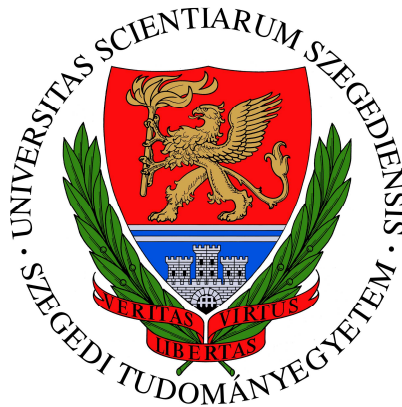


dc_256_11

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

KÍSÉRLETES AKUT PANCREATITIS: A PATOGENEZIS ÉS TERÁPIÁS CÉLPONTOK VIZSGÁLATA



Dr. Rakonczay Zoltán

Szegedi Tudományegyetem, ÁOK
I. sz. Belgyógyászati Klinika

SZEGED

2011

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	3
2. CÉLKITŰZÉSEK	5
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	6
3.1. Kísérleti protokollok	6
3.1.1. Az L-arginin és közvetlen metabolitjainak ill. az L-hisztidin és L-lizin dóziszfüggő hatásának vizsgálata	6
3.1.2. Az L-arginin-, L-ornitin-, ill. L-lizin-indukálta akut pancreatitis időbeli lefolyásának vizsgálata	6
3.1.3. Az irreverzibilis argináz gátló kezelés hatása az L-arginin-indukálta akut pancreatitisre	6
3.1.4. Az 1-metilspermidin hatása az L-ornitin-indukálta akut pancreatitisre	6
3.1.5. A pirrolidin-ditiokarbamát és metilprednizolon előkezelés hatása az L-arginin-indukálta akut pancreatitisre	7
3.1.6. A metilprednizolon előkezelés hatása a cholecystokinin-indukálta akut pancreatitisre	7
3.2. Állatok feláldozása, mintavétel	7
3.3. Laboratóriumi paraméterek	8
3.4. Szövettani vizsgálatok	9
3.5. Statisztikai analízis	9
4. EREDMÉNYEK	10
4.1. A nagy dóziséjú bázikus aminosavak és az L-arginin metabolitok intraperitoneális injekciójának hatása a pancreasra	10
4.2. Az intraperitoneális L-arginin-, L-ornitin- és L-lizin injekció dózis- és időfüggésének vizsgálata	10
4.2.1. Az L-arginin hatása	10
4.2.2. Az L-ornitin hatása	11
4.2.3. Az L-lizin hatása	15
4.3. Az argináz-gátlás hatása az L-arginin-indukálta akut pancreatitisre	19
4.4. A poliaminok szerepe L-ornitin-indukálta akut pancreatitisben	20
4.4.1. Poliamin homeosztázis L-ornitin-indukálta akut pancreatitisben	20
4.4.2. A szintetikus poliamin analóg 1-metilspermidin hatása az L-ornitin-indukálta akut pancreatitisre	20
4.5. Nukleáris faktor- κ B aktiváció-gátlás hatása akut pancreatitisben	21
4.5.1. A pirrolidin-ditiokarbamát és metilprednizolon előkezelés hatása az L-arginin-indukálta akut pancreatitisre	22
4.5.2. A metilprednizolon előkezelés hatása cholecystokinin-indukálta akut pancreatitisre	23
5. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK	24
6. EREDMÉNYEK ÖSSZEGZÉSE ÉS MEGBESZÉLÉSE	25
6.1. A nagy dóziséjú i.p. adott bázikus aminosavak hatása a patkány pancreasra	25
6.1.1. Dózis-hatás vizsgálatok	25
6.1.2. L-arginin-, L-ornitin-, illetve L-lizin-indukálta akut pancreatitis időbeli vizsgálata	26
6.2. A bázikus aminosavakkal kiváltható akut pancreatitis patomechanizmusa	28
6.3. A bázikus aminosavakkal kiváltható akut pancreatitis hasznosíthatósága	28
6.4. A poliaminok szerepe akut pancreatitisben	29
6.5. Az argináz szerepe L-arginin-indukálta akut pancreatitisben	30
6.6. Nukleáris faktor- κ B aktiváció és annak gátlása akut pancreatitisben	31
7. VIZSGÁLATAINK JELENTŐSÉGE ÉS JÖVŐBENI TERVEINK	32

dc_256_11

8. KÖZLEMÉNYJEGYZÉK.....	34
8.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	34
8.2. A Ph.D. fokozat megszerzését követő időszak egyéb közleményei.....	36
8.3. A Ph.D. értekezésben szereplő közlemények	41
9. SCIENTOMETRIAI ADATOK.....	43
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	45

1. BEVEZETÉS

Az akut pancreatitis a hasnyálmirigy heveny gyulladásos betegsége, mely még napjainkban is nagy morbiditással és elfogadhatatlanul magas mortalitással jár. A kórlefolyás az esetek közel 80 %-ában enyhe ödémás, 20 %-ban azonban súlyos nekrotizáló, a beteg életét is veszélyeztető állapothoz vezethet. A pancreatitis súlyos formája esetén a hospitalizáció elhúzódik, gyakran jár fertőzésekkel és más szövődményekkel, beleértve a többszervi elégtelenséget is. A betegség oki kezelése a mai napig megoldatlan.

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^{2+} szignál következtében létrejövő korai tripszinogén aktivációnak, a proinflammatorikus citokinek szintéziséért felelős transzkripciós faktornak, a nukleáris faktor- κB (NF- κB)-nek, az oxidatív stressznek és a mitokondriális károsodásnak fontos szerepe van a pancreatitis kialakulásában. A folyamatok időbeli sorrendje és összefüggése azonban mindmáig tisztázatlan.

Az akut pancreatitis kialakulását számos mechanizmus igyekszik megakadályozni. Ezek közül igen fontosak a hő-sokk fehérjék (HSP-k). A HSP-k vagy más néven dajkafehérjék - mind a prokarióta, mind az eukarióta élőlényekben megtalálható konzervált molekulák, melyeknek nélkülözhetetlen szerepe van egyes stresszhatások, betegségek (így az akut pancreatitis) kivédésében, túlélésében, ill. az okozott károsodás mérséklésében. A HSP-k osztályozása közelítőleges molekulatömegük (kD) alapján történik.

