyökök (beleértve az NOot) <sup>(105)</sup>, a gyulladásos mediátorok (NF-κB, interleukinok) <sup>(130)</sup>, az endoplazmatikus retikulum stressz <sup>(108)</sup> és a poliaminok <sup>(42)</sup> szerepe. Bár egy ideig azt gondoltuk, hogy az L-arginin esetleg az L-ornitinen keresztül fejtheti ki az exokrin pancreast károsító hatását, mindennek ellentmond, hogy az L-lizin (mely nem hozható direkt kapcsolatba az előbbi aminosavak metabolizmusával) is hasonló karakterisztikájú betegséget indukál. A pancreas károsodás esetlegesen az L-arginin, L-ornitin és L-lizin alifás oldalláncának tulajdonítható, hiszen a hatástalan L-hisztidin egy imidazol gyűrűt tartalmaz. Másrészről az sem zárható ki, hogy az L-arginin, az L-ornitin és az L-lizin toxikus hatása - legalábbis részben - erős pozitív töltésüknek is tulajdonítható, hiszen az L-hisztidin az előzőekhez képest a legkevésbé bázikus hatású.

Érdekességképpen említenék egy humán esettanulmányt, mely szerint egy fiatal sportoló férfinél nagy mennyiségű (táplálékkiegészítőkkel bejuttatott) arginin elfogyasztása után az akut pancreatitisre jellemző klinikai tünetek jelentek meg <sup>(141)</sup>. A *per os* bevitt bázikus aminosavak akut pancreatitist kiváltó hatása azonban nem bizonyított. A bélbe (véletlenül) oltott L-arginin nem okoz betegséget (nem publikált adat). Magam részéről inkább azt tartom valószínűnek, hogy az említett betegnél valamilyen genetikai eltérés játszhatott szerepet a kórkép kialakulásában.

# 7.3. A bázikus aminosavakkal kiváltható akut pancreatitis hasznosíthatósága

Összefoglalóan, a bázikus aminosavakkal kiváltott pancreatitismodellek többnyire jól reprodukálják/modellezik a humán betegség során is észlelhető főbb laboratóriumi elváltozásokat (a szérum amiláz- és -lipáz aktivitás-emelkedés mellett a tripszinogén- és a NF- $\kappa$ B aktiváció, a citokin szintézis, a HSP expresszió, az oxidatív stressz fokozódása). A patológiai vizsgálat szintén igazolta a humán akut pancreatitis jellegzetes szövettani eltéréseit (pl. interstitialis ödéma, gyulladásos sejtek beszűrődése és acinussejtek vacuolisatioja, nekrózisa, apoptosisa). Az L-lizin *i.p.* adagolása korai, szelektív mitokondriális károsodást is eredményez a pancreasban. Fontos megemlíteni, hogy a bázikus aminosavakkal kiváltott pancreatitis esetén az első szövettani elváltozások már a tripszinogén és a NF- $\kappa$ B aktiváció előtt megjelentek. Azt is meg kell jegyeznem, hogy ezek a pancreatitismodellek nem ideálisak az extrapancreaticus szövődmények vizsgálatára.

Az L-ornitin-indukálta akut pancreatitismodellt már más kutatócsoportok is sikeresen használták <sup>(142)</sup>. Reményeink szerint az általunk vizsgált/kifejlesztett experimentális modellek használata elterjed, hiszen ezeknek akár klinikai relevanciája is lehet, melyekkel tanulmányozhatjuk az akut nekrotizáló pancreatitis molekuláris eseményeit. A modellek lehetőséget biztosítanak továbbá potenciális terápiás eljárások kifejlesztésére is.

# 7.4. A poliaminok szerepe akut pancreatitisben

A poliaminszintek fokozódása és csökkenése egyaránt apoptosist okozhat a sejtekben <sup>(143)</sup>. A poliaminok szerepére akut pancreatitisben először Alhonen és mtsai. által kifejlesztett transzgenikus patkányok világítottak rá, melyek overexpresszálják a SSAT enzimet <sup>(41)</sup>. A pancreas poliaminszintjének csökkenése valószínűleg a DNS- és a fehérjeszintézis gátlását okozza, ami hozzájárul az acinussejtek halálához. Mindezek alapján felmerült bennünk a poliaminok lehetséges szerepének vizsgálata is a betegség kialakulásában. Érdekes módon fokozott pancreaticus spermidin katabolizmust találtunk L-ornitin-, illetve L-lizin-indukálta akut pancreatitisben, melyet valószínűleg a SSAT aktiváció mediál <sup>(131,132)</sup>. A poliamin katabolizmus a pancreasra specifikus elváltozás, hiszen a tüdő spermidin szintjének csökkenését kivéve az L-ornitin kezelés hatására a poliaminszintek általában nőttek a májban

és a tüdőben is. A stabil poliamin analóg MeSpd kezelés nem befolyásolta a természetes poliaminok szintjének változását, a SSAT aktivációját és az L-ornitin-indukálta akut pancreatitis súlyosságát. Ez annak is tulajdonítható, hogy a pancreasban felhalmozódó MeSpd nem tudta kompenzálni a spermidin depléciót.

Fontos megjegyezni azt is, hogy a pancreas poliaminszintjeinek változása csak a hisztológiai károsodás első jelei után jelentek meg. Míg a legkorábbi károsodás jelei (vaszkuláris congestio, vacuolisatio, mitokondriális lézió és az acinussejtek apoptosisa) már 2-4 óra elteltével jelen vannak a bázikus aminosavak által indukált akut pancreatitisben, addig a poliamin katabolizmus csak a 6-12. órától volt megfigyelhető. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a spermidin katabolizmus és a SSAT aktiváció nem vesznek részt az L-ornitinés az L-lizin-indukálta pancreatitis iniciációjában. A pancreas károsodás csúcsán (24-72. óra) igen kifejezett poliamin katabolizmus volt megfigyelhető. Az L-arginin-indukálta pancreatitisben legkorábban a 24. órában vizsgálták a pancreaticus poliamin pool-okat és a SSAT aktivitást, de ott is az eredményeinkkel összhangban lévő változásokat kaptak<sup>(42)</sup>. A taurokolsavval-indukált pancreatitisben a pancreaticus SSAT aktivitás már valamivel korábban, a 3-6. órától megfigyelhető volt (44). Érdekes különbség az előző tanulmányhoz képest, hogy az L-arginin, L-ornitin vagy L-lizin-indukálta modellekben sem spermin katabolizmus, sem putreszcin akkumuláció nem volt megfigyelhető a pancreasban. Nem szabad azonban elfelejteni, hogy a poliamin homeosztázis nem csak a metabolizmus, hanem a poliamin transzport (szekréció és felvétel) által szabályozott <sup>(37,38)</sup>. Egy másik magyarázat szerint – ahogy a SSAT transzgenikus egerekben megfigyelhető volt (144) –, a poliamin metabolikus ciklus felgyorsul, és a poliamin szintézis dominálja a poliamin katabolizmust. A spermin és spermidin depléció humán nektrotizáló akut pancreatitisben is kimutatható volt<sup>(43)</sup>.

A szintetikus  $\alpha$ -metilált poliamin analógok, mint pl. a MeSpd, a természetes poliaminokhoz képest metabolikusan jóval stabilabbak, mivel nem szubsztrátja a SSAT-nak és gyenge szubsztrátja a spermin szintáznak <sup>(145)</sup>. Mindezek mellett az analógok képesek ellátni a természetes poliaminok celluláris funkcióit <sup>(146)</sup>. A metilált poliamin származékok a poliamin transzportban szerepet játszó proteinek szubsztrátjai, és akkumulálódnak a pancreasban az *i.p.* adminisztrációt követően. A MeSpd előkezelés teljesen kivédte a cink-indukálta akut pancreatitis kialakulását SSAT-t overexpresszáló transzgenikus patkányokban <sup>(147)</sup>. A pancreas spermidinszint-csökkenés kompenzációjaként az L-ornitin-indukálta akut pancreatitis kivédésének céljából a patkányokat MeSpd-nel kezeltük. Mind az előkezelés, mind az utókezelés hatástalan volt a pancreatitis kivédésére, illetve a betegség súlyosságának csökkentésére. A MeSpd-nel való előkezelés csökkentette a pancreas spermidin szintjét

L-ornitin-indukálta pancreatitisben. Ez arra utal, hogy a szintetikus poliamin analóg tovább fokozza a természetes poliaminok katabolizmusát, vagy az analóg vegyület elfoglalja a spermidin kötőhelyét a pancreas szövetben. A dolgozatban ismertetett eredmények részben ellentmondanak az L-arginin- és taurokolát-indukálta akut pancreatitisben tapasztalt MeSpd hatásokhoz képest. A MeSpd előkezelés szignifikánsan csökkentette az L-arginin-indukálta (2,5 g/kg *i.p.*) akut pancreatitis súlyosságát anélkül, hogy befolyásolta volna a SSAT aktivációt és az azt követő poliamin katabolizmust <sup>(42)</sup>. Ezzel ellentétben (és az eredményeinkkel összhangban) a MeSpd előkezelés nem befolyásolta a cerulein-indukálta (7x50 µg/kg) pancreatitis súlyosságát <sup>(42)</sup>. A biszmetilspermin kezelés (de nem az előkezelés) csökkentette a taurokolát-indukálta akut pancreatitis súlyosságát a 24. óránál, de nem befolyásolta az acinus nekrózis mértékét 72 órával a betegség indukcióját követően <sup>(44)</sup>. Továbbá a biszmetilspermin kezelés elhalálozást is okozott 72 órával a pancreatitis indukcióját követően <sup>(44)</sup>. Meg kell jegyeznünk, hogy a nátrium-taurodezoxikolsav (2 %) infúziója a pancreas vezetékbe és a 2,5 g/kg L-arginin *i.p.* injekciója kisebb súlyosságú betegséget okoz a 3 g/kg L-ornitinnel kiváltott pancreatitishez képest. Az ellentmondó eredmények magyarázhatók azzal, hogy a stabil poliamin analógok csak korábban adva és kevésbé súlyos nekrotizáló akut pancreatitisben hatásosak.

# 7.5. Az argináz szerepe L-arginin-indukálta akut pancreatitisben

Az *i.p.* injektált nagy dózisú L-arginin nagyrészt L-ornitinné konvertálódik patkányokban, ami az argináz szerepére utal a bázikus aminosav katabolizmusában, illetve felvetik az L-ornitin szerepét az L-arginin-indukálta akut pancreatitis patogenezisében <sup>(131,148)</sup>. A legnagyobb argináz aktivitást a májban találtuk, a pancreasban, a tüdőben és a vesében nagyságrendekkel kisebb volt az aktivitás. Ez nyilván nem meglepő, és összhangban van korábbi eredményekkel <sup>(149)</sup> is, hiszen az enzimnek kulcsszerepe van az ureaciklusban. Így feltételezhető, hogy a kísérleteinkben használt nagy dózisú L-arginin metabolizmusa is nagyobb részt a májban zajlik.

Kísérletünkben az AIHA előkezelés szignifikánsan csökkentette az L-arginin-indukálta (3,5 g/kg *i.p.*) pancreas károsodás mértékét. Összességében tehát valószínű, hogy az argináznak fontos szerepe van az L-arginin-indukálta pancreatitis kialakulásában. Az irodalmi adatoknak megfelelő dózisú <sup>(150,151)</sup>, 60 μM AIHA (*in vivo* 15 mg/kg) a patkánymáj-homogenátum argináz

és tisztított borjú argináz aktivitását 25 %-kal csökkentette. Fontos megemlíteni azonban, hogy az AIHA nem csak az arginázra, de az ODC-ra is gátló hatással van <sup>(150,151)</sup>. Érdekes módon az AIHA adminisztráció önmagában is stresszválaszt váltott ki a pancreasban, melynek hatására fokozódott a HSP27 és HSP72 expressziója. Ez annak tulajdonítható, hogy az argináz aktivitás gátlása az urea ciklust is érinti, ami megemeli a toxikus ammónia koncentrációját. A HSP-k preindukciója védő hatással rendelkezik az L-arginin-indukálta akut pancreatitisben <sup>(59)</sup>. Magunk is a proinflammatorikus citokinek koncentrációjának csökkenését találtuk a szérumban <sup>(72)</sup>. Utóbbiak miatt nem tudjuk kizárni az AIHA kezelés hatására indukálódó HSP-k sejtvédő hatását.

Eddig két tanulmány foglalkozott az argináz aktivitásával humán akut pancreatitisben. Sandstrom és mtsai. <sup>(152)</sup> a szérum argináz aktivitását változatlannak találták az akut pancreatitis kialakulásának kezdeti szakaszában, míg Scibor és mtsai. <sup>(153)</sup> ezzel ellentétben, szignifikáns argináz aktivitás csökkenést figyeltek meg.

