

A TRIPSZIN ÉS AZ EPESAVAK SZEREPE
AKUT ÉS KRÓNIKUS PANKREATITISZBEN

Doktori értekezés
magyar nyelvű kivonata

Ózsvári Béla

Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola
A gasztrointesztinális rendszer működése ép és kóros körülmények között
című Doktori Program



Témavezetők:
Dr. Hegyi Péter és Dr. Rakonczay Zoltán
SZTE-ÁOK, I. sz. Belgyógyászati Klinika,
Gasztrointesztinális Sejtélettani és Patofiziológiai Munkacsoport

Szeged
2008

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés anyagát képező közlemények:

1) **Ózsvári B**, Sahin-Tóth M, Hegyi P. The guinea pig pancreas secretes a single trypsinogen isoform, which is defective in autoactivation. *Pancreas* (elfogadva)

Impakt faktor: 2,12

2) Rosendahl J, Witt H, Szmola R, Bhatia E, **Ózsvári B**, Landt O, Schulz HU, Gress TM, Pfützer R, Löhr M, Kovacs P, Bluher M, Stumvoll M, Choudhuri G, Hegyi P, Morsche RHM, Drenth JPH, Truninger K, Macek M Jr, Puhl G, Witt U, Schmidt H, Buning C, Ockenga J, Kage A, Groneberg DA, Nickel R, Berg T, Wiedenmann B, Bodeker H, Keim V, Mossner J, Teich N, Sahin-Tóth M. Chymotrypsin C (CTRC) alterations that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. *Nature Genetics* 2008; 40:78-82.

Impakt faktor: 24,18

3) Venglovecz V, Rakonczay Z Jr, **Ózsvári B**, Takács T, Lonovics J, Varró A, Gray MA, Argent BE, Hegyi P. Differential effects of bile acids on pancreatic ductal bicarbonate secretion in guinea pig. *Gut* (bíráló alatt)

Impakt faktor: 9,002

4) Hegyi P, **Ózsvári B**, Ignáth I, Venglovecz V, Rakonczay Z Jr, Takács T, Borka K, Schaff Zs, Papp Gy J, Tóth A, Varró A, Sahin-Tóth M, Lonovics J. The effects of trypsin on pancreatic PAR-2 receptors. *Pancreas*, 2006; 33: 468-469 (absztrakt)

5) Ignáth I, **Ózsvári B**, Venglovecz V, Rakonczay Z Jr, Takács T, Lonovics J, Borka K, Schaff Z, Tóth A, Varró A, Sahin-Tóth M, Hegyi P. Localization and functional characterization of PAR-2 receptor in guinea pig pancreatic duct cells. *Pancreatology*, 2006; 6:326 (absztrakt)

Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó közlemények:

4) Tóth-Molnár E, Venglovecz V, **Ózsvári B**, Rakonczay Z Jr, Varró A, Tóth A, 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*, 2007;48:3746-55.

Impakt faktor: 3,64

5) 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* (elfogadva)

Impakt faktor: 2,12

Tudományometriai adatok:

Megjelent közlemények száma:	4
Összesített impakt faktor:	41,06
Megjelent absztraktok száma:	15
Tudományos előadások száma:	22

BEVEZETÉS

A pankreatitisznek, a hasnyálmirigy gyulladáisos megbetegedésének, két fő típusa ismert: akut és krónikus. Akut pankreatitisz leggyakrabban a Vater ampullába történő epekő beékelődés során alakul ki, míg a krónikus pankreatitisz kialakulása mögött elsősorban túlzott alkoholfogyasztás áll. Az örökletes krónikus pankreatitisz a krónikus gyulladás egyik ritka típusa, mely általában fiatalabb korban jelentkezik, és egyes családokban halmozottan fordul elő.

Általánosan elfogadott, hogy az akut pankreatitisz kialakulásának elsődleges folyamatai az acinussejtben történnek, és ennek létrejöttében a tripszin kulcsfontosságú szerepet játszik. A tripszinogén, a hasnyálmirigy legfőbb emésztőenzime, mely a többi enzimmel együtt inaktív formában, zimogénként termelődik. Fiziológias körülmények között a tripszinogén kizárólag a nyombélben aktiválódik a bélhámsejtek felszínén található enteropeptidáz hatására. A humán hasnyálmirigy három tripszinogén izoformát termel: a kationos-, anionos- és mezotripszinogént.

