

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

A PANKREÁSZ VEZETÉKSEJTEK ÉLETTANI ÉS KÓRÉLETTANI JELENTŐSÉGE



Dr. Hegyi Péter

**Szegedi Tudományegyetem
I. sz. Belgyógyászati Klinika**

SZEGED

2010

TARTALOMJEGYZÉK

	OLDALSZÁM
1. RÖVID ÖSSZEFOGLALÁS	5
1.1 Absztrakt	5
1.2 Közlemények	
1.2.1 A dolgozat alapját képező <u>első és utolsó szerzős</u> <i>in extenso</i> közlemények.	7
1.2.2 A Ph.D. fokozat megszerzését követő egyéb <i>in extenso</i> közlemények	8
1.3 Scientometria adatok	12
1.4 A dolgozatban használt rövidítések összefoglalása	13
2. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS	15
2.1 Az epitél sejtek jellemzői	15
2.2 A gasztrointesztinális epitél sejtek áttekintése	18
2.3 A pankreász vezetéksejtek élettani jellemzése	20
2.3.1 A pankreász vezetéksejtek bikarbonát szekréciójának mechanizmusa	20
2.3.2 A pankreász vezetéksejtek bikarbonát szekréciójának szabályozása	23
2.3.2.1 Serkentő utak	23
2.3.2.2 Gátló utak	24
2.4 A sav-bázis transzporterek és az intracelluláris pH (pH _i) fontossága	26
2.5 A pankreatitisz patomechanizmusa	28
2.5.1. A pankreász acinus sejtek szerepe	28
2.5.2 A pankreász duktuszok lehetséges kórélettani szerepe	30
2.5.3 A pankreatitisz kiváltásában szerepet játszó etiológiai faktorok	31
2.5.3.1 Epesavak	31
2.5.3.2 Alkohol	34
2.5.3.3 Vírusok	35
2.5.3.4 Egyebek	36
3. CÉLKITŰZÉSEK	37
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	38
4.1 Etikai engedély	38
4.2 Intakt pankreász duktuszok izolálása	38
4.3 Pankreász duktuszok mikroperfúziója	39
4.4 Fluoreszcens vizsgálómódszerek	40
4.4.1 Intracelluláris pH (pH _i) mérés	40
4.4.2 Intracelluláris kalcium [Ca ²⁺] _i mérés	40
4.4.3 Intracelluláris ATP ([ATP] _i) mérés	41
4.5 A sejtek pufferkapacitásának (β) meghatározása	41
4.6 A HCO ₃ ⁻ szekréció meghatározása	42

4.7	Immunhisztokémia	43
4.8	Elektronmikroszkópia	44
4.9	Western Blott	45
4.10	A kísérletekben használt vírus törzsek	46
4.11	A hasnyálmirigy duktuszok vírussal történő fertőzése	46
4.12	A vírus szerkezeti fehérjeinek kimutatása	47
4.13	Oldatok és anyagok	47
4.14	Statisztika	48
5.	EREDMÉNYEK	49
5.1	Új korszerű adat-analízis kifejlesztése	49
5.1.1	A fluoreszcens intenzitás befolyásolja a 490/440 hányados mértékét	49
5.1.2	A fluoreszcens intenzitás befolyásolja a 490/440 hányados mértékét pankreász vezetéksejtekben	50
5.1.3	pH kalibrációs görbék felvétele BCECF-AM festék használata során pankreász vezetéksejtekben	51
5.1.4	A pankreász duktális vezetéksejtek nyugalmi intracelluláris pH-jának meghatározása	56
5.1.5	Az intracelluláris pH meghatározása rövid idejű kísérletek esetén	58
5.1.6	A kalibrációs metodika NH_4Cl pulzussal történő tesztelése	59
5.1.7	Az intracelluláris pH meghatározása hosszú ideig tartó kísérletek során	61
5.2	A substance P (SP) hatásának pankreász vezetéksejtekre kifejtett hatásának vizsgálata	64
5.2.1	A substance P (SP) lokalizációja tengerimalac hasnyálmirigyben	64
5.2.2	A substance P (SP) HCO_3^- szekrécióra kifejtett hatásának vizsgálata	65
5.2.3	A substance P (SP) acidózisból történő regenerációra kifejtett hatása	68
5.2.4	A substance P (SP) alkalózisból történő regenerációra kifejtett hatása	71
5.2.5	A Protein kináz C (PKC) aktivációja mimikálja a substance P (SP) gátló hatását	75
5.2.6	A Protein kináz C (PKC) gátlása csökkenti a substance P (SP) gátló hatását	79
5.2.7	A protein kináz C (PKC) izoformák kifejeződése tengerimalac hasnyálmirigyben	83
5.2.8	A H_2DIDS -érzékeny HCO_3^- transzport folyamatok karakterizálása mikroperfundált duktuszokban	84
5.3	Epesavak hatása a pankreász duktális sejteire	88
5.3.1	Bazolaterálisan alkalmazott epesavak intracelluláris pH (pH_i)-ra gyakorolt hatása	88
5.3.2	Luminalisan alkalmazott epesavak intracelluláris pH	91

	(pH _i)-ra gyakorolt hatása	
5.3.3	Az intracelluláris pH (pH _i) regenerációja epesav jelenlétében	93
5.3.4	Az epesavak bikarbonát szekrécióra gyakorolt hatásának vizsgálata	95
5.3.5	Az epesavak dózis függően növelik az intracelluláris Ca ²⁺ koncentrációt [Ca ²⁺] _i	101
5.3.6	Az epesavak bikarbonát szekrécióra gyakorolt serkentő illetve gátló hatásának összefüggése a [Ca ²⁺] _i emelkedéssel	105
5.3.7	Az epesavak hatása a sejtorganellumokra	106
5.3.8	Az epesavak intracelluláris ATP-[ATP] _i -re kifejtett hatása	107
5.3.9	Az intracelluláris ATP [ATP] _i koncentráció hatása a bikarbonát szekrécióra	109
5.4	A vírusok pankreász duktuszokra kifejtett hatásának vizsgálata	111
5.4.1	A vírus-fertőzés hatékonysága	111
5.4.2	A PRV fertőzés citotoxikus hatása	112
5.4.3	A vírusfertőzés hatása a pankreász vezetéksejtek bikarbonát szekréciójára.	112
6.	KÖVETKEZTETÉSEK, ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK	116
7.	MEGBESZÉLÉS	117
7.1	Korszerű kalibrációs adat analízis kidolgozása	117
7.2	A pankreász bikarbonát szekréciójának élettani megfigyelései.	117
7.3	A pankreász bikarbonát szekréciójának kórélettani megfigyelései	128
7.	JELEN KÍSÉRLETEK JÖVŐBENI TERVEK	138
8.1	A tripszin hatása a pankreász vezetéksejtek bikarbonát szekréciójára.	138
8.2	Jövőbeni tervek és lehetőségek	139
9.	IRODALMI HIVATKOZÁSOK	140
10.	KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	166

1. RÖVID ÖSSZEFOGLALÁS

1.1 Absztrakt

Az 1980-as évekig úgy gondolták, hogy a pankreász vezetéksejtek fő feladata az acinus sejtek számára történő mechanikai váz biztosítása. Az 1980-as évek elején Barry Argent és mtsai. kidolgoztak egy olyan sejtizolálási metodikát, mely lehetővé tette intakt pankreász duktuszok és duktális sejtek izolálását. Ezt követően számos kísérlet bizonyította, hogy a duktális sejtek nem csak egy mechanikus vázat képeznek az acinusok számára, hanem a pankreász nedv bikarbonát és ~ 1,5 liter folyadék szekréciójáért is felelősek. Ezen HCO_3^- -ban gazdag oldat feladata, hogy kimossa az acinusok által termelt emésztőenzimeket a pankreász duktális rendszeréből, illetve a duodenumba jutva semlegesítse a gyomornedv savas pH-ját. Kísérleteink fő metodikája a pankreász vezetéksejtek bikarbonát szekréciójának mérése volt, amihez a sejtek intracelluláris pH-jának (pH_i) pontos meghatározása nélkülözhetetlen. Első lépésben **kidolgoztunk egy korszerű új módszert**, mellyel a korábbiakhoz képest lényegesen pontosabban lehet a sejtek pH_i -jét megadni.

Ezt követően az pankreász vezetéksejtek neurohumorális szabályozása közül a gátló utakat vizsgáltuk. A HCO_3^- szekréciót gátló útvonalak alapvető fontosságúak a pankreász **élettani** működése szempontjából: (i) csökkentik a duktuszon belül kialakuló hidrosztatikai nyomást (megakadályozva ezáltal az enzimek parenchimába történő szivárgását), illetve (ii) étkezés után kikapcsolják a hasnyálmirigy nedv szekrécióját. Először sikerült kimutatnunk, hogy a substance P (SP) neurokinin receptoron keresztül jelentősen gátolja a pankreász bikarbonát szekrécióját, melynek jelenősége lehet az emésztést követő szekréciós nedvek termelésének leállításában. A protein kináz C

aktivációján keresztül létrejövő gátló hatás főként a lumenális oldalon levő anion cserélő transzporterén keresztül valósul meg.

Az élettani megfigyelések után célul tűztük ki a pankreász vezetéksejtek pankreatitiszben betöltött **kórélettani** szerepének tanulmányozását. Kísérleteink során az epesavak illetve a vírusok szerepét vizsgáltuk. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a nem konjugált epesavak kis dózisban stimulálják a pankreász vezetéksejtek HCO_3^- szekrécióját, melynek során a pankreász vezeték sejtjei megpróbálják a toxikus epesavakat kimosni a pankreászból. Ha ez nem sikerül és az epesavak nagyobb koncentrációban is eléri a sejteket, akkor a szekréció szinte teljesen gátlódik, mely döntő mértékben súlyosbíthatja a pankreatitisz lefolyását. Kísérleteinkben tisztáztuk, hogy a serkentő hatás elsősorban intracelluláris kalcium szignálon keresztül, míg a gátló hatás ATP csökkenés útján alakul ki. Hasonlóan a kis dózisú epesavak hatásához, a vírus fertőzés korai szakaszában a virulens pseudorabies vírus fokozta a pankreász vezetéksejtek HCO_3^- szekrécióját.

Összességében megállapíthatjuk, hogy a pankreász vezetéksejtek HCO_3^- és folyadék szekréciója - hasonlóan a többi epitél sejtek szabályozó mechanizmusaihoz - serkentő és gátló szabályozás alatt áll. Kísérleteink során a szakirodalomban elsőként tisztáztuk az egyik gátló neuropeptid, a SP hatásait. Az epesavakkal és vírusokkal végzett kísérleteink egyértelműen bizonyítják a HCO_3^- szekréció kórélettani jelentőségét. A pankreatitisz kezdeti szakaszában, a pankreász vezetéksejtek fokozott szekrécióval próbálják a toxikus anyagokat kimosni a pankreászból. Ha ez a védőmechanizmus nem elégséges és a toxikus anyagok nagy koncentrációban érik el a sejteket, akkor egy szekréciós stop alakul ki, ami jelentősen súlyosbíthatja a pankreatitisz lefolyását.

1.2 Közlemények

Az itt felsorolt *in extenso* közlemények a <http://www.mtakoztest.hu/kpa.htm> adattárából, változtatás nélkül lettek letöltve.

1.2.1 A dolgozat alapját képező első és utolsó szerzős *in extenso* közlemények

1. Maleth J, Venglovecz V, Rázga Zs, Tiszlavicz L, Rakonczay Z, **Hegyi P**. The non-conjugated chenodeoxycholate induces severe mitochondrial damage and inhibits bicarbonate transport in pancreatic duct cells. **GUT** (2009, in print)
IF: 9.766
2. Venglovecz V, Rakonczay Z, Ozsvári B, Takacs T, Lonovics J, Varro A, Gray MA, Argent BE, **Hegyi P**. Effects of bile acids on pancreatic ductal bicarbonate secretion in guinea pig. **GUT** 57: (8)1102-1112 (2008)
IF: 9.766
3. **Hegyi P**, Gray MA, Argent BE. Substance p inhibits bicarbonate secretion from guinea pig pancreatic ducts by modulating an anion exchanger. **AM J PHYSIOL-CELL PH** 285: (2)C268-C276 (2003)
IF: 4.103
4. **Hegyi P**, Rakonczay Z Jr. The inhibitory pathways of pancreatic ductal bicarbonate secretion. **INT J BIOCHEM CELL B** 39: (1)25-30 (2007)
IF: 4.009
5. **Hegyi P**, Rakonczay Z, Tiszlavicz L, Varro A, Toth A, Racz G, Varga G, Gray MA, Argent BE. Protein kinase C mediates the inhibitory effect of substance P on HCO₃⁻ secretion from guinea pig pancreatic ducts. **AM J PHYSIOL-CELL PH** 288: (5)C1030-C1041 (2005)
IF: 3.942
6. **Hegyi P**, Rakonczay Z, Farkas K, Venglovecz V, Ozsvári B, Seidler U, Gray MA, Argent BE. Controversies in the role of slc26 anion exchangers in pancreatic ductal bicarbonate secretion. **PANCREAS** 37: (2)232-234 (2008)
IF: 2.708
7. **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: (4)427-434 (2004)
IF: 1.872
8. **Hegyi P**, Ördög B, Rakonczai Z Jr, Takács T, Lonovics J, Szabolcs A, Sári R, Tóth A, Papp JGy, Varró A, Kovács M, Gray AM, Argent BE, Boldogkoi Zs. Effect of herpesvirus infection on pancreatic duct cell secretion. **WORLD J GASTROENTERO** 11: (38)5997-6002 (2005)

1.2.2 A Ph.D. fokozat megszerzését követő egyéb in extenso közlemények.

1. Rosendahl J, Witt H, Szmola R, Bhatia E, Ozsvári B, Landt O, Schulz HU, Gress TM, Pfuetzner R, Loehr M, Kovacs P, Blueher M, Stumvoll M, Choudhuri G, **Hegyi P**, Morsche RHT, Drenth JP, Truninger K, Macek M, Puhl G, Witt U, Schmidt H, Buening C, Ockenga J, Kage A, Groneberg DA, Nickel R, Berg T, Wiedenmann B, Boedeker H, Keim V, Moessner J, Teich N, Sahin-Toth M. Chymotrypsin c (ctrc) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. **NAT GENET** 40: (1)78-82 (2008)
IF: 30.259
2. Rakonczay Z Jr, **Hegyi P**, Takacs T, McCarroll J, Saluja AK. The role of nf-kappab activation in the pathogenesis of acute pancreatitis. **GUT** 57: (2)259-267 (2008)
IF: 9.766
3. Jiang L, Gonda TA, Gamble MV, Salas M, Seshan V, Tu S, Twaddell WS, **Hegyi P**, Lazar G, Steele I, Varro A, Wang TC, Tycko B. Global hypomethylation of genomic dna in cancer-associated myofibroblasts. **CANCER RES** 68: (23)9900-9908 (2008)
IF: 7.514
4. . Rakonczay Z, **Hegyi P**, Dosa S, Ivanyi B, Jarmay K, Biczó G, Hracsko Z, Varga IS, Karg E, Kaszaki J, Varro A, Lonovics J, Boros I, Gukovsky I, Gukovskaya AS, Pandol SJ, Takacs T. A new severe acute necrotizing pancreatitis model induced by L-ornithine in rats. **CRIT CARE MED** 36: (7)2117-2127 (2008)
IF: 6.594
5. Rakonczay Z Jr, Jarmay K, Kaszaki J, Mandi Y, Duda E, **Hegyi P**, Boros I, Lonovics J, Takacs T. Nf-kappab activation is detrimental in arginine-induced acute pancreatitis. **FREE RADICAL BIO MED** 34: (6)696-709 (2003)
IF: 5.063
6. 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⁺ localization, but decreased NHE3 function indicate F regulatory sodium transport defect in ulcerative colitis. **INFLAMM BOWEL DIS** (2009, in print)
IF: 4.975
7. Rakonczay Z Jr, **Hegyi P**, Hasegawa M, Inoue M, You J, Iida A, Ignath I, Alton EW, Griesenbach U, Ovari G, Vag 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: (2)442-455 (2008)
IF: 4.313
8. Sung KF, Odinokova IV, Mareninova OA, Rakonczay Z Jr, **Hegyi P**, Pandol SJ, Gukovsky I, Gukovskaya AS. Prosurvival bcl-2 proteins stabilize pancreatic mitochondria and protect against necrosis in experimental pancreatitis. **EXP CELL RES** 315: (11)1975-1989 (2009)
IF: 3.948