Fontos itt megemlítenem a NOS lehetséges szerepét az L-arginin-indukálta pancreatitis létrejöttében, hiszen ez a másik kulcsenzim az L-arginin metabolizmusában. Régóta vita tárgya ugyanis, hogy a NOS-nak / NO-nak védő- (154,155,156), károsító- (157,158,159) vagy semleges (160) hatása van-e az akut pancreatitis kialakulására <sup>(111)</sup>. Fontos üzenete a munkánknak, hogy a NO önmagában nem elég az L-arginin-, ill. L-ornitin-indukálta pancreatitis kialakulásához. A 3,5 g/kg L-arginin *i.p.* injekcióját követően a szérum citrullinkoncentráció-emelkedés jóval kisebb volt az L-ornitin koncentráció változásához képest. Ezzel összhangban vannak korábbi eredményeink is, melyek szerint a NO képződés gátlása (NG-nitro-L-arginin-metilészterrel) L-arginin-indukálta akut pancreatitisben csak egyes laborparaméterek változását mérsékelte, és nem befolyásolta a panceas szövettani károsodását <sup>(109)</sup>. Eredményeinkkel ellentétben mások azt találták, hogy az aminoguanidin (egy iNOS specifkus inhibítor), csökkentette az L-argininindukálta pancreatitis súlvosságát <sup>(158)</sup>. Ha megnézzük a NOS indukció lefutását, jól látszik, hogy a NO nem a kezdeti folyamatokban játszik fontos szerepet L-arginin-indukálta pancreatitisben. A pancreaticus konstitutív NOS aktivitás erőteljesen csökkent 6 órával az L-arginin injekciót követően, majd fokozatosan növekedett, míg a csúcsát a 24. óránál érte el <sup>(109)</sup>. Indukálható NOS aktivitás emelkedés csak a 24. órában volt kimutatható. A NO képződést gátló N-nitro-L-arginin-metilészter csak a laborparaméterek változását csökkentette L-argininindukálta pancreatitisben, a pancreas szövettani károsodásának mértékét nem (109). Mindenesetre az L-ornitin-indukálta pancreatitismodell használata jobb lehet az L-argininénél, hiszen az előbbi esetben nincsen jelentős NO képződés, ami befolyásolhatja a pancreatitis súlyosságát.

# 7.6. Nukleáris faktor-*kB* aktiváció és annak gátlása akut pancreatitisben

Eredményeink szerint a szupramaximális dózisban adott CCK és a nagydózisú L-arginin, L-ornitin és L-lizin *i.p.* injekciója is NF- $\kappa$ B aktivációt okoz. Irodalmi adatok szerint mostanra már elég egyértelmű, hogy az akut pancreatitis patogenezisében a NF- $\kappa$ B igen fontos szerepet játszik <sup>(8)</sup>.

A transzkripciós faktor aktivációjának időbeli lefutása viszont pancreatitismodellenként változik, mint ahogy az nálunk is megfigyelhető volt. A nagy dózisú CCK- vagy cerulein kezelés egérben és patkányban egészen korai (a kezelést követő első 15 percben) pancreaticus NF-κB aktivációt okoz, ami a gyulladásos mediátorok szintézisének emelkedéséhez vezet <sup>(115,161,162,163,164,165)</sup>. A NF-κB aktivációnak két fázisa van. Az első fázis (ami az IκB-α degradáció következtében jön létre) a CCK adminisztrációt követően fél órával bekövetkezik, és 90 perc után a kezdeti szintre tér vissza <sup>(115)</sup>. A második fázis (ami az IκB-β degradáció következtében jön létre) 3 órával a CCK injekció után jön létre és a 6. óráig tart. A "supershift" analízis szerint a NF-κB komplexekben a p50-, p65-, és p52 fehérjék is megtalálhatók, viszont c-Rel-t nem tudtak kimutatni <sup>(115,163)</sup>.

A nátrium-taurokolsav retrográd injekciója a patkányok biliopancreaticus ductusába szintén viszonylag gyors (1 órán belül) NF-κB aktivitációt és súlyos nekrotizáló akut pancreatitist okoz <sup>(166,167,168,169,170)</sup>. A taurokolsavas pancreatitismodellben a NF-κB aktivációja főleg a pancreas fejre lokalizálódott <sup>(166)</sup>. Ez talán nem olyan meglepő, hiszen a pancreas károsodás is a feji régióban volt a legsúlyosabb, szemben az általunk beállított modellekben kialakuló, egész szervet érintő relatíve homogén gyulladással. A NF-κB p65 alegységének nukleáris transzlokációja együtt járt a P-szelektin, az ICAM-1, és más adhéziós molekulák expressziójának fokozódásával acinus és endotél sejtekben 1 órával a taurokolát adminisztrációját követően <sup>(171)</sup>. Ez végső soron a polimorfonukleáris sejtek nagyfokú adherenciájához és transzmigrációjához vezetett. Az aktivált neutrofilek fokozzák a reaktív oxigén-gyökök termelését, ami további NF-κB aktivációt okoz <sup>(172)</sup>. A forbol-mirisztát-acetát által aktivált neutrofil granulociták fokozták a NF-κB DNS-kötő aktivitását (p50/p50, p50/p65) és a következményes citokin (IL-1β, IL-6, TNF-α) szintézist pancreas acinussejtekben <sup>(172)</sup>.

A patkányok biliopancreaticus vezetékének ligációja fokozott protein kináz (p38 mitogén-aktivált protein kináz, Akt) és NF- $\kappa$ B aktivációhoz vezet, ami emelkedett TNF- $\alpha$  szintet eredményez az áloperált kontroll csoporthoz képest <sup>(174,175,176,177)</sup>. A NF- $\kappa$ B aktiváció már 1 órával a lekötés után detektálható volt, és a 24. órában kifejezetten emelkedett volt. Supershift esszével ebben a pancreatitismodellben kimutatható volt a NF- $\kappa$ B p65 alegysége.

Chen és mtsai. szellemes módon vizsgálták a pancreaticus NF- $\kappa$ B aktiváció hatását <sup>(178)</sup>. Egy adenovírus konstrukció segítségével aktív RelA/p65 NF- $\kappa$ B alegységet juttattak be intraductalis retrográd injekcióval patkányba. Ebben a modellben a NF- $\kappa$ B aktiváció szignifikánsan emelkedett a kontroll AdGFP vírussal transzfektált állatokhoz képest. A NF- $\kappa$ B aktiváció masszív MPO aktivitás-fokozódást okozott 16 órán belül, és 48 órán keresztül emelkedett maradt. A neutrofil infiltráció nemcsak a pancreasban, de a tüdőben is jelen volt, és nagyfokú szövetkárosodáshoz vezetett. A NF- $\kappa$ B aktiváció és a gyulladás súlyossága csökkent, ha az aktív RelA/p65 mellett I $\kappa$ B $\alpha$ -t vittek be az adenovírus vektorral.

Vizsgálataink szerint a MP előkezelés CCK-, illetve L-arginin-indukálta akut pancreatitisben is jótékony hatású volt. A glükokortikoidok igen potens gyulladásgátló gyógyszerek (179). Az irodalmi adatok többsége szerint a proinflammatorikus transzkripciós faktor gátlása hatásos az akut pancreatitis kivédésére. Eredményeinkkel összhangban Paszt és mtsai. kimutatták a metilprednizolon előkezelés NF-κB aktiváció gátló hatását, illetve azt is igazolták, hogy a szteroiddal való előkezelés csökkentette az L-arginin-indukálta akut pancreatitis súlyosságát <sup>(180)</sup>. Ramudo és mtsai. szintén kimutatták a dexametazon jótékony hatását taurokolsavval indukált akut pancreatitisben <sup>(181)</sup>. A dexametazon kezelés csökkentette a pancreas ICAM-1 expresszióját és a gyulladásos infiltrációt. A hidrokortizon protektív hatását több kutatócsoport is kimutatta súlyos nekrotizáló akut pancreatitisben <sup>(182,183,184)</sup>. A gükokortikoidok csökkentik az acinussejtek apoptoticus elhalását cerulein-indukálta akut pancreatitisben <sup>(185)</sup>. Az előzőekkel ellentétben Manso és mtsai. a kolin-deficiens etioninnal kiegészített diéta-indukálta pancreatitis súlyosbodását írta le hidrokortizon kezelés hatására, bár ebben a tanulmányban a patkányokat 7 napig előkezelték a gyógyszerrel <sup>(186)</sup>. A hidrokortizon adása a betegség lefolyása során nem feltétlenül hatásos (183, 184,186). Gloor és mtsai. 10 mg/kg hidrokortizont adtak 10 perccel a cerulein-indukálta pancreatitis kiváltása után, és nem találtak védő hatást <sup>(184)</sup>. Ezek az ellentmondó eredmények a különböző akut pancreatitismodellekkel (ödémás és nekrotizáló), időzítésekkel (elő vagy utókezelés) és szteroid dozírozással magyarázhatók. Mindenesetre a MP előkezelés jótékony hatása a NF-kB aktiváció és a következményes proinflammatorikus citokin expresszió gátlásának tulajdonítható akut

pancreatitisben. Utóbbi vegyület gyulladásgátló hatását ödémás pancreatitisben valószínűleg a NF-κB DNS-kötődését követően fejti ki <sup>(129)</sup>. Mindezek ellenére a szteroidok súlyos nekrotizáló pancreatitisben való használata a mai napig vitatott kérdés.

A szteroidokon kívül más gyulladásgátló hatású vegyületek is hatásosnak bizonyultak a pancreaticus NF- $\kappa$ B aktiváció gátlására. A peroxiszóma proliferátor–aktivált receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) a ligandfüggő nukleáris receptorok szupercsaládjába tartozik, és gyulladásgátló hatása van. A PPAR $\gamma$  ligand 15d-prosztaglandin J<sub>2</sub>–vel történő előkezelés szignifikánsan gátolta a pancreaticus I $\kappa$ B degradációt és a NF- $\kappa$ B DNS-kötő aktivitást, és szintén csökkentette a proinflammatorikus gyulladásos mediátorok [ciklooxigenáz-2 (COX-2), ICAM-1, IL-6] szintjét, valamint a pancreatitis súlyosságát egérben <sup>(187)</sup>. A gyulladásgátló etil-piruvátnak szintén jótékony hatása volt akut nekrotizáló pancreatitisben. A szer szignifikánsan gátolta a NF- $\kappa$ B aktivációt és a proinflammatorikus citokinek (TNF- $\alpha$ , IL-6) szintézisét <sup>(188)</sup>. Az etil-piruvát mindezeken felül a szisztémás (máj, tüdő, bélmucosa permeabilitás) szervkárosodást is mérsékelte, és javította a hosszútávú túlélést.

A COX-2 egy indukálható enzim, melynek központi szerepet tulajdonítanak a gyulladásos betegségek progressziójában. Akut pancreatitisben kimutatták, hogy a COX-2 gátlás nem csak az általa előállított gyulladásos mediátorok szintjének csökkentésében, hanem a NF-kB aktiváció második fázisának gátlásában is szerepet játszik <sup>(162,189)</sup>. Érdekes módon azonban a COX-2 specifikus gátlása SC-58125-nel úgy csökkentette a pancreatitis súlyosságát, hogy nem befolyásolta a szérum és a pancreas IL-1 $\beta$  és IL-6 koncentrációját <sup>(189)</sup>. Song és mtsai. azt találták, hogy a COX-2 gátlása (farmakológiai gátló szerekkel és "knock-out" egerek használatával) a pancreatitis súlyosságának csökkentése mellett a pancreatitisszel asszociált tüdőkárosodást is mérsékelte egerekben <sup>(162)</sup>.

Az antioxidáns PDTC alacsonyabb dózisok (1- és 10 mg/kg) esetén szintén mérsékelte az L-arginin-indukálta pancreatitis súlyosságát. A NF-κB aktiváció főleg az oxidatív stressz által érintett szövetterületek esetén mutatható ki. Éppen ezért talán nem is olyan meglepő, hogy a potens antioxidáns hatással bíró N-acetilciszteint igen széles körben használják a NF-κB aktiváció és a következményes gyulladásos citokin szintézis gátlására CCK-, taurokolsav- vagy pancreas ductus ligatio-indukálta pancreatitisben <sup>(166,169,177,190)</sup>. Bizonyos lipid peroxidációgátló vegyületek (pl. a raxofelaszt) szintén gátolták a NF-κB aktivációját, és csökkentették a cerulein-indukálta pancreatitis súlyosságát <sup>(191)</sup>. Eredményeinkkel összhanban a PDTC számos pancreatitismodellben gátolta a NF-κB aktivációt <sup>(167,169,192,193)</sup>.
Mint azt a bevezetőben említettem, akut pancreatitisben több proteáz is aktiválódik, a proteáz inhibítorok pedig csökkentik a pancreatitis súlyosságát és a NF- $\kappa$ B aktiváció mértékét. A guamerin-származtatott szintetikus peptid (pancreas és leukocita elasztáz inhibítor), például szignifikánsan gátolta a cerulein-indukálta pancreatitis jellegzetes markereit: a neutrofil infiltrációt és a NF- $\kappa$ B aktivációt <sup>(194)</sup>. Hasonlóképpen a kalpain I (tiol-proteáz, ami az I $\kappa$ B- $\alpha$  degredációért is felelős) inhibítorral való előkezelés nagymértékben csökkentette a cerulein-indukálta pancreas- és tüdőkárosodást egerekben <sup>(195)</sup>. Ez együtt járt a NF- $\kappa$ B aktiváció, az ICAM-1 expresszió és a gyulladásos infiltráció gátlásával <sup>(196)</sup>. A patkányok előkezelése a sejtpermeábilis MG-132 tripeptiddel (ami egy proteoszóma inhibítor, mely más proteázokat is gátol, pl. a kalpainokat és a katepszineket), szignifikánsan csökkentette a CCK-indukálta NF- $\kappa$ B activációt és a pancreatitis súlyosságát <sup>(197)</sup>. Mindenképpen fontos megjegyezni azonban, hogy a többnyire nem-specifikus hatású farmakológiai gátló szerekkel (antioxidáns és/vagy gyulladásgátló) vigyázni kell, hiszen ezek más szignalizációs utakat is befolyásolnak, illetve toxikus hatásuk is lehet.

