

OTKA ZÁRÓJELENTÉS (2003-2005)

Szám: 42589

Cím: **Intracelluláris védekező mechanizmusok akut pancreatitisben: Kísérletes és klinikai vizsgálatok**

(Vizsgálataink folytatását képezik a korábbi OTKA (T29697) támogatás segítségével megkezdett kutatásoknak)

A gyulladással megbetegedések (artritisek, gyulladással bélbetegségek, sclerosis multiplex, stb.) során létrejövő intracelluláris folyamatok részleteinek megismerése az elmúlt években jelentősen felgyorsult. Az hasnyálmirigy heveny gyulladásának specifikuma, hogy a minden sejtre jellemző **környezet-cytoplazma-sejtmag interakciók** mellett az acinussejt olyan inaktív **emésztőenzimeket** (proteázok, lipolyticus enzimek, amylase, stb) termel, melyek a gyulladás kiváltásának korai fázisában fontos szerepet játszanak. Az intracelluláris történések központi szereplői azok a **transzkripciós faktorok** (pl. NF- κ B), **proteoszomák**, **hősokk fehérjék**, **oxigén-eredetű szabadgyökök** és **cytokinek**, melyek experimentális vizsgálatával kapott eredményeink az akut pancreatitis kialakulását új megvilágításba helyezték. Az eredmények alapján az akut pancreatitis klinikai/gyógyszeres kezelésére is számos új lehetőség kínálkozik. Humán vizsgálataink a fenti tényezők **genetikai hátterének** megismerését célozták.

Kísérletes vizsgálatok:

Az NF- κ B transzkripciós faktor szerepe a kísérletes pancreatitis patogenezisében:

A gyulladás során aktiválódó és fokozottan expresszáldó proinflammatorikus gének (interleukinek, kemokinek, adhéziós molekulák, ezek receptorai és enzimek) szabályozásában szerepet játszó egyik legfontosabb pluripotens intracelluláris transzkripciós faktor az ún. nukleáris faktor kappa B (NF- κ B). A legtöbb sejt citoplazmájában inaktív formában található gátló fehérjékhez (I κ B -k) kötődve. Gyulladással stimulúra az I κ B foszforilálódik, a proteoszómákban degradálódik, ílymódon felszabadul az NF- κ B nukleáris lokalizációs szignál, ami a nukleusba jutva a gyulladással gének promoter régiójához kötődik és aktiválja azt. *Vizsgálataink az NF- κ B meghatározás metodikájának kidolgozását, a kísérletes pancreatitis modellekben az NF- κ B szerepének feltérképezését, és az aktivációját gátló anyagok vizsgálatát, szintetikus előállítását célozták.*

Eredmények:

- Arginin (Arg)-indukálta kísérletes pancreatitis során /hasonlóan a taurokólsavval (Na-Tc) és cholecystokininnel (CCK) kiváltott pancreatitishez/ az Arg specifikus és dózis-függő NF- κ B aktivációt okoz (2,5).
- Az NF- κ B aktiváció **elektroforetikus mobility shift (EMSA)** módszerrel direkt módon, valamint a következményes cytokin és hősokk fehérje (HSP) szintézis kimutatásával indirekt módon is jellemezhető (2)
- **Pyrrolidin dithiocarbamát (PDTC)** és **methylnprednisolon (MP)** előkezelés blokkolja az NF- κ B aktivációt (2).
- MP előkezelés nem volt hatással az NF- κ B DNS kötődésére, így hatása ettől downstream valószínűsíthető (1).