9. Tóth-Molnár E, Venglovecz V, Ozsvári B, Rakonczay Z, Varró A, Papp JGy, Tóth A, Lonovics J, Takács T, Ignáth I, Iványi B, **Hegyi P**. New experimental method to study acid/base transporters and their regulation in lacrimal gland ductal epithelia. **INVEST OPHTH VIS SCI** 48: (8)3746-3755 (2007)
IF: 3.528

10. Treharne JK, Xu Z, Chen JH, Best G, Cassidy DM, Gruenert DC, **Hegyi P**, Gray MA, Sheppard DN, Kunzelmann K, Mehta A Inhibition of protein kinase CK2 closes the CFTR Cl⁻ channel, but has no effect on the cystic fibrosis mutant $\Delta F508$ -CFTR. **CELL PHYSIOL BIOCHEM** 24: 347-360 (2009)
IF: 3.246

11. Czako L, **Hegyi P**, Rakonczay Z Jr, Wittmann T, Otsuki M. Interactions between the endocrine and exocrine pancreas and their clinical relevance. **PANCREATOLOGY** 9: (4)351-359 (2009)
IF: 3.043

12. Pagliocca A, **Hegyi P**, Venglovecz V, Rackstraw SA, Khan Z, Burdyga G, Wang TC, Dimaline R, Varro A, Dockray GJ. Identification of ezrin as a target of gastrin in immature mouse gastric parietal cells. **EXP PHYSIOL** 93: (11)1174-1189 (2008)
IF: 2.910

13. Ozsvári B, **Hegyi P**, Sahin-Toth M. The guinea pig pancreas secretes a single trypsinogen isoform, which is defective in autoactivation. **PANCREAS** 37: (2)182-188 (2008)
IF: 2.708

14. Ignáth I, **Hegyi P**, Venglovecz V, Székely Cs, Carr G, Hasegawa M, Inoue M, Takács T, Argent BE, Gray MA, Rakonczay Z. CFTR expression but not Cl⁻ transport is involved in the stimulatory effect of bile acids on apical Cl⁻/7HCO₃⁻ exchange activity in human pancreatic duct cells. **PANCREAS** 38: (8)921-929 (2009)
IF: 2.708

15. Kovacs P, Szilvassy Z, **Hegyi P**, Nemeth J, Ferdinandy P, Tosaki A. Effect of transdermal nitroglycerin on glucose-stimulated insulin release in healthy male volunteers. **EUR J CLIN INVEST** 30: (1)41-44 (2000)
IF: 2.071

16. Jambrik Z, Gyöngyösi M, **Hegyi P**, Czakó L, Takács T, Farkas A, Mándy Y, Góg Cs, Glogar D, Csanády M. Plasma levels of IL-6 correlate with hemodynamic abnormalities in acute pancreatitis in rabbits. **INTENS CARE MED** 28: (12)1810-1818 (2002)
IF: 2.041

17. Czakó L, Takács T, Varga IS, Tiszlavicz L, Hai DQ, **Hegyi P**, Matkovics B, Lonovics J. Involvement of oxygen-derived free radicals in L-arginine-induced acute pancreatitis. **DIGEST DIS SCI** 43: (8)1770-1777 (1998)
IF: 1.972

18. Rakonczay Z Jr, Boros I, Jarmay K, **Hegyi P**, Lonovics J, Takacs T. Etanol administration generates oxidative stress in the pancreas and liver, but fails to induce

heat-shock proteins in rats. **J GASTROEN HEPATOL** 18: (7)858-867 (2003)
IF: 1.530

19. Sari R, Peitl B, Kovacs P, Lonovics J, Palvolgyi A, **Hegyi P**, Nagy I, Nemeth J, Szilvassy Z, Porszasz R. Cyclic gmp-mediated activation of a glibenclamide-sensitive mechanism in the rabbit sphincter of oddi. **DIGEST DIS SCI** 49: (3)514-520 (2004)
IF: 1.427

20 Czakó L, Takács T, **Hegyi P**, Prónai L, Tulassay Zs, Lakner L, Döbrönte Z, Boda K, Lonovics J. Quality of life assessment after pancreatic enzyme replacement therapy in chronic pancreatitis. **CAN J GASTROENTEROL** 17: (10)597-603 (2003)
IF: 1.265

21. Rakonczay Z Jr, Fearn A, **Hegyi P**, Boros I, Gray MA, Argent BE. Characterization of H⁺ and HCO₃⁻ transporters in cfpac-1 human pancreatic duct cells. **WORLD J GASTROENTERO** 12: (6)885-895 (2006)

22. Takacs 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. [Changes in diagnostic and therapeutic standards of acute pancreatitis in clinical practice. epidemiologic analysis of data from a regional center of internal medicine and surgery] **ORVOSI HETILAP** 149: (14)645-654 (2008)

23. Takacs T, Szabolcs A, Biczo G, **Hegyi P**, Rakonczay Z. A kísérletes akut pancreatitismodellek klinikai relevanciája. [The clinical relevance of experimental acute pancreatitis models]. **ORVOSI HETILAP** 149: (42)1981-1986 (2008)

24. Sahin-Toth M, **Hegyi P**, Toth M. Genetikai kockázati tényezők kronikus pancreatitisben [Genetic risk factors in chronic pancreatitis]. **ORVOSI HETILAP** 149: (36)1683-1688 (2008)

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

26. Czakó L, Szabolcs A, Vajda A, Csáti S, Venglovecz V, Rakonczay Z Jr, **Hegyi P**, Tiszlavicz L, Csont T, Pósa A, Berkó A, Varga C, Varga Ilona S, Boros I, Lonovics J. Hyperlipidemia induced by a cholesterol-rich diet aggravates necrotizing pancreatitis in rats. **EUR J PHARMACOL** 572: (1)74-81 (2007)
IF: 2.376

27. Szabolcs A, Reiter RJ, Letoha T, **Hegyi P**, Papai G, Varga I, Jarmay K, Kaszaki J, Sari R, Rakonczay Z Jr, Lonovics J, Takacs T. Effect of melatonin on the severity of L-arginine-induced experimental acute pancreatitis in rats. **WORLD J GASTROENTERO** 12: (2)251-258 (2006)

28. Palvolgyi A, Sari R, Nemeth J, Szabolcs A, Nagy I, **Hegyi P**, Lonovics J, Szilvassy Z. Interplay between nitric oxide and vip in cck-8-induced phasic contractile activity in the rabbit sphincter of oddi. **WORLD J GASTROENTERO** 11: (21)3264-3266 (2005)

29. Letoha T, Somlai C, Takacs T, Szabolcs A, Jarmay K, Rakonczay Jr 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 GASTROENTERO** 11: (7)990-999 (2005)
30. Sári R, Pálvölgyi A, Rakonczay Z, Takács T, Lonovics J, Czakó L, Szilvássy Z, **Hegyi P**. Etanol inhibits the motility of the rabbit sphincter of Oddi in vitro. **WORLD J GASTROENTERO** 10: (23)3470-3474 (2004)
31. **Hegyi P**, Rakonczay Z Jr, Sári R, Góg Cs, Lonovics J, Takács T, Czakó L. L-arginine-induced experimental pancreatitis. **WORLD J GASTROENTERO** 10: (14)2003-2009 (2004)
32. **Hegyi P**, Rakonczay Z, Sári R, Czakó L, Farkas N, Góg Cs, Németh J, Lonovics J, Takács T. Insulin is necessary for the hypertrophic effect of cholecystokinin-octapeptide following acute necrotizing pancreatitis. **WORLD J GASTROENTERO** 10: (15)2275-2277 (2004)
33. Czakó L, **Hegyi P**, Takács T, Góg Cs, Farkas A, Mándy Y, Varga IS, Tiszlavicz L, Lonovics J. Effects of octreotide on acute necrotizing pancreatitis in rabbits. **WORLD J GASTROENTERO** 10: (14)2082-2086 (2004)

1.3. Scientometriai adatok

	Rész adat	Összesen
TUDOMÁNYOS ELŐADÁSAI		
Kongresszusi előadások száma	-----	182
TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK SZÁMA		
Lektorált szakfolyóiratokban megjelent tudományos közlemények száma	----- ---	50
Ebből első vagy utolsó szerzőként	16	-----
Nemzetközi folyóiratban	45	-----
Hazai idegennyelvű folyóiratban	1	-----
Hazai magyar nyelvű folyóiratban	4	-----
Szerkesztői levelek, hozzászólások, válaszok száma	0	-----
Kongresszusi előadások folyóiratban vagy könyvben	-----	2
Külföldi folyóiratban	2	-----
Magyar folyóiratban	0	-----
Folyóiratban megjelent absztraktok száma	-----	134
SZAKFOLYÓIRATOKBAN MEGJELENT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEINEK MINŐSÍTÉSE		
Valamennyi eredeti közleményeinek összegzett impakt faktora (absztraktok és nem lektorált levelek nélkül)	----- ---	147.082
Az utolsó 10 év éves átlaga (2000. január 6 – 2010.	142.473	-----
A PhD vagy kandidátusi disszertációban <i>nem szereplő</i> közlemények impakt faktor összege	140.008	----- --
TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEINEK IDÉZETTSÉGE		
Idézettség összesen	-----	615
ebből független idézés	483	-----
ebből önidézés	132	-----

1.4 A dolgozatban használt rövidítések összefoglalása

5-HT	5-hidroxi-triptamin
ADH	alkohol dehidrogenáz
AE	bazolaterális $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (anion) cserélő transzporter
Amilorid	3,5-diamino-6-kloro-N-(diaminometilidén)pirazin-2-karboxamid;
[ATP]_i	intracelluláris ATP koncentráció
β	pufferkapacitás
BAPTA-AM	1,2-bisz-o-aminofenoxietán-N,N,N,N-tetraecetsav
BCECF-AM	2,7-bisz-2-karboxietil-5-(és-6-)karboxifluoreszcein acetoximetil észter
BIS	bisindolylmaleimide
BSA	bovin szérum albumin
BSP	bromoszulfoftalein
Bumetanid	3-butilamino-4-fenoxi-5-szulfamoil-benzo-esav
cAMP	adenozin 3':5'-ciklikus monofoszfát
cGMP	guanozin 3':5'- ciklikus monofoszfát
[Ca²⁺]_i	intracelluláris Ca^{2+} koncentráció
CA	szénsavanhidráz
CACC	Ca^{2+} aktiválta Cl^- csatorna
CDC	kenodezoxikólsav
CFTR	cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor
CCK	kolecisztokinin
DAG	diacilglicerol
DMSO	dimetil szulfoxid
DIDS	4, 4'-diizocianostilbene-2,2'-diszulfonsav
ER	endoplazmatikus retikulum
FAEE	szabad zsírsav etil észter
FURA 2-AM	polyamino carboxylic acid - acetoxymethyl ester
GCDC	glikokenodezoxikólsav
GFP	zöld fluoreszcens fehérje
H₂DIDS	dihidro-4, 4'-diizocianostilbene-2,2'-diszulfonsav
IP₃	inozitol-trifoszfát

$J(B^-)$,	bázis beáramlás vagy sav kiáramlás
- $J(B^-)$	bázis kiáramlás vagy sav beáramlás
NBC	Na^+/HCO_3^- kotranszporter
NHE	Na^+/H^+ cserélő
Ntcp	Na^+ -függő epesav transzportert
OATP	organikus anion transzportert
pH_i	intracelluláris pH
PBS	foszfát puffer
PDBu	phorbol 12,13-dibutyrate
PDD	4- α -phorbol esters
PFU	vírus plakkot alkotó egység
PKC	protein kináz C
PLC	foszfolipáz C
SOCC	raktár mediálta Ca^{2+} csatorna
SP	substance P (P anyag)
TBST	Tris puffer
TLS	taurolitokólsav-3-szulfát
VIP	vazoaktív intesztinális peptid
XeC	xestospongín C

2. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Az epitél sejtek jellemzői

Az **epitélium** azon sejtek csoportját foglalja össze, mely a szervezetben két egymástól elkülönülő ion- és folyadéktartalmú teret határol el egymástól. Ebből adódóan minden területet, ahol a szervezet a külvilággal érintkezhet, vagy érintkezik epiteliális sejtek borítanak (pl. bőr, a gasztrointesztinális traktus sejtjei, tüdő). Epitél sejtek azonban nem csak a külvilág és a szervezet között található, de belső folyadéktereket - melyek nem érintkeznek a külvilággal - is elkülöníthet (pl. agy, belső fül, hasüreg, mellüreg). Az epitél sejtek alapvetően az alábbi tulajdonságokkal rendelkeznek ⁽¹¹⁹⁾:

1. **Szoros kapcsolat.** Az epitél sejtek egymáshoz szorosan kapcsolódnak. A kapcsolódási pontokon (tight junction) minimális folyadék- és iontranszport valósul meg. A sejtek közötti szoros kapcsolat alapvető fontosságú a védekezés illetve az egyirányú folyadék- és iontranszportok kialakításában ⁽⁶¹⁾.
2. **Polaritás.** Az epitél sejtek membránja két különböző felépítésű membránból vagy pontosabban membrán részből áll, melyek egymással folytonosságot alkotnak és a sejtek közötti érintkezési helyeken (tight junction) kapcsolódnak össze. A polaritásnak alapvető szerepe van az egyirányú transzportfolyamatokban (pl. a felszívódás vagy kiválasztás folyamatában). A két részmembránt általánosságban bazolaterális és apikális (vagy luminális) membránnak hívjuk ⁽¹²⁰⁾.
3. **Tapadás.** Az epitél sejtek bazális sejtrétege a kötőszöveti sejtekhez egy komplex struktúrájú vékony bazális membránon (rétegen) keresztül tapad,

mely mind az epitél sejtek, mind pedig a kötőszöveti sejtek által termelt anyagokból áll ⁽⁵⁴⁾.

4. **Avaszkularizáció.** Az epitél sejtréteg nem tartalmaz ereket, ezért a sejt életéhez szükséges anyagokat, gázokat diffúzió útján veszik fel a környezetükből ⁽⁵⁴⁾.
5. **Regeneráció.** Az epitél sejtréteg folyamatosan megújul. A sejtek - főként a károsító hatások következtében - elhalnak és leválnak a sejtrétegről. Helyükre az epitéliumban található őssejtekből újabb epitél sejtek képződnek, melyek szövet specifikusan az elődeikhez hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek. Fontos megemlíteni, hogy a daganatos megbetegedések közel 90%-a ezen megújulási folyamat károsodásából alakul ki ⁽⁵⁴⁾.