A fenti, nem-specifikus hatásokat elkerülendő, több újabb tanulmányban is egyre specifikusabb vegyületeket, illetve újabban "knock-out" egereket használtak a NF-kB aktiváció vizsgálatára akut pancreatitisben. Letoha és mtsai. egy sejt-permeábilis NF-kB gátló peptid hatásáról számoltak be <sup>(198,199)</sup>. A NF-κB p50 alegység nukleáris lokalizációs szignálját egy sejtpermeábilis penetratin peptid molekulához konjugálták. Az inhibítor peptid (PN50) gátolta a NF-κB aktivációját és védő hatást fejtett ki CCK-indukálta akut pancreatitisben <sup>(198)</sup>. Fontos kiemelni azt is, hogy a PN50-nek még abban az esetben is kedvező hatása volt, ha a CCK injekciót követően adagolták az állatoknak. Egy másik tanulmányban egereket előkezeltek egy hexapeptiddel, ami szelektíven gátolja a NF-KB aktivációt azáltal, hogy blokkolja a NEMO kötődését az IKK-hoz (200). A hexapeptid ezáltal a pancreaticus- és tüdőkárosodást is mérsékelte cerulein-indukálta akut pancreatitisben. Altavilla és mtsai. a cerulein-indukálta pancreatitis súlyosságát vizsgálták NF-κB/p105 "knock-out" egerekben <sup>(201)</sup>. Ezekben az egerekben a pancreaticus NF-κB DNS-kötő aktivitás, a TNF-α expresszió, a leukocita akkumuláció és az oxidatív stressz mértéke is kisebb volt a vad-típusú kontrollhoz képest. Ezzel párhuzamosan a laboratóriumi és szövettani paraméterek szerint a "knock-out" egerek pancreatitisének súlyossága is kisebb volt. Aleksic és mtsai. a konstitutíve aktív IKKß alegységgel rendelkező egerekben fokozott leukocita inflitrációt és súlyosabb ceruleinindukálta pancreatitist észleltek <sup>(202)</sup>. Baumann és mtsai. hasonló eredményeket kaptak egy másik transgenikus egér-modellben, ami lehetővé tette a IKKB/NF-kB szignalizáció acinussejt-

specifikus kondicionális aktivációját vagy gátlását <sup>(203)</sup>. A konstitutíve aktív IKKβ önmagában is masszív pancreas szövetkárosodást okozott, ami hasonlított a cerulein-indukálta pancreatitisre. A domináns-negatív IKK2 expresszió szignifikánsan javította a cerulein-indukálta pancreatitis súlyosságát. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az acináris NF-κB aktiváció fontos szerepet játszik az akut pancreatitis kialakulásában azáltal, hogy transzkripciós szinten szabályozza a proinflammatorikus géneket.

Bár a legtöbben egyetértenek abban, hogy a NF-κB aktiváció gátlása hasznos akut experimentális pancreatitisben, meg kell említeni, hogy az első tanulmányok egyikében pont az ellenkező hatást találták cerulein-indukálta akut pancreatitisben patkányokban <sup>(163)</sup>. Steinle és mtsai. szerint a PDTC és az N-acetilcisztein súlyosbítják az akut pancreatitist. A szerzők ezt úgy magyarázták, hogy a NF-κB-nek az apoptosis gátlásában is szerepe lehet, így a transzkripciós faktor gátlása fokozza az apoptosist és nekrózist. Említésre méltóak még Algül és mtsai-nak transzgenikus modellen kapott eredményei: a NF-κB DNS kötődésért és RelA/p65 dimerizációért felelős pancreas-specifikus RelA homológia domén deléciója súlyos nekrotizáló pancreatitist okozott <sup>(204)</sup>. Ezt a váratlan hatást - legalábbis részben - a PAP-1 indukció hiányának tulajdonították, aminek közismerten védő hatása van az acinussejtekre pancreatitisben.

# 8. VIZSGÁLATAINK JELENTŐSÉGE ÉS JÖVŐBENI TERVEINK

Vizsgálataink során több olyan kórélettani folyamatot is karakterizáltunk, amelyek szerepet játszhatnak az akut pancreatitis kialakulásában. Eredményeink megnyitják a lehetőséget a betegség kezelésére. A HSP induktor vegyületek mindenképpen jótékony hatásúak lehetnek pancreatitisben. A megfelelő időben és dózisban alkalmazott NF-κB gátló vegyületek alkalmazása szintén ígéretes lehet. Egy másik klinikai jelentőséggel bíró potenciális támadáspont az acinussejtek károsodott mitokondriális funkciójának helyreállítása. Amennyiben sikerülne a károsodott acinusok ATP tartalmát a pancreatitis során valamilyen módon normál-közeli szinten fenntartani, az segíthetne a sejteknek átvészelni a betegséget. Ez a ductalis sejtek szempontjából is fontos lehet, hiszen korábban kimutattuk, hogy az epesavak nagy koncentrációban csökkentik az intracelluláris ATP szintet.

Ahogy azt a bevezetőben említettem, a pancreas acinussejtek mellett a ductalis sejteknek is fontos szerepük van az akut pancreatitis patogenezisében. Ezt laboratóriumunkban már több *in vitro* tanulmányban is igazoltuk. Folyamatban vannak az *in vivo* vizsgálatok arra vonatkozóan, hogy olyan transzgenikus egerekben indukáljunk akut pancreatitist, melyeknek a ductalis HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréciója csökkent. Előkísérleteink eredménye szerint az utóbbi egerekben a pancreatitis súlyossága nagyobb.

Reményeink szerint kísérletes eredményeink olyan gyógyszerfejlesztések alapját képezhetik, melyek előbb-utóbb a betegágy mellett is hasznosíthatók lesznek.

# 9. IRODALOMJEGYZÉK

- 1. Banks PA. Epidemiology, natural history, and predictors of disease outcome in acute and chronic pancreatitis. Gastrointest Endosc 2002;56:S226-30.
- Pandol SJ, Saluja AK, Imrie CW, Banks PA. Acute pancreatitis: bench to the bedside. Gastroenterology 2007;132:1127-51.
- Gorelick FS. Pancreas cell physiology and pancreatitis cell biology. Summary of a symposium held at the joint meeting of the EPC and the IAP, Heidelberg 2002. Pancreatology 2003;3:207-8.
- Sári R, Pálvölgyi A, Rakonczay Z, Jr., Takács T, Lonovics J, Czakó L, Szilvássy Z, Hegyi P. Ethanol inhibits the motility of rabbit sphincter of Oddi in vitro. World J Gastroenterol 2004;10:3470-4.
- Whitcomb DC. Genetic polymorphisms in alcoholic pancreatitis. Dig Dis 2005;23:247-54.
- Saluja AK, Donovan EA, Yamanaka K, Yamaguchi Y, Hofbauer B, Steer ML. Cerulein-induced in vitro activation of trypsinogen in rat pancreatic acini is mediated by cathepsin B. Gastroenterology 1997;113:304-10.
- Hofbauer B, Saluja AK, Lerch MM, Bhagat L, Bhatia M, Lee HS, Frossard JL, Adler G, Steer ML. Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats. Am J Physiol 1998;275:G352-62.
- 8. **Rakonczay Z**, Hegyi P, Takacs T, McCarroll J, Saluja AK. The role of NF-kappa B activation in the pathogenesis of acute pancreatitis. Gut 2008;57:259-267.
- Odinokova IV, Sung KF, Mareninova OA, Hermann K, Gukovsky I, Gukovskaya AS. Mitochondrial mechanisms of death responses in pancreatitis. J Gastroenterol Hepatol 2008;23 Suppl 1:S25-30.
- Saluja A, Hashimoto S, Saluja M, Powers RE, Meldolesi J, Steer ML. Subcellular redistribution of lysosomal enzymes during caerulein-induced pancreatitis. Am J Physiol 1987;253:G508-16.
- Halangk W, Lerch MM, Brandt-Nedelev B, Roth W, Ruthenbuerger M, Reinheckel T, Domschke W, Lippert H, Peters C, Deussing J. Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. J Clin Invest 2000;106:773-81.
- Petersen O. Ca2+ signaling in pancreatic acinar cells: physiology and pathophysiology. Braz J Med Biol Res 2009;42:9-16.

- Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol 2009;1:a001651.
- Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V, Song M, Sandoval D, Gukovsky S, Pandol SJ. Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis. J Clin Invest 1997;100:1853-62.
- 15. Konturek SJ, Dembinski A, Konturek PJ, Warzecha Z, Jaworek J, Gustaw P, Tomaszewska R, Stachura J. Role of platelet activating factor in pathogenesis of acute pancreatitis in rats. Gut 1992;33:1268-74.
- Hofbauer B, Saluja AK, Bhatia M, Frossard JL, Lee HS, Bhagat L, Steer ML. Effect of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase on two models of experimental acute pancreatitis. Gastroenterology 1998;115:1238-47.
- Ais G, Lopez-Farre A, Gomez-Garre DN, Novo C, Romeo JM, Braquet P, Lopez-Novoa JM. Role of platelet-activating factor in hemodynamic derangements in an acute rodent pancreatic model. Gastroenterology 1992;102:181-7.
- Dabrowski A, Gabryelewicz A, Chyczewski L. The effect of platelet activating factor antagonist (BN 52021) on acute experimental pancreatitis with reference to multiorgan oxidative stress. Int J Pancreatol 1995;17:173-80.
- 19. Heinrich S, Schafer M, Rousson V, Clavien PA. Evidence-based treatment of acute pancreatitis: a look at established paradigms. Ann Surg 2006;243:154-68.
- 20. Gukovskaya AS, Gukovsky I, Jung Y, Mouria M, Pandol SJ. Cholecystokinin induces caspase activation and mitochondrial dysfunction in pancreatic acinar cells. Roles in cell injury processes of pancreatitis. J Biol Chem 2002;277:22595-604.
- Voronina SG, Barrow SL, Gerasimenko OV, Petersen OH, Tepikin AV. Effects of secretagogues and bile acids on mitochondrial membrane potential of pancreatic acinar cells: comparison of different modes of evaluating DeltaPsim. J Biol Chem 2004;279:27327-38.
- Voronina SG, Barrow SL, Simpson AW, Gerasimenko OV, da Silva Xavier G, Rutter GA, Petersen OH, Tepikin AV. Dynamic changes in cytosolic and mitochondrial ATP levels in pancreatic acinar cells. Gastroenterology 2010;138:1976-87.
- Schild L, Matthias R, Stanarius A, Wolf G, Augustin W, Halangk W. Induction of permeability transition in pancreatic mitochondria by cerulein in rats. Mol Cell Biochem 1999;195:191-7.
- 24. Tinel H, Cancela JM, Mogami H, Gerasimenko JV, Gerasimenko OV, Tepikin AV, Petersen OH. Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region

prevent spreading of inositol trisphosphate-evoked local cytosolic Ca(2+) signals. Embo J 1999;18:4999-5008.

- Criddle DN, Gerasimenko JV, Baumgartner HK, Jaffar M, Voronina S, Sutton R, Petersen OH, Gerasimenko OV. Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? Cell Death Differ 2007;14:1285-94.
- 26. Malorni W, Campesi I, Straface E, Vella S, Franconi F. Redox features of the cell: a gender perspective. Antioxid Redox Signal 2007;9:1779–1801.
- 27. Rau B, Poch B, Gansauge F, Bauer A, Nussler AK, Nevalainen T, Schoenberg MH, Beger HG. Pathophysiologic role of oxygen free radicals in acute pancreatitis: initiating event or mediator of tissue damage? Ann Surg 2000;231:352-60.
- 28. Siriwardena AK, Mason JM, Balachandra S, Bagul A, Galloway S, Formela L, Hardman JG, Jamdar S. Randomised, double blind, placebo controlled trial of intravenous antioxidant (n-acetylcysteine, selenium, vitamin C) therapy in severe acute pancreatitis. Gut 2007;56:1439-44.
- 29. Bhatia M. Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2004;286:G189-96.
- 30. Hirota M, Ohmuraya M, Baba H. The role of trypsin, trypsin inhibitor, and trypsin receptor in the onset and aggravation of pancreatitis. J Gastroenterol 2006;41:832-6.
- Granger J, Remick D. Acute pancreatitis: models, markers, and mediators. Shock 2005;24 Suppl 1:45-51.
- 32. Denham W, Denham D, Yang J, Carter G, MacKay S, Moldawer LL, Carey LC, Norman J. Transient human gene therapy: a novel cytokine regulatory strategy for experimental pancreatitis. Ann Surg 1998;227:812-20.
- 33. Van Laethem JL, Eskinazi R, Louis H, Rickaert F, Robberecht P, Deviere J. Multisystemic production of interleukin 10 limits the severity of acute pancreatitis in mice. Gut 1998;43:408-13.
- 34. Zou WG, Wang DS, Lang MF, Jin DY, Xu DH, Zheng ZC, Wu ZH, Liu XY. Human interleukin 10 gene therapy decreases the severity and mortality of lethal pancreatitis in rats. J Surg Res 2002;103:121-6.
- 35. Norman JG, Franz MG, Fink GS, Messina J, Fabri PJ, Gower WR, Carey LC. Decreased mortality of severe acute pancreatitis after proximal cytokine blockade. Ann Surg 1995;221:625-31.
- 36. Closa D, Motoo Y, Iovanna JL. Pancreatitis-associated protein: from a lectin to an antiinflammatory cytokine. World J Gastroenterol 2007;13:170-4.

- Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. Biochem J 2003;376:1-14.
- 38. Moinard C, Cynober L, de Bandt JP. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. Clin Nutr 2005;24:184-97.
- 39. Loser C, Folsch UR, Cleffmann U, Nustede R, Creutzfeldt W. Role of ornithine decarboxylase and polyamines in camostate (Foy-305)-induced pancreatic growth in rats. Digestion 1989;43:98-112.
- 40. Janne J, Alhonen L, Pietila M, Keinanen TA. Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals. Eur J Biochem 2004;271:877-94.
- Alhonen L, Parkkinen JJ, Keinanen T, Sinervirta R, Herzig KH, Janne J. Activation of polyamine catabolism in transgenic rats induces acute pancreatitis. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:8290-5.
- 42. Hyvonen MT, Herzig KH, Sinervirta R, Albrecht E, Nordback I, Sand J, Keinanen TA, Vepsalainen J, Grigorenko N, Khomutov AR, Kruger B, Janne J, Alhonen L. Activated polyamine catabolism in acute pancreatitis: alpha-methylated polyamine analogues prevent trypsinogen activation and pancreatitis-associated mortality. Am J Pathol 2006;168:115-22.
- 43. Hyvonen MT, Merentie M, Uimari A, Keinanen TA, Janne J, Alhonen L. Mechanisms of polyamine catabolism-induced acute pancreatitis. Biochem Soc Trans 2007;35:326-30.
- 44. Jin HT, Lamsa T, Merentie M, Hyvonen MT, Sand J, Raty S, Herzig KH, Alhonen L, Nordback I. Polyamine levels in the pancreas and the blood change according to the severity of pancreatitis. Pancreatology 2008;8:15-24.
- 45. Welch WJ. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. Physiol Rev 1992;72:1063-81.
- 46. Morimoto RI, Santoro MG. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. Nat Biotechnol 1998;16:833-8.
- 47. **Rakonczay Z**, Takacs T, Boros I, Lonovics J. Heat shock proteins and the pancreas. J Cell Physiol 2003;195:383-391.
- 48. Dudeja V, Vickers SM, Saluja AK. The role of heat shock proteins in gastrointestinal diseases. Gut 2009;58:1000-9.
- 49. Le Gall IM, Bendayan M. Possible association of chaperonin 60 with secretory proteins in pancreatic acinar cells. J Histochem Cytochem 1996;44:743-9.

- 50. Lee HS, Bhagat L, Frossard JL, Hietaranta A, Singh VP, Steer ML, Saluja AK. Water immersion stress induces heat shock protein 60 expression and protects against pancreatitis in rats. Gastroenterology 2000;119:220-9.
- 51. Hwang JH, Ryu JK, Yoon YB, Lee KH, Park YS, Kim JW, Kim N, Lee DH, Jeong JB, Seo JS, Kim YT. Spontaneous activation of pancreas trypsinogen in heat shock protein 70.1 knock-out mice. Pancreas 2005;31:332-6.
- 52. Bhagat L, Singh VP, Song AM, van Acker GJ, Agrawal S, Steer ML, Saluja AK. Thermal stress-induced HSP70 mediates protection against intrapancreatic trypsinogen activation and acute pancreatitis in rats. Gastroenterology 2002;122:156-65.
- 53. Ethridge RT, Ehlers RA, Hellmich MR, Rajaraman S, Evers BM. Acute pancreatitis results in induction of heat shock proteins 70 and 27 and heat shock factor-1. Pancreas 2000;21:248-56.
- 54. Weber CK, Gress T, Muller-Pillasch F, Lerch MM, Weidenbach H, Adler G. Supramaximal secretagogue stimulation enhances heat shock protein expression in the rat pancreas. Pancreas 1995;10:360-7.
- 55. Strowski MZ, Sparmann G, Weber H, Fiedler F, Printz H, Jonas L, Goke B, Wagner AC. Caerulein pancreatitis increases mRNA but reduces protein levels of rat pancreatic heat shock proteins. Am J Physiol 1997;273:G937-45.
- 56. Weber H, Wagner AC, Jonas L, Merkord J, Hofken T, Nizze H, Leitzmann P, Goke B, Schuff-Werner P. Heat shock response is associated with protection against acute interstitial pancreatitis in rats. Dig Dis Sci 2000;45:2252-64.
- 57. Bhagat L, Singh VP, Hietaranta AJ, Agrawal S, Steer ML, Saluja AK. Heat shock protein 70 prevents secretagogue-induced cell injury in the pancreas by preventing intracellular trypsinogen activation. J Clin Invest 2000;106:81-9.
- 58. O'Reilly DA, Roberts JR, Cartmell MT, Demaine AG, Kingsnorth AN. Heat shock factor-1 and nuclear factor-kappaB are systemically activated in human acute pancreatitis. Jop 2006;7:174-84.
- 59. Tashiro M, Schafer C, Yao H, Ernst SA, Williams JA. Arginine induced acute pancreatitis alters the actin cytoskeleton and increases heat shock protein expression in rat pancreatic acinar cells. Gut 2001;49:241-50.
- Balog A, Gyulai Z, Boros LG, Farkas G, Takacs T, Lonovics J, Mandi Y. Polymorphism of the TNF-alpha, HSP70-2, and CD14 genes increases susceptibility to severe acute pancreatitis. Pancreas 2005;30:e46-50.

- Wagner AC, Weber H, Jonas L, Nizze H, Strowski M, Fiedler F, Printz H, Steffen H, Goke B. Hyperthermia induces heat shock protein expression and protection against cerulein-induced pancreatitis in rats. Gastroenterology 1996;111:1333-42.
- Frossard JL, Pastor CM, Hadengue A. Effect of hyperthermia on NF-kappaB binding activity in cerulein-induced acute pancreatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001;280:G1157-62.
- 63. Frossard JL, Bhagat L, Lee HS, Hietaranta AJ, Singh VP, Song AM, Steer ML, Saluja AK. Both thermal and non-thermal stress protect against caerulein induced pancreatitis and prevent trypsinogen activation in the pancreas. Gut 2002;50:78-83.
- 64. Otaka M, Okuyama A, Otani S, Jin M, Itoh S, Itoh H, Iwabuchi A, Sasahara H, Odashima M, Tashima Y, Masamune O. Differential induction of HSP60 and HSP72 by different stress situations in rats. Correlation with cerulein-induced pancreatitis. Dig Dis Sci 1997;42:1473-9.
- Otaka M, Itoh H, Kuwabara T, Zeniya A, Fujimori S, Tashima Y, Masamune O. Induction of a 60-kDa heat shock protein in rat pancreas by water-immersion stress. Int J Biochem 1993;25:1769-73.
- 66. Rakonczay Z, Takacs T, Mandi Y, Ivanyi B, Varga S, Papai G, Boros I, Lonovics J. Water immersion pretreatment decreases pro-inflammatory cytokine production in cholecystokinin-octapeptide-induced acute pancreatitis in rats: possible role of HSP72. Int J Hyperthermia 2001;17:520-535.
- Weber H, Merkord J, Jonas L, Wagner A, Schroder H, Kading U, Werner A, Dummler W. Oxygen radical generation and acute pancreatitis: effects of dibutyltin dichloride/ethanol and ethanol on rat pancreas. Pancreas 1995;11:382-8.
- Rakonczay Z, Ivanyi B, Varga I, Boros I, Jednakovits A, Nemeth I, Lonovics J, Takacs T. Nontoxic heat shock protein coinducer BRX-220 protects against acute pancreatitis in rats. Free Radical Biology and Medicine 2002;32:1283-1292.
- Kubisch C, Dimagno MJ, Tietz AB, Welsh MJ, Ernst SA, Brandt-Nedelev B, Diebold J, Wagner AC, Goke B, Williams JA, Schafer C. Overexpression of heat shock protein Hsp27 protects against cerulein-induced pancreatitis. Gastroenterology 2004;127:275-86.
- 70. **Rakonczay Z**. The potential role of heat shock proteins in the prevention of acute experimental pancreatitis. Ph.D. dissertation, University of Szeged 2002.

- 71. **Rakonczay Z**, Takacs T, Ivanyi B, Mandi Y, Papai G, Boros I, Varga IS, Jost K, Lonovics J. The effects of hypo- and hyperthermic pretreatment on sodium taurocholate-induced acute pancreatitis in rats. Pancreas 2002;24:83-89.
- 72. Takacs T, **Rakonczay Z**, Varga I, Ivanyi B, Mandi Y, Boros I, Lonovics J. Comparative effects of water immersion pretreatment on three different acute pancreatitis models in rats. Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire 2002;80:241-251.
- 73. **Rakonczay Z**, Mandi Y, Kaszaki J, Ivanyi B, Boros I, Lonovics J, Takacs T. Induction of HSP72 by sodium arsenite fails to protect against cholecystokinin-octapeptide-induced acute pancreatitis in rats. Dig Dis Sci 2002;47:1594-1603.
- 74. Steward MC, Ishiguro H, Case RM. Mechanisms of bicarbonate secretion in the pancreatic duct. Annu Rev Physiol 2005;67:377-409.
- 75. Venglovecz V, Rakonczay Z, Ozsvari B, Takacs T, Lonovics J, Varro A, Gray MA, Argent BE, Hegyi P. Effects of bile acids on pancreatic ductal bicarbonate secretion in guinea pig. Gut 2008;57:1102-1112.
- 76. Yamamoto A, Ishiguro H, Ko SB, Suzuki A, Wang Y, Hamada H, Mizuno N, Kitagawa M, Hayakawa T, Naruse S. Ethanol induces fluid hypersecretion from guinea-pig pancreatic duct cells. J Physiol 2003;551:917-26.
- 77. Hegyi P, **Rakonczay Z**. Insufficiency of electrolyte and fluid secretion by pancreatic ductal cells leads to increased patient risk for pancreatitis. Am J Gastroenterol 2010;105:2119-2120.
- 78. Freedman SD, Kern HF, Scheele GA. Pancreatic acinar cell dysfunction in CFTR(-/-) mice is associated with impairments in luminal pH and endocytosis. Gastroenterology 2001;121:950-7.
- 79. Noble MD, Romac J, Vigna SR, Liddle RA. A pH-sensitive, neurogenic pathway mediates disease severity in a model of post-ERCP pancreatitis. Gut 2008;57:1566-71.
- 80. Takacs T, Szabolcs A, Biczo G, Hegyi P, **Rakonczay Z**. A kísérletes akut pancreatitismodellek klinikai relevanciája. Orv Hetil 2008;149:1981-6.
- Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. Scand J Gastroenterol 1980;15:411-6.
- Nevalainen TJ, Seppa A. Acute pancreatitis caused by closed duodenal loop in the rat. Scand J Gastroenterol 1975;10:521-7.

- Lombardi B, Estes LW, Longnecker DS. Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-ethionine fed with a choline-deficient diet. Am J Pathol 1975;79:465-80.
- 84. Pfeffer RB, Stasior O, Hinton JW. The clinical picture of the sequential development of acute hemorrhagic pancreatitis in the dog. Surg Forum 1957;8:248-51.
- 85. Su KH, Cuthbertson C, Christophi C. Review of experimental animal models of acute pancreatitis. HPB (Oxford) 2006;8:264-86.
- Chetty U, Gilmour HM, Taylor TV. Experimental acute pancreatitis in the rat--a new model. Gut 1980;21:115-7.
- 87. Musa BE, Nelson AW, Gillette EL, Ferguson HL, Lumb WV. A model to study acute pancreatitis in the dog. J Surg Res 1976;21:51-6.
- Laukkarinen JM, Van Acker GJ, Weiss ER, Steer ML, Perides G. A mouse model of acute biliary pancreatitis induced by retrograde pancreatic duct infusion of Nataurocholate. Gut 2007;56:1590-8.
- Perides G, Laukkarinen JM, Vassileva G, Steer ML. Biliary acute pancreatitis in mice is mediated by the G-protein-coupled cell surface bile acid receptor Gpbar1. Gastroenterology 2010;138:715-25.
- 90. Pfeffer RB, Lazzarini-Robertson A, Jr., Safadi D, Mixter G, Jr., Secoy CF, Hinton JW. Gradations of pancreatitis, edematous, through hemorrhagic, experimentally produced by controlled injection of microspheres into blood vessels in dogs. Surgery 1962;51:764-9.
- 91. Shibayama Y. Pancreatic venous stasis and endotoxaemia as aetiologic factors in acute haemorrhagic pancreatitis. J Pathol 1987;152:177-82.
- 92. Lampel M, Kern HF. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. Virchows Arch A Pathol Anat Histol 1977;373:97-117.
- 93. Niederau C, Ferrell LD, Grendell JH. Caerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin. Gastroenterology 1985;88:1192-204.
- 94. Willemer S, Elsasser HP, Adler G. Hormone-induced pancreatitis. Eur Surg Res 1992;24 Suppl 1:29-39.
- 95. Niederau C, Luthen R, Niederau MC, Grendell JH, Ferrell LD. Acute experimental hemorrhagic-necrotizing pancreatitis induced by feeding a choline-deficient, ethionine-supplemented diet. Methodology and standards. Eur Surg Res 1992;24 Suppl 1:40-54.