A kimotripszinogén a második proenzim a pankreász proteáz kaszkádban, aktivációja specifikusan tripszin által következik be. Köztudott, hogy a tripszinogén és a kimotripszinogén hasonló molekulák. A legnagyobb eltérés szubsztrátspecificitásukban van, mivel a tripszin arginin és lizin oldalláncok mellett, míg a kimotripszin főként aromás aminosavak (fenilalanin, triptofán és tirozin) mellett hasít. A humán hasnyálmirigy legfőbb kimotripszinogén izoformái a B1 és B2, míg a C izoforma kisebb mennyiségben termelődik. Egy nemrég közölt tanulmány arról számolt be, hogy ezen izoforma egyedülálló proteáz aktivitással rendelkezik, és a humán kationos tripszinogén aktiválásában, illetve a tripszin lebontásában játszik kulcsszerepet. Magas kalciumszint jelenlétében (például a duodenumban) serkenti a tripszinogén aktivációját, míg alacsony kalciumszint esetén (további bélszakaszokon) annak lebontását segíti elő.

Az elmúlt évtizedben a krónikus pankreatitisz genetikai hátterének feltárásában jelentős eredmények kerültek publikálásra. A humán kationos tripszinogén és a humán hasnyálmirigy eredetű tripszin inhibitor génben számos mutációt találtak. Az ezzel

kapcsolatos *in vitro* kísérletek sok esetben a tripszinogén fokozott autoaktivációját, illetve a tripszin inhibitor szekréciójának hiányát mutatták. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a hasnyálmirigyben fiziológias körülmények között jelenlévő kismértékű tripszinogén aktiváció, és a képződött tripszin inaktivációjának egyensúlya megbomolhat, így feltehetőleg ezek a folyamatok vezetnek kórosan megnövekvő tripszinaktivitáshoz a szövetben.

Az akut pankreatitisz *in vivo* kísérleti modelleivel lehetővé vált a gyulladás patogenezisének vizsgálatára. A leggyakrabban alkalmazott kolecisztokinin-analóg cerulein szupramaximális dózisban patkányban enyhe ödémás, míg egérben súlyos nekrotizáló akut pankreatitist idéz elő. Más modellek esetén L-arginint vagy epesavat fecskendeznek a kísérleti állatokba (intraperitonealisan illetve intraduktálisan), melyek hatására nekrotizáló akut pankreatitisz alakul ki. Évek óta használnak kísérletes pankreatitisz modelleket patkányban és egérben, azonban tengerimalacban végzett kísérletekről csak néhány közlemény számol be. Ennek egyik oka az lehet, hogy a tengerimalacban nehezebb kiváltani akut hasnyálmirigygyulladást.

Az epe- és a hasnyálmirigyvezeték egy közös kivezetőnyíláson, a Vater ampullán keresztül nyílik a duodenumba. Emiatt az anatómiai elhelyezkedés miatt az epevezetékben leszállt és oda beékelődött epekő zavart okozhat a hasnyálmirigy működésében, mely végül akut pankreatitisz kialakulásához vezethet. Az epekő egyes esetekben felvándorolhat a hasnyálmirigyvezetékben, melynek következtében a különböző epesavak befolyásolhatják az acinusok és a vezetéket képző epitélisejtek működését.

Az epesavak koleszterin molekulákból képződnek a májsejtekben, melyek a sejtből történő szekréció előtt glicin vagy taurin aminosavakkal konjugálódnak. Dekonjugálódásukat egyes baktériumok hozzák létre.

Számos tanulmány foglalkozik az epesavak acinussejtre gyakorolt hatásával, melyekben leírják, hogy az epesavak inozitol-trifoszfát függő intracelluláris kalciumfelszabadulást váltanak ki az acinussejtben, mely akár az adott sejt halálához is vezethet. Kimutatták, hogy magas dózisban (1-15 mM) az epesavak akár 20,000 dalton nagyságú molekulák számára is permeabilizálhatják a duktális epitélisejtek membránját, és lecsökkentik az

epitelsejtek transzepteliális rezisztenciáját. Elmondható tehát, hogy az epesavak által okozott toxicitás fontos szerepet játszhat a sejtkárosodásban mind az acinus mind a duktális epitelsejtekben.