A fent említett tulajdonságok nélkülözhetetlenek az epitél sejtek funkcióinak megtartásához. Fontos kiemelni, hogy az előbb felsorolt jellemzők minden epitél sejtre igazak. Az epitél sejtek sokszínűsége és változatossága azonban a részletekben rejlik. Funkciójuk, alakjuk, specializációjuk alapján többféleképpen is csoportosíthatjuk őket ^[(119)].

(a) Morfológia:

- **Laphám.** Vékony lap szerint elhelyezkedő sejtek, melyek átmérője a felszínre merőleges tengelyben lényegesen kisebb, mint a felszínre párhuzamos tengelyben. Általában kevés funkcióval rendelkeznek, főként védelmet (pl. bőr) vagy az általuk körbezárt lumenben különböző anyagok áthaladását biztosítják (pl. nyelőcső) ⁽¹¹⁹⁾.

- **Köbhám.** Keresztmetszetében kocka alakú, hexagonális sejtek. Elsősorban olyan helyeken találhatóak, ahol a funkcióban a szekréció és/vagy felszívás dominál (pl. pankreász) ⁽¹¹⁹⁾.
- **Hengerhám.** Hasonlít a köbhámhoz, de hosszmeteszében a felszínre merőleges tengelyben lényegesen vastagabb, mint a felszínre párhuzamos tengelyben. Funkciójukban hasonlítanak a köbhámhoz (pl. vékonybél) ⁽¹¹⁹⁾.

(b) Funkció:

- **Szekretáló epitélíum.** A folyadék- és iontranszport elsősorban a bazális membrán felől a lumen irányába történik (pl. pankreász duktális sejtek, parietális sejtek) ^(9, 137).
- **Felszívó epitélíum.** A folyadék és iontranszport, beleértve természetesen más anyagokat is (aminosavak, glükóz stb.), elsősorban a lumen felől a véráram felé történik (pl. vastagbél kripták) ⁽¹⁷⁾.

Természetesen számtalan egyéb felosztási lehetőség van, pl. szerkezetük alapján (nem mirigyes vagy mirigyes, exokrín vagy endokrín); vagy pl. szekrétumuk alapján (szerózus, mucinózus, kevert mirigyek), azonban ezek részletes tárgyalása túlhalad ezen értekezés célkitűzéseitől.

2.2 A gasztrointesztinális epítél sejtek áttekintése

A gasztrointesztinális epítél sejtek fő feladata, hogy a szervezet számára biztosítsák a megfelelő mennyiségű folyadék-, ion- és tápanyagfelvételt. Működésük bonyolult, elsősorban neurohumorális szabályozás alatt áll. Az összehangoltságot és bonyolultságot jól jelzi, hogy közel 8-10 liter különböző összetételű, ionokkal és emésztőenzimekkel gazdag szekrétumot termel (nyálmirigyek (~1,5L) a gyomor (~2,5L) a vékonybél (~2L) a pankreász (~1,5L) a máj (~1L)), mely nélkülözhetetlen a tápanyagok lebontásához, majd abszorpciójához ⁽¹⁷⁾. Ehhez kb. 2-3 liter napi folyadékbevitel társul, így általában 10 liter felett van az a napi ionokkal és tápanyagokkal teli folyadéktartalom, mely bekerül a gasztrointesztinális traktus lumenébe ⁽¹⁷⁾. A termelt nedvek nagy része, kb. 8,5 liter a vékonybeleben keresztül ⁽¹⁴³⁾, míg a fennmaradó ~1,5 liter a vastagbeleben keresztül szívódik fel ⁽¹⁷⁾. Mindössze ~ 0,2-0,3 liter folyadék távozik naponta a széklettel. A fent említett szekréciók és abszorpciók percről percre szabályozott módon történnek, ezen folyamatokat serkentő és gátló mechanizmusok összehangolása alapvető fontosságú. Az itt felsorolt rövid élettani áttekintés jól mutatja a gasztrointesztinális traktus epítél sejtjeinek, illetve ion transzportereinek fontosságát ⁽¹⁷⁾. Ezen folyadék- és iontranszportok zavara jelentősen növelhetik (pl. szekréciós hasmenés esetén ⁽¹⁷⁰⁾) vagy csökkenthetik (pl. cisztás fibrózis ⁽¹⁵⁶⁾) a lumen folyadéktartalmát. A rendellenes szekréció súlyos esetben akár halálhoz is vezethet.

Az epítél sejtek ion transzportereinek expressziója illetve membránra történő lokalizációja – funkciójukból adódóan – jelentősen eltérnek a gasztrointesztinális traktus egyes területein. Míg a proton pumpa (H^+/K^+ ATPáz) elsősorban a parietális sejtek apikális membránján ⁽¹⁸⁹⁾, addig a bikarbonát szekrécióért felelős anion (Cl^-/HCO_3^-) cserélő transzporter a pankreász vezeték sejtjeinek lumenén expresszálódik nagy számban ⁽⁹⁾.

Ezen különbségek miatt tudják a sejtek az emésztéshez szükséges, többségében jelentősen eltérő ionkoncentrációjú oldatokat biztosítani.

Az epitél sejteken keresztüli **folyadéktranszportot** alapvetően a klorid ionok szekréciója ⁽⁵⁸⁾ (főként a kalcium aktiválta klorid csatornán és cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR) klorid csatornán keresztül), az elektrogenikus nátrium (az epiteliális nátrium csatornán keresztül) és az elektroneutrális nátrium-klorid abszorpciója (főként a nátrium-hidrogén és a klorid-bikarbonát cserélőn keresztül) határozza meg ⁽⁵⁸⁾. A víz ezen ionokat követve főként a víz-csatorna molekulákon (aquaporinok) keresztül szívódik fel vagy szekretálódik a lumenbe ⁽³³⁾.

A folyadék mellett döntő fontosságú a szekrétumok **pH**-jának biztosítása. E nélkül az emésztés szinte lehetetlen lenne, mert az egyes enzimek aktivitása jelentősen függ a pH-tól. A gyomor fősejtjei által termelt fehérjebontó pepszin 2-4-es pH tartományban a legaktívabb ⁽⁷⁴⁾, míg a zsírbontó lipáz enzim aktivációjához lúgos pH (8,0) az optimális ⁽¹⁷³⁾. A luminális pH-k biztosításában az ion transzporterek döntő szerepet játszanak (pl. a fentebb említett H^+/K^+ ATPáz vagy Cl^-/HCO_3^- cserélő transzporterek).

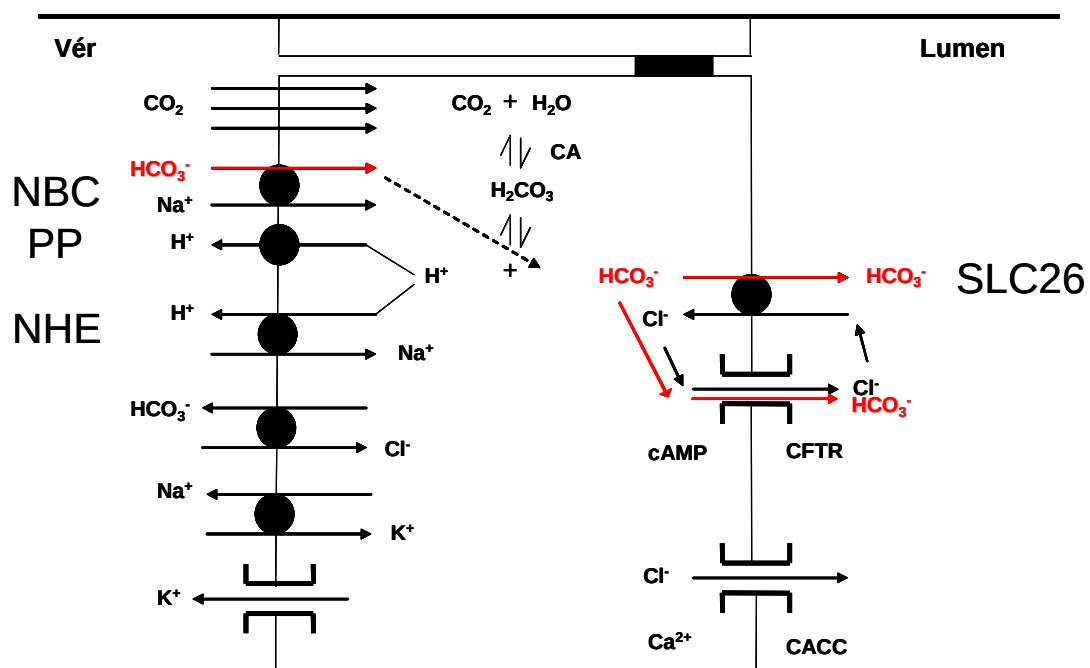
Jelen MTA doktori értekezés fő célkitűzése a gasztrointesztinális traktus egyik epitél sejtcsoportjának a pankreász vezetéksejtek élettani és kórélettani vizsgálata.

2.3 A pankreász vezetéksejtek élettani jellemzése

2.3.1 A pankreász vezetéksejtek bikarbonát szekréciójának mechanizmusa

Az 1980-as évekig úgy gondolták, hogy a pankreász vezetéksejtek fő feladata, hogy az acinus sejtek számára mechanikai vázat biztosításának. Az 1980-as évek elején Barry Argent és mtsai. kidolgoztak egy olyan sejtizolálási metodikát, mely lehetővé tette intakt pankreász vezetékek (duktuszok) és vezetéksejtek (duktális sejtek) izolálását ⁽¹⁰⁾. Ezt követően számos közlemény bizonyította, hogy a duktális sejtek nemcsak egy mechanikus vázat képeznek az acinusok számára, hanem a pankreász nedv bikarbonát és folyadékszekréciójáért is felelősek. Ezen HCO_3^- -ban gazdag oldat feladata, hogy kimossa az acinusok által termelt emésztőenzimeket a pankreász duktális rendszeréből, illetve a duodenumba jutva semlegesítse a gyomornedv savas pH-ját ⁽⁹⁾. A pankreász vezetéksejtek által termelt bikarbonát szekréció mértéke jelentősen eltér egyes fajokban. A patkány kb. 80 mM, a nyúl kb. 110 mM míg pl. a humán vagy tengerimalac pankreász duktális epitél sejtek, igen magas, 140 mM-os koncentrációban is képesek HCO_3^- szekrécióra. ⁽⁹⁾.

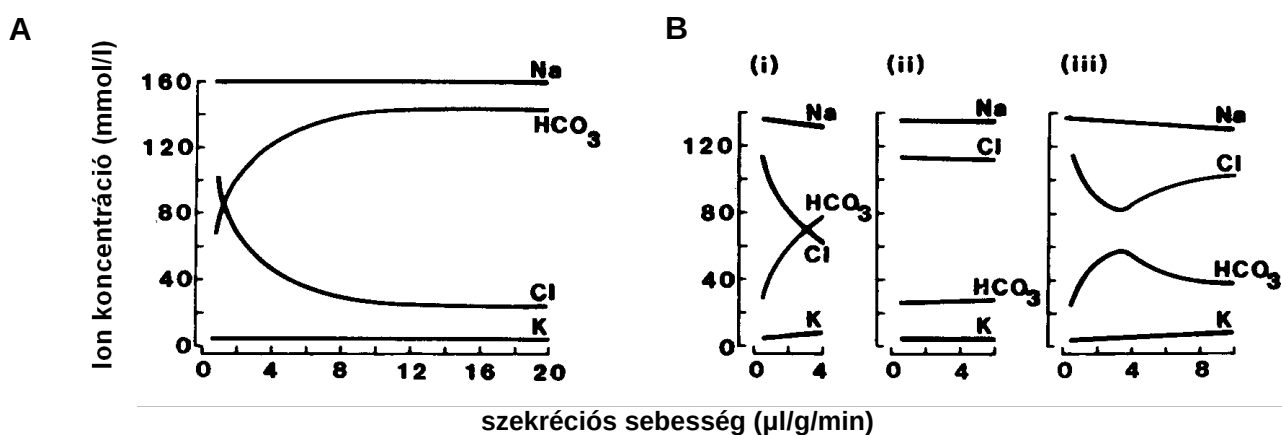
Az 1. ábra a pankreász duktális sejtjeinek HCO_3^- szekréciójának jelenleg elfogadott modelljét szemlélteti. A szekretált HCO_3^- legnagyobb része a vérből származik, ahonnan a bikarbonát ionok a bazolaterálisan elhelyezkedő $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ kotranszporteren (NBC) keresztül jutnak a sejtbe. A HCO_3^- sejten belüli akkumulációjának másik lehetséges módja (mely lényegesen gyorsabb, de kisebb mértékű) a vérben oldott CO_2 passzív, sejtmembránon keresztüli diffúziója. A sejtbe bejutott CO_2 a szénsav-anhidráz (CA) enzim segítségével szénsavvá alakul, majd a keletkezett szénsav HCO_3^- ionra és protonra bomlik. Ezt követően a H^+ főként a bazolaterális Na^+/H^+ cserélőn (NHE) és minimális



1. ábra. A pankréász vezetékesjelek bikarbonát szekréciójában fontos szerepet játszó ion transzporterek és csatornák. NBC: $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ kotranszporter, PP: proton pumpa, NHE: Na^+/H^+ cserélő transzporter, SLC26: luminalis anion transzporter, CFTR: cisztás fibrózis transzregulátor fehérje, CACC: Ca^{2+} aktiválta klorid csatorna, CA: karbonsav anhidráz.

mértékben a $\text{H}^+/\text{ATPáz}$ -on keresztül hagyja el a sejtet, míg a HCO_3^- az apikális oldalon elhelyezkedő $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ cserélőn keresztül szekretálódik a lumenbe. A bikarbonát szekrécióban kulcsfontosságú szerepet játszó apikális $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ cserélő az SLC26 transzporter család tagja. A bikarbonát szekréció másik fontos transzportere a CFTR Cl^- csatorna, amely az SLC26 transzporterhez hasonlóan a luminális membránon helyezkedik el. A CFTR csatorna permeabilitása az anionok közül a Cl^- ionokra nézve a legnagyobb ⁽⁷¹⁾ emiatt korábban úgy gondolták, hogy ezen transzporter egyetlen feladata a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ cseréhez szükséges luminális Cl^- koncentráció biztosítása. Az utóbbi évek kutatási eredményei azonban egyértelműen bizonyítják, hogy stimulált szekréció során a csatorna permeabilitása megváltozik. A jelenleg leginkább elfogadott álláspont szerint alaphelyzetben (azaz nem stimulált állapotban) a HCO_3^- ionok a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ cserélőn keresztül szekretálódnak a lumenbe mindaddig, amíg a bikarbonát ionok koncentrációja el

nem éri a ~ 70-80 mM-t. A klorid és bikarbonát cserélő fontos szerepét jól tükrözi a pankreász nedv ionkoncentrációjának változása (2. ábra). A két anion, a HCO_3^- és a Cl^- , gyakorlatilag teljesen fordított arányban változik egymáshoz képest és a két anion együttes koncentrációja állandó. A pankreász nedv Na^+ és K^+ koncentrációja gyakorlatilag állandó. Stimuláció hatására mind az anion cserélő, mind pedig a CFTR csatorna aktivitása többszörösére megnő. Mi több, a CFTR csatorna HCO_3^- permeabilitása szintén emelkedik. Ezen változások során alakul ki a ~ 140 mM-os bikarbonátban gazdag szekrétaum.