- 96. Wedgwood KR, Adler G, Kern H, Reber HA. Effects of oral agents on pancreatic duct permeability. A model of acute alcoholic pancreatitis. Dig Dis Sci 1986;31:1081-8.
- 97. Pandol SJ, Periskic S, Gukovsky I, Zaninovic V, Jung Y, Zong Y, Solomon TE, Gukovskaya AS, Tsukamoto H. Ethanol diet increases the sensitivity of rats to pancreatitis induced by cholecystokinin octapeptide. Gastroenterology 1999;117:706-16.
- 98. Friedman HS, Lowery R, Shaughnessy E, Scorza J. The effects of ethanol on pancreatic blood flow in awake and anesthetized dogs. Proc Soc Exp Biol Med 1983;174:377-82.
- 99. Mizunuma T, Kawamura S, Kishino Y. Effects of injecting excess arginine on rat pancreas. J Nutr 1984;114:467-71.
- 100. Kishino Y, Takama S, Kitajima S. Ultracytochemistry of pancreatic damage induced by excess lysine. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 1986;52:153-67.
- Kitajima S, Kishino Y. Pancreatic damage produced by injecting excess lysine in rats. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 1985;49:295-305.
- 102. Hegyi P, Rakonczay Z, Jr., Sari R, Gog C, Lonovics J, Takacs T, Czako L. L-arginineinduced experimental pancreatitis. World J Gastroenterol 2004;10:2003-9.
- 103. Tani S, Itoh H, Okabayashi Y, Nakamura T, Fujii M, Fujisawa T, Koide M, Otsuki M. New model of acute necrotizing pancreatitis induced by excessive doses of arginine in rats. Dig Dis Sci 1990;35:367-74.
- 104. Dawra R, Sharif R, Phillips P, Dudeja V, Dhaulakhandi D, Saluja AK. Development of a new mouse model of acute pancreatitis induced by administration of L-arginine. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2007;292:G1009-18.
- Czako L, Takacs T, Varga IS, Tiszlavicz L, Hai DQ, Hegyi P, Matkovics B, Lonovics J. Involvement of oxygen-derived free radicals in L-arginine-induced acute pancreatitis. Dig Dis Sci 1998;43:1770-7.
- 106. Takacs T, Czako L, Jarmay K, Farkas G, Jr., Mandi Y, Lonovics J. Cytokine level changes in L-arginine-induced acute pancreatitis in rat. Acta Physiol Hung 1996;84:147-56.
- 107. Hegyi P, Takacs T, Jarmay K, Nagy I, Czako L, Lonovics J. Spontaneous and cholecystokinin-octapeptide-promoted regeneration of the pancreas following Larginine-induced pancreatitis in rat. Int J Pancreatol 1997;22:193-200.
- 108. Kubisch CH, Sans MD, Arumugam T, Ernst SA, Williams JA, Logsdon CD. Early activation of endoplasmic reticulum stress is associated with arginine-induced acute pancreatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2006;291:G238-45.

- 109. Takacs T, Czako L, Morschl E, Laszlo F, Tiszlavicz L, Rakonczay Z, Lonovics J. The role of nitric oxide in edema formation in L-arginine-induced acute pancreatitis. Pancreas 2002;25:277-282.
- 110. Morris SM, Jr. Enzymes of arginine metabolism. J Nutr 2004;134:2743S-2747S; discussion 2765S-2767S.
- 111. Hegyi P, **Rakonczay Z**. The role of nitric oxide in the physiology and pathophysiology of the exocrine pancreas. Antioxid Redox Signal 2011; EPub.
- Grigorenko NA, Vepsalainen J, Jarvinen A, Keinanen TA, Alhonen L, Janne J, Kritsyn AM, Khomutov AR. [A new synthesis of alpha-methylspermidine]. Bioorg Khim 2004;30:441-5.
- 113. Chace DH, Millington DS, Terada N, Kahler SG, Roe CR, Hofman LF. Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry. Clin Chem 1993;39:66-71.
- 114. Nagy I, Pap A, Varro V. Time-course of changes in pancreatic size and enzyme composition in rats during starvation. Int J Pancreatol 1989;5:35-45.
- 115. Gukovsky I, Gukovskaya AS, Blinman TA, Zaninovic V, Pandol SJ. Early NF-kappaB activation is associated with hormone-induced pancreatitis. Am J Physiol 1998;275:G1402-14.
- 116. Kuebler WM, Abels C, Schuerer L, Goetz AE. Measurement of neutrophil content in brain and lung tissue by a modified myeloperoxidase assay. Int J Microcirc Clin Exp 1996;16:89-97.
- 117. Hrabak A, Bajor T, Meszaros G. The inhibitory effect of various indolyl amino acid derivatives on arginase activity in macrophages. Amino Acids 2008;34:293-300.
- 118. Coulombe JJ, Favreau L. A new simple semimicro method for colorimetric determination of urea. Clin Chem 1963;9:102-8.
- 119. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-5.
- 120. Kurucz I, Tombor B, Prechl J, Erdo F, Hegedus E, Nagy Z, Vitai M, Koranyi L, Laszlo L. Ultrastructural localization of Hsp-72 examined with a new polyclonal antibody raised against the truncated variable domain of the heat shock protein. Cell Stress Chaperones 1999;4:139-52.
- 121. Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. Nucleic Acids Res 1983;11:1475-89.

- 122. Goa J. A micro biuret method for protein determination; determination of total protein in cerebrospinal fluid. Scand J Clin Lab Invest 1953;5:218-22.
- 123. Hyvonen T, Keinanen TA, Khomutov AR, Khomutov RM, Eloranta TO. Monitoring of the uptake and metabolism of aminooxy analogues of polyamines in cultured cells by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 1992;574:17-21.
- 124. Janne J, Williams-Ashman HG. On the purification of L-ornithine decarboxylase from rat prostate and effects of thiol compounds on the enzyme. J Biol Chem 1971;246:1725-32.
- Bernacki RJ, Bergeron RJ, Porter CW. Antitumor activity of N,N'-bis(ethyl)spermine homologues against human MALME-3 melanoma xenografts. Cancer Res 1992;52:2424-30.
- 126. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. Anal Biochem 1966;16:359-64.
- 127. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol 1990;186:464-78.
- 128. Odinokova IV, Sung KF, Mareninova OA, Hermann K, Evtodienko Y, Andreyev A, Gukovsky I, Gukovskaya AS. Mechanisms regulating cytochrome c release in pancreatic mitochondria. Gut 2009;58:431-42.
- 129. Rakonczay Z, Duda E, Kaszaki J, Ivanyi B, Boros I, Lonovics J, Takacs T. The antiinflammatory effect of methylprednisolone occurs down-stream of nuclear factor-kappa B DNA binding in acute pancreatitis. Eur J Pharmacol 2003;464:217-227.
- 130. Rakonczay Z, Jarmay K, Kaszaki J, Mandi Y, Duda E, Hegyi P, Boros I, Lonovics J, Takacs T. NF-kappa B activation is detrimental in arginine-induced acute pancreatitis. Free Radic Biol Med 2003;34:696-709.
- 131. Rakonczay Z, Hegyi P, Dosa S, Ivanyi B, Jarmay K, Biczo G, Hracsko Z, Varga IS, Karg E, Kaszaki J, Varro A, Lonovics J, Boros I, Gukovsky I, Gukovskaya AS, Pandol SJ, Takacs T. A new severe acute necrotizing pancreatitis model induced by L-ornithine in rats. Crit Care Med 2008;36:2117-2127.
- 132. Biczo G, Hegyi P, Dosa S, Shalbuyeva N, Berczi S, Sinervirta R, Hracsko Z, Siska A, Kukor Z, Jarmay K, Venglovecz V, Varga IS, Ivanyi B, Alhonen L, Wittmann T, Gukovskaya A, Takacs T, Rakonczay Z. The crucial role of early mitochondrial injury in L-lysine-induced acute pancreatitis. Antioxid Redox Signal 2011; EPub.

- Fang S, Thomas RM, Conklin JL, Oberley LW, Christensen J. Co-localization of manganese superoxide dismutase and NADH diaphorase. J Histochem Cytochem 1995;43:849-55.
- 134. Sung KF, Odinokova IV, Mareninova OA, Rakonczay Z, Hegyi P, Pandol SJ, Gukovsky I, Gukovskaya AS. Prosurvival Bcl-2 proteins stabilize pancreatic mitochondria and protect against necrosis in experimental pancreatitis. Exp Cell Res 2009;315:1975-1989.
- 135. Biczo G, Hegyi P, Sinervirta R, Berczi S, Dosa S, Siska A, Ivanyi B, Venglovecz V, Takacs T, Alhonen L, Rakonczay Z. Characterization of polyamine homeostasis in Lornithine-induced acute pancreatitis in rats. Pancreas 2010;39:1047-1056.
- Biczo G, Hegyi P, Dosa S, Balla Z, Venglovecz V, Ivanyi B, Wittmann T, Takacs T, Rakonczay Z. Aliphatic, but not imidazole, basic amino acids cause severe acute necrotizing pancreatitis in rats. Pancreas 2011;40:486-487.
- 137. Biczo G, Hegyi P, Berczi S, Dosa S, Hracsko Z, Varga IS, Ivanyi B, Venglovecz V, Wittmann T, Takacs T, Rakonczay Z. Inhibition of arginase activity ameliorates L-Arginine-induced acute pancreatitis in rats. Pancreas 2010;39:868-874.
- Bohus E, Coen M, Keun HC, Ebbels TM, Beckonert O, Lindon JC, Holmes E, Noszal B, Nicholson JK. Temporal metabonomic modeling of l-arginine-induced exocrine pancreatitis. J Proteome Res 2008;7:4435-45.
- Leung PS, Chan YC. Role of oxidative stress in pancreatic inflammation. Antioxid Redox Signal 2009;11:135-65.
- Elder AS, Saccone GT, Bersten AD, Dixon DL. L-Arginine-induced acute pancreatitis results in mild lung inflammation without altered respiratory mechanics. Exp Lung Res 2011;37:1-9.
- 141. Saka M TA, Ates Y, Bagci S, Karaeren N, Dagalp K. Acute pancreatitis possibly due to arginine use: a case report. Turk J Gastroenterol 2004;15:56-8.
- 142. Zhou H, Liu L, Bai Y, Wu W, Li G, Li J, Zou D, Gao J, Li Z. Damage of the interstitial cells of Cajal and myenteric neurons causing ileus in acute necrotizing pancreatitis rats. Surgery 2011;149:262-75.
- Schipper RG, Penning LC, Verhofstad AA. Involvement of polyamines in apoptosis.
   Facts and controversies: effectors or protectors? Semin Cancer Biol 2000;10:55-68.
- 144. Pirinen E, Kuulasmaa T, Pietila M, Heikkinen S, Tusa M, Itkonen P, Boman S, Skommer J, Virkamaki A, Hohtola E, Kettunen M, Fatrai S, Kansanen E, Koota S, Niiranen K, Parkkinen J, Levonen AL, Yla-Herttuala S, Hiltunen JK, Alhonen L, Smith

U, Janne J, Laakso M. Enhanced polyamine catabolism alters homeostatic control of white adipose tissue mass, energy expenditure, and glucose metabolism. Mol Cell Biol 2007;27:4953-67.