- Az NF- κ B aktiváció gátlásával mérsékelhetők a pancreatitis laboratóriumi és morfológiai jelei is (1,2)
- **Hydrocortison** (HC) és **dexamethazon** (DX) kis dózisaik ugyancsak csökkentették a Na-Tc-kiváltotta pancreatitis laboratóriumi és morfológiai jeleit. A **steroid receptor antagonist RU-38486** fokozta a pancreatitis indukálta gyulladási jeleket (1,2,7).
- Peptidszintézis során **NF- κ B gátló peptidet (PN50)** ill. ezt a sejtbe transzportáló penetratin analógot állítottunk elő, melyek alkalmazásával mind az elő- mind pedig az utókezelés jelentősen csökkentette a CCK-indukálta kísérletes pancreatitis súlyosságát (12). A PN50 hatására a pancreatitis során az apoptózis/necrosis arány az előbbi felé tolódott, ami a pancreatitis elleni védelem fontos eleme (12).
- Az általunk szintetizált **MG132** tripeptid (Z-Leu-Leu-Leu-aldehyd) **proteaszóma inhibitor** hatása révén jelentősen gátolta az I κ B degradációját és a következményes NF- κ B aktivációt. Ez a magyarázata annak, hogy az MG132 elő- és utókezelés egyaránt jelentősen csökkentette a CCK-kiváltotta kísérletes pancreatitis súlyosságát (14).
- Igazoltuk, hogy az Arg nagy dózisaival kiváltott akut pancreatitis és a CCK-indukálta akut pancreatitis kialakulásában is intenzív szabadgyökös reakciók játszanak kulcsszerepet. **Scavenger** hatású anyagokkal (**melatonin, resveratrol**) jelentősen csökkenthető volt mind a pancreatitis mortalitása mind pedig annak laboratóriumi és szövettani jelei. Ismeretes, hogy a szabadgyökök képesek direkt módon az NF- κ B aktiválására, így végső soron a fenti molekulák is a transzkripció faktor gátlása révén fejtik ki protektív hatásukat (15,16).

Hősök fehérjék szerepe a kísérletes pancreatitis elleni védelemben:

A hőssok fehérjék (HSP-k) a sejtek intracelluláris védekező rendszerének egyik legfontosabb tényezői. A sejt fehérjéinek szállításában, térszerkezetének létrehozásában és fenntartásában, lebontásában játszanak szerepet a sejt nyugalmi állapotában is, de különösen stressz hatását követően. Hő, kémiai, fizikai stb. ingerekre a HSP-k szintézise jelentősen megemelkedik ami fontos védelmet jelenet a sejt számára. A HSP-eket molekula tömegük szerint csoportosíthatjuk. *Az előző OTKA támogatás folytatásaként vizsgáltuk a HSP-k szerepét a kísérletes pancreatitis elleni védelemben, összefüggéseit a gyulladási mediátorok (cytokinek, szabadgyökök) változásával és a HSP-indukció termikus és gyógyszeres lehetőségeit.*

Eredmények:

- A **glucocorticoidok** és a steroid receptor antagonist (**RU-34486**) hatását vizsgálva a kísérletes akut pancreatitisben megállapítottuk, hogy a korai fázisban a steroidok mérsékelik a pancreatitis súlyosságát, később növelik a betegség túlélését. Az RU-34486 hatása ezzel ellentétes (7). Igazoltuk, hogy a steroidok fenti hatását a HSP szintézis (főként **HSP60, HSP72**) fokozása révén fejtik ki: a steroid adagolással kiváltott fokozott HSP szintézist során a CCK-indukálta pancreatitisben is csökkent a következményes cytokin és szabadgyök termelés és a pancreatitis súlyossága (1,7).
- A humán akut pancreatitis kiváltásában az alkohol központi szerepet játszik. Kísérletes körülmények között patkányban modelleztük az **alkohol hatását** és vizsgáltuk összefüggését a HSP termeléssel. Megállapítottuk, hogy mind az akut mind pedig a chronicus alkohol adagolás szabadgyökös reakciókat indukál

a májban ill. a pancreasban. Az alkohol azonban nem befolyásolja a sejtek HSP szintetikus kapacitását (4).

- A HSP-k jelentőségét a pancreas ép és kóros működése során összefoglaló közleményben adtuk közre (3).