2. ábra. A pankreász nedv ion összetétele. (A) A szekretált pankreász nedv elektrolit összetétele különböző szekréciós sebesség mellett macskában. (B) A szekretált pankreász nedv elektrolit összetétele stimuláció hatására. (i) szekretin (ii) cerulein (iii) szekretin + cerulein. (Forrás: Vay Liang W Go, Pancreas, Case RM –Argent BE: Pancreatic duct cell secretion. 308. o)

A másik anion csatorna, amely a CFTR mellett a duktális sejtek apikális membránján található, a Ca^{2+} aktiválta Cl^- csatorna (CACC), melyet az intracelluláris kalcium szint emelkedése $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (10 nM-1 μM) aktivál ^(72, 188). Ahogy fentebb már említésre került, a klorid ionok szekréciója alapvető fontosságú a folyadékáramlás biztosításához. Jelenlegi ismereteink alapján ez a csatorna szolgáltatja a maximális szekréció alatt a lumenális Cl^- és folyadékszekréciót, ami elengedhetetlen a napi 1,5 liter bikarbonátban gazdag szekréció létrejöttében ⁽¹⁶⁴⁾.

2.3.2 A pankreász vezetékesjelek bikarbonát szekréciójának szabályozása

A duktális HCO_3^- szekréció élettani körülmények között - hasonlóan a többi epitél sejtek szabályozó mechanizmusaihoz - serkentő és gátló szabályozás alatt áll. Az eddig megjelent közlemények döntő többsége az ion- és folyadékszékreció szabályozásának a vizsgálatakor elsősorban a „**serkentő működés**” fontosságát emelik ki. Ezen serkentő működés komplex neuroendokrín szabályozás alatt áll.

2.3.2.1 Serkentő utak

A **neurális** szabályozás a nervus vagus-on keresztül valósul meg. Étkezés során (illetve már előtte is a kefalikus fázis során) vagus stimuláció alakul ki és a felszabaduló paraszimpatomimetikus neurotranszmitter acetilkolin beindítja a szekréciót. A vazoaktív intesztinális peptid (VIP) neurotranszmitterrel rendelkező neuronok száma lényegesen kevesebb, azonban ezen neuronok aktivációja szintén fokozza a pankreász duktuszok bikarbonát- és folyadékszékrecióját. A bikarbonátszekreció serkentésében azonban nem a neurális, hanem a **hormonális** stimulációé a vezető szerep.

- a) az intracelluláris **cAMP** szint melésén keresztül végbemenő stimuláció

A peptid hormonok csoportjába tartozó szekretin a duktális HCO_3^- szekréció egyik legfontosabb szabályzó eleme, mely az intracelluláris cAMP emelésével fokozza a bikarbonát- és folyadékszékreciót.⁽¹⁰⁾ A korábban említett VIP és a β -adrenerg agonisták is hasonló hatásmechanizmussal stimulálják a szekréciót^(10, 70).

- b) az intracelluláris **cGMP** szint emelésén keresztül végbemenő stimuláció

A guanylin és uroguanylin rövid peptidek, melyeket a vékonybél epitéliumában elhelyezkedő enterokromaffin sejtek termelnek. Ezek az anyagok a sejten belüli cGMP koncentráció emelésén keresztül fokozzák a CFTR működését ⁽⁴⁷⁾.

c) az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelésén keresztül végbemenő stimuláció

Az acetilkolin, hisztamin és angiotenzin II az intracelluláris kalcium koncentráció $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelésével képes stimulálni a pankreász bikarbonát szekrécióját ⁽¹⁰⁾. A duktális sejtek szekrécióját azonban nemcsak a véráram felől érkező anyagok, hanem a luminális membrán felőli (valószínűleg az acinusok által termelt) vegyületek is befolyásolják. Az ATP, a lumen felől a purinerg P2 receptorokon hatva, az acetilkolinhoz hasonlóan $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedést generál, serkentve ezáltal a HCO_3^- szekréciót ⁽¹⁰⁾.

2.3.2.2 Gátló utak

A serkentő működés során a hormonok és neurotranszmitterek által kiváltott sejten belüli jelátviteli utak viszonylag jól tisztázottak. Mindemellett a folyadék- és ionkiválasztás szabályozásában már bizonyították a „**gátló működés**” jelenlétét különböző epitéliumokban. A HCO_3^- szekréciót gátló útvonalak alapvető fontossággal bírhatnak fiziológiás körülmények között azáltal, hogy csökkentik a duktuszon belül kialakuló hidrosztatikai nyomást (megakadályozva ezáltal az enzimek parenchimába történő szivárgását), illetve étkezés után kikapcsolják a hasnyálmirigy szekréciót ⁽¹³⁾.

A gátló működés egyes részei centrális eredetűek. Ilyen pl. azoknak a neuralis folyamatoknak a gátlása, melyek stimulálják az epitéliumot. Ezek a folyamatok **indirekt** módon gátolják az epitélium ion- és folyadékszekrécióját. Az utóbbi évek kutatási eredményei azonban egyértelműen bizonyították, hogy különböző gátló hormonok és

neurotranszmitterek **direkt** úton is képesek gátolni az epiteliális szekréciót, mely felveti annak a lehetőségét, hogy az epitéliumnak sejten belüli (a serkentő utaktól független) gátló útjai is vannak ^(16, 107, 157, 183, 184). A közleményekben leginkább a bélhámsejt gátló útjait vizsgálták. A szakirodalomban a szerzők egyértelműen felvetik az **anion szekréció gátlásának** fontosságát, mint a bélhámsejt normál élettani működéséhez nélkülözhetetlen folyamatot. Az alábbi intracelluláris utakat azonosították:

- (i) a membrán receptorok down-regulációja (pl. PKC aktivációt követően) ^(183, 184),
- (ii) a serkentő intracelluláris hírvivő molekulák koncentrációjának csökkentése (pl. cAMP szint csökkenése neuropeptid Y, peptid YY adását ^(43, 157), α 2-adrenerg agonisták adminisztrációját ^(107, 184) vagy szomatosztatin adását ⁽¹⁸⁴⁾ követően),
- (iii) a gátló intracelluláris hírvivő molekulák termelése pl. Ins(3,4,5,6)P₄ (mely kolinerg aktiváció hatására termelődik) mely blokkolja a Ca²⁺ által aktivált Cl⁻ csatornát ⁽¹⁶⁾ és a phosphatidylinositol-3-kinase lipid termékek (EGF hatására termelődnek), melyek gátolják a bazolaterális K⁺ csatornákat ⁽¹⁶⁾.

A „gátló utak” élettani jelentőségét már több közlemény is felvetette. Például a pankreász vezeték lumenében kialakuló hidrosztatikus nyomásfokozódás hatására kialakuló (5-HT által mediált) szekréció gátlás, mely hatására csökken az intraluminalis nyomás. Ez kivédi az enzimek parenchimába történő kiszivárgását ⁽¹⁶⁷⁾. Másrésről, a gátló működés élettani szerepe az étkezést követő stimulált szekréció kikapcsolásában is felvetődik ⁽⁶⁾.

A P anyag (substance P, SP) ⁽¹³⁾, a bazolaterálisan alkalmazott ATP ⁽⁸⁸⁾ és az 5-HT ⁽¹⁶⁷⁾ gátolja a ductális szekréciót. Jelen értekezés egyik középpontjában az undekapeptid SP áll, mely gátolja a szekretin által kiváltott ductális szekréciót kutyában ^(94, 104) és

patkányban⁽⁹⁵⁾ is. A SP emellett erős gátló hatást fejt ki izolált patkány pankreász vezetékekben (i) a bazális és, (ii) szekretin által stimulált, (iii) bombesin által stimulált, (iv) és az acetilkolin által stimulált folyadék szekrécióra ⁽¹³⁾. A SP ezen hatása dózis-függő és SP antagonistával (pl. spantid) blokkolható ⁽¹³⁾. A SP kimutatható a pankreász idegvégződéseiben, ezért nagyon valószínű, hogy gátló hatása élettani jelentőséggel bír ⁽¹³⁰⁾. Izolált pankreász vezetékekben azt is kimutatták, hogy a SP gátolja a cAMP által stimulált folyadék szekréciót is, mely arra utal, hogy a peptid gátló hatását a sejten belül poszttranszkripcionális szinten fejt ki ⁽¹³⁾. Mindemellett, ezen kísérletek egyike sem azonosította azt a csatornát vagy transzportert, illetve olyan intracelluláris szignalizációt, melyen keresztül a SP kifejti gátló hatását.

2.4. A sav-bázis transzporterek és az intracelluláris pH (pH_i) fontossága

A pankreász vezetéksejtek legfontosabb élettani feladata a bikarbonát ionok lumenbe történő szekretálása. E feladat végrehajtásában nélkülözhetetlen szereppel bírnak a sejtek sav-bázis transzporterei (NHE, PP, NBC, AE), melyek nem csak a szekrécióban, de a stabil intracelluláris pH (pH_i) biztosításában is fontos szerepet töltenek be. A sav-bázis transzporterek aktivitása jelentősen függ a pH_i-től. Míg az anion cserélő transzporter aktivitása pH_i emelkedés során jelentősen nő, addig a NHE aktivitása lúgos közegben (illetve már semleges pH esetén is) közel nulla. A NHE transzporter aktivitása - az anion cserélő transzporterrel ellentétesen - a pH_i csökkenése során fokozatosan nő. Ebből adódóan, a pH_i pontos ismerete kulcsfontosságú a bikarbonát szekréció pontos meghatározásában. A pH_i-t fluoreszcens módszerrel tudjuk meghatározni. A technika lényege, hogy egy nem fluoreszkáló anyag, a BCECF-AM diffúzióval bejut a sejtbe, majd a nem specifikus észterázok hatására egy fluoreszcens BCECF-re és egy észter csoportra (AM) bomlik. Tekintettel arra, hogy a BCECF a hidrolízist követően hidrophil molekulává

alakul, nem tud kijutni a sejtéből. Amennyiben 480-500 nm hullámhosszon a sejteket megvilágítjuk, akkor 535 nm-en a BCECF emissziós intenzitásának mértéke erősen pH függő lesz. A festék koncentrációja (és ezzel együtt a fluoreszcens intenzitás is) a folyamatos mosás következtében fokozatosan csökken a sejtben. Ezért a pH_i pontos meghatározásához egy pH függő (490nm) és egy pH független (440nm) hullámhosszon kell a sejteket megvilágítani. A két különböző hullámhosszon mért fluoreszcens intenzitás hányadosa pH emelkedés hatására nő, míg pH csökkenés hatására csökken.

A fluoreszcens szignálok *in situ* kalibrációjára Thomas és mtsai 1979-ben dolgoztak ki egy metodikát, melyben a kalibráció a magas K^+ /nigericin technika felhasználásával történt ⁽¹⁷¹⁾. A kalibráció során, a duktuszokat magas K^+ tartalmú HEPES oldattal mosták, melynek pH értékét acidotikus és alkalotikus pH között meghatározott léptékben változtatták. Annak ellenére, hogy az elmúlt 30 évben számtalan kutató használta - különböző típusú sejteken végzett pH mérés során - a Thomas féle kalibrációs módszert, a módszer számos meg nem oldott kérdést vet fel. A közleményeket gondosan áttanulmányozva olyan furcsaságokat lehet találni, melyek magyarázatra szorulnak. Például ugyanazon sejtek kezdő (nyugalmi) pH-jai között jelentős különbségeket lehet találni. Még akkor is, amikor a sejtek előkészítése vagy izolálása, illetve a kísérlet során alkalmazott kondíciók megegyezők voltak. Például, ugyanazon közleményben a hepatoma sejtek nyugalmi pH-ja 6,78 és 7,2 között változott ⁽¹⁸⁵⁾. Bikarbonátot szekretáló epitel sejtek esetén is hasonló különbségeket találtak. A közleményekből az látszik, hogy a pankreász vezetéks sejtek nyugalmi pH-ja 7,25 és 7,57 ⁽⁵³⁾ között az epe vezetéks sejtek nyugalmi pH-ja 6,88 és 7,28 ⁽¹⁶⁵⁾ között változik. Felmerül a kérdés: vajon ezek a különbségek élettani okokból vagy a kalibráció hiányosságai miatt alakultak-e ki?

Tekintettel arra, hogy az ion transzporterek aktivitása jelentősen függ a sejten belüli pH-tól, kutatásaink elején fontosnak tartottuk e kérdés pontos tisztázását.

2.5 A pankreatitisz patomechanizmusa

A heveny hasnyálmirigy gyulladás egy olyan gyulladásos megbetegedés, melyben a specifikus és nem specifikus gyulladásos reakciók mellett, a pankreász által termelt enzimek korai, sejten illetve szöveten belüli aktivációja figyelhető meg. Stressz hatására (az etiológiai tényezőtől függetlenül) a kezdeti lokális gyulladásból egy generalizált, több szervre kiterjedő gyulladás alakulhat ki, mely több szervet érintő diszfunkciót, végső esetben halált okozhat.

2.5.1. A pankreász acinus sejtek szerepe

A betegség kialakulásában döntő jelentősége van az **acinusok** károsodásának. A pankreatitisz két legfontosabb folyamata az **autodigeszcio** (önemésztődés) és a **gyulladás**.

Autodigeszcio:

Élettani körülmények között a pankreász enzimek szintézise a citoplazmától teljesen elkülönülve, granulumokban, inaktív formában, proteáz inhibitorok jelenlétében történik ⁽⁶⁹⁾. E tulajdonságok bármelyikének károsodása a pankreatitisz kialakulását eredményezheti ^(96, 152). A pankreatitisz kialakulásának kezdeti lépése a mai napig a leginkább vitatott területe a pankreatitisz patofiziológiájának. A jelenleg legszélesebb körben elfogadott teória szerint az acinust ért károsodás során toxikus Ca^{2+} szignál alakul ki ⁽¹⁴⁰⁾, mely a sejt energetikájának károsodása miatt (ATP szint csökkenés) tartósan emelkedett marad ⁽¹⁴²⁾. Ennek hatására a granulumok lumenbe történő exocitózisa erősen gátlődik és szekréciós stop alakul ki ⁽⁷⁸⁾. A granulumokból tripszinogén míg a lizoszómákból katepszin B kerül a citoplazmába. Ezt követően a katepszin B hidrolizálja az

inaktív proteázt, azaz, a tripszinogénből, aktív tripszin keletkezik ⁽⁷⁸⁾. Az aktív tripszin már önmaga is képes tripszinogént aktiválni (autoaktiváció) ⁽¹⁰⁵⁾. Ezt követően a tripszin aktiválja a többi pankreatikus enzimet is (pl. elasztáz, lipáz). A tripszinogén katepszin B-vel történő aktivációjához nélkülözhetetlen az alacsony pH (acidózis) ⁽¹⁷²⁾. Ennek legfőbb oka az lehet, hogy a pankreatikus tripszin inhibitorok aktivitása alacsony pH-n jelentősen lecsökken. Az acidózis mellett a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedése is tripszinogén autoaktivációt okoz, azonban a mai napig vitatott, hogy a Ca^{2+} szignál gátlása önmagában kivédi-e, kivédheti-e a pankreatitisz kialakulását. Az aktív tripszin és a toxikus kalcium szignál együttesen a sejt halálához vezethet, aminek során az emésztőenzimek a sejtek közötti térbe kerülnek és beindul a pankreász majd az egyéb hasúri szervek, erek önmésztődése.