A proteázok által aktivált receptorcsalád (PAR) felfedezésével nyilvánvalóvá vált, hogy az emésztőenzimeknek nem csak fehérjebontó funkciója van, hanem szignálmolekulaként is működhetnek. Kimutatták, hogy a tripszin a receptorcsalád tagjai közül legnagyobb mértékben a PAR-2 típust aktiválja, melynek expresszióját már leírták kutya, marha és humán hasnyálmirigy acinus- és duktuszeptelsejtekben. Mindez azt mutatja, hogy az akut pankreatitisz korai szakaszában aktiválódott tripszinek stimulálják a hasnyálmirigyvezeték epitelsejteket, melyek fontos védőszerepet játszhatnak a gyulladás továbbterjedésének megakadályozásában.

CÉLKITŰZÉSEK

I. A tengerimalac hasnyálmirigy által termelt tripszinogén izoformák száma és jellege ezidáig még feltáratlan maradt, így célunk volt ennek megvalósítása a következőképpen:

I/1. Tengerimalac tripszinogén cDNS variánsok klónozása.

I/2. Tripszinogén fehérjék ekotin-affinitás és kationcserélő kromatográfiás eljárásokkal történő izolálása.

I/3. Izoformák karakterizálása különböző biokémiai mérésekkel.

II. Egy nemrég megjelent tanulmány szerint a humán kimotripszin C mindhárom humán tripszin(ogén) specifikus lebontására képes. Célul tűztük ki ezen fehérje pankreatitisz kialakításában betöltött szerepének vizsgálata, mely során a következőket végeztük el:

II/1. Idiopátiás (ismeretlen eredetű), vagy örökletes krónikus pankreatitiszben szenvedő német betegekben előforduló kimotripszin C mutációk keresése.

II/2. A betegekben leggyakrabban előforduló kimotripszin C mutációk funkcionális vizsgálata, mely során a mutációk fehérje expressziójára, illetve aktivitására kifejtett hatását határoztuk meg.

III. Az akut pankreatitisz korai fázisában az aktiválódott tripszin illetve az epesavak befolyásolhatják a hasnyálmirigyvezeték epitélisejtek működését, ezért a következő célokat tűztük ki:

III/1. A tripszin hasnyálmirigyvezeték epitélisejtek intracelluláris kalcium koncentrációjára kifejtett hatásának meghatározása, illetve a PAR-2 receptor expressziójának vizsgálata tengerimalac hasnyálmirigyben.

III/2. Epesavak hatásának meghatározása a hasnyálmirigyvezeték epitélisejtek intracelluláris kalcium koncentrációjára.

MÓDSZEREK

I. Klónozás. A tengerimalac tripszinogén izoformák klónozása során a pankreász homogenizátumból elsőként mRNS-t izoláltunk, majd az mRNS-t cDNS-sé írtuk át. A tripszinogén konzervatív régiójára tervezett primerekkel PCR reakciókat végeztünk, a kapott termékeket plazmid vektorba helyeztük, majd megszekvenáltattuk. A kapott cDNS szekvenciák alapján állítottuk össze a tripszinogén teljes aminosavsorrendjét.

Tripszinogén izoformák tisztítása. A tengerimalac pankreász homogenizátumot ekotin-affinitás oszlopra vittük fel (ekotin: szerin proteáz inhibitor). A kapott eluátumot ezután Mono S kationcserélő kromatográfiának vetettük alá. A frakcionált mintákat további aktivitásmérésekkel, gélfuttatást követően a fehérjesávokat Coomassie Brilliant Blue R-250-nel történő festéssel vizsgáltuk.

Enzimaktivitás mérések. A tengerimalac tripszinogént enteropeptidázzal, katepszin B-vel és tripszinnel aktiváltuk. A minták tripszin aktivitását fotometriás módszerrel, szintetikus (arginin tartalmú) kromogén szubsztrát mennyiségének hasításából állapítottuk meg.