Az állatkísérletes vizsgálatok lehetőséget nyújtanak a pancreas betegségek modellezésére, a patomechanizmus tanulmányozására és a pancreatitis kivédésében szerepet játszó vegyületek tesztelésére. 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 faktora, izolált, önálló részletei a pancreatitis kiváltását követő első pillanattól kezdődően. Az akut pancreatitismodellek többsége invazivitásuk, kivitelezési nehézségük (pl. retrográd ductalis epesav injekció, duodenum kacs lekötés), vagy nem megfelelő reprodukálhatóságuk miatt nehezen használhatók. Ráadásul ahhoz, hogy egy modell megfelelően használható legyen, jól kell reprezentálnia a humán betegség jellegzetességeit, laboratóriumi eltéréseit és

szöveti elváltozásait. 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 kórlefolásába.

A bázikus aminosavak (L-arginin és L-lizin) pancreas károsító hatása régóta ismert. Az *i.p.* injektált, nagy dózisú L-arginin akut pancreatitist vált ki patkányban és egérben. Az L-lizin pancreas károsító hatásáról jóval kevesebb információ van a szakirodalomban. Kitajima és Kishino, illetve Kishino és mtsai. vizsgálata szerint az *i.p.* adott 4 g/kg L-lizin injekció kiterjedt szövetskárosodást, acináris mitokondriális duzzadást és ellentmondásosan gyulladásos beszűrődés nélküli sejtnekrózist okozott. Az L-arginin-indukálta pancreatitis vizsgálatának nagy hagyománya van a SZTE, ÁOK, I. sz. Belklinika Pancreas Laboratóriumának kutatásaiban. Az arginines pancreatitis indukciójának patomechanizmusa a mai napig sem teljesen ismert, de feltételezhető, hogy az oxigén szabadgyökök, a gyulladásos faktorok, az endoplazmatikus retikulum stressz, a nitrogén-monoxid (NO) és a poliaminok egyaránt fontos szerepet játszanak ebben. Az L-arginin több útvonalon keresztül metabolizálódhat. E folyamatok két kulcsenzime a NO szintetáz (NOS), illetve az argináz. A NOS (melynek három izoformája ismert: a konstitutív endoteliális és -neuronális, illetve az indukálható forma) az L-arginin átalakulását katalizálja L-citrullinné NO képződésével. Az argináz enzim az L-arginint L-ornitinné és ureává hidrolizálja. Az argináz I izoforma a citoszolban található. Legmagasabb szövetsi expressziót a májban mutat, míg a mitokondriális argináz II számos extrahepaticus szövetben megtalálható.

Az L-ornitin a poliaminok (putreszcin, spermidin és spermin) szintézisének a prekursora. A poliaminoknak nélkülözhetetlen szerepük van a sejtek normális működésében és túlélésében. Metabolizmusukat 3 fő enzim szabályozza. A poliamin bioszintézist az ornitin dekarboxiláz (ODC) és az *S*-adenozil-metionin-dekarboxiláz mediálja, míg a poliamin katabolizmus rate-limitáló kulcsenzime a spermidin/spermin N^1 -acetiltranszferáz (SSAT). Érdekes módon emlősökben a pancreas tartalmazza a spermidint a legnagyobb koncentrációban, de ennek jelentősége nem igazán ismert. 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 patkányban. A pancreaticus SSAT-aktivációt és az ennek következtében kialakuló poliamin katabolizmust

több akut pancreatitismodellben és humán akut pancreatitises hasnyálmirigy szövetből is kimutatták.

2. 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 meghatározók lehetnek.

Részletesebb céljaink a következők 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- κ B transzkripció faktor,**
- b.) **HSP-k,**
- c.) **poliaminok**
- d.) **argináz és**
- e.) **szabadgyökös mechanizmusok szerepét.**

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleteinkhez standard körülmények között tartott 180-300 g tömegű hím Wistar patkányokat használtunk az állatvédelmi- és etikai szabályoknak megfelelően.

3.1. Kísérleti protokollok

3.1.1. Az L-arginin és közvetlen metabolitjainak ill. az L-hisztidin és L-lizin dóziszfüggő hatásának vizsgálata

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

3.1.2. 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.

3.1.3. Az irreverzibilis argináz gátló kezelés hatása az L-arginin-indukálta akut pancreatitisre

A patkányokat 15 mg/kg (+)-S-2-amino-6-jodoacetamido-hexánsavval (AIHA) vagy annak vivőanyagával kezeltük *i.p.* 1 órával a fiziológias 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.

3.1.4. 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 injekció (3 g/kg, *i.p.*) előtt (n = 4) vagy után (n = 4) fiziológias sóoldattal oltottuk *i.p.* Az MO24 csoportban (n = 6) a patkányokat 50 mg/kg 1-metilspermidinnel (MeSpd) 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 kezeltünk. A csoportok jelölésében a 24 és a 48 az L-ornitin injekciótól számított feláldozás időpontját jelenti órában.

3.1.5. A pirrolidin-ditiokarbamát és metilprednizolon előkezelés hatása az L-arginin-indukálta 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.

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

A MP előkezelés (2 x 30 mg/kg *i.m.* 12 órás időközzel adva) hatását cholecystokinin (CCK)-indukálta akut pancreatitisben (2x100 µg/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.

3.2. 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 hasnyálmirigyt abdominális feltárás után kipreparáltuk, és 4 °C-on megtisztítottuk a nyirokcsomóktól és 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.

3.3. *Laboratóriumi paraméterek*

A pancreas tömeg/testtömeg hányados (p.w./b.w.) a gyulladásos ödéma mértékéről ad információt. Az amiláz-, lipáz- és aszpartát-aminotranszferáz (ASAT) aktivitást és a glükóz-, Ca^{2+} -, triglicerid-, urea- és kreatinin koncentrációkat standard kitek segítségével határoztuk meg. A szérum arginin-, ornitin- és citrullin koncentrációkat Chase és mtsai. módszere szerint vizsgáltuk tömegspektrometriás eljárással, szűrőpapíron szárított szérum mintákból. A pancreas tripszinogén tartalmát egy para-nitroaniliddel konjugált szubsztrát felhasználásával fotométerrel, tripszin aktivitását egy 7-amino-4-metilkumarinnal konjugált szubsztrát segítségével fluoriméterrel mértük. A pancreaticus mieloperoxidáz (MPO) aktivitás a gyulladásos infiltráció mértékéről ad felvilágosítást. Utóbbi enzim aktivitásának meghatározását egy mesterséges szubsztrát (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) felhasználásával végeztük. Az argináz aktivitást exogén L-arginin hozzáadásával, kolorimetriás módszerrel mértük. A pancreaticus HSP72, HSP27, $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ és $\text{I}\kappa\text{B-}\beta$ fehérje expresszió mértékét kemilumineszcenciával erősített Western blot analízis segítségével határoztuk meg. A NF- κB DNS-kötő aktivitást nukleáris fehérje extraktokból elektroforetikus „mobility shift assay”-jel detektáltuk.