Gyulladásos folyamatok:

Az enzimaktivációval párhuzamosan a pankreászban szintén aktiválódik a NF- κ B transzkripciós faktor, mely számos pro-inflammatorikus gén kifejeződéséért felelős ^(145, 146). A szövetközi térbe áramló leukociták amplifikálják a gyulladásos kaszkádot, az aktiválódott sejtek szabadgyököket ⁽⁴⁸⁾ és elasztázt ⁽¹²²⁾ bocsátanak ki. Ezt követően az acinus- és fehérvérsejtekből felszabaduló proinflammatorikus mediátorok (tumor nekrosis faktor (TNF), interleukin-6, stb.) fokozzák a gyulladás súlyosságát ⁽¹¹⁷⁾. A gyulladás, hasonlóképpen, mint a tripszin intracelluláris aktivizálódása a sejtek halálához vezethetnek.

2.5.2. A pankreász duktuszok lehetséges kórélettani szerepe

A pankreász **vezetéksejtek** pankreatitisz során betöltött szerepét az 1990-es évek *in vivo* vizsgálatai vetették fel először. Kimutatták, hogy ceruleinrel indukált akut experimentális pankreatitisz vizsgálata során hipoproteinaemiával társult hiperszekréció alakul ki patkányban ⁽⁴⁹⁾. Ezen szekréciós változás megelőzte a pankreászban végbemenő

morfológiai elváltozásokat. Hasonló hipoproteinaemiás hipervolémiás szekréciót váltott ki a pankreász duktális rendszerébe injektált Na^+ -taurokolát⁽⁴⁹⁾ illetve az intraperitonealisan alkalmazott pankreatitist indukáló nagy dózisú L-Arginin is.⁽⁷⁹⁾ Ezen megnövekedett folyadékszékreció minden esetben a pankreatitisz indukciót követő időszakban alakult ki. Azokban a modellekben, ahol a betegség továbbfejlődött (pl. az L-Arginin vagy a Na^+ -taurokolát modell esetén) a hiperszekréciót hiposzekreció követte. A hipoproteinaemia kialakulásáért nagy valószínűség szerint a már fent említett acinus sejtekben kialakuló szekreciós stop tehető felelőssé. A fenti adatok azt sugallják, hogy a szekrétrum volumenének változásáért (hiper- majd a később kialakuló hiposzekreció) valószínűleg a duktuszok tehetők felelőssé, azonban ennek oka a szakirodalomban tisztázatlan. Meg kell említeni, hogy a pankreász nedv volumenének csökkenése önmagában is képes pankreatitist kiváltani, melyre a legjobb példa a cisztás fibrózis.

In vitro körülmények között eddig csak az etanol hatását vizsgálták duktális epitél sejteken. A kis dózisú etanol hatására megemelkedik a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ illetve fokozódik a duktális sejtek szekretin-indukálta bikarbonát szekreciója⁽¹⁹⁰⁾. Munkacsoportunk mutatta ki, hogy az etanol a pankreász duktuszokra gyakorolt stimuláló hatása mellett ellazítja az Oddi szfinktert, mely megkönnyíti a stimulált szekrétrum pankreász vezetékrendszeréből történő kijutását⁽¹⁵⁵⁾. Nagy dózisú alkohol esetén azonban csökken a duktális szekreció⁽¹⁹⁰⁾. Ezen adatok azt sugallják, hogy a pankreász védekező mechanizmusai egy komplex rendszert képezhetnek, melynek megismerése alapvető fontosságú lehet a pankreatitisz patomechanizmusának megértésében.

2.5.3 A pankreatitisz kiváltásában szerepet játszó etiológiai faktorok

Az akut hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásáért 70-80%-ban az epekövesség és az alkohol fogyasztás tehető felelőssé.

2.5.3.1. Epesavak

Az akut pankreatitisz kialakulása leggyakrabban biliáris eredetre vezethető vissza. A klasszikus **Opie-féle teória** szerint az akut biliáris pankreatitisz kiváltásában az epehólyagban és/vagy az epeutakban képződő és a Vater papilláig vándorló, majd oda beékelődő epekövek kóroki szerepet játszanak ⁽¹³⁵⁾. Az impaktált kő miatt az epe kifolyása a duodenum felé akadályozottá válik, az epe a pankreász vezetékbe regurgitálhat, így az egyébként inaktív formában képződő *szerin-proteázok* (tripszinogén, kimotripszinogén, stb.) az *epesavak* hatására a *pankreász* vezetékben aktiválódhatnak. Az intrapankreatikusan aktiválódó emésztőenzimek hatására megindul a hasnyálmirigy önmésztődésének folyamata, azaz kialakul az akut pankreatitisz ⁽¹⁶³⁾.

Acosta és mtsai igazolták, hogy az akut **biliáris pankreatitiszes** betegek székletében jelentősen gyakrabban mutathatóak ki epekő kristályok, mint az epeköves, de pankreatitiszben nem szenvedő betegekében ⁽¹⁾. Ez a felismerés felveti annak lehetőségét, hogy az *epekövek összetételének* (epesavak/epefestékek/ Ca^{2+} -sók/koleszterin), az alkotók arányának jelentősége lehet a kórkép kialakulásában ⁽⁷⁵⁾. Fontos megjegyezni, hogy az egyébként steril, baktériumokat nem tartalmazó epe biliáris pankreatitiszben gyakran fertőződik ⁽⁵⁾. Ennek oka, a fertőződés patomechanizmusa nem ismert, ugyanakkor jelentősége igen nagy, hiszen az egyébként steril pankreász nekrosis is felülfertőződhet és súlyos, az életet veszélyeztető septicus állapot, többszervi elégtelenség alakulhat ki. A fertőzött pankreász nekrosisban szenvedő betegek mortalitása ma is 30% körül van ^(5, 129).

Az **epe fő organikus összetevői** az epesavak, a foszfolipidek, valamint a koleszterol, amelyek kevert micellákat formálnak az epében. Az epesavak a májban glicinnel vagy taurinnal képesek konjugálódni. Az elsődleges epesavak a májban,

koleszterolból képződnek. Ezek a kólsav, kenodezoxikólsav (CDC) és ezek konjugált leszármazottjai, a glikokólsav, taurokólsav és a glikokenodezoxikólsav (GCDC). Másodlagos epesavak az elsődleges epesavakból (az intesztinális mikroorganizmusok segítségével) az epe enterohepatikus keringése során képződnek ⁽⁸⁵⁾. Tint és mtsai. a tengerimalac epéjének tanulmányozása során azt találták, hogy a tengerimalac epéjének fő alkotórésze a kenodezoxikólsav, az urzodezoxikólsav, és a 7-ketolitokólsav ⁽¹⁷⁴⁾. Legnagyobb mennyiségben a kenodezoxikólsav fordul elő, majd ezt követi a 7-ketolitokólsav és végül az urzodezoxikólsav. A későbbiekben más tanulmányok is megerősítették ⁽⁵⁰⁾, hogy a tengerimalac elsődleges epesava a CDC, amelynek egy része az enterocirkuláris keringés során 7-ketolitokólsavvá oxigenizálódik. Ez azt sugallja, hogy a 7-ketolitokólsav baktériumok által képződik, majd reabszorbeálódik és urzodiollá alakul az állat májában.

Az epesavak luminális diffúzióval vagy **epesav transzporterek** segítségével jutnak be a sejtekbe. A nem-konjugált epesavak gyenge savak, ezért egyszerűen átdiffundálnak a plazmamembránon ⁽¹⁷⁶⁾. Ezzel szemben, a taurinnal vagy glicinnel konjugált epesavak számára a membrán átjárhatatlan, ezért a sejtekbe történő felvételükhöz transzport mechanizmusra van szükség ⁽¹²⁴⁾. Jelenleg nagy számú epesav transzportert sikerült klónozni, illetve lokalizálni a polarizált epitél sejtek luminális vagy bazolaterális oldalán ^(77, 110, 176). Az epesav transzporterek jelenlétét a pankréaszban eddig még csak acinus sejtekben vizsgálták ^(99, 166). Pankréász acinus sejtekben két típusú epesav transzportert sikerült kimutatni; egy nagy-affinitású Na⁺-függő epesav transzportert (Ntcp), és egy organikus anion transzportert (Oatp), amely a nátriumtól független epesav felvételért felelős. A transzporterek immunofestése azt mutatta, hogy míg az Ntcp az acinus sejtek luminális oldalára lokalizálódik, addig az Oatp-vel szembeni antitestek mind a bazolaterális mind az apikális oldalát megfestették a sejteknek ^(99, 166). Mindkét

transzporter képes bejuttatni az epesavakat az acinus sejtekbe, az Ntcp nátriummal, míg az Oatp szerves anionhoz kapcsoltn. Nincs adat az irodalomban, hogy az epesavak vajon képesek-e aktívan transzportálódni a pankreász vezeték epitél sejtekbe, és ha igen milyen mechanizmuson keresztül.

Az **epesavak toxikus hatásának** celluláris mechanizmusát különböző típusú epitél sejteken, főképp májsejteken ^(21, 22) és epe sejtvonalon ⁽¹⁵⁹⁾ tanulmányozták. A májsejtekben az erősen toxikus monohidroxi epesavak *kálcium szignálok*at képesek kiváltani ⁽⁴¹⁾. Hasonló eredményeket figyeltek meg pankreász acinus sejtek esetében is ⁽¹⁷⁸⁾, ahol a taurolitokólsav 3-sulfate (TLC-S) lokális apikális kálcium szignálok, globális tranziens oszcillációkat, és tartós kálcium emelkedéseket váltott ki. A kálcium forrása intracelluláris, és elsősorban inozitol trifoszfát által mediált ⁽³⁴⁾. Az epesavak kálcium felszabadító sajátossága feltételezi, hogy a kálcium egy fontos közreműködő faktor az epesav-indukált sejthalálban. A konstitutívan magas szinten jelenlévő $[Ca^{2+}]_i$ különböző másodlagos szignalizációs útvonalakat indít be ^(21, 56, 159). Az egyik ilyen útvonalat (amely sejthalálhoz is vezet), Kim és mtsai tanulmányozták ⁽⁹⁹⁾. Vizsgálataik szerint az epesavak azáltal emelték meg a $[Ca^{2+}]_i$ -t, hogy legátolták a szarko/endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATP-áz pumpáját, míg a Ca^{2+} raktárakat kiürítették. Más tanulmányok főként a bélben és a májban az epesavak által aktivált protein kináz C enzimet vizsgálták ^(21, 63, 147).

2.5.3.2. Alkohol

Az alkohol az európai országokban általában a második leggyakoribb etiológiai faktor akut pankreatitiszben ⁽⁶⁴⁾. Annak ellenére, hogy ezen értekezés célkitűzései között nem szerepel az alkohol hatásának vizsgálata, fontosnak tartjuk röviden összefoglalni az alkohol hatásait. Ez azért is fontos, mert a legújabb felmérések szerint a felnőttkori halálozás (ami nem az öregedés következményeiből alakul ki) leggyakoribb oka több

országban is (pl. Oroszország) a túlzott mértékű alkoholfogyasztás (MRC/40/09 Media Release, 2009).

Érdekességképpen meg kell említeni, hogy etanollal önmagában nem lehet experimentális pankreatitist kiváltani. ^(7, 141) Sem a folyadékban bevitt etanol, sem pedig az intragasztriálisan alkalmazott etanol infúzió nem tud pankreatitist kiváltani patkányban ⁽⁵⁵⁾. *In vitro* kísérletek szerint, még a magas koncentrációjú etanolnak is minimális hatása volt az acinus sejtek $[Ca^{2+}]_i$ -ra ^(45, 46). Ezek az adatok arra utalnak, hogy nem az etanol, hanem annak metabolitjai játszanak döntő szerepet a betegség kialakulásában. Az etanol lebomlása mind oxidatív mind pedig nem-oxidatív úton történhet. Az oxidatív lebomlást az alkohol dehidrogenáz (ADH) mediálja. ADH hatására az etanolból acetaldehid képződik. Az acetaldehidnek önmagában nincs hatása a pankreász acinus sejtekre, ezért nem valószínű, hogy szerepet játszik a betegség kialakításában. Ezzel szemben, az etanol nem-oxidatív lebomlási termékei (szabad zsírsav észterek - FAEE) toxikus $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést indukálnak ^(44, 45). Nem csak *in vitro* de *in vivo* körülmények között is igazolódott a FAEE toxikus hatása. FAEE patkányba történő infundálásának hatására vakuolizáció és tripszinogén aktiváció volt megfigyelhető az acinus sejtekben ⁽¹⁸⁶⁾. Fontos megjegyezni, hogy a FAEE szintáz koncentrációja a pankreászban a legnagyobb ⁽¹⁸⁶⁾. A poszt-mortem vizsgálatok is az etanol nem-oxidatív lebomlási útjára hívják el a figyelmet. Akut alkohol intoxikációban elhunyt embereknél is a FAEE szintáz koncentrációja a pankreászban volt a legnagyobb ⁽¹⁰⁹⁾.

A jelenleg legelfogadottabb teória szerint az etanolból FAEE szintáz hatására FAEE képződik, ami az ER-ból IP_3 mediálta úton Ca^{2+} -ot szabadít fel ^(44, 45). Ezt követően a FAEE-ből hidrolázok hatására szabad zsírsav (FA) képződik, amelyik az alkohol lebomlási termékei közül a legtoxikusabb károsító tényező. A FA erősen gátolja a mitokondriális ATP

szintézist, mely hatására a megemelkedett $[Ca^{2+}]_i$ nem tud az ER-ba visszatérni. A kialakuló toxikus Ca^{2+} szignál pedig a sejt halálát fogja okozni ⁽⁴⁴⁾.

Hasonlóan az acinus sejtekhez az etanolnak önmagában nincs hatása, sem a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedésre, sem pedig a duktális bikarbonát szekrécióra. Szekretinnel együtt adva, kis dózisban (1mM) viszont fokozzák a bikarbonát szekrécióját ⁽¹⁹⁰⁾. Nagy dózisban (100mM) viszont, szekretintől függetlenül gátolják a bikarbonát szekrécióját. Ez a toxikus hatásuk nagy valószínűség szerint szintén az ATP szintézis csökkenésén keresztül valósul meg, azonban erre vonatkozóan nem áll irodalmi adat rendelkezésünkre.

2.5.3.3. Vírusok

Számos vírusról kimutatták, hogy akut pankreatitist válthatnak ki. A Cocksackievírus B3 ⁽¹⁷⁹⁾ és B4 ⁽⁸⁶⁾, mumpsz vírus ⁽⁸⁶⁾, varicella ⁽¹⁰⁰⁾, hepatitisz A ⁽⁹⁷⁾ és B ⁽⁵²⁾, citomegalovírus ⁽¹⁸⁷⁾, varicella-zoster vírus ⁽¹⁴⁴⁾ és herpesz simplex vírus (HSV) ⁽¹⁶⁰⁾ szerepelnek a leggyakoribb pankreatitist indukáló vírusok között.

A pszeudorabies vírus (PRV) közeli kapcsolatban áll a HSV-vel, mely közismerten humán patogén vírus ^(26, 29). Természetes körülmények között PRV fertőzés a malacban fordul elő. Ettől függetlenül számos emlős család is hordozhatja (húsevők, patások és rágcsálók) a kórokozót. Az emberi faj rezisztens a vírusra ⁽²⁶⁾. A PRV fertőzés egy többlépéses folyamat, melynek első lépésében a vírus receptor-mediáltan kapcsolódik a gazdasejt felszínéhez. Ezt követően a vírus bejut a sejtbe, a PRV nukleokapszid megközelíti a sejtmag membránját és egy nem teljesen ismert mechanizmussal bejuttatja vírális DNS-ét a sejtmagba. A vírus lítikus ciklusa egy transzkripcionális kaszkád mechanizmus szabályozása alatt áll ⁽²⁹⁾. Arra vonatkozóan, hogy a vírusherfertőzésnek milyen hatásai vannak a pankreász duktális bikarbonát szekrécióra, nem áll rendelkezésünkre információ.