II. Genetikai vizsgálatok. A mutációk keresését Dr. Heiko Witt (Charité Egyetemi Klinika, Hepatológiai és Gasztroenterológiai Osztály, Berlin), Dr. Niels Teich (Lipcsei Egyetem, Gasztroenterológiai és Hepatológiai Osztály, Lipcse) és Dr. Eesh Bhatia (Sanjay Gandhi Posztgraduális Orvosi Intézet, Lucknow, India) laboratóriumaiban végezték direkt DNS szekvenálással.

Plazmidok készítése. A humán kimotripszin C cDNS-ét eukarióta expressziós vektorba klónoztuk. A variánsokat PCR mutagenézissel állítottuk elő, majd ezeket is vektorba klónoztuk. A fehérjéhez kapcsolt epitópot (Glu-Glu jelölés a Western-blot analízishez)

szintén PCR-rel illesztettük be a konstrukciókba.

Tranziens transzfekciók. Humán embrionális veseepítelsejteket (HEK 293T) és patkány acinussejteket (AR42J) tranziensen transzfektáltunk az egyes kimotripszin C variánsokat kódoló natív, illetve epitóppal jelölt konstrukciókkal. A transzfekciót követően, a sejtek médiumából történő mintavétellel, 48 órán keresztül követtük a szecernált kimotripszin C aktivitását, mely aktivitásmérést fotometriás módszerrel végeztük. Az epitóppal jelölt konstrukciókkal transzfektált acinussejteket 48 órás inkubáció után ceruleinrel stimuláltuk, majd a médiumból vett mintákat immunoblotnak vetettük alá.

Kimotripszin C aktivitás meghatározása. A transzfekciót követően a mintavétel során nyert kimotripszin C tartalmú médiumot tripszinnel aktiváltuk 20 percig 37 °C-on. A kimotripszin C aktivitását fotometriásan, szintetikus kromogén (fenilalanin vagy leucin tartalmú) szubsztráttal vizsgáltuk.

Western blot. A transzfektált sejtek médiumait SDS-poliakrilamid gélelektroforézisnek vetettük alá, majd Immobilon-P (Millipore) membránra transzferáltuk. A médiumba szecernált kimotripszin C mennyiségének megállapításához az epitóp ellen termelt monoklonális antitestet használtuk. A transzfektált sejt kivonatok szintén az epitóp ellen termelt ellenanyag felhasználásával vizsgáltuk meg.

III. Primer hasnyálmirigy vezetékek izolálása. Tengerimalac hasnyálmirigyét kollagenázzal emésztettük 37 °C-on 30 percig, ezt követően mikrodisszekciós módszerrel intra- és interlobuláris hasnyálmirigy vezetékeket izoláltunk, majd a primer vezetékeket 37 °C-os CO₂ inkubátorban 24 órán keresztül tartottuk fenn.

Hasnyálmirigy vezetékek mikroperfúziója. A mikroperfúziós kísérlet során a hasnyálmirigyvezeték lumenébe juttatott oldat epitelsejtre gyakorolt hatását vizsgáltuk.

Luminális mikroperfúzió során a duktuszt tartópipettával rögzítettük, miközben a belső, perfúziós pipettát a duktusz lumenébe vezettük. Az oldatokat a perfúziós pipettán keresztül juttattuk be a duktuszok lumenébe.

Intracelluláris kalcium koncentráció mérése. A hasnyálmirigy vezetékeket kalcium szenzitív fluoreszcens festékekkel (FURA2-AM) töltöttük fel 60 percen keresztül. A kísérleteket Cell^R képalkotó rendszeren (Olympus, Budapest) végeztük, melynek során a sejtekbe került fluoreszcens festéket 340, illetve 380 nm-es fényel gerjesztettük, majd 510 nm-en regisztráltuk a festékek, az intracelluláris szabad kalcium koncentráció függvényében kibocsátott fényét.

Immunhisztokémia. A tengerimalac hasnyálmirigyét formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyasztuk. Ezután metszeteket készítettünk a mintából. A blokkolást követően a metszeteket először humán PAR-2 receptor ellen nyúlban termelt elsődleges antitesttel, majd kecskében termelt nyúl elleni, tormaperoxidázhoz kapcsolt másodlagos antitesttel inkubáltuk. Az előhíváshoz 3'3 diaminobenzidint használtunk.