- 145. Lakanen JR, Coward JK, Pegg AE. alpha-Methyl polyamines: metabolically stable spermidine and spermine mimics capable of supporting growth in cells depleted of polyamines. J Med Chem 1992;35:724-34.
- 146. Jarvinen A, Grigorenko N, Khomutov AR, Hyvonen MT, Uimari A, Vepsalainen J, Sinervirta R, Keinanen TA, Vujcic S, Alhonen L, Porter CW, Janne J. Metabolic stability of alpha-methylated polyamine derivatives and their use as substitutes for the natural polyamines. J Biol Chem 2005;280:6595-601.
- 147. Rasanen TL, Alhonen L, Sinervirta R, Keinanen T, Herzig KH, Suppola S, Khomutov AR, Vepsalainen J, Janne J. A polyamine analogue prevents acute pancreatitis and restores early liver regeneration in transgenic rats with activated polyamine catabolism. J Biol Chem 2002;277:39867-72.
- 148. Trulsson L, Sandstrom P, Sundqvist T, Smeds S, Gasslander T, Svanvik J. The Influence of a load of L-arginine on serum amino acids and pancreatic apoptosis/proliferation and ATP levels in the rat. Pancreas 2004;29:e113-20.
- 149. Herzfeld A, Rosenoer VM, Raper SM. Glutamate dehydrogenase, alanine aminotransferase, thymidine kinase, and arginase in fetal and adult human and rat liver. Pediatr Res 1976;10:960-4.
- 150. Chamorro G, Salazar M, Salazar S, Ceballos G, Trujillo J, Munoz O, Yanez R. Antifertility effects of (+)-S-2-amino-6-iodoacetamidohexanoic acid (2-AIHA) in female rats. Contraception 1996;53:247-51.
- 151. Trujillo-Ferrara J, Koizumi G, Munoz O, Joseph-Nathan P, Yanez R. Antitumor effect and toxicity of two new active-site-directed irreversible ornithine decarboxylase and extrahepatic arginase inhibitors. Cancer Lett 1992;67:193-7.
- 152. Sandstrom P, Trulsson L, Gasslander T, Sundqvist T, von Dobeln U, Svanvik J. Serum amino acid profile in patients with acute pancreatitis. Amino Acids 2008;35:225-31.
- Scibior D, Ashamiss F, Wierzbicki Z, Baranczyk-Kuzma A. [Arginase activity in blood serum of patients with acute and chronic pancreatitis]. Pol Merkur Lekarski 2006;21:522-4.
- 154. Molero X, Guarner F, Salas A, Mourelle M, Puig V, Malagelada JR. Nitric oxide modulates pancreatic basal secretion and response to cerulein in the rat: effects in acute pancreatitis. Gastroenterology 1995;108:1855-62.

- 155. Werner J, Fernandez-del Castillo C, Rivera JA, Kollias N, Lewandrowski KB, Rattner DW, Warshaw AL. On the protective mechanisms of nitric oxide in acute pancreatitis. Gut 1998;43:401-7.
- 156. Sugiyama Y, Kato S, Mitsufuji S, Okanoue T, Takeuchi K. Pathogenic role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS/NOS-III) in cerulein-induced rat acute pancreatitis. Dig Dis Sci 2006;51:1396-403.
- 157. Dabrowski A, Gabryelewicz A. Nitric oxide contributes to multiorgan oxidative stress in acute experimental pancreatitis. Scand J Gastroenterol 1994;29:943-8.
- 158. Lomis TJ, Siffring CW, Chalasani S, Ziegler DW, Lentz KE, Stauffer KE, McMillan A, Agarwal N, Lowenstein CJ, Rhoads JE, Jr. First place winner of the Conrad Jobst Award in the gold medal paper competition. Nitric oxide synthase inhibitors Nmonomethylarginine and aminoguanidine prevent the progressive and severe hypotension associated with a rat model of pancreatitis. Am Surg 1995;61:7-10.
- 159. Shields CJ, Delaney CP, Winter DC, Young L, Gorey TF, Fitzpatrick JM. Induction of nitric oxide synthase is a key determinant of progression to pulmonary injury in experimental pancreatitis. Surg Infect (Larchmt) 2006;7:501-11.
- Weidenbach H, Lerch MM, Gress TM, Pfaff D, Turi S, Adler G. Vasoactive mediators and the progression from oedematous to necrotising experimental acute pancreatitis. Gut 1995;37:434-40.
- 161. Hietaranta AJ, Saluja AK, Bhagat L, Singh VP, Song AM, Steer ML. Relationship between NF-kappaB and trypsinogen activation in rat pancreas after supramaximal caerulein stimulation. Biochem Biophys Res Commun 2001;280:388-95.
- 162. Song AM, Bhagat L, Singh VP, Van Acker GG, Steer ML, Saluja AK. Inhibition of cyclooxygenase-2 ameliorates the severity of pancreatitis and associated lung injury. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2002;283:G1166-74.
- 163. Steinle AU, Weidenbach H, Wagner M, Adler G, Schmid RM. NF-kappaB/Rel activation in cerulein pancreatitis. Gastroenterology 1999;116:420-30.
- 164. Yu JH, Lim JW, Namkung W, Kim H, Kim KH. Suppression of cerulein-induced cytokine expression by antioxidants in pancreatic acinar cells. Lab Invest 2002;82:1359-68.
- 165. Szabolcs A, Varga IS, Varga C, Berko A, Kaszaki J, Letoha T, Tiszlavicz L, Sari R, Lonovics J, Takacs T. Beneficial effect of resveratrol on cholecystokinin-induced experimental pancreatitis. Eur J Pharmacol 2006;532:187-93.

- 166. Vaquero E, Gukovsky I, Zaninovic V, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Localized pancreatic NF-kappaB activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001;280:G1197-208.
- Long J, Song N, Liu XP, Guo KJ, Guo RX. Nuclear factor-kappaB activation on the reactive oxygen species in acute necrotizing pancreatitic rats. World J Gastroenterol 2005;11:4277-80.
- 168. Meng Y, Ma QY, Kou XP, Xu J. Effect of resveratrol on activation of nuclear factor kappa-B and inflammatory factors in rat model of acute pancreatitis. World J Gastroenterol 2005;11:525-8.
- 169. Shi C, Zhao X, Wang X, Andersson R. Role of nuclear factor-kappaB, reactive oxygen species and cellular signaling in the early phase of acute pancreatitis. Scand J Gastroenterol 2005;40:103-8.
- Zhao ZC, Zheng SS, Cheng WL, Wang X, Qi Y. Suppressing progress of pancreatitis through selective inhibition of NF-KappaB activation by using NAC. J Zhejiang Univ Sci 2004;5:477-82.
- 171. Telek G, Ducroc R, Scoazec JY, Pasquier C, Feldmann G, Roze C. Differential upregulation of cellular adhesion molecules at the sites of oxidative stress in experimental acute pancreatitis. J Surg Res 2001;96:56-67.
- 172. Kim H, Seo JY, Roh KH, Lim JW, Kim KH. Suppression of NF-kappaB activation and cytokine production by N-acetylcysteine in pancreatic acinar cells. Free Radic Biol Med 2000;29:674-83.
- 173. Seo JY, Kim H, Seo JT, Kim KH. Oxidative stress induced cytokine production in isolated rat pancreatic acinar cells: effects of small-molecule antioxidants. Pharmacology 2002;64:63-70.
- 174. Dunn JA, Li C, Ha T, Kao RL, Browder W. Therapeutic modification of nuclear factor kappa B binding activity and tumor necrosis factor-alpha gene expression during acute biliary pancreatitis. Am Surg 1997;63:1036-43; discussion 1043-4.
- 175. Samuel I, Zaheer S, Nelson JJ, Yorek MA, Zaheer A. CCK-A receptor induction and P38 and NF-kappaB activation in acute pancreatitis. Pancreatology 2004;4:49-56.
- 176. Samuel I, Yorek MA, Zaheer A, Fisher RA. Bile-pancreatic juice exclusion promotes Akt/NF-kappaB activation and chemokine production in ligation-induced acute pancreatitis. J Gastrointest Surg 2006;10:950-9.

- 177. Ramudo L, Manso MA, Sevillano S, de Dios I. Kinetic study of TNF-alpha production and its regulatory mechanisms in acinar cells during acute pancreatitis induced by bilepancreatic duct obstruction. J Pathol 2005;206:9-16.
- Chen X, Ji B, Han B, Ernst SA, Simeone D, Logsdon CD. NF-kappaB activation in pancreas induces pancreatic and systemic inflammatory response. Gastroenterology 2002;122:448-57.
- Barnes PJ. Molecular mechanisms and cellular effects of glucocorticosteroids. Immunol Allergy Clin North Am 2005;25:451-68.
- 180. Paszt A, Eder K, Szabolcs A, Tiszlavicz L, Lazar G, Duda E, Takacs T, Lazar G, Jr. Effects of glucocorticoid agonist and antagonist on the pathogenesis of L-arginineinduced acute pancreatitis in rat. Pancreas 2008;36:369-76.
- 181. Ramudo L, Yubero S, Manso MA, Sanchez-Recio J, Weruaga E, De Dios I. Effects of dexamethasone on intercellular adhesion molecule 1 expression and inflammatory response in necrotizing acute pancreatitis in rats. Pancreas 2010;39:1057-63.
- Osman MO, Jacobsen NO, Kristensen JU, Larsen CG, Jensen SL. Beneficial effects of hydrocortisone in a model of experimental acute pancreatitis. Dig Surg 1999;16:214-21.
- 183. Lazar G, Jr., Varga J, Lazar G, Duda E, Takacs T, Balogh A, Lonovics J. The effects of glucocorticoids and a glucocorticoid antagonist (RU 38486) on experimental acute pancreatitis in rat. Acta Chir Hung 1997;36:190-1.
- 184. Gloor B, Uhl W, Tcholakov O, Roggo A, Muller CA, Worni M, Buchler MW. Hydrocortisone treatment of early SIRS in acute experimental pancreatitis. Dig Dis Sci 2001;46:2154-61.
- 185. Kimura K, Shimosegawa T, Sasano H, Abe R, Satoh A, Masamune A, Koizumi M, Nagura H, Toyota T. Endogenous glucocorticoids decrease the acinar cell sensitivity to apoptosis during cerulein pancreatitis in rats. Gastroenterology 1998;114:372-81.
- 186. Manso MA, Rebollo A, Pescador R, de Dios I. Action of CCK on CDE diet-induced acute pancreatitis in rats treated with hydrocortisone. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol 1995;111:257-63.
- 187. Hashimoto K, Ethridge RT, Saito H, Rajaraman S, Evers BM. The PPARgamma ligand, 15d-PGJ2, attenuates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis. Pancreas 2003;27:58-66.
- 188. Yang R, Uchiyama T, Alber SM, Han X, Watkins SK, Delude RL, Fink MP. Ethyl pyruvate ameliorates distant organ injury in a murine model of acute necrotizing pancreatitis. Crit Care Med 2004;32:1453-9.

- 189. Slogoff MI, Ethridge RT, Rajaraman S, Evers BM. COX-2 inhibition results in alterations in nuclear factor (NF)-kappaB activation but not cytokine production in acute pancreatitis. J Gastrointest Surg 2004;8:511-9.
- 190. Gukovskaya AS, Mouria M, Gukovsky I, Reyes CN, Kasho VN, Faller LD, Pandol SJ. Ethanol metabolism and transcription factor activation in pancreatic acinar cells in rats. Gastroenterology 2002;122:106-18.
- 191. Altavilla D, Famulari C, Passaniti M, Campo GM, Macri A, Seminara P, Marini H, Calo M, Santamaria LB, Bono D, Venuti FS, Mioni C, Leone S, Guarini S, Squadrito F. Lipid peroxidation inhibition reduces NF-kappaB activation and attenuates ceruleininduced pancreatitis. Free Radic Res 2003;37:425-35.
- 192. Grady T, Liang P, Ernst SA, Logsdon CD. Chemokine gene expression in rat pancreatic acinar cells is an early event associated with acute pancreatitis. Gastroenterology 1997;113:1966-75.
- 193. Virlos I, Mazzon E, Serraino I, Di Paola R, Genovese T, Britti D, Thiemerman C, Siriwardena A, Cuzzocrea S. Pyrrolidine dithiocarbamate reduces the severity of cerulein-induced murine acute pancreatitis. Shock 2003;20:544-50.
- 194. Song M, Zaninovic V, Kim D, Gukovsky I, Gukovskaya A, Kang K, Pandol S. Amelioration of rat cerulein pancreatitis by guamerin-derived peptide, a novel elastase inhibitor. Pancreas 1999;18:231-9.
- 195. Han Y, Weinman S, Boldogh I, Walker RK, Brasier AR. Tumor necrosis factor-alphainducible IkappaBalpha proteolysis mediated by cytosolic m-calpain. A mechanism parallel to the ubiquitin-proteasome pathway for nuclear factor-kappab activation. J Biol Chem 1999;274:787-94.
- 196. Virlos I, Mazzon E, Serraino I, Genovese T, Di Paola R, Thiemerman C, Siriwardena A, Cuzzocrea S. Calpain I inhibitor ameliorates the indices of disease severity in a murine model of cerulein-induced acute pancreatitis. Intensive Care Med 2004;30:1645-51.
- 197. Letoha T, Somlai C, Takacs T, Szabolcs A, Rakonczay Z, Jarmay K, Szalontai T, Varga I, Kaszaki J, Boros I, Duda E, Hackler L, Kurucz I, Penke B. The proteasome inhibitor MG132 protects against acute pancreatitis. Free Radic Biol Med 2005;39:1142-1151.
- 198. Letoha T, Somlai C, Takacs T, Szabolcs A, Jarmay K, **Rakonczay Z, Jr.**, Hegyi P, Varga I, Kaszaki J, Krizbai I, Boros I, Duda E, Kusz E, Penke B. A nuclear import

inhibitory peptide ameliorates the severity of cholecystokinin-induced acute pancreatitis. World J Gastroenterol 2005;11:990-9.