2.5.3.4. Egyebek

Az epesavak, alkohol (zsírsavak) és vírusokon kívül természetesen más toxikus anyagok is indukálhatnak pankreatitist. **Fertőző ágenseknél** a vírusokon kívül meg kell említenünk a baktériumokat (pl. yersinia ⁽¹⁵¹⁾, szalmonella ⁽²⁵⁾, kampilobaktérium ⁽³⁵⁾) parazitákat (aszkarisz ⁽¹⁵⁴⁾, clonorchis ⁽¹⁶¹⁾) és a gombás fertőzést is (aszpergillus ⁽¹³⁹⁾, candida ⁽³⁷⁾). A **metabolikus** okok között a primer hypertrigliceridaemiát ⁽¹⁸¹⁾ és a lipoprotein lipáz deficienciát ⁽¹⁸¹⁾ feltétlen ki kell emelnünk. A **gyógyszerek** közül kb. 40 különböző hatóanyagot hoztak összefüggésbe a pankreatitisz kialakulásával (pl. didanosine ⁽⁷⁶⁾, azathioprine ⁽¹¹⁸⁾), melyek ismerete fontos a pankreász betegek kezelése megtervezésében. A **veleszületett rendellenességek** (pl. pankreász divízum ⁽¹⁶⁹⁾), **tripszin mutációk** ⁽¹⁰⁵⁾ és különböző **hasúri traumák** ⁽³⁶⁾ szintén az etiológiai okok között szerepelnek. Multicentrikus genetikai vizsgálatok irányába mi is folytattunk kutatásokat ⁽¹⁵⁰⁾, ezen vizsgálatok bemutatása azonban nem szerepel az értekezés célkitűzései között.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink során célul tűztük ki egy korszerű **adat analízis metodika kifejlesztését** a pH_i időbeli követésére. Ezt követően fontosnak tartottuk a pankreász vezetéksejtek bikarbonát szekréciójának **élettani** (elsősorban a gátló szabályozó működés) és **kórélettani** (akut pankreatitiszben betöltött szerepét *in vitro* körülmények között) megfigyelését.

Részletezett célkitűzések:

- 3.1. Korszerű adat-analízis metodika kifejlesztése az pH_i időbeli követésére
- 3.2. A pankreász vezetéksejtek gátló működésének tanulmányozása
 - 3.2.1. A SP hatásának vizsgálata a pankreász vezetéksejtekre
 - 3.2.2. A SP okozta szekréció gátlás intracelluláris útjainak vizsgálata
- 3.3. A pankreatitist kiváltó toxikus anyagok vizsgálata a pankreász vezetéksejtjeinek bikarbonát szekréciójára
 - 3.3.1. Az epesavak hatásának vizsgálata
 - 3.3.2. A nem-konjugált és konjugált epesavak közötti különbségek vizsgálata
 - 3.3.3. A vírusfertőzés duktális szekrécióra kifejtett hatásának vizsgálata

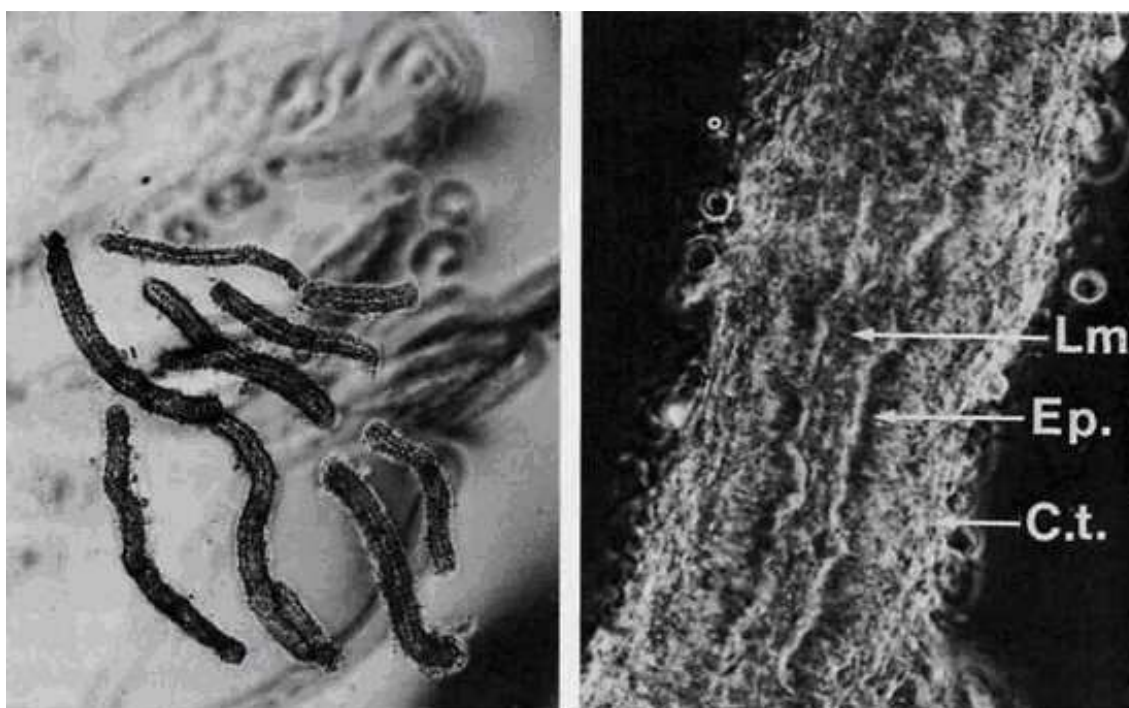
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Etikai engedély

Az állatkísérleteket mind a Munkahelyi Állatvédelmi Bizottságtól (MÁB) mind, pedig az ÁNTSZ-től megkapott hivatalos engedélyek birtokában végeztük.

4.2 Intakt pankreász duktuszok izolálása

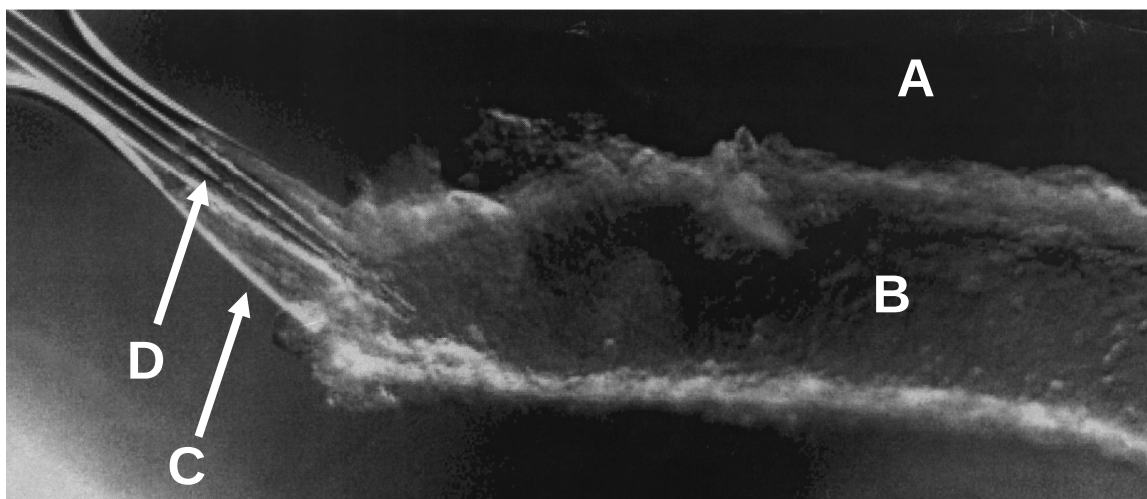
Intra- és interlobuláris duktuszokat izoláltunk kb. 150-200 gramm tömegű tengerimalacok hasnyálmirigyéből. A tengerimalac hasnyálmirigyét 37 C°-on 30 perci g kollagenázzal emésztettük, majd ezt követően a duktuszokat mikrodisszekciós technikával sztereomikroszkóp alatt izoláltuk (3. ábra). Az izolált duktuszokat 37 C°-os 5%-os CO₂-t tartalmazó inkubátorban 24 órán keresztül inkubáltuk. Ez idő alatt a duktuszok két vége leforrt és a szekréciónak köszönhetően lumenük felhízott ⁽¹⁰⁾.



3. ábra: Frissen izolált pankreász duktuszok fénymikroszkópos képe. Lm: lumen, Ep: epitél sejtek, C.t.: kötőszöveti sejtek (forrás: fotó B.E.Argent, Newcastle Egyetem)

4.3 Pankreász duktusok mikroperfúziója

A kísérlek egy részében a duktusokat mikroperfundáltuk ⁽⁸⁸⁾. A mikroperfúzió lényege, hogy a polarizált epitél sejtek lumenális illetve bazolaterális oldalát különböző ion összetételű oldatokkal perfundáljuk. A hasnyálmirigy duktusok lumenének a perfundálásához egy külső, tartó pipettát és egy belső, perfúziós pipettát készítettünk (4. ábra). A lumenális perfúzió során a duktusz egyik végét levágtuk, a másik végét pedig a tartó pipettába szívtuk. Ezt követően a belső perfúziós pipettát finoman a duktusz lumenébe vezettük. A perfúziós pipettán keresztül a duktusz lumenébe jutott oldat (10-30 μ l/perc) a levágott végen keresztül hagyta el a duktuszt. A lumenális perfúzióval megegyező irányú, nagy sebességű külső perfúzió (4-5 ml/perc) biztosította, hogy a lumenálisan adott oldat a duktusz lumenéből kijutva ne jusson a bazolaterális oldalhoz.



4. ábra. Perfundált tengeri malac pankreász vezeték. (A) extracelluláris tér, (B) intraluminalis tér, (C) rögzítő pipetta, (D) perfundáló pipetta.

4.4. Fluoreszcens vizsgálómódszerek

4.4.1. Intracelluláris pH (pH_i) mérés

A 12 órán keresztül inkubált duktuszokat Cell Tak adhéziós molekula segítségével üveglemezhez (24 mm^2) rögzítettük, mely egy perfúziós kád alapját képezte. A kádat egy Olympus Cell^R (Olympus, Budapest, Magyarország) fluoreszcens képalkotó mikroszkóp tárgyasztalára helyeztük. Ezt követően a duktuszokat 20-30 percig egy pH-érzékeny fluoreszcens festékkel (BCECF-AM-el ($2 \mu\text{M}$)) inkubáltuk 37°C -on, standard HEPES oldatban. Inkubálást követően a duktuszokat folyamatosan, 4-5 ml/perc sebességgel különböző oldatokkal perfundáltuk. A kísérletek során 4-5 területről (ROI) gyűjtöttük a fluoreszcens intenzitást, melyek mindegyike 10-20 sejtből álló területet foglalt magában. A sejteket először 490 nm majd 440 nm hullámhosszúságú fénnel felváltva gerjesztettünk, majd a 490/440 fluoreszcens emissziós arányt 535 nm hullámhosszon mértük. Másodpercenként 4 pH_i mérést rögzítettünk. A fluoreszcens szignál (490/445 hányados) kalibrációját az eredmények 3.1 fejezet leírás alapján végeztük.

4.4.2. Intracelluláris kalcium koncentráció [Ca^{2+}]_i mérése

A [Ca^{2+}]_i mérést a pH_i meghatározáshoz hasonlóan végeztük. A sejteket azonban a kalcium szenzitív FURA 2-AM-mel ($5\mu\text{M}$) töltöttük fel. A sejteket 340 nm és 380 nm hullámhosszúságú fénnel megvilágítottuk, majd a 340/380-as emissziós hányadost 510 nm hullámhosszon mértük. A perfúziós sebesség és az adatrögzítés módja teljes egészében megegyezett a pH_i mérés adataival.

4.4.3. Intracelluláris ATP ([ATP]_i) mérés

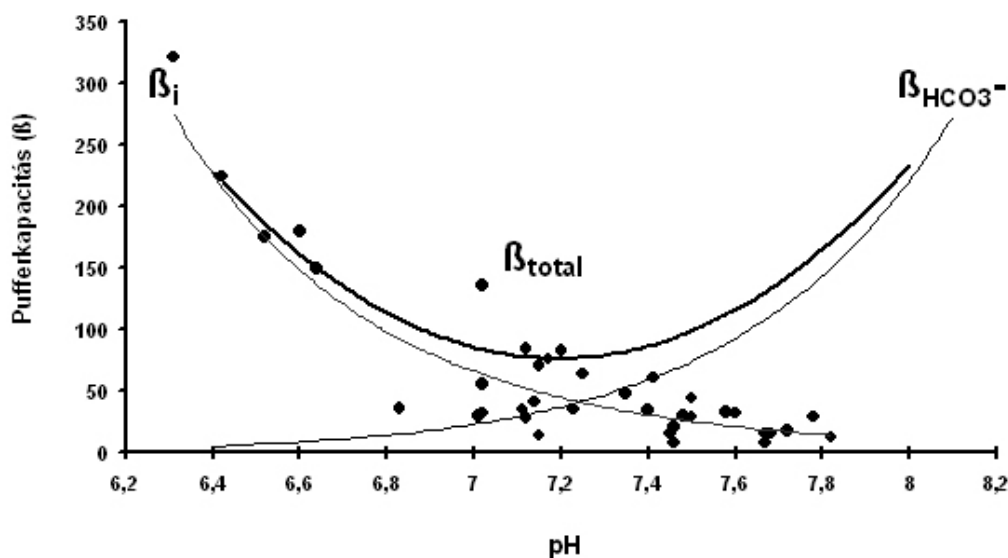
Az [ATP]_i koncentráció mérését technikailag hasonlóan végeztük, mint a korábbi két fluoreszcens mérést. A sejteket 4 μmol/L Mg-Green-AM festékkel 30 percig töltöttük szobahőmérsékleten. Tekintettel arra, hogy az ATP-nek az ADP-től 10x erősebb a magnézium ionokhoz történő kötődése, a sejten belüli Mg ionok nagy része MgATP formátumban van jelen ^(44, 87, 115). Ezáltal, a Mg-Green által kibocsájtott fluoreszcens jel arányos lesz az ADP:ATP hányadossal, aminek hatására jól követhető a [ATP]_i szint alakulása. Ha a fluoreszcens intenzitás emelkedik, akkor az [ATP]_i szint csökken. A sejteket 476 nm-en világítottuk meg és a fluoreszcens intenzitást 535 nm-en gyűjtöttük.

4.5. A sejtek pufferkapacitásának (β) meghatározása

A hasnyálmirigy duktális sejtek saját pufferkapacitásának (β_i) meghatározásához az ammónium-pulzus technikát alkalmaztuk ⁽¹⁸⁵⁾. A β_i a sejt azon képességét mutatja, hogy mennyire képesek a pH_i-ban bekövetkező változásokat pufferolni. A hasnyálmirigy duktális sejteket Na⁺ és HCO₃⁻ ionoktól mentes, különböző koncentrációjú NH₄Cl oldattal perfundáltuk. A Na⁺ és HCO₃⁻ oldatból történő kivonása biztosította a sav-bázis transzporterek kikapcsolását. A β_i-t a Henderson-Hasselbach egyenlet segítségével határoztuk meg. A teljes pufferkapacitást a

$$\beta_{\text{total}} = \beta_i + \beta_{\text{HCO}_3^-} = \beta_i + 2.3 \times [\text{HCO}_3^-]_i$$

képlet segítségével számoltuk ki, ahol β_{HCO₃⁻} a HCO₃⁻/CO₂ rendszer pufferkapacitást, míg a [HCO₃⁻]_i a HCO₃⁻ sejten belüli koncentrációját jelenti (5. ábra).