EREDMÉNYEK

I/1. A tengerimalac pretripszinogén cDNS-ek klónozása során két, minimálisan különböző izoformát találtunk. A két izoforma aminosavszekvenciája között az egyetlen különbség a szignál peptid 15-ik aminosavában volt (alanin vagy szerin), azonban szekréciónk során mindkét izoformából ugyanazon fehérje keletkezik.

I/2. A tripszinogén fehérjék tisztítása során több frakcióban izoláltunk tengerimalac tripszinogén fehérjéket, melyek a fehérjeszekvenálás eredménye alapján ugyanazt a tripszinogén izoformát tartalmazták.

I/3. A megtisztított tengerimalac tripszinogén fehérje kísérleteink során aktiválható volt enteropeptidázzal és katepszin B-vel, autolízise közepes mértékű volt, viszont egyáltalán nem autoaktiválódott azon körülmények között, ahol a humán kationos és az anionos tripszinogén izoforma is jól autoaktiválódik.

II/1. Két kimotripszin C mutációt találtunk, az R254W (arginin > triptofán) és a K247_R254del (8 aminosavat érintő deléció) mutációkat, melyek együttesen a kontroll csoporthoz képest (21/2804; 0,7%) szignifikánsan gyakrabban fordultak elő az idiopátiás vagy az örökletes pankreatitiszes betegcsoportokban (30/901; 3,3%). Az említett két mutáció hasonló arányban volt jelen az alkohol eredetű krónikus pankreatitiszben szenvedő betegekben (10/348; 2,9%), az alkohol eredetű májbeteggekhez viszonyítva (3/432; 0,7%). Indiai trópusi krónikus pankreatitiszes betegekben is találtunk kimotripszin C mutációkat (10/71; 14,1%), melyek a kontrollcsoportban szintén alacsony számban voltak jelen (1/84; 1,2%), közülük az A73T mutáció (alanin > treonin) volt kimutatható nagyobb számban (4/71; 5,6%).

II/2. A mutációk szekréciónra gyakorolt hatását különböző konstrukciók tranzienstanszfekciójával vizsgáltuk humán embrionális veseepitél és patkány acinussejtekben. Megmértük a szekretált kimotripszin C aktivitását, mennyiségét (Coomassie Brilliant Blue R-250 festéssel, és Western-blot technikával), melyek során megállapítottuk, hogy az R254W mutációt hordozó fehérje aktivitása a szekrécións mintavételek során szinte mindig a vad típus 40%-át adta, míg a gélfotókon 50%-kal kevesebb mennyiségű fehérje

volt detektálható a kontrollhoz képest. Az A73T és a deléció hordozó variáns aktivitása egyetlen mintavételnél sem volt detektálható, míg a gélfotók alapján csak igen csekély mennyiségű fehérje szekrécióját kaptuk.

Továbbá kimutattuk, hogy az R254W mutációt hordozó kimotripszin C enzimkinetikája két különböző szubsztráton is csaknem megegyezik a vad típuséval.

III/1. A tripszin dózisfüggően okozott kalcium szignált a tengerimalac hasnyálmirigyvezeték bazális és luminális oldalán. A szójabab tripszin inhibitor előkezelés kivédte a tripszin intracelluláris kalciumszignált kiváltó hatását. Hasonlóképpen, a kalciumkelátor, BAPTA-AM előkezelés is meggátolta a tripszin kalciumszint növekedésére gyakorolt hatását. A PAR-2 receptor aktiváló peptid a tripszinnel azonos mértékű intracelluláris kalciumkoncentráció változást okozott a sejtekben. Immunhisztokémiai vizsgálat során PAR-2 receptor expresszióját találtuk az intralobuláris hasnyálmirigyvezeték epitelsejtek luminális oldalán. Érdekes, hogy a receptor nagyobb, interlobuláris vezetékben nem volt jelen, itt a vezeték körüli idegsejtekben volt megtalálható. Kimutatható volt még PAR-2 receptor a tengerimalac hasnyálmirigyben lévő érhálózat endotelsejteiben és a Langerhans-szigetekben is.