A pancreas szövetből a NF- κB által szabályozott gének (pl. IL-1 β , IL-6 és TNF- α) koncentrációját enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kittel határoztuk meg a gyártó utasításai szerint. A plazma tripszinogén aktivációs peptid (TAP) koncentrációját a Biotrin által forgalmazott ELISA kittel mértük.

A spermidin-, spermin-, putreszcin- és MeSpd szinteket magas nyomású folyadék kromatográfiával Hyvönen és mtsai. módszere szerint határoztuk meg. A pancreaticus ODC és a SSAT aktivitás meghatározását Jänne és Williams-Ashman, illetve Bernacki és mtsai. módszere szerint végeztük.

Az oxidatív stresszről információt adó paraméterek közül a következőket mértük: pancreaticus nem-fehérje szulfhidril-csoport (NSG) tartalom, glutation-peroxidáz (GSH-Px) és Mn- és Cu/Zn-szuperoxid-dizmutáz (SOD) aktivitás, malondialdehid (MDA) koncentráció és karbonil-protein szint.

Az apoptózis detektálására a pancreasból genomikus DNS-t izoláltunk és a DNS-t agaróz gélen futtattuk.

A patkány pancreas mitokondiumokat (RPM) és a -máj mitokondriumokat (RLM) fizioológias sóoldattal kezelt, illetve 1 vagy 4 órával a 2 g/kg L-lizin *i.p.* injekcióját követően izoláltuk Odinokova és mtsai. módszere szerint. A mitokondriális membránpotenciált ($\Delta\Psi_m$) és oxigénfogyasztást RPM és RLM szuszpenzióban tetrafenil-foszfónium-ion-, illetve Clark elektródák segítségével mértük.

3.4. Szövettani vizsgálatok

Az akut pancreatitis során bekövetkező hisztopatológiai változásokat: az interstitialis ödémát, a vaszkuláris kongeszciót, a leukocita adhézíót és infiltrációt, az acinussejtek habos degenerációját/vacuolumok képződését, az acinussejtek apoptózisát és nekrózisát, a regeneráció jeleit (mitózis, ductuloacinaris struktúrák) patológus kollégák szemikvantitatívan értékelték. Az apoptózis mennyiségi meghatározását TdT-mediated dUTP Nick-End-labeling (TUNEL) technikával végeztük. A NADH₂ diaforáz enzimhisztokémiával az acináris mitokondriumok morfológiáját vizsgáltuk. A transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz az állatokból eltávolított pancreas egy kis darabját (kb. 1-1 mm³) használtuk fel.

3.5. Statisztikai analízis

A statisztikai kiértékeléshez variancia analízist használtunk. Szignifikánsnak a $p < 0,05$ értéket fogadtuk el.

4. EREDMÉNYEK

4.1. 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 L-lizin hatását a szérum amiláz aktivitásra, a p.w./b.w.-ra, a pancreaticus MPO aktivitásra és a hisztológiára 24 órával az injekciót követően. 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 előbbiekkal szemben nem okozott pancreas károsodást. A 2,9 g/kg L-citrullinnal, ill. 3 g/kg L-hisztidin-HCl-dal kezelt állatok labor- és szövettani paraméterei nem különböztek szignifikáns mértékben a fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll csoporttól. 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 pancreatititre 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. Összességében elmondhatjuk, hogy míg az alifás oldallánccal rendelkező bázikus aminosavak akut pancreatitist váltanak ki, addig az imidazol oldallánccal rendelkező L-hisztidinnek nincs ilyen hatása.

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

4.2.1. Az L-arginin hatása

A 3 g/kg L-arginin-HCl *i.p.* injekciója után 12-36 órával I κ B- α (mely a NF- κ B nukleáris transzlokációját szabályozza) degradációt figyeltünk meg a pancreasban, mellyel párhuzamosan az előbbi időpontokban erős NF- κ B DNS-kötő aktivitás-fokozódást tapasztaltunk. A 4 g/kg L-arginin-HCl nem okozott I κ B- α degradációt és NF- κ B aktivációt. A nagy dózisú L-arginin-HCl (3 vagy 4 g/kg) a kezelést követő 1 óra múlva szignifikánsan csökkentette a pancreas IL-1 β koncentrációját. Az L-arginin kezelés után 12 órával az IL-1 β szintje szignifikánsan emelkedett a kontrollhoz képest. Az IL-1 β koncentráció 24 óra elteltével volt a legmagasabb, ezután csökkent. A pancreas TNF- α koncentrációja már 6 órával az injekció után emelkedett volt, a csúcsát 18 órával a kezelés után érte el, azután nagyjából egy szinten stabilizálódott.

Az L-arginin adminisztráció dózisfüggő HSP60 és HSP72 expresszió fokozódást okozott a pancreasban. A HSP72 expresszió 2 órával a 3 g/kg L-arginin-HCl injekció után már szignifikánsan magasabb volt a kontrollhoz képest, csúcsát a 18. óránál érte el és 96 óráig magas szinten maradt. A HSP60 szintje nem emelkedett meg ennyire, 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 észleltekhöz képest. A HSP60 expresszió a 12 – 48. óráig szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz képest. A HSP72 szintézis a 24. óráig enyhén emelkedett volt, majd a csúcsát 48 óra múlva érte el.

A 3,5 g/kg L-arginin-HCl *i.p.* injekcióját követően a szérum arginin-, citrullin- és ornitin koncentrációk szignifikánsan emelkedtek a kontroll csoport értékeihez képest. 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.

4.2.2. Az L-ornitin hatása

Az 1- vagy 2 g/kg L-ornitin-HCl-dal oltott állatokban nem volt detektálható pancreas lézió. 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.