5. ábra A hasnyálmirigy duktális sejtek pufferkapacitása. A hasnyálmirigy duktális sejteket különböző koncentrációjú Na^+ és HCO_3^- mentes NH_4Cl oldattal perfundáltuk. Na^+ hiányában a Na^+ -függő pH szabályozó mechanizmusok nem működnek. Az intrinszik pufferkapacitást (β_i) a Henderson-Hasselbach egyenlet segítségével határoztuk meg ($n = 40$). A regressziós analízist Excel program segítségével végeztük. A teljes pufferkapacitást (β_{total}) a $\beta_{\text{total}} = \beta_i + \beta_{\text{HCO}_3^-} = \beta_i + 2,3 \times [\text{HCO}_3^-]_i$ képlet segítségével számoltuk ki, ahol $\beta_{\text{HCO}_3^-}$ a $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ rendszer pufferkapacitását, míg a $[\text{HCO}_3^-]_i$ a HCO_3^- sejten belüli koncentrációját jelenti.

4.6. A HCO_3^- szekréció meghatározása

Kísérleteink során a bikarbonát szekréciót három különböző metodikával mértük.

Transzporter blokkoló metodika. Ezen kísérletek során a HCO_3^- akkumulációjában szerepet játszó bazolaterális transzportereket, a NHE-t illetve a NBC-t, 0,2 mM amilorid valamint 0,1 mM DIDS 5 percen át történő adásával gátoltuk ⁽¹⁶⁸⁾. Ennek köszönhetően a pH_i csökkenését figyelhattunk meg. Az acidifikáció mértéke a sejt pufferkapacitását illetve az apikális membránon keresztüli HCO_3^- kiáramlás sebességét tükrözi ⁽¹⁶⁸⁾. Az amilorid és DIDS adásának első 60 másodpercében bekövetkező pH_i csökkenés mértékét ($\Delta\text{pH}/\Delta t$) lineáris regressziós analízis segítségével számoltuk ki. A regressziós görbe felvétele 240 adatpont felhasználásával (4 pH_i mérés másodpercenként) történt.

Alkalózisból történő regeneráció. Ezekben a kísérletekben a duktuszokat 3 percig 20 mM NH_4Cl -tartalmú oldattal perfundáltuk, amely azonnali, rendkívül gyors pH_i növekedést

eredményezett. Az alkalózisból történő regeneráció mértékét ($\Delta\text{pH}/\Delta t$) az első 30 másodpercben (120 adatpont) vizsgáltuk a már korábban említett regressziós analízis segítségével.

Klorid elvonásos technika. A Cl^- luminalis oldalról történő elvonása szubsztrát hiányában leállítja majd megfordítja az anion cserélő transzporter működését. Az alkalózis mértékéből következtethetünk az anion cserélő transzporter aktivitására. Az alkalózis kialakulásának sebességét ($\Delta\text{pH}/\Delta t$) az első 60 másodpercben (240 adatpont) vizsgáltuk a már korábban említett regressziós analízis segítségével.

A pH_i -ban bekövetkező változásokat a

$$J(\text{B}^-) = \Delta\text{pH}/\Delta t \times \beta_{\text{total}}$$

egyenlet segítségével bázis árammá [$J(\text{B}^-)$] konvertáltuk. A befelé irányuló bázis áramokat $J(\text{B}^-)$, míg a kifelé irányuló áramokat $-J(\text{B}^-)$ -ként jelöltük.

4.7. Immunhisztokémia

A SP immunhisztokémiai analíziséhez 4%-os formalinban fixált paraffinba ágyazott hasnyálmirigy metszetet használtunk. Az 5 μm vastagságú metszetek festését automata rendszer végezte (Autostain, Dako, Glostrup, Denmark). A metszeteket először megtisztítottuk, majd az endogén peroxidáz aktivitást 10 perces 3%-os H_2O_2 kezeléssel blokkoltuk. Az antigén helyeket 120 °C-on 3 perces citrát pufferben történő inkubálással tártuk fel. Ahhoz, hogy a nem specifikus festődéseket minimalizáljuk, a metszeteket 30 percig, tejben előkezeltük. Ezt követően a metszeteket 30 percig (1:50 hígítás; Bio Genex Laboratories, San Ramon, CA) anti-egér SP elsődleges poliklonális ellenanyaggal

inkubáltuk, majd kétszer 10 percig mostuk LSAB2-el (DAKO). Az immunoreaktivitást 10 perces 3,3'-diaminobenzidin-ben történő inkubálással mutattuk ki, majd a metszeteket dehidráltuk. A SP jelenlétét sötétpiros kromagénnel detektáltuk.

4.8 Elektronmikroszkópia

Kísérleteink során a már korábban részletezett módon intra- és interlobuláris duktuszokat izoláltunk. A duktuszokat ezt követően 1-10 perc időtartamra különböző anyagokkal CDC, GCDC, cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP)) kezeltük, majd 24 órára 4 °C-on fixáló oldatba helyeztük (3% glutáraldehidet és 2% dextránt tartalmazó foszfát-puffer oldat). A duktuszok beágyazása az 1. táblázat protokollja alapján történt. 70 µm vastag félvékony metszeteket LEICA Reichert Ultracut S típusú mikrotom segítségével készítettünk. A metszeteket Toluidin-kék festékkel festettük meg. A következő lépésben a mintából ultravékony (70 nm) metszeteket készítettünk, majd azokat egylyukú hártásított rácslapra vittük fel. Utolsó lépésként a minta kontrasztosítását végeztük: a mintát 0,25%-os uranyl-acetát oldatba 30 percen keresztül 40 °C-ra helyezzük, majd 5 percig 20 °C-on Reynolds-féle ólom-citrát oldatban inkubáltuk. A transzmissziós elektronmikroszkópia során Phillips CM 10 típusú elektronmikroszkópot használtunk. A képeket analySIS nevű program segítségével 1450-64000 nagyításban készítettük el.

	perc
Foszfát-pufferes mosás	10
Inkubálás 1%-os OsO ₄ -ban	60
Foszfát-pufferes mosás	10
Mosás 50%-os alkoholban	5
Mosás 70%-os alkoholban	5
Inkubálás 70%-os alkoholban oldott uranyl-acetátban	20
Mosás 96%-os alkoholban	2*10
Mosás abszolút alkoholban	2*10
Mosás acetonban	2*10
Beágyazás aceton-epon keverékbe	30
Beágyazás epon keverékbe (60°C)	30

1. Táblázat. A pankreász duktuszok beágyazásának menete.

4.9 Western Blot

A tengerimalac hasnyálmirigyből izolált intra- és interlobuláris duktuszokat felhasználásig -70°C-on tároltuk. Hozzávetőlegesen 100 darab duktuszt 75 µl lízis pufferben homogenizáltunk (lízis puffer összetétele: 250 mmol/l szukróz, 50 mmol/l HEPES, pH 7,5, 2 mmol/l EGTA, 10 mmol/l EDTA, 20 µmol/l leupeptin, 0,2 mMol/l phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 µg/ml aprotinin, 2 mmol/l Na-ortovanadát, és 10 mmol/l Na-pyrophosphate). Ezt követően a sejtlizátumot 5 percig SDS minta pufferben (500 mM Tris _HCl (pH 6,8), 28% glycerol, 6% SDS, 6 mM EGTA, 24% mercaptoetanol, és 0.0003% bromphenol kék) főztük, majd -70°C-on tároltuk felhasználásig. Az így elkészített mintákat SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS page), 6%-os gélben a Xcell SureLock elektroforetikus készülék segítségével (Invitrogen, Budapest, Magyarország) választottuk el. Pozitív kontrollként tengerimalac agyat használtunk (10 µg fehérje), míg a fehérjék méretének meghatározásához Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker-t vittünk fel a gélre (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). Az elektroforetikus szeparáláshoz a Laemmli metodikát alkalmaztuk ⁽¹⁰⁸⁾. A PVDF (polyvinylidene fluoride) membránokat (Fluka, Budapest, Magyarország) 1 percig aktiváltuk metanolban, majd 5 percig inkubáltuk a transzfer pufferben. Ezt követően a fehérjéket a gélről átvittük a membránra, majd a membránt 1 órán keresztül szobahőmérsékleten Tris-t tartalmazó sóoldatban (Tween 20 (TBST): 10 mM Tris, 0,5 M NaCl, és 1% Tween 20, pH 7,4 és 2% (wt/vol) ECL Advance blocking agent (Amersham) blokkoltunk. Az izoform specifikus elsődleges ellenanyagokat a blokkoló oldatban hígítottuk (1:1000 hígítás), majd ebben az oldatban a membránokat 1 órán keresztül inkubáltuk. Az inkubációt követően a membránokat TBST-ben mostuk, majd megfelelő, torma peroxidázzal konjugált másodlagos antitesttel (1:10000 hígítás) 1 órán keresztül inkubáltuk. Az immunjelek

előhívása kemilumineszcens szubsztrátot használtunk (ECL kit), majd a jelet fényérzékeny röntgen filmre rögzítettük (Kodak Biomax Light film, Rochester, NY).

4.10 A kísérletekben használt vírus törzsek

Kísérleteink során a PRV genetikailag módosított, replikálódni képes virulens törzsét, a Ba-Dup Green-t (BDG) használtuk. A BDG létrehozásához Bartha vírust használtunk ⁽¹⁸⁾, amely a PRV vírustörzs legyengített formája (oltóanyag). A genetikailag módosított zöld fluoresszcens fehérje (GFP) génjét expressziós kazettában a PRV rövid fordított ismétlődéseket tartalmazó (inverted repeat) szegmensében található antisense promóter régiójába inzertáltuk ^(26, 31). Kontroll törzsként a PRV replikálódni nem képes, Ka-EPOlacgfp (KEG) vírus törzsét használtuk. A KEG vírustörzset a ribonukleotid reduktáz kis alegységének ⁽²⁸⁾ és a korai fehérje (EPO) gének ⁽²⁷⁾ deléciójával hoztuk létre. A GFP és β -galaktozidáz (lacZ) géneket tartalmazó expressziós kazettát az EPO gén helyére inzertáltuk ⁽³²⁾. Ennek a mutációnak köszönhetően a vírus elvesztette replikációs képességét ⁽³²⁾.

4.11 A hasnyálmirigy duktuszok vírussal történő fertőzése

A duktuszok tápfolyadékát 10^7 PFU/ml BDG vírussal vagy 10^{10} PFU/mL KEG vírussal egészítettük ki. A duktuszokat a vírust tartalmazó tápoldatokkal 6 órán keresztül inkubáltuk. A nem-fertőzött duktuszokat normál tápfolyadékban inkubáltuk. Ezt követően mind a fertőzött, mind pedig a kontroll duktuszokat további 18 órán keresztül normál tápfolyadékban inkubáltuk. A 24 órás (teljes inkubálási idő) inkubálási idő végére a duktuszok két vége leforrt és a szekréciónak megfelelően felhíztak ⁽¹⁰⁾.

4.12 A vírus szerkezeti fehérjéinek kimutatása

A vírus szerkezeti fehérjéit immunfluoreszcens festéssel azonosítottuk. Az izolált duktuszokat 1 órán keresztül 40 g/l paraformaldehidben-PBS oldatban (pH 7,4) szobahőmérsékleten fixáltuk. Ezt követően a duktuszokat háromszor PBS-ben mostuk, majd 1 órán keresztül 10 g/l szarvasmarha szérum albumint (BSA) és 1 ml/l Triton X-100-at tartalmazó PBS oldatban szobahőmérsékleten blokkoltuk. A duktuszokat nyúl poliklonális antivirális ellenanyaggal (Affinity Bioreagents, Golden, USA) 1:500 hígításban 24 órán keresztül 4°C-on inkubáltuk. Az inkubálást ismét háromszori PBS-es mosás követett, majd a duktuszokat újabb 24 órán keresztül a vörös színtartományban emittáló Alexa Fluor 633-as anti-nyúl másodlagos ellenanyaggal (1:1000 hígítás; Molecular Probes, USA) 4°C-on inkubáltuk. Újabb mosást követően a duktuszokat tárgylemezre rögzítettük. A kontroll duktuszoknál immunohisztokémiai festődés nem volt megfigyelhető. A vírus GFP expresszióját és az immunfluoreszcens szignálokat konfokális lézer pásztázó (scanning) mikroszkóp (Zeiss, LSM 400) segítségével vizsgáltuk.

4.13 Oldatok és anyagok

A kísérleteinkben használt oldatok összetételét a 2. táblázat foglalja össze. A HEPES tartalmú oldatokat 100% O₂-vel gázoltattuk a pH értéküket pedig 7,4 -re állítottuk be HCl vagy NaOH segítségével. A HCO₃⁻-ot tartalmazó oldatokat karbogénnel (95% O₂ / 5% CO₂) gázoltattuk. Az oldatok hőmérséklete minden esetben 37°C volt. Az összes laboratóriumi vegyszert, fehérjéket, transzporter blokkolókat és ionofórokat a Sigma-Aldrich vegyszercégtől rendeltük (Budapest, Hungary). A kromatográfiás tisztaságú kollagenázt a Worthington cégtől szereztük be (Lakewood, NJ, USA). A nigericint abszolút etanolban, a DIDS-et és amilorde-ot DMSO-ban, míg a szekretint, SP-t és spantid-et 1%

albumint tartalmazó oldatban oldottuk. A Cell-Tak sejtragasztót a Beckton Dickinson cégtől szereztük be (Bedford, MA, USA). A BCECF-AM, FURA-AM, Mg-Green-AM fluoreszcens festéket a Csertex Kft-től vásároltuk (Budapest, Magyarország).

	Standard HEPES	Standard HCO ₃ ⁻	magas-K ⁺ HEPES	NH ₄ ⁺ HEPES	NH ₄ ⁺ HCO ₃ ⁻	Na ⁺ mentes HEPES	NH ₄ ⁺ Na ⁺ mentes HEPES	Cl ⁻ mentes HEPES	Cl ⁻ mentes HCO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺ Cl ⁻ mentes HEPES	NH ₄ ⁺ Cl ⁻ mentes HCO ₃ ⁻
NaCl	130	115	5	110	95						
KCl	5	5	130	5	5	5	5				
MgCl ₂	1	1	1	1	1	1	1				
CaCl ₂	1	1	1	1	1	1	1				
NaHEPES	10		10	10							
Glükóz	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
NaHCO ₃		25			25				25		25
NH ₄ Cl				20	20		20				
NMDG.Cl						140	120				
HEPES						10	10	10		10	
Na glükonát								140	115	120	95
K ₂ szulfát								2,5	2,5	2,5	2,5
Mg glükonát								1	1	1	1
Ca glükonát								6	6	6	6
NH ₄ szulfát										20	20

2. táblázat. Oldatok összetétele. Az oldatok összetételéhez az értékek mM-ban vannak megadva. A HEPES tartalmú oldatokat 100% O₂-vel gázoltattuk a pH értéküket pedig HCl vagy NaOH segítségével 7,4 - re állítottuk be. A HCO₃⁻-ot tartalmazó oldatokat karbogénnel (95% O₂ / 5% CO₂) gázoltattuk. Az oldatok hőmérséklete minden esetben 37°C volt.