III/2. Kísérleteink során nem csak az aktivált tripszint, de más toxikus anyagok (pl. konjugált és nem konjugált epesavak) pankreászduktuszokra kifejtett hatását is megvizsgáltuk. Mind a nem konjugált chenodeoxykolát mind pedig a konjugált glycochenodeoxykolát dózisfüggő intracelluláris kalciumszint emelkedést váltott ki a pankreászvezeték sejtekben. A kalcium extracelluláris oldatból történő kivonása, illetve a paraszimpatolitikus hatású atropin sem csökkentette az epesavak által kiváltott intracelluláris calcium szint emelkedést. A BAPTA-AM és a koffein viszont teljesen blokkolta az epesavak intracelluláris kalcium koncentrációjára kifejtett hatását. Kísérleteinkben mind az inozitol-trifoszfát receptor gátlószere, mind a foszfolipáz C inhibitor is hatékonyan gátolta a kis dózisú chenodeoxykolát, kalcium szint emelő hatását. Ugyanezek az inhibitorok azonban csak részben tudták csökkenteni a nagy dózisú chenodeoxykolát, kalciumszint emelő hatását.

MEGBESZÉLÉS

Az ezidáig megszekvenált állatfajok genomjában számos tripszinogén gént írtak le. Emberben 9 tripszinogén gén található, melyekből 3 izoforma fejeződik ki. Érdekes módon úgy néz ki, hogy a tengerimalac pankreász egyetlen tripszinogén izoformát termel. Ezt az eredményt támasztja alá a tengerimalac tripszinogén izoformák klónozása is, melyek során két cDNS variánst izoláltunk. A cDNS variánsokról átródó fehérjék csupán a 15-ik aminosavban különböznek egymástól. Ez a különbség a szignálpeptidben található, amely a fehérjeérés során lehasad, így mindkét izoformából gyakorlatilag ugyanaz a proenzim keletkezik. Ez a felfedezés igen meglepő, mivel eddig minden fajban több tripszinogén izoforma expresszióját találták.

Biokémiai vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a tisztított tengerimalac tripszinogén jól aktiválható enteropeptidázzal és katepszin B-vel. Ez azt mutatja, hogy a katepszin B által okozott tripszinogén aktiváció lejátszódhat a tengerimalac pankreász acinussejtekben. A fehérje autokatalitikus bomlása közepes mértékű, és meglepő módon egyáltalán nem autoaktiválódik azon körülmények között, ahol mind az anionos, mind a kationos humán tripszinogén izoformák autoaktivációt mutatnak. Mindezen eredmények azt mutatják, hogy egyetlen tripszinogén izoforma expressziója és a tripszinogén autoaktivációjának hiánya is elégséges a fiziológiás emésztőműködéshez. A humán kationos tripszinogén leggyakoribb mutációi örökletes pankreatitiszre hajlamosítanak, melyekre jellemző a fokozott autoaktiváció. A tengerimalac tripszinogén autoaktivációra való képességének hiánya arra utal, hogy ez a faj ellenállóbb lehet pankreatitisszel szemben.

A kimotripszin C a tripszinogének specifikus lebontására képes, mely valószínűleg pankreatitisz elleni védőfunkció lehet. Feltételeztük, hogy ennek a védőfunkciónak teljes vagy részleges hiánya pankreatitisz kialakulását okozhatja, ezért célunk volt a krónikus pankreatitises populációban a humán kimotripszin C gén esetleges mutációinak keresése, ezután pedig a mutációk funkcionális vizsgálata. A betegekben talált két leggyakoribb mutáció egyik esetben a fehérje aktivitásának és szekréciójának teljes hiányát mutatta (K247_R254del, 8 aminosav deléciója), míg a másik

mutáció (R254W, arginin/triptofán csere) esetén a fehérje szekréciójának 40%-os csökkenését találtuk. Kimutattuk, hogy a humán kimotripszinogén C génben talált funkcióvesztést eredményező mutációk pankreatitisz kialakulására hajlamosítanak, azáltal hogy megszüntetik a fehérje tripszinlebontó képességét. Így tanulmányunk elsőként azonosította a humán kimotripszin C-t egy újabb, pankreatitisz kialakításban szerepet játszó géneként.