A fenti eredmények figyelembevételével az L-ornitin-indukálta pancreatitis időbeli lefolyásának vizsgálatához a 3 g/kg dózist választottuk. **2 órával** az L-ornitin injekcióját követően nem észleltünk mikroszkópos elváltozást a pancreasban. **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 nekrozisát (<10 %) láttuk. A transzmissziós elektronmikroszkópos képen ugyanebben az időpontban zimogén granulomok, myelin figurákat és mitokondriális maradványokat tartalmazó nagy autofág vacuolumok voltak láthatók. A “habos” vacuolisatio a közepes denzitású zsírcseppeknek felelhet meg a sejtek bazális részében. A mitokondriális kriszták és a durva felszíni endoplazmatikus retikulum enyhén dilatáltak voltak, a riboszómák részben leváltak az utóbbi struktúrákról. 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 nekrozis mértéke 15-25 % körül volt. A **tizenkettedik órában** diffúz közepes fokú monocita és neutrofil infiltrációt láttunk, az acinussejt nekrozis mértéke 26-50 % volt. **18 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. órában** észleltük. Utóbbi időpontban az elektronmikroszkópos vizsgálat súlyos zonális acinussejt károsodást mutatott. A károsodott nekrotikus sejtek elsősorban az acinusok közepére lokalizálódtak, az acinusok bazális részén kevésbé károsodtak a sejtek. A nagy autofág vacuolumok zimogén szemcséket, myelin figurákat és/vagy granuláris elektrondenz anyagot tartalmaztak. A zimogén granulomok száma jelentős mértékben, bizonyos területeken nullára csökkent. Alapvetően két fő típusú sejtkárosodás volt megfigyelhető a metszeteken: a nukleáris membrán eltűnése az egész nukleusz lízisével együtt, vagy a kromatin kondenzációja a nukleáris membrán alatt (az utóbbi ritkábban). A nukleoluszok eltűnése a citoplazma zsugorodásával, vagy a nélkül is jellemző volt. Az acinussejtek bazális kompartmentjében közepes denzitású lipid cseppek voltak megfigyelhetők. A mitokondriumok nem tűntek kórosnak, de a durva felszíni endoplazmatikus retikulum kitágult, a riboszómák leváltak róla. Az interstitialis térben számos neutrofil és monocita sejt volt megfigyelhető. A **36. órában** a pancreas ödémája még mindig súlyos volt. A monocita és neutrofil sejtek adherenciája csökkent, de masszív neutrofil infiltrációt láttunk; az acinussejtek nekrozisa 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 **48. órában** a

szöveti képet a diffúz, súlyos monocita/makrofág, fibroblaszt és neutrofil granulocita infiltráció uralta. A **72. órában** már nem volt interstitialis ödéma, de a diffúz gyulladásos infiltráció még mindig megfigyelhető volt. A lobulusokban és a ductuloacinaris struktúrák körül enyhe fokú kollagéndepozíció volt. A ductuloacinaris struktúrák a tubularis lumenből eredtek. A metszetekben mitotikus figurákat és kisfokú apoptotikus aktivitást láttunk. **Egy héttel** az L-ornitin injekció után még mindig diffúz, közepes mértékű fibroblaszt és makrofág infiltráció volt megfigyelhető, a neutrofilok száma csökkent a pancreas szövetben. 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. Néhány megnagyobbodott sejt sok kicsi elektrondenz granulumot tartalmazott, ami ductoendokrin proliferációra utal. **1 hónappal** az L-ornitin kezelés után a pancreas szövet már hasonlított a kontrollhoz, a károsodott parenchyma egy részét azonban zsírszövet töltötte ki. Az acinusban nagyfokú mitotikus aktivitás és regeneratív atípiát 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 nekrozisra utalnak. Ugyanebben az idő-intervallumban a tüdőben kis mértékű alveolaris megvastagodás volt látható neutrofil infiltrációval, esetenkénti bevérzéssel. Utóbbi elváltozások enyhe fokú légzési disztressz szindrómára utalnak.

A szérumban amiláz aktivitások a 9-24. óráig szignifikánsan növekedtek, azután (48 óránál) a kontroll érték alá csökkentek. A pancreas amiláz aktivitása a 24. órától szignifikánsan csökkent, a 72. és a 168. óra között szinte alig volt detektálható. Az L-ornitin injekció után 24 órával a hasüregből kinyert ascites amiláz aktivitása rendkívül magas volt. A pancreatic tripszin aktivitás 9-48 órával a 3 g/kg L-ornitin-HCl beadását követően szignifikánsan emelkedett. A gyulladásos mediátorok hatására a pancreasban megjelenő leukociták

infiltrációjának mértékét a MPO aktivitás meghatározásával kvantifikáltuk. 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. óránál) következett be.

A fiziológias sóoldattal kezelt kontroll csoportban nem lehetett HSP72 expressziót kimutatni. Az L-ornitin injekciója után 4 órával a HSP72 expresszió szignifikánsan nőtt, a 18. óránál volt a csúcsa, és 1 hónap elteltével is emelkedett maradt.

Az L-ornitin injekció hatására a pancreaticus I κ B szintek a 9. órától kezdve szignifikánsan csökkentek. Az I κ B- α szintje 36 órával az L-ornitin injekciót követően normalizálódott, az I κ B- β szintje azonban 168 órával a beadás után is alacsony maradt. Az I κ B degradációval összhangban - és a NF- κ B aktiváció következtében - a pancreaticus IL-1 β szintézis a 9. órától kezdve szignifikánsan nőtt.

A szövettani analízis szerint 6 órával az L-ornitin injekció után az apoptoticus sejtek száma nagymértékben fokozódott. A pancreaticus genomikus DNS analízis 9 órával az L-ornitin injekciója után az agaróz gélelektroforézis létra-mintázatot mutatott, ami nagyfokú apoptoticus aktivitásra utal. 24 órával az L-ornitin injekciót követően a DNS nem-specifikus degradációra jellemző (smear) képet mutatott, ami nagymértékű nekrozis jelenlétére utal. Az apoptózis mértékének pontos kvantifikálásához TUNEL technikát használtunk. Az apoptoticus sejtek %-os aránya nagymértékben megnőtt az L-ornitin kezelés hatására. Az apoptózis ráta 6-9 órával a kezelés után volt a legnagyobb.

A NSG tartalom a kontroll csoporthoz képest szignifikánsan növekedett 6 órával az L-ornitin injekciót követően, majd fokozatosan csökkent. A GSH-Px- és Cu/Zn-SOD aktivitások a 24. óra után szignifikánsan emelkedtek. Ezzel ellentétben a Mn-SOD aktivitás 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.

A patkányok testtömege az L-ornitin injekciót követő első naptól 1 hónapig szignifikánsan csökkent a kontroll állatokéhoz képest. Az L-ornitin injekciót követően a 18-48. óráig a p.w./b.w. szignifikánsan emelkedett, majd a 168. órától 1 hónap elteltéig szignifikánsan csökkent. A p.w./b.w. emelkedés az ödémának, a csökkenés a nekrozisnak a következménye.

A szérum ASAT aktivitás 24 és 48 órával az L-ornitin injekciót követően szignifikánsan nőtt, ami máj-érintettségére utal. A szérum glükóz koncentrációja 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. 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).