4.14 Statisztika

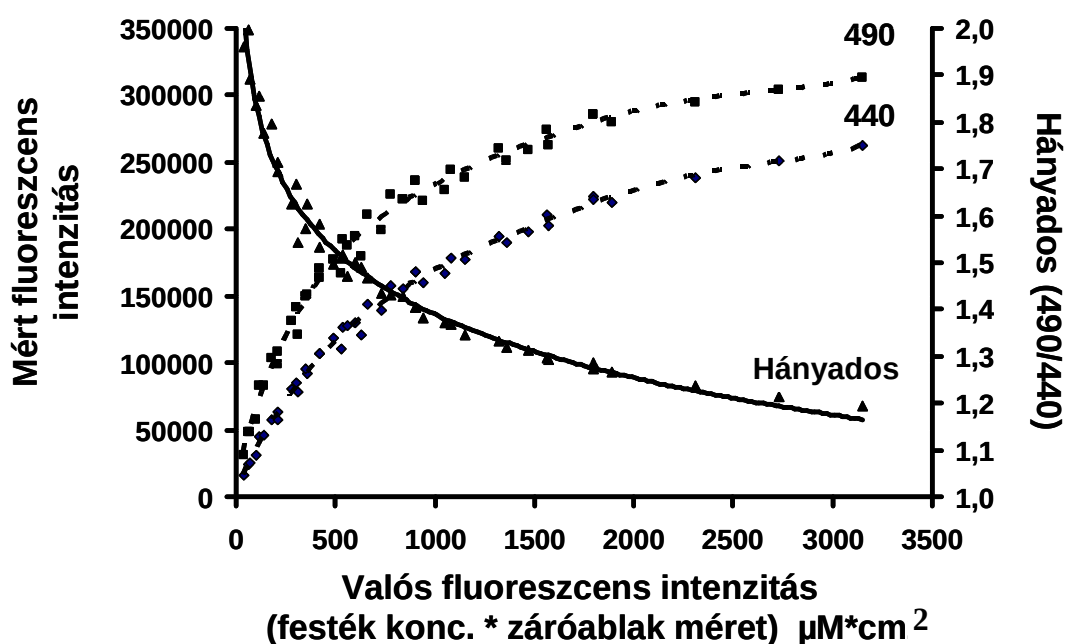
Az eredményeket átlag ± standard hiba (SE) formájában tüntettük fel (n = kísérletek száma). A szignifikáns eltéréseket Student féle páros t-próbával (amikor két csoportot hasonlítottunk össze) vagy egy tényezős ANOVA próbával (amikor 3 vagy több csoportot hasonlítottunk össze) határoztuk meg. Szignifikánsnak a $p \leq 0,05$ értéket fogadtuk el.

5. EREDMÉNYEK

5.1 Új korszerű adat-analízis kifejlesztése

5.1.1 A fluoreszcens intenzitás befolyásolja a 490/440 hányados mértékét

BCECF-et (mely önmagában is fluoreszkál) desztillált vízben oldottunk. Két különböző koncentrációjú BCECF oldatot készítettünk (20 μM és 40 μM) és különböző méretű záróablak (shutter) méret mellett gyűjtöttük a fluoreszcens jelet. A téglalap alakú záróablak méretét a monitoron mértük és cm^2 -ben adtuk meg. A kísérlet során 1-90 cm^2 között 30 különböző záróablak méretet használtunk. A teljes fluoreszcens intenzitás



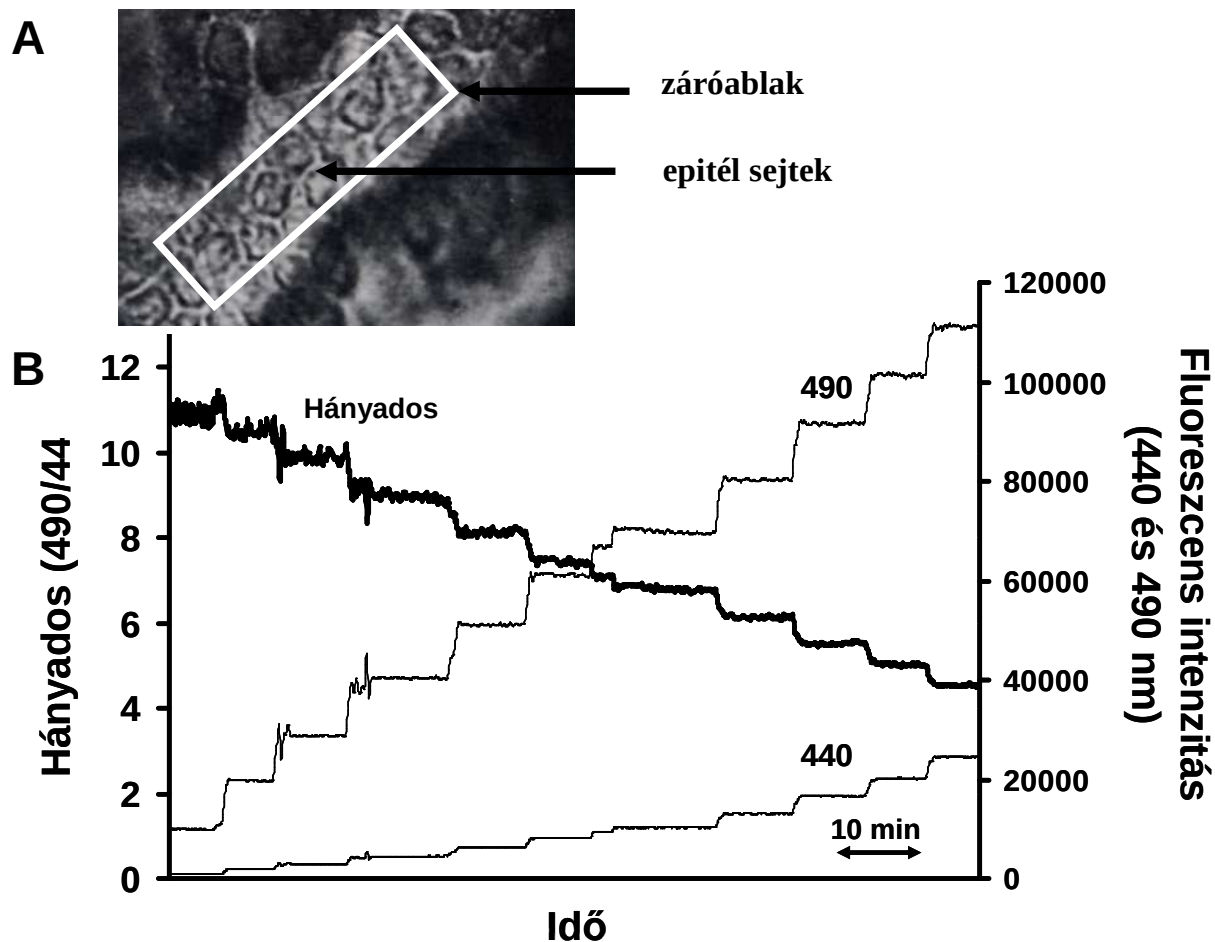
6. ábra A valós és mért fluoreszcens intenzitás egymáshoz való viszonya 490 és 440 nm-en. (BCECF-et desztillált vízben oldottunk fel. A teljes, valós fluoreszcens intenzitást a festék koncentrációja (20 illetve 40 μM) és a záróablak méretéből 30 különböző záróablak méret (1-90 cm^2). A téglalap alakú záróablak méretét a monitoron mértük és cm^2 -ben adtuk meg.

mértékét a vizsgált terület méretéből (cm^2) és a használt BCECF oldat koncentrációjából (μM) számoltuk ki. A 6. ábra mutatja a BCECF oldat teljes, azaz valós fluoreszcens

intenzitásának viszonyát a mért fluoreszcens intenzitás függvényében 440 és 490 nm-es megvilágítás mellett. Jól látható, hogy kezdetben a valós és mért fluoreszcens intenzitás lineárisan változik. Amikor viszont az intenzitás $250 \mu\text{M}\cdot\text{cm}^2$ fölé emelkedik, az optikai rendszer elkezd szaturálódni és a rendszer a valós fluoreszcens intenzitásnál kevesebbet mér. Megjegyzendő, hogy a 440 és 490nm-es emissziós értékek nem paralel módon változnak, azaz a 490/440-es hányados a fluoreszcens intenzitás változásával szintén változik. Alacsony fluoreszcens intenzitás mellett a 490/440-es hányados 2, az intenzitás emelkedésével viszont a hányados mindössze 1,2.

5.1.2 A fluoreszcens intenzitás befolyásolja a 490/440 hányados mértékét pankreász vezetéksejtekben

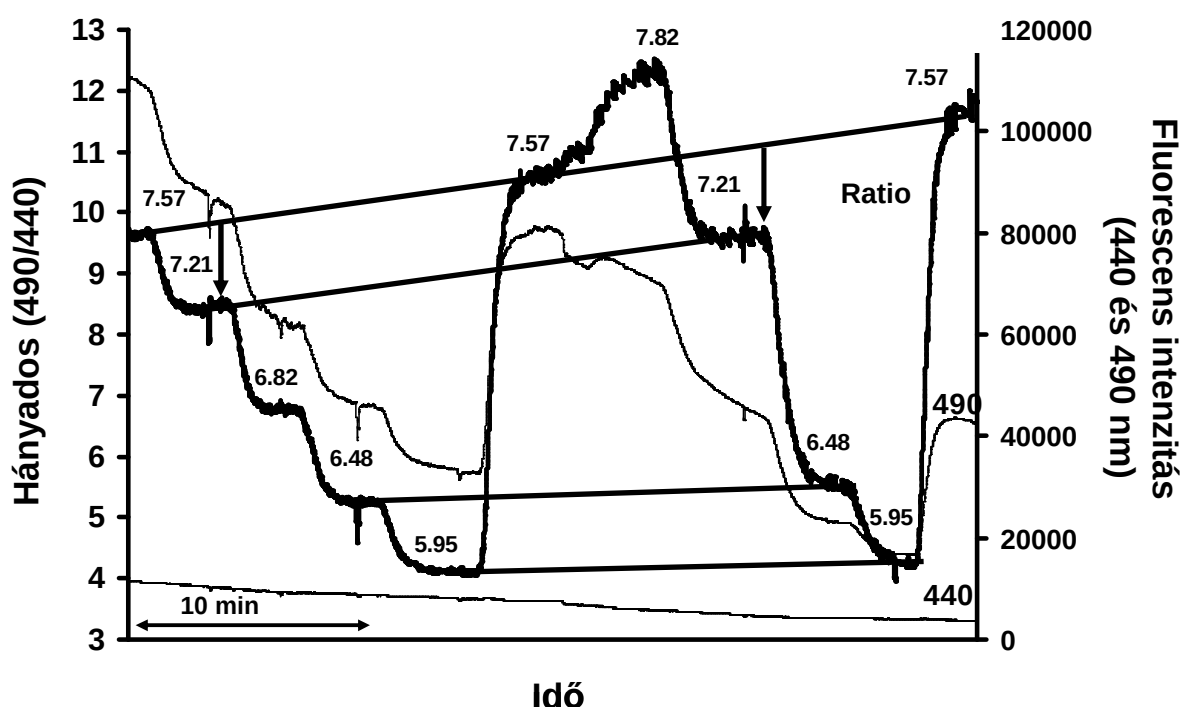
Az előző kísérletsorozatban egyértelművé vált, hogy a korábbi leírásokkal ellentétben a 490/440-es hányados egy sejtek nélküli rendszerben nem állandó. Ezért a következő kísérletsorozatban megvizsgáltuk, hogy változik-e a 490/440-es hányados mértéke amennyiben pankreász vezetéksejtekben vizsgáljuk az intenzitást. Természetesen ekkor már nem BCECF-et, hanem BCECF-AM-et használtunk. A sejteket 20-30 percen keresztül $2\mu\text{M}$ BCECF-fel töltöttük. Ezt követően a sejteket standard HEPES oldattal 4-5 ml/perc sebességgel perfundáltunk. A záróablak méretet 8 cm^2 -ként 0 és 88 cm^2 között növeltük. Tekintettel arra, hogy az extracelluláris tér a kísérlet alatt állandó volt (standard HEPES oldat) a sejtek pH_i értékének is állandónak kellett lennie. A 7. ábra jól mutatja, hogy a záróablak méretének növelésével a 490/440-es hányados csökken. A korábban BCECF-fel, sejtek nélkül végzett (6. ábra) és BCECF-AM-mel sejteken végzett (7. ábra) kísérletek egyértelműen bizonyítják, hogy a 490/440-es hányados nem csak a pH függvényében változhat.



7. ábra. A záróablak méretének hatása a fluoreszcens intenzitásra. (A) Intakt pankréász duktusz fénymikroszkópos képe. **(B):** A fluoreszcens intenzitások egymáshoz való viszonya. A sejteket 20-30 percen keresztül $2\mu\text{M}$ BCECF-fel töltöttük. Ezt követően a sejteket standard HEPES oldattal 4-5 ml/perc sebességgel perfundáltunk. A záróablak méretet 8 cm^2 -ként 0 és 88 cm^2 között növeltük.

5.1.3 pH kalibrációs görbék felvétele BCECF-AM festék használata során pankréász vezetéksejtekben

Kísérleteinket 10 különböző duktuszon végeztük. A 8. ábrán egy reprezentatív kísérletet mutatunk be. A pH kalibrációt magas $[\text{K}^+]$ koncentrációjú oldatban feloldott $10\mu\text{mol/l}$ nigericin adása mellett, az extracelluláris pH 5,95 és 8,46 között történő változtatásával végeztük ⁽¹⁷¹⁾. Mivel az intracelluláris K^+ koncentráció magas, a nigericin pedig egy K^+/H^+



8. ábra .A 490/440-es hányados kalibrációja pankréász vezetékesjtekben. Kísérleteinket 10 különböző duktuszon végeztük. A 8. ábrán egy reprezentatív kísérletet mutatunk be. A pH kalibrációt magas $[K^+]$ koncentrációjú oldatban feloldott $10\mu\text{mol/l}$ nigericin adása mellett, az extracelluláris pH 5,95 és 8,46 között történő változtatásával végeztük. Az azonos pH-hoz tartozó pontokat összeköttöttük. Jól látható, hogy az azonos pH-hoz tartozó hányados nem állandó a kísérlet alatt.

cserélő transzporter szerepet tölt be, a pH_i gyorsan beáll az extracelluláris pH szintjére. A különböző pH-k 490 és 440 nm-en mért emissziós fluoreszcens intenzitásának a mértéket a 8. ábra mutatja. A záróablak mérete a kísérlet alatt végig állandó volt. A kísérlet minél pontosabb lebonyolítása érdekében a kísérlet elején és a legvégén azonos extracelluláris pH-jú oldatot használtunk (önkéntesen a 7,57-es pH-jú oldatot választottuk). A 8. ábrán jól látható, hogy az emissziós 490/440-es hányados $pH_i = 7,57$ -nél a kísérlet elején (9,7) és a végén (11,7) különbözik. Annak ellenére, hogy azonos záróablak méretet használtunk, a festék vesztés miatt (ami egyértelműen kijelenthető a 440 nm-nél mért fluoreszcens intenzitás csökkenése láttán) a sejtből kiáramló teljes fluoreszcens intenzitás csökkent, aminek következtében a 490/440-es hányados emelkedett (8. ábra). Különböző pH-jú oldatoknál is - hasonlóképpen a 7,57-es pH-hoz - 490/440-es hányados emelkedést