- Letoha T, Kusz E, Papai G, Szabolcs A, Kaszaki J, Varga I, Takacs T, Penke B, Duda E. In vitro and in vivo nuclear factor-kappaB inhibitory effects of the cell-penetrating penetratin peptide. Mol Pharmacol 2006;69:2027-36.
- 200. Ethridge RT, Hashimoto K, Chung DH, Ehlers RA, Rajaraman S, Evers BM. Selective inhibition of NF-kappaB attenuates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis. J Am Coll Surg 2002;195:497-505.
- 201. Altavilla D, Famulari C, Passaniti M, Galeano M, Macri A, Seminara P, Minutoli L, Marini H, Calo M, Venuti FS, Esposito M, Squadrito F. Attenuated cerulein-induced pancreatitis in nuclear factor-kappaB-deficient mice. Lab Invest 2003;83:1723-32.
- 202. Aleksic T, Baumann B, Wagner M, Adler G, Wirth T, Weber CK. Cellular immune reaction in the pancreas is induced by constitutively active IkappaB kinase-2. Gut 2007;56:227-36.
- 203. Baumann B, Wagner M, Aleksic T, von Wichert G, Weber CK, Adler G, Wirth T. Constitutive IKK2 activation in acinar cells is sufficient to induce pancreatitis in vivo. J Clin Invest 2007;117:1502-13.
- 204. Algul H, Treiber M, Lesina M, Nakhai H, Saur D, Geisler F, Pfeifer A, Paxian S, Schmid RM. Pancreas-specific RelA/p65 truncation increases susceptibility of acini to inflammation-associated cell death following cerulein pancreatitis. J Clin Invest 2007;117:1490-501.

# 10. KÖZLEMÉNYJEGYZÉK

10.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

 Rakonczay Z Jr, Duda E, Kaszaki J, Iványi B, Boros I, Lonovics J, Takács T. The antiinflammatory effect of methylprednisolone cccurs down-stream of nuclear factor-κB DNA binding in acute pancreatitis. Eur J Pharmacol 464:217-227 (2003) IF: 2,352

 2. Rakonczay Z Jr, Jármay K, Kaszaki J, Mándi Y, Duda E, Hegyi P, Boros I, Lonovics J, Takács T. NF-κB activation is detrimental in arginine-induced acute pancreatitis. Free Radic Biol Med 34:696-709 (2003)
 IF: 5,063

 Rakonczay Z Jr, Takács T, Boros I, Lonovics J. Heat shock proteins and the pancreas. J Cell Physiol 195:383-391 (2003) Összefoglaló cikk
 IF: 5,463

4. Hegyi P, **Rakonczay Z Jr,** Sári R, Góg C, Lonovics J, Takács T, Czakó L. L-arginineinduced experimental pancreatitis. World J Gastroenterol 10:2003-2009 (2004) Összefoglaló cikk

5. **Rakonczay Z Jr**, Hegyi P, Takács T, McCarroll J, Saluja AK. The role of NF-κB activation in the pathogenesis of acute pancreatitis. Gut 57:259-267 (2008) Összefoglaló cikk IF: 9,766

6. Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Dósa S, Iványi B, Jármay K, Biczó G, Hracskó Z, Varga IS, Karg E, Kaszaki J, Varró A, Lonovics J, Boros I, Gukovsky I, Gukovskaya AS, Pandol SJ, Takács T. A new severe acute necrotizing pancreatitis model induced by L-ornithine in rats. Crit Care Med 36:2117-27 (2008) IF: 6,594

7. Takács T, Szabolcs A, Biczó G, Hegyi P, **Rakonczay Z.** A kísérletes akut pancreatitismodellek klinikai relevanciája. Orv Hetil 149:1981-6 (2008) Összefoglaló cikk

8. Sung KF, Odinokova IV, Mareninova OA, Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Pandol SJ, Gukovsky I, Gukovskaya AS. Prosurvival Bcl-2 proteins stabilize pancreatic mitochondria and protect against necrosis in experimental pancreatitis. Exp Cell Res 315:1975-89 (2009)
 IF: 3,589

 Biczó G, Hegyi P, Berczi S, Dósa S, Hracskó Z, Varga IS, Iványi B, Venglovecz V, Wittmann T, Takács T, Rakonczay Z Jr. Inhibition of arginase activity ameliorates L-arginine-induced acute pancreatitis in rats. Pancreas 39:868-874 (2010)
 IF: 2,607

10. Biczó G, Hegyi P, Sinervirta R, Berczi S, Dósa S, Siska A, Iványi B, Venglovecz V, Takács T, Alhonen L, Rakonczay Z Jr. Characterisation of polyamine homeostasis in L-ornithine-induced acute pancreatitis in rats. Pancreas 39:1047-56 (2010)
IF: 2,607

Hegyi P, Rakonczay Z. Insufficiency of electrolyte and fluid secretion by pancreatic ductal cells lead to increased patients risk to pancreatitis. Am J Gastroenterol 105:2119-20 (2010) Hozzászólás

Hegyi P, Pandol S, Venglovecz V, Rakonczay Z Jr. The acinar-ductal tango in the pathogenesis of acute pancreatitis. Gut 60:544-552 (2011) Összefoglaló cikk
 IF (2010): 10,614

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 40:486-487 (2011) Hozzászólás

14. Biczó G, Hegyi P, Dósa S, Shalbuyeva N, Berczi S, Sinervirta R, Hracskó Z, Siska A, Kukor Z, Jármay K, Venglovecz V, Varga IS, Iványi B, Alhonen L, Wittmann T, Gukovskaya A, Takács T, Rakonczay Z Jr. The crucial role of early mitochondrial injury in L-lysine-induced acute pancreatitis. Antioxid Redox Signal EPub (2011)
IF (2010): 8,209

15. Hegyi P, Rakonczay Z Jr. The role of nitric oxide in the physiology and pathophysiology of the exocrine pancreas. Antioxid Redox Signal EPub (2011) Összefoglaló cikk
IF (2010): 8,209

# 10.2. A Ph.D. fokozat megszerzését követő időszak egyéb közleményei

Rakonczay Z Jr, Takács T, Iványi B, Mándi Y, Pápai G, Boros I, Varga I, Jost K, Lonovics J. Induction of heat shock proteins fails to produce protection against trypsin-induced acute pancreatitis in rats. Clin Exp Med 2:89-97 (2002) \*A Ph.D. fokozat megszerzését megelőzően jelent meg, de a Ph.D. értekezésben nem szerepelt IF: 0,516

 Rakonczay Z Jr, Boros I, Jármay K, Hegyi P, Lonovics J, Takács T. Ethanol administration generates oxidative stress in the pancreas and liver, but fails to induce heat-shock proteins in rats. J Gastroent Hepatol 18:858-867 (2003)
 IF: 1,530

3. Paszt A, **Rakonczay Z**, Kaszaki J, Szentpáli K, Wolfard A, Tiszlavicz L, Lázár G. Glükokortikoid hormonok által szabályozott mechanizmusok szerepe kísérletes akut pancreatitis lefolyásában. Magy Seb 56:185-192 (2003)

4. Hegyi P, Rakonczay Z Jr, Gray MA, Argent BE. Measurement of intracellular pH in pancreatic duct cells: A new method for calibrating the fluorescence data. Pancreas 28:427-434 (2004)

IF: 1,872

5. Paszt A, Takács T, **Rakonczay Z**, Kaszaki J, Tiszlavicz L, Lázár G, Duda E, Szentpáli K, Boros M, Balogh Á, Lázár G Jr. The role of the glucocorticoid-dependent mechanism in the progression of sodium taurocholate-induced acute pancreatitis in the rat. Pancreas 29:75-82 (2004)

IF: 1,872

6. Hegyi P, **Rakonczay Z Jr**, Sári R, Farkas N, Góg C, Németh J, Lonovics J, Takács T. Insulin is necessary for the hypertrophic effect of CCK-8 following acute necrotizing experimental pancreatitis. World J Gastroenterol 10:2275-2277 (2004)

Sári R, Pálvölgyi A, Rakonczay Z Jr, Takács T, Lonovics J, Czakó L, Szilvássy Z, Hegyi P. Ethanol inhibits the motility of the rabbit sphincter of Oddi in vitro. World J Gastroenterol 10:3470-3474 (2004)

8. Letoha T, Somlai C, Takács T, Szabolcs A, Jármay K, **Rakonczay Z Jr**, Hegyi P, Varga I, Kaszaki J, Krizbai I, Boros I, Duda E, Kusz E, Penke B. A nuclear import inhibitory peptide ameliorates the severity of cholecystokinin-induced acute pancreatitis. World J Gastroenterol 11: 990-999 (2005)

9. Hegyi P, **Rakonczay Z Jr**, Tiszlavicz L, Varró A, Tóth A, Rácz G, Varga G, Gray MA, Argent BE. Protein kinase C mediates the inhibitory effect of substance P on bicarbonate secretion from guinea pig pancreatic ducts. Am J Physiol Cell Physiol 288: C1030-1041 (2005) IF: 3,939

Letoha T, Somlai C, Takács T, Szabolcs A, Rakonczay Z Jr, Jármay K, Szalontai T, Varga I, Kaszaki J, Boros I, Duda E, Hackler L, Kurucz I, Penke B. The proteosome inhibitor MG132 protects against acute pancreatitis. Free Radic Biol Med 39:1142-1151 (2005)
 IF: 4,971

11. Hegyi P, Ördög B, **Rakonczai Z Jr**, Takács T, Lonovics J, Szabolcs A, Sári R, Tóth A, Papp GJ, Varró A, Kovács M, Gray MA, Argent BE, Boldogkői Z. The effect of herpesvirus infection on pancreatic duct cell secretion. World J Gastroenterol 38:5997-6002 (2005)

12. Szabolcs A, Reiter RJ, Letoha T, Hegyi P, Pápai G, Varga I, Jármay K, Kaszaki J, Sári R, **Rakonczay Z Jr**, Lonovics J, Takács T. The effect of melatonin on the severity of L-arginine-induced experimental acute pancreatitis in rats. World J Gastroenterol 12:251-258 (2006)

13. Hofner P, Balog A, Gyulai Z, Farkas G, **Rakonczay Z**, Takács T, Mándi Y. Polymorphism in the IL-8 gene, but not in the TLR4 gene, increases the severity of acute pancreatitis. Pancreatology 6:542-548 (2006)

IF: 2,147

14. Hegyi P, **Rakonczay Z**, Tiszlavicz L, Varró A, Tóth A, Rácz C, Varga G, Gray MA, Argent BE. SLC26 transporters and the inhibitory control of pancreatic ductal bicarbonate secretion. In, Epithelial anion transport in health and disease: the role of the SLC26 transporters family. Novartis Foundation Symposium No. 273. John Wiley & Sons, London 273:164-173 (2006)

15. **Rakonczay Z Jr**, Fearn A, Hegyi P, Boros I, Gray MA, Argent BE. Functional characterization of  $H^+$  and  $HCO_3^-$  transporters in human pancreatic duct cells. World J Gastroenterol 12:885-895 (2006)

16. Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Hasegawa M, Inoue M, You J, Iida A, Ignáth I, Alton EW, Griesenbach U, Óvári G, Vág J, Da Paula AC, Crawford RM, Varga G, Amaral MD, Mehta A, Lonovics J, Argent BE, Gray MA. CFTR gene transfer to human cystic fibrosis pancreatic duct cells using a sendai virus vector. J Cell Physiol 214:442-455 (2008) IF: 4,313

17. Hegyi P, Rakonczay Z Jr. The inhibitory pathways of pancreatic ductal bicarbonate secretion. Int J Biochem Cell Biol 39:25-30 (2007) Összefoglaló cikk
IF: 4,009

18. Tóth-Molnár E, Venglovecz V, Ózsvári B, **Rakonczay Z Jr**, Varró A, Tóth A, Papp JG, Lonovics J, Takács T, Ignáth I, Iványi B, Hegyi P. A new experimental method to study the acid/base transporters and their regulation in lacrimal gland ductal epithelia. Invest Ophthalmol Vis Sci 48:3746-3755 (2007) IF: 3,528

19. Czakó L, Szabolcs A, Vajda Á, Csáti S, Venglovecz V, **Rakonczay Z Jr**, Hegyi P, Tiszlavicz L, Csont T, Pósa A, Berkó A, Varga C, Varga IS, Boros I, Lonovics J. Hyperlipidemia induced by a cholesterol-rich diet aggravates necrotizing pancreatitis in rats. Eur J Pharmacol 572:74-81 (2007) IF: 2,376

20. Hegyi P, Takács T, **Rakonczay Z Jr.** Lansoprazol az oxidatív stressz elleni védelemben. Experimentális adatok. LAM 18: 55-58 (2008)

21. Takács T, Szabolcs A, Hegyi P, **Rakonczay Z Jr**, Farkas G. Az akut pancreatitis diagnosztikus és terápiás elveinek változása a klinikai gyakorlatban. Egy regionális belgyógyászati és sebészeti centrum adatainak epidemiológiai analízise. Orv Hetil 149: 645–654 (2008)

22. Venglovecz V, **Rakonczay Z Jr**, Ózsvári B, Takács T, Lonovics J, Varró A, Gray MA, Argent BE, Hegyi P. Effects of bile acids on pancreatic ductal bicarbonate secretion in guinea pig. Gut 57:1102-12 (2008) IF: 9,766