4.2.3. Az L-lizin hatása

A 0-2 g/kg dózisú injekció hatására egyetlen állat sem pusztult el. A 2,5 g/kg-os dózis a patkányok 43 %-ánál, a 3 g/kg-os 54 %-nál, a 3,5 g/kg-os 80 %-nál, a 4-5 g/kg-os dózis valamennyi állatnál 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 mutatta. 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 folts kalcifikációt észleltünk, a hasüregben ascites képződött.

Eredményeink alapján az L-lizin indukálta akut pancreatitis időbeli lefolyásának vizsgálatához a 2 g/kg dózist választottuk. 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. **2 órával** az L-lizin injekció után az acinussejtek szerkezete megváltozott, vacuolisálódtak. Az idő előrehaladtával a világosan festődő vacuolumok mérete egyre nagyobb lett és több acinussejtben is megjelent. Az L-lizin kezelést követő **6. órában** a „habos degeneráció” már az acinusok zömét érintette, és néhány apoptoticus test is látható volt. Az apoptózis 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 apoptózis mértéke $0,58 \pm 0,05$ % volt. Az interstitialis ödéma kiterjedése fokozódott, a gyulladásos sejtek (monociták és neutrofil granulociták) száma is nőtt. **48 órával** 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. **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. **1 héttel** az injekció után még mindig diffúz, mérsékelt fokú gyulladásos beszűrődés volt látható; egy-egy ductuloacinaris struktúrából új acinusok és ductusok képződtek. Az apoptosis mértéke $1,39 \pm 0,18$ % volt. A károsodott parenchyma egy részét zsírsejtek foglalták el. **1 hónappal** 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.

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_2 diaforáz enzimhisztokémiával ezek a sejtstruktúrák jól megjeleníthetők. A kontroll pancreas szövetben a mitokondriumok sötétkéken festődtek, főleg perinukleárisan helyezkedtek el. Formájuk apró pálcikához hasonló, hosszuk $0,94 \pm 0,03$ μm . Két órával az *i.p.* L-lizin injekció után a mitokondriumok nagy része világoskék vezikula lett, a hosszuk megnőtt ($1,45 \pm 0,06$ μm). 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.

A pancreas minták elektronmikroszkópos képén 6, 24 óra és 1 hét múlva a 2 g/kg L-lizin injekció után bekövetkező mikroszkópos elváltozások láthatók. Az L-lizin kezelés után **6 órával** az acináriss mitokondriumok megduzzadtak, hosszuk 2-4 μm volt. Néhánynak a mérete a nukleuszét is megközelítette. 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 vacuolisatiót és a diaforáz enzimhisztokémiával készült mintákon észlelt világoskék gömbszerű vezikulák eredetét. Ezek az elváltozások a mitokondriumok hidropikus degenerációjával magyarázhatók. A **24. órában** az acinusok súlyosan károsodtak. 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. héten** a pancreaszövet regenerációja megkezdődött. A sejtek között kollagén-depozitumok, néhány mononukleáris sejt és tekervényes ductuloacinaris struktúra volt megtalálható, melyből ép acinusok és ductusok differenciálódtak.

Az L-lizin hatására a p.w./b.w. kétfázisú emelkedést követően a kontroll érték alá csökkent. 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). Az injekció után 24 órával – 1 héttel a pancreasban az amiláz aktivitása a nagyfokú acinussejt nekrosis miatt szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest.

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.

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

A pancreaticus SSAT aktivitás az L-lizin kezelés hatására bifázisos emelkedést mutatott. 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. A spermin szint nem változott az L-lizin kezelés hatására; putreszcint nem tudunk kimutatni.

A kontroll állatokból izolált pancreasban nem volt detektálható HSP72 expresszió, míg a pancreatitis kialakulásával párhuzamosan a HSP72 szintézise fokozódott. 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 κ B- α mennyisége az L-lizin injekciót követő 24-168. órában a kontrollhoz képest szignifikánsan csökkent. Ezzel párhuzamosan az L-lizin injekció után 24-72 órával a pancreaticus IL-1 β expresszió szignifikánsan nőtt. Össességében ezek az eredmények fokozott NF- κ B aktivációra utalnak.

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

Az L-lizin hatásának izolált pancreas és máj mitokondriumok $\Delta\Psi_m$ -jának valamint oxigénfogyasztásának 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 izolált RPM és RLM stabil $\Delta\Psi_m$ -t és oxigénfogyasztást mutatott. Az exogén ADP hozzáadásával stimuláltuk az oxidatív foszforilációt RPM-ban és RLM-ban, 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 és RLM oxigénfogyasztását, és csak kis mértékben 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. Hasonló $\Delta\Psi_m$ regeneráció-gátlás volt megfigyelhető az ADP adását követően RPM-ben 1 órával és 4 órával 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, ami a RPM-ok szelektív károsodására utal.

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

A patkányok májában mért argináz aktivitás kb. 3 nagyságrenddel nagyobb volt a vesében, a tüdőben és a pancreasban mértekhez képest. Feltételezhető, hogy az *i.p.* adott L-arginin nagy részét is a májban található argináz metabolizálja.

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

A p.w./b.w. szignifikánsan nőtt a 3,5 g/kg L-arginin adminisztráció hatására. Az AIHA előkezelés szignifikánsan csökkentette ezt a p.w./b.w. emelkedést. A szérum amiláz aktivitás egyik csoportban sem változott szignifikáns mértékben. A pancreas amiláz aktivitása az L-arginin kezelés hatására szignifikánsan csökkent. 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. Az AIHA előkezelés szignifikánsan gátolta ezt a tripszin aktivitás-fokozódást.

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

A NSG tartalom és a GSH-Px aktivitás szignifikánsan nőtt 24 órával az L-arginin injekciója után. 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 pancreatitis csoportokban.

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

A 3,5 g/kg L-arginin *i.p.* injekciója súlyos akut nekrotizáló pancreatitist hozott létre patkányokban. 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.

4.4. A poliaminok szerepe L-ornitin-indukálta akut pancreatitisben

4.4.1. Poliamin homeosztázis L-ornitin-indukálta akut pancreatitisben

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

A pancreas ODC aktivitása a 24. órában szignifikánsan fokozódott a kontrollhoz képest. A SSAT aktivitás az előbbi időpontban szintén magasabb volt a kontrollhoz képest és a 72. órában csúcsosodott ki (a normális közel tízszeres aktivitásával) és a 168. óráig emelkedett maradt. Meglepő módon a pancreasban nem tudtunk putreszcint detektálni, noha az ODC és a SSAT aktivitásfokozódások következtében mindenképpen ez várható lenne (amennyiben a poliamin szintézis nem múlja felül a katabolizmust).