Gyulladásos mediátorok szerepe kísérletes acut pancreatitisben

A pro-inflammatorikus mediátorok szerepe az acut pancreatitis kialakulásában és lefolyásában intenzíven tanulmányozott terület, hiszen kiderült: a betegség prognózisa a mediátorok által kiváltott gyulladásos válaszreakció szindróma intenzitásától és a következményes többszervi elégtelenség kialakulásától függ. A genetikusan determinált gyulladásos válaszreakció a fentiekben már érintett intracelluláris tényezők révén jut kifejezésre. *Vizsgálataink a gyulladás során létrejött cytokin- és szabadgyök felszabadulás, az apoptosis kialakulása és az ezeket befolyásoló gyógyszeres kezelés lehetőségeinek feltérképezését célozták.*

Eredmények:

- A kísérletes acut pancreatitis számos típusában (CCK-, Arg-, ischemia-reperfüzió, Na-Tc-kiváltotta) igazoltuk a **cytokinek** (TNF- α , Il-6) és **szabadgyökök** (malonyl-dialdehid /MDA/, carbonyl proteinek, stb.) felszabadulásának dózis- és időfüggését (1,2,4,5,6,7,9,11,12,14,15,16).
- Na-Tc intraduktális adagolásának és **ischemia-reperfüzió** kiváltásának kombinálásával patkányban létrehozott nekrotizáló pancreatitis kialakulásában igazoltuk a gyulladásos cytokinek, a **nitrogén monoxid** patogenetikai szerepét. Igazoltuk, hogy a fenti modellben is megfigyelhető az apoptózis és a necrózis közötti fordított arányosság: az **apoptosis** fokozásával mérsékelhető a necrosis mértéke (9).
- Na-Tc-kiváltotta pancreatitisben nyúlban az **octreotid** előkezelés jelentősen csökkentette a betegség súlyosságát. Ebben a kedvező hatásban az octreotid pro-inflammatorikus cytokinek szintézisét gátló hatása lehetett igazolni (6).
- Az Oddi sphincter (OS) pancreatitist kiváltó szerepét vizsgálva megállapítottuk, hogy az **alkohol** dózisfüggően gátolja a nyúl bazális, carbachol, erythromycin és CCK-stimulálta OS motilitását. Ez a helyzet lehetőséget teremt a bilio-pancreaticus reflux kialakulására (10).
- Megállapítottuk, hogy a CCK-val kiváltott pancreatitist követő regeneráció diabeteses patkányban jelentősen elmarad a kontrollhoz képest. A regeneráció folyamata exogén **inzulin** adásával meggyorsítható, azaz a peptid jelenléte elengedhetetlen a normális regeneráció folyamatában (8).

Klinikai vizsgálatok:

Az humán acut pancreatitis lefolyásában a kísérletes vizsgálatokban igazolt tényezők, így a gyulladásos mediátorok közül a cytokinek (pl. **TNF- α**), az ezek felismerését lehetővé tevő receptorok (pl. **CD14**) és a hősokk fehérjék is fontos szerepet játszanak. Felmerült, hogy genetikai vizsgálatokkal tanulmányozzuk a fenti **fehérjéket kódoló gének polymorfizmusát**, mely magyarázhatja a pancreatitis lefolyásában észlelhető egyedi különbségeket. Eredményeink arra utalnak, hogy a humán acut pancreatitis súlyosságát a TNF- α gén polymorfizmusa, és a CD14 LPS receptor polymorfizmusa lényegesen nem befolyásolja. A **HSP70-2G** allél előfordulása azonban jelentősen gyakoribb volt a súlyos nekrotizáló formákban, ami az intracellulárisan csökkent védekező mechanizmus kóroki szerepére utal (11). A módosított gének pancreasba juttatása új lehetőséget nyithat a gyulladásos

betegségek kezelésében. Az erre vonatkozó kísérletes vizsgálataink során **először sikerült genetikailag módosított pseudorabies vírust (PSV) juttatni patkány pancreas ductus epithél sejtekbe** anélkül, hogy az a ductus működését befolyásolta volna. A vírus a későbbiekben egyéb gének bejuttatásának vektoraként szerepelhet (13).