23. Hegyi P, **Rakonczay Z Jr**, Farkas K, Venglovecz V, Ózsvári B, Seidler U, Gray MA, Argent BE. Controversies in the role of SLC26 anion exchangers in pancreatic ductal bicarbonate secretion. Pancreas 37:232-4 (2008) Hozzászólás

24. Czakó L, Hegyi P, **Rakonczay Z Jr**, Wittmann T, Otsuki M. Interactions between the endocrine and exocrin pancreas and its clinical relevance. Pancreatology 9:351-359 (2009) Összefoglaló cikk

IF: 2,195

25. Szabolcs A, Biczó G, **Rakonczay Z**, Tiszlavicz L, Halm G, Wittmann T, Takács T. Simultaneous proteosome inhibition and heat shock protein induction by bortezomib is beneficial in experimental pancreatitis. Eur J Pharmacol 616:270-4 (2009) IF: 2,585

26. Ignáth I, Hegyi P, Venglovecz V, Székely CA, Carr G, Hasegawa M, Inoue M, Takács T, Argent BE, Gray MA, **Rakonczay Z Jr.** CFTR expression but not Cl<sup>-</sup> transport is involved in the stimulatory effect of bile acids on apical Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange activity in human pancreatic duct cells. Pancreas 38:921-9 (2009) IF: 2,733

27. Yeruva S, Farkas K, Hubricht J, Rode K, Riederer B, Bachmann O, Cinar A, **Rakonczay Z**, Molnár T, Nagy F, Wedemeyer J, Manns M, Raddatz D, Musch M, Chang E, Hegyi P, Seidler U. Preserved Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 3 expression and localization, but decreased NHE3 function indicate regulatory sodium transport defect in ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis 16:1149-61 (2010)

IF: 4,613

28. Maléth J, Venglovecz V, Rázga Z, Tiszlavicz L, **Rakonczay Z Jr**, Hegyi P. The nonconjugated chenodeoxycholate induces severe mitochondrial damage and inhibits bicarbonate transport in pancreatic duct cells. Gut 60:136-8 (2011) Hozzászólás

29. Hegyi P, Venglovecz V, Pallagi P, Maléth J, Takács T, **Rakonczay Z.** Galanin – a potent inhibitor of pancreatic bicarbonate secretion – is involved in the induction and progression of cerulein-induced experimental acute pancreatitis. Pancreas 40:155-6 (2011) Hozzászólás

30. Venglovecz V, Hegyi P, **Rakonczay Z**, Tiszlavicz L, Nardi A, Grunnet M, Gray MA. Pathophysiological relevance of apical large-conductance Ca2+-activated potassium channels in pancreatic duct epithelial cells. Gut 60:361-9 (2011) IF (2010): 10,614

31. Farkas K, Yeruva S, **Rakonczay Z Jr**, Ludolph L, Molnár T, Nagy F, Szepes Z, Schnúr A, Wittmann T, Hubricht J, Riederer B, Venglovecz V, Lázár G, Király M, Zsembery Á, Varga G, Seidler U, Hegyi P. New therapeutical targets in ulcerative colitis: The importance of ion transporters in the human colon. Inflamm Bowel Dis 17:884-98 (2011) IF (2010): 4,613

32. Kemény LV, Hegyi P, **Rakonczay Z Jr**, Borka K, Korompay A, Gray MA, Argent BE, Venglovecz V. Substance P inhibits pancreatic ductal bicarbonate secretion via neurokinin receptors 2 and 3 in the guinea pig exocrine pancreas. Pancreas 40:793-5 (2011) Hozzászólás

33. Hegyi P, Maléth J, Venglovecz V, **Rakonczay Z Jr.** Pancreatic ductal bicarbonate secretion: challenge of the acinar acid load. Front Physiol 2:36 (2011) Összefoglaló cikk

34. Kunstár É, Hegyi P, **Rakonczay Z Jr**, Farkas K, Nagy F, Wittmann T, Molnár T. Is bile acid malabsorption really specific to Crohn's disease or is it simply a consequence of ileal resection? Front Physiol 2:28 (2011) Hozzászólás

# 10.3. A Ph.D. értekezésben szereplő közlemények

 Takács T, Hegyi P, Jármay K, Czakó L, Góg C, Rakonczay Z Jr, Németh J, Lonovics J. Cholecystokinin fails to promote pancreatic regeneration in diabetic rats following the induction of experimental pancreatitis. Pharmacol Res 44:363-372 (2001)
 IF: 0,863

2. **Rakonczay Z Jr**, Takács T, Mándi Y, Iványi B, Varga I, Pápai G, Boros I, Lonovics J. Water immersion pretreatment decreases pro-inflammatory cytokine production in cholecystokinin-octapeptide-induced acute pancreatitis in rats: possible role of HSP72. Int J Hyperthermia 17:520-535 (2001) IF: 1,086

Rakonczay Z Jr, Takács T, Iványi B, Mándi Y, Pápai G, Boros I, Varga I, Jost K, Lonovics J. The effects of hypo- and hyperthermic pretreatment on sodium taurocholate-induced acute pancreatitis in rats. Pancreas 24:83-89 (2002)
 IF: 1,456

4. Takács T, **Rakonczay Z Jr**, Varga IS, Iványi B, Mándi Y, Boros I, Lonovics J. The comparative effects of water immersion pretreatment on three different acute pancreatitis models in rats. Biochem Cell Biol 80:241-251 (2002) IF: 1,873

5. Rakonczay Z Jr, Iványi B, Varga IS, Boros I, Jednákovits A, Németh I, Lonovics J, Takács T. Non-toxic heat shock protein coinducer BRX-220 protects against acute pancreatitis in rats.
Free Radic Biol Med 32:1283-1292 (2002)
IF: 5,533

6. Rakonczay Z Jr, Mándi Y, Kaszaki J, Iványi B, Boros I, Lonovics J, Takács T. Induction of HSP72 by sodium arsenite fails to protect against cholecystokinin-octapeptide-induced acute pancreatitis in rats. Dig Dis Sci 47:1594-1603 (2002) IF: 1,438

7. Takács T, Czakó L, Morschl É, László F, Tiszlavicz L, Rakonczay Z Jr, Lonovics J. The role of nitric oxide in edema formation in L-arginine induced acute pancreatitis. Pancreas 25:31-38 (2002)
IF: 1,456

# **11. SCIENTOMETRIAI ADATOK**

MTMT tudománymetriai táblázat

Rakonczay Zoltán tudományos és oktatási munkásságának összefoglalása MTA V. Orvostudományi Osztály (2011.09.30.)

Közlemény típusok	Száma		Hivatkozások	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Tudományos folyóiratcikk	48			
teljes cikk, nemzetközi folyóiratban		<u>44</u>	<u>600</u>	<u>773</u>
teljes cikk, hazai idegen nyelvű folyóiratban		0	0	0
teljes cikk, hazai magyar nyelvű folyóiratban		<u>3</u>	<u>3</u>	<u>5</u>
cikk, tudományos levélként		<u>1</u>	0	0
II. Könyvek	0			
a) Szakkönyv	0			
Szakkönyv, kézikönyv, idegen nyelvű		0	0	0
Szakkönyv, kézikönyv, magyar nyelvű		0	0	0
Tankönyv		0	0	0
b) Szerkesztett könyv	0	17.17.17.17.1		and the second se
Szerkesztett könyv, idegen nyelvű		0		
Szerkesztett könyv, magyar nyelvű		0		
Szerkesztett tankönyv		0		
III. Könyvfejezet	0			
Könyvfejezet, idegen nyelvű		0	0	0
Könyvfejezet, magyar nyelvű		0	0	0
Tankönyvekbe írt fejezetek		0	0	0
IV. Proceedings <sup>+</sup>	1		5	5
V. Multicentrikus vizsgálat	0			
a) Szerző		0	0	0
b) Szereplő		0		
Tudományos közlemények összesen (I-V.)	<u>49</u>		<u>608</u>	<u>783</u>

VI. Egyéb tudományos	<u>7</u>			
Egyéb tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkeket is		0	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok		Z	Z	<u>13</u>
VII. Absztrakt	125		11	12

Összesített impakt faktor	146,97		
Idézettség száma	<b></b>	 626	808
Hirsch index	<u>19</u>		

Speciális tudománymetriai adatok	
	Adat
Első szerzős folyóiratcikkek száma (az összes %-ban)	<u>13</u> (27,08%)
Utolsó szerzős tudományos cikkek száma (az összes %- ban)	<u>10</u> (20,83%)
Első és utolsó szerzőségű folyóiratcikkek impakt faktorai	<u>84,10</u>
Az utolsó tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2003 - ) tudományos folyóiratcikkek összegzett impakt faktora és száma (zárójelben)	<u>132,75</u> ( <u>40</u> )
Magyar nyelven megjelent tudományos teljes folyóiratcikkek száma	<u>3</u>
Az utolsó 10 év (2002- 2011) tudományos teljes, lektorált folyóiratcikkeinek száma	<u>46</u>
összesített impakt faktora	<u>145,02</u>
hivatkozások száma	<u>736</u>
A legmagasabb idézettségű közlemény idézettsége (az összes idézettség százalékában	<u>69</u> (8,54%)
Folyóiratcikkek,15-nél több szerzővel (nem multicentrikus)	<u>5</u>

# 12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először is szeretném köszönetemet kifejezni **Prof. Dr. Takács Tamás** egyetemi tanárnak, mentoromnak és barátomnak, akihez Ph.D. hallgató korom óta fordulhatok tudományos tanácsért, támogatásért és bíztatásért. Megkülönböztetett köszönettel tartozom laborvezető-társamnak, **Dr. Hegyi Péter**nek, akire nem csak a laborban, hanem a mindennapi életben is bármikor számíthatok. Nélküle a pályafutásomban meghatározó szereppel bíró Newcastle-i és Los Angeles-i tanulmányutaim sem valósulhattak volna meg.

Nívós intézményi háttér nélkül nincs minőségi kutatás. Ezúton is szeretnék köszönet mondani **Prof. Dr. Lonovics János**nak és **Prof. Dr. Wittmann Tibor**nak, a SZTE, ÁOK, I. sz. Belgyógyászati Klinika volt és jelenlegi igazgatójának, tanszékvezető egyetemi tanárának, akik lehetőséget biztosítottak számomra a tudományos munkára. Hálával tartozom **Prof. Dr. Boros Imrének**, a SZTE, TTIK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék vezetőjének, aki még diákkörös hallgatóként bevezetett a tudományos kutatás rejtelmeibe és megszerettette azt velem. Szintén köszönettel tartozom **Prof. Dr. Varró András**nak, a SZTE, ÁOK, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet tanszékvezetőjének, aki helyet biztosított számunkra a továbbterjeszkedéshez, és szakmai, valamint baráti tanácsaival segítette munkámat. Köszönet illeti **Prof. Dr. Barry Argent**-et és **Dr. Mike Gray**-t, a University of Newcastle kutatóit, akik megismertették velem a pancreas vezetéksejtek bikarbonát szekréciójának vizsgálatát (még ha nem is foglalkoztam ezzel a témával a dolgozatban).

Szeretném megköszönni hazai és külföldi társszerzőimnek, kollégáimnak és munkatársaimnak a segítségét, utóbbiak közül külön kiemelve azokat, akik a dolgozat témájában született közleményekben aktív szerepet vállaltak: Prof. Dr. Alhonen Leena, Balla Zsolt, Dr. Berczi Sándor, Dr. Biczó György, Dr. Czakó László, Dr. Dósa Sándor, Prof. Dr. Duda Ernő, Prof. Dr. Gukovskaya Anna, Prof. Dr. Gukovsky Ilya, Prof. Dr. Iványi Béla, Dr. Jármay Katalin, Dr. Karg Eszter, Dr. Kaszaki József, Prof. Dr. Mándi Yvette, Dr. Mareninova Olga, Dr. McCarroll Joshua, Dr. Odinokova Irina, Prof. Dr. Pandol Stephen, Prof. Dr. Saluja Ashok, Dr. Shalbuyeva Natalia, Sinervirta Riitta, Dr. Siska Andrea, Dr. Sung Kai-Feng, Dr. Szabolcs Annamária, Dr. Szőllősiné Dr. Varga Ilona és Dr. Venglovecz Viktória.

Ez a munka nem jöhetett volna létre Fuksz Zoltánné, Ökrös Gyuláné, Árva Miklósné, Sitkei Ágnes, Horesnyi Béláné, Magyarné Pálfi Edit és Enyinginé Etus asszisztensi segítsége nélkül.

Kutatómunkánk anyagi támogatását számos hazai (Országos Tudományos Kutatási Alap, Magyar Tudományos Akadémia, Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatal, Nemzeti Fejlesztési Ügynökség - TÁMOP) és nemzetközi (The Wellcome Trust, The Physiological Society, The Royal Society, Deutsche Forschungsgemeinschaft) szervezet biztosította.

Nem utolsó sorban hálával tartozom páromnak, Szekeres Emesének, kisfiamnak Ákosnak és szüleimnek (Prof. Dr. Rakonczay Zoltánnak és Dr. Rakonczay Zoltánné Gyarmati Zsuzsannának) szeretetükért, türelmükért és támogatásukért.