A hepaticus putreszcin szint a kontrollhoz képest 26-szor volt nagyobb 6 órával az L-ornitin injekciót követően, azután a kontroll szintre esett vissza. A hepaticus spermidin szint a 6-72. óráig szignifikánsan nagyobb volt. A spermin tartalom szintén magasabb volt a kontroll értékhez képest a 24. és a 72. óra között.

A májban észleltekhöz hasonlóan a tüdő putreszcin-szint 6 órával az injekciót követően csúcsosodott, majd visszatért a kontroll szintre. A tüdő spermidin tartalma szignifikánsan csökkent 6, 72 és 168 órával az L-ornitin kezelést követően. A tüdő spermin tartalma viszont egyik vizsgált időpontban sem változott szignifikáns mértékben a kontroll csoporthoz képest.

4.4.2. A szintetikus poliamin analóg 1-metilspermidin hatása az L-ornitin-indukálta akut pancreatitissre

A MeSpd mind az előkezelés (MO24: $4,53 \pm 1,79$ nmol/mg protein), mind az utókezelés (OM24: $10,42 \pm 1,35$ nmol/mg protein, OM48: $8,74 \pm 1,18$ nmol/mg protein)

hatására felhalmozódott a pancreas szövetben. A pancreas spermidin tartalma szignifikánsan csökkent az L-ornitinnel kezelt csoportokban, míg a spermin tartalom nem változott. A pancreas SSAT aktivitása szignifikánsan, négyszeresére emelkedett az L-ornitin injekció hatására a 24. órában és több mint hétszeresére a 48. órában. Putreszcint egyik csoportban sem tudtunk kimutatni. A MeSpd adminisztráció nem befolyásolta ezeket a paramétereket.

Az L-ornitin injekciót követően 24 és 48 órával interstitialis ödéma, vaszkuláris congestio, leukocita adherencia és infiltráció, valamint az acináris sejtek nekrozisa volt megfigyelhető a pancreasban. A MeSpd adminisztráció nem befolyásolta a vizsgált szövettani paramétereket.

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. A pancreas amiláz aktivitása az L-ornitinnel kezelt csoportokban szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest, az *OM24* csoportot kivéve. A szérum lipáz aktivitás az *OM24* csoportban szignifikánsan magasabb volt az *O24* csoporthoz képest. A p.w./b.w. szignifikánsan emelkedett 24 órával a 3 g/kg L-ornitin kezelést követően. A MeSpd adminisztráció a 24. és a 48 órában sem befolyásolta a p.w./b.w. változását.

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

A 3 g/kg L-ornitin *i.p.* injekció szignifikánsan fokozta a HSP72 szintézist 24 órával a betegség indukciója után. Az I κ B- α szint szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz képest 24 és 48 órával az L-ornitin injekció után. A MeSpd kezelés nem befolyásolta a HSP72 és I κ B- α expresszióját. Az I κ B degradációval párhuzamosan - és a NF- κ B aktiváció következtében - a pancreaticus IL-1 β szintézis szignifikánsan fokozódott 24 és 48 órával az L-ornitin injekciót követően. A MeSpd elő- és utókezelésnek nem volt hatása a gyulladásos citokin szintekre. Bár a MeSpd utókezelés az IL-1 β expressziót tendenciózusan csökkentette, ez az eltérés azonban nem volt szignifikáns.

4.5. *Nukleáris faktor- κ B aktiváció-gátlás hatása akut pancreatitisben*

4.5.1. *A pirrolidin-ditiokarbamát és metilprednizolon előkezelés hatása az L-arginin-indukálta akut pancreatitisre*

Az 1- és 10 mg/kg dózisban adott PDTC előkezelés szinte teljesen kivédte az I κ B- α degradációt és a NF- κ B DNS-kötő aktivitás-fokozódást 24 órával az L-arginin injekcióját követően. A 100 mg/kg dózisban adott PDTC viszont nem védte ki a NF- κ 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 κ B- α degradációt és a NF- κ B DNS-kötő aktivitást a MP mindegyik dózisban csökkentette.

A nagy dózisú L-arginin kezelés szignifikánsan fokozta a pancreaticus IL-1 β és TNF- α koncentrációkat a kontrollhoz képest. A proinflammatorikus citokin szinteket az 1- és 10 mg/kg PDTC vagy 1-, 10- és 30 mg/kg MP szignifikánsan csökkentette a vivőanyaggal kezelt L-arginines csoporthoz képest.

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. Az 1 mg/kg PDTC illetve 10- vagy 30 mg/kg MP szignifikánsan csökkentette a p.w./b.w.-t (azaz a gyulladáshoz ödéma mértékét) 24 órával az L-arginin injekcióját követően. Ugyan volt egy tendencia arra vonatkozóan, hogy a PDTC-, illetve MP előkezelés L-arginin-indukálta akut pancreatitisben csökkentse a szérum amiláz aktivitást, ez azonban nem érte el a szignifikáns mértéket.

Az L-arginin injekció szignifikánsan csökkentette a pancreas amiláz- és tripszinogén aktivitását, de nem befolyásolta a DNS tartalmát a kontrollhoz képest. A patkányok PDTC-tal, illetve MP-nal való előkezelése szignifikánsan mérsékelte ezeket a változásokat.

Az L-arginin injekció szignifikánsan fokozta a pancreas NSG tartalmát, a MDA és a karbonil-proteinek szintjét a kontrollhoz képest. 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.

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

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.

4.5.2. A metilprednizolon előkezelés hatása cholecystokinin-indukálta akut pancreatitisre

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. 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.

A CCK injekciók fokozták a pancreas TNF- α és IL-6 koncentrációját az idő függvényében. 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.

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

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.

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.

NF- κ B DNS kötődést a kontroll csoportokban szinte alig tudtunk kimutatni. A CCK injekciók az idő előrehaladtával fokozták a NF- κ B DNS-kötő aktivitást, melynek maximumát a 2. órában figyeltük meg. A 2 x 30 mg/kg MP előkezelés egyik időpontban sem befolyásolta a NF- κ B DNS-kötő aktivitását.

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

5. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

5.1. Igazoltuk, hogy a bázikus aminosavak közül az L-arginin mellett az L-ornitin és az L-lizin is képes nagy dózisban nekrotizáló akut pancreatitist kiváltani patkányban, míg a D-ornitinnek és az L-hisztidinnek 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.