Közlemények:

1. Rakonczay Z. Jr., Duda E., Kaszaki J., Iványi B., Hegyi P., Boros I., Lonovics J., **Takács T.**: The anti-inflammatory effect of methylprednisolone is independent of NF-kappa B and HSP72 induction in cholecystokinin-octapeptide-induced acute pancreatitis in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 464 (2-3): 217-227, 2003.
IF: 2.164
2. Rakonczay Z. Jr., Jármay K., Kaszaki J., Mándi Y., Duda E., Hegyi P., Boros I., Lonovics J., **Takács T.**: NF-kappa B activation is detrimental in arginine-induced acute pancreatitis. *Free Rad. Biol. Med.* 34 (6): 696-709, 2003.
IF: 5.533
3. Rakonczay Z. Jr., **Takács T.**, Boros I., Lonovics J.: Heat shock proteins and the pancreas. *J. Cell Physiol.* 195 (3): 383-391, 2003.
IF: 4.845
4. 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 protein in rats. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 18: 858-867, 2003.
IF: 1.521
5. Hegyi P., Rakonczay Z. Jr., Sári R., Góg C., Lonovics J., **Takács T.** and Czakó L.: L-arginine-induced experimental pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* 10 (14): 2003-2009, 2004.
IF: 3.318
6. Czakó L., Hegyi P., **Takács T.**, Góg C., Farkas A., Mándi Y., Varga I.S., Tiszlavicz L., and Lonovics J.: Effects of octreotide on acute necrotizing pancreatitis in rabbits. *World J. Gastroenterol.* 10 (14): 2082-2086, 2004.
IF: 3.318
7. Paszt A., **Takács T.**, Rakonczay Z., Kaszaki J., Wolfard A., Tiszlavicz L., Lázár G., Duda E., Szentpáli K., Czakó L., 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 (1): 75-82, 2004. IF: 1.456
8. Hegyi P., Rakonczay Z., Sári R., Czakó L., Farkas N., Góg C., Németh J., Lonovics J., **Takács T.**: Insulin is necessary for the hypertrophic effect of cholecystokinin-octapeptide following acute necrotizing experimental pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* 10 (15): 2275-2277, 2004.
IF: 3.318
9. Leindler L., Morschl E., Laszló F., Mandi Y., **Takács T.**, Jarmay K., Farkas G.: Importance of cytokines, nitric oxide and apoptosis in the pathological process of necrotizing pancreatitis in rats. *Pancreas* 29 (2): 157-161, 2004.
IF: 1.456
10. Sári R., Pálvölgyi A., Rakonczay Z., **Takács T.**, Lonovics J., Czakó L., Szilvássy Z., Hegyi P.: Ethanol inhibits the motility of rabbit sphincter of Oddi in vitro. *World J. Gastroenterol.* 10 (23): 3470-3474, 2004.
IF: 3.318
11. Balog A., Gyulai Z., Boros L.G., Farkas G., **Takács T.**, Lonovics J., Mándi Y.: Polymorphism of the TNF-alpha, Hsp-70-2, and CD14 genes increases susceptibility to severe acute pancreatitis. *Pancreas* 30 (2): e46-50, 2005.
IF: 1.456
12. Letoha T, Somlai Cs, **Takács T.**, Szabolcs A, Jármay K, Rakonczay Z, 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.
IF: 3.382

13. Hegyi P., Ördög B., Rakonczay Z., **Takács T.**, Lonovics J., Szabolcs A., Sári R., Tóth A., Papp G.J., Varró A., Kovács M., Gray M.A., Argent B.E., Boldogkői Z.: The effect of herpesvirus infection on pancreatic duct cell secretion. *World J. Gastroenterol.* 11 (38): 5997-6002, 2005.
IF: 3.382
14. Letoha T., Somlai C., **Takács T.**, Szabolcs A., Rakonczay Jr Z., Jármy 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 Rad. Biol. Med.* 39: 1142-1151, 2005.
IF: 5.625
15. Szabolcs A., Reiter R.J., Letoha T., Hegyi P., Papai G., Varga I., Jarmay K., Kaszaki J., Sari R., Rakonczay Z., Lonovics J., **Takács T.**: Effect of melatonin on the severity of L-arginine-induced experimental acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12 (2): 251-258.
IF: 3.82
16. Szabolcs A., Varga IS., Varga C., Berkó A., Kaszaki J., Letoha T., Tizslavicz L., Sári R., Lonovics J., **Takács T.**: Beneficial effect of resveratrol on cholecystokinin- induced experimental *pancreatitis. *Eur J Pharmacol* 2006 (accepted).
IF: 2.432