A proteázok által aktivált receptorokat (PAR), mint ahogy nevük is mutatja, különböző fehérjebontó enzimek aktiválnak. A tripszin a receptorcsalád tagjai közül legnagyobb mértékben a PAR-2 típust aktiválja, melynek expresszióját ezidáig kutya, marha és humán hasnyálmirigyben írták le. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy tripszin hatására kalciumszignál jön létre tengerimalac hasnyálmirigyvezeték epitélisejtekben, mely effektus tripszin inhibitorral és intracelluláris kalcium kelátorral is kivédhető volt. PAR-2 aktiváló peptid azonos jellegű kalciumszignált okozott a sejtekben mint a tripszin. Immunhisztokémai festéssel szintén igazoltuk a PAR-2 receptor jelenlétét az intralobuláris hasnyálmirigyvezetékek epitélisejtekben.

Az akut pankreatitisz gyakori kiváltó oka az epekő beékelődése a hasnyálmirigyvezetékbe. Kísérleteinkben a nagy dózisú kenodeoxikolát és a glikokenodeoxikolát kalcium szignált generált a tengerimalac hasnyálmirigyvezeték epitélisejtjeiben. Ez arra utal, hogy a hasnyálmirigyvezeték epitélisejtek epesav hatására aktiválódnak, amely egyfajta védőfunkció lehet a gyulladás megakadályozásában. Megállapítottuk továbbá, hogy az epesavak által kiváltott kalciumszignál inozitol-trifoszfát, illetve foszfolipáz C mediátorok közreműködésével megy végbe a hasnyálmirigyvezeték epitélisejtekben.

Mindezen eredményeink alapján elmondható, hogy az akut pankreatitisz korai szakaszában mind az aktiválódott tripszinek mind pedig a különböző epesavak stimulálják a hasnyálmirigyvezeték epitélisejteket, azáltal, hogy emelik a sejtek kalciumszintjét. Az így aktiválódott sejtek fontos védőserepet játszhatnak a gyulladás továbbterjedésének megakadályozásában.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani:

Prof. Lonovics Jánosnak és **Prof. Wittmann Tibornak**, a SZTE-ÁOK, I. sz. Belgyógyászati Klinika volt és jelenlegi igazgatójának, amiért az általuk vezetett intézetben dolgozhattam;

Prof. Takács Tamásnak, hogy a Pancreas Munkacsoportban való munkámat lehetővé tette;

Prof. Varró Andrásnak, a SZTE-ÁOK, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet igazgatójának, amiért lehetőséget adott, hogy intézetében dolgozhassunk;

Dr. Hegyi Péternek és **Dr. Rakonczay Zoltánnak**, témavezetőimnek, amiért doktori értekezésemet laboratóriumukban, irányításuk alatt végezhettem, valamint jó tanácsaikért és kritikáikért;

Dr. Sahin-Tóth Miklósnak, amiért munkacsoportjában dolgozhattam Bostonban, illetve **Dr. Rosztóczy Ferencnek**, aki ösztöndíjat biztosított számomra a tanulmányút ideje alatt;

Prof. Barry E. Argent-nek és **Dr. Mike A. Gray-nek** támogatásukért, az angliai Newcastle-i Egyetemről, ahol szintén lehetőségem volt egy rövid időre tapasztalatot is szerezni;

Szegedi és bostoni kollégáimnak: **Venglovecz Viktóriának**, **Dr. Szmola Richárdnak**, **Dr. Király Orsolyának**, **Dr. Szepessy Editnek** és **Ignáth Imrének** szakmai segítségükért, támogatásukért;

Dr. Borka Katalinnak (SOTE, II. Patológia Intézet), hogy az immunhisztokémiai festéseket elvégezte.

A szegedi és a bostoni labor asszisztenseinek: **Fuksz Zoltánnénak**, **Magyarné Pálfi Editnek**, **Sitkei Ágnesnek**, **Sahin-Tóth Verának** és **Árva Miklósnénak** segítségükért és kedvességükért;

Német és indiai kollaborációs partnereinknek: **Dr. Heiko Wittnek**, **Dr. Niels Teichnak** és **Dr. Eesh Bhatianak** a mutációk azonosításáért, valamint a **vizsgálatban résztvevő személyeknek**.

Legnagyobb köszönetem **családom tagjainak** szól, akik mindvégig támogattak, segítettek és elfogadták a külföldi és az itthoni munkával járó nehézségeket.