5.2. 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. A bázikus aminosavakkal kiváltott akut pancreatitisben kimutattuk a betegségre jellemző főbb elváltozásokat: a tripszinogén és NF- κ B aktivációt, a citokinszintézist, a HSP expressziót, az oxidatív stresszt és a laborparaméterek változását. A patológiai vizsgálat szintén igazolta az akut pancreatitis jellegzetes szövettani eltéréseit (pl. interstitialis ödéma, gyulladásoos sejtek beszűrődése és acinussejtek vacuolisatioja, nekrozisa, apoptosisa).

5.3. 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- κ B aktivációját.

5.4. Megállapítottuk, hogy az L-arginines pancreatitis kezdeti időszakában (2. h) a szérum ornitin koncentráció nagyobb mértékben emelkedett az argininhez képest. 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.

5.5. Kimutattuk, hogy a pancreaticus SSAT aktiváció és a következményes spermidin katabolizmus - más pancreatitismodellekhez hasonlóan - az L-ornitin- és az L-lizin-indukálta

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.

5.6. Kísérleteink igazolták, hogy az L-arginin-indukálta akut pancreatitisben aktiválódik a NF- κ B transzkripciós faktor. A NF- κ B aktiváció gátlása az antioxidáns és gyulladásgátló PDTC, illetve MP előkezeléssel jótékony hatású volt L-arginin-indukálta akut pancreatitisben.

5.7. Vizsgálataink szerint a MP előkezelés nem befolyásolta a pancreaticus NF- κ B DNS kötődését CCK-indukálta akut pancreatitisben, de csökkentette a gyulladásos választ és ezen keresztül a betegség kialakulását. A MP jótékony hatását valószínűleg a NF- κ B DNS-kötődése után fejtí ki.

6. EREDMÉNYEK ÖSSZEGZÉSE ÉS MEGBESZÉLÉSE

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

6.1.1. Dózis-hatás vizsgálatok

Az *i.p.* adott bázikus aminosavak pancreas károsító hatása dóziszfüggő: 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. Egyes patkányok hatékonyabban metabolizálhatják az L-lizint, illetve technikai probléma lehetősége is felmerül (pl. bélbe oltás). Eredményeinkkel összhangban az L-arginin nagy dózisa (>5 g/kg *i.p.*) hamar megölte a patkányokat. A halálozás feltehetően valamilyen metabolikus komplikációból adódik.

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

Az L-arginin, L-ornitin és L-lizin által indukált súlyos akut pancreatitis modellekben feltérképeztük a betegség patogenezisében kulcsszerepet játszó tényezőket: a gyulladásos mediátorokat (pl. citokinek), illetve az azok szintéziséért felelős géneket szabályozó NF- κ B transzkripció faktort, a HSP-ket, és a szabadgyökös mechanizmusokat. Az equimoláris dóziszú (11,7 ml/kg 1,424 M/l) L-arginin metabolitok: az L-citrullin, L-ornitin és nitroprusszid-nátrium 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-arginin-indukálta akut pancreatitisben.

Az akut pancreatitis patomechanizmusáról leginkább elterjedt elmélet szerint a betegség egyik iniciáló faktora a tripszinogén acinussejteken belüli aktivációja és a pancreas szövet következményes önmérsztődése. Bázikus aminosavakkal kiváltott pancreatitis esetén ez nem feltétlenül van így. Az L-ornitin-, illetve az L-lizin-indukálta akut pancreatitisben a pancreas tripszin aktivitás szignifikáns növekedése csak az injekció után 9-48 órával következett be. Eredményeinkkel összhangban az L-argininnel kezelt rágszálókban a pancreas tripszin aktivitása csak a betegség kialakulásának későbbi fázisában nőtt meg szignifikánsan. 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.

A citoprotektív HSP-k szintézise a sejteket károsító stresszhatásra fokozódik. 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 HSP72 expressziójának fokozódása tehát már igen korán jelzi a pancreas válaszreakcióját a károsító ágenssel szemben.

A humán és az experimentális akut pancreatitis patomechanizmusában számos gyulladásos faktor vesz részt. E faktorok szabályozásáért nagyrészt a NF- κ B transzkripció

faktor a felelős. A pancreaticus I κ B- α degradáció és ezzel párhuzamosan a NF- κ B aktivációja proinflammatorikus citokinek (pl. IL-1 β , TNF- α) 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.

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- κ B aktivációt okoz. A jelenségek sorrendisége az akut pancreatitis kutatásban is vita tárgya.

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. A laboratóriumi eredményeket összegezve elmondhatjuk, hogy az L-lizin-indukálta akut pancreatitisben a mitokondriumok károsodása megelőzte a korai acináris tripszinogén- és NF- κ B aktivációt.

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 a 12-48. órában a nekrosis dominált a pancreas szövetben, ezen kívül számos apoptoticus testet is megfigyeltünk. Érdekes módon 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 L-ornitinnel végzett kísérleteinkben az apoptosist 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 metabolizálódnia kell). Az L-ornitinnel, illetve az L-lizinnel kezelt állatokból preparált pancreas minták elektronmikroszkópos képén dezorganizált endoplazmatikus retikulumokat láttunk, melyhez hasonlót az L-arginin-indukálta pancreatitisben is megfigyeltek. 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,

illetve Kishino és mtsai. 4 g/kg dózis esetén csak acinussejt nekrozist láttak gyulladásos infiltráció nélkül. Utóbbi megfigyelésre nem tudunk magyarázatot adni.

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. A komolyabb tüdőkárosodás hiánya több (súlyos) akut pancreatitismodell esetén is megfigyelhető. A pulmonáris szövödmény 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 nekrosis ellenére) szinte mindegyike túlélte a betegséget.

6.2. 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 NO-t), a gyulladásos mediátorok (NF- κ B, interleukinok), az endoplazmatikus retikulum stressz és a poliaminok szerepe. Bár egy ideig azt gondoltuk, hogy az L-arginin esetleg az L-ornitinen keresztül fejtheti ki az exokrin pancreas 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, az L-ornitin és az L-lizin alifás oldalláncának tulajdonítható, hiszen a hatástalan L-hisztidin egy imidazol gyűrűt tartalmaz. Másrészt az sem zárható ki, hogy az L-arginin, L-ornitin és L-lizin toxikus hatása - legalábbis részben - erős pozitív töltésüknek is tulajdonítható, hiszen az L-hisztidin az előzőekhez képest a legkevésbé bázikus hatású.

6.3. A bázikus aminosavakkal kiváltható akut pancreatitis hasznosíthatósága

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- κ B aktiváció, a citokinszintézis, 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, nekrozisa, 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- κ B aktiváció előtt megjelentek. Azt is meg kell jegyezni, hogy ezek a pancreatitismodellek nem ideálisak az extrapancreaticus szövődmények vizsgálatára.

Az L-ornitin-indukálta akut pancreatitismodellt már más kutatócsoportok is sikeresen használták. 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.

6.4. A poliaminok szerepe akut pancreatitisben

A poliaminok szerepére akut pancreatitisben először Alhonen és mtsai. által kifejlesztett transzgenikus patkányok világítottak rá, melyek overexpresszálják a SSAT enzimet. A pancreas poliamin szintjének 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 L-ornitin-, illetve L-lizin-indukálta akut pancreatitisben is fokozott pancreaticus spermidin katabolizmust találtunk, melyet valószínűleg a SSAT aktiváció mediál. A poliamin katabolizmus a pancreasra specifikus elváltozás, hiszen a tüdő spermidin szintjének csökkenését kivéve az L-ornitin kezelés hatására a poliamin szintek 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 poliamin szintjeinek 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-ornitin- és az L-lizin-indukálta pancreatitis iniciációjában. A pancreas károsodás csúcsán (24-72. óra) igen kifejezett poliamin katabolizmus volt megfigyelhető.

A szintetikus α -metilált poliamin analógok, mint pl. a MeSpd, a természetes poliaminokhoz képest metabolikusan jóval stabilabbak, mivel nem szubsztátja a SSAT-nak és gyenge szubsztátja a spermin szintáznak. Mindezek mellett az analógok képesek ellátni a természetes poliaminok celluláris funkcióit. A metilált poliamin származékok a poliamin transzportban szerepet játszó proteinek szubsztátjai, és akumulálódnak a pancreasban az *i.p.* adminisztrációt követően. A MeSpd előkezelés teljesen kivédte a cink-indukálta akut pancreatitis kialakulását SSAT-t overexpresszáló transzgenikus patkányokban. A pancreas spermidin szint 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.

6.5. 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. 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 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, 60 μ M 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. 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 arginázaktivitás 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. Magunk is a proinflammatorikus citokinek koncentrációjának csökkenését találtuk a szérumban. Utóbbiak miatt nem tudjuk kizárni az AIHA kezelés hatására indukálódó HSP-k sejtvédő hatását.

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-, károsító- vagy semleges hatása van-e az akut pancreatitis kialakulására. Fontos üzenete a munkánknak, hogy a NO önmagában nem elég az L-arginin (L-ornitin)-indukálta pancreatitis kialakulásához. A 3,5 g/kg L-arginin *i.p.* injekcióját követően a szérum citrullin koncentráció 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 pancreas szövettani károsodását. Az L-ornitin-indukálta pancreatitismodell használata jobb lehet az L-argininénél, hiszen az előbbi esetben nincsen jelentős NO képződés, ami befolyásolhatja a pancreatitis súlyosságát.

6.6. Nukleáris faktor- κ B aktiváció és annak gátlása akut pancreatitisben

Eredményeink szerint a szupramaximális dózisban adott CCK és a nagy dózisú L-arginin, L-ornitin és L-lizin *i.p.* injekciója is NF- κ B aktivációt okoz. Irodalmi adatok szerint mostanra már elég egyértelmű, hogy az akut pancreatitis patogenezisében a NF- κ B igen fontos

szerepet játszik. A transzkripciós faktor aktivációjának időbeli lefutása viszont pancreatitismodellenként változik, mint ahogy az nálunk is megfigyelhető volt. Míg a nagy dózisú CCK- vagy cerulein kezelés egérben és patkányban egészen korai (a kezelést követő első 15 percben) pancreaticus NF- κ B aktivációt okoz, addig ez a bázikus aminosavakkal kiváltott pancreatitis esetén jóval később következett be.

A glükokortikoidok igen potens gyulladásgátló gyógyszerek. Vizsgálataink szerint a MP előkezelés CCK-, illetve L-arginin-indukálta akut pancreatitisben is jótékony hatású volt. Az irodalmi adatok többsége szerint a proinflammatorikus transzkripciós faktor gátlása hatásos az akut pancreatitis kivédésére. Mindezek ellenére a szteroidok súlyos nekrotizáló pancreatitisben való használata a mai napig vitatott kérdés.

Az antioxidáns PDTC alacsonyabb dózisok (1- és 10 mg/kg) esetén szintén mérsékelte az L-arginin-indukálta pancreatitis súlyosságát. A NF- κ B 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- κ B aktiváció és a következményes gyulladással citokinszintézis gátlására CCK-, taurokolsav- vagy pancreas ductus ligatio-indukálta pancreatitisben. Eredményeinkkel összhangban a PDTC számos pancreatitismodellben gátolta a NF- κ B aktivációt.

7. 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- κ B 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 epe-savak nagy koncentrációban csökkentik az intracelluláris ATP szintet.

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

dc_256_11

transzgenikus egerekben indukáljunk akut pancreatitist, melyeknek a ductalis HCO_3^- 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.

8. KÖZLEMÉNYJEGYZÉK

8.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Rakonczay Z Jr**, Duda E, Kaszaki J, Iványi B, Boros I, Lonovics J, Takács T. The anti-inflammatory effect of methylprednisolone occurs down-stream of nuclear factor- κ B 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- κ B activation is detrimental in arginine-induced acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med* 34:696-709 (2003)

IF: 5,063

3. **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, Czákó L. L-arginine-induced 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- κ B 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, Odínokova 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
9. 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
11. 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
12. 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
13. 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

8.2. A Ph.D. fokozat megszerzését követő időszak egyéb közleményei

1. **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

2. **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)
7. 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
10. 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 proteasome 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 proteasome 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⁻ transport is involved in

the stimulatory effect of bile acids on apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 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^+/H^+ 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 non-conjugated 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 Ca^{2+} -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, Zsembéry 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

8.3. A Ph.D. értekezésben szereplő közlemények

1. 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
3. **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

9. SCIENTOMETRIAI ADATOK

MTMT tudományometriai 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	<u>48</u>	---	---	---
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	---	---	---
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⁺	<u>1</u>	---	<u>5</u>	<u>5</u>
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 folyóiratcikket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikket is	---	0	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	<u>7</u>	<u>7</u>	<u>13</u>
VII. Absztrakt	<u>125</u>	---	<u>11</u>	<u>12</u>

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

Speciális tudánymetria	
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> (40)
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>

10. 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 biztatásért. Megkülönböztetett köszönettel tartozom laborvezető-társamnak, **Dr. Hegyi Péternek**, 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 Jánosnak** és **Prof. Dr. Wittmann Tibornak**, 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 Andrásnak**, 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 vezetékszekréciójának 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. Odínokova 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. Venglovecz Viktória és Dr. Szöllősiné Dr. Varga Ilona.**

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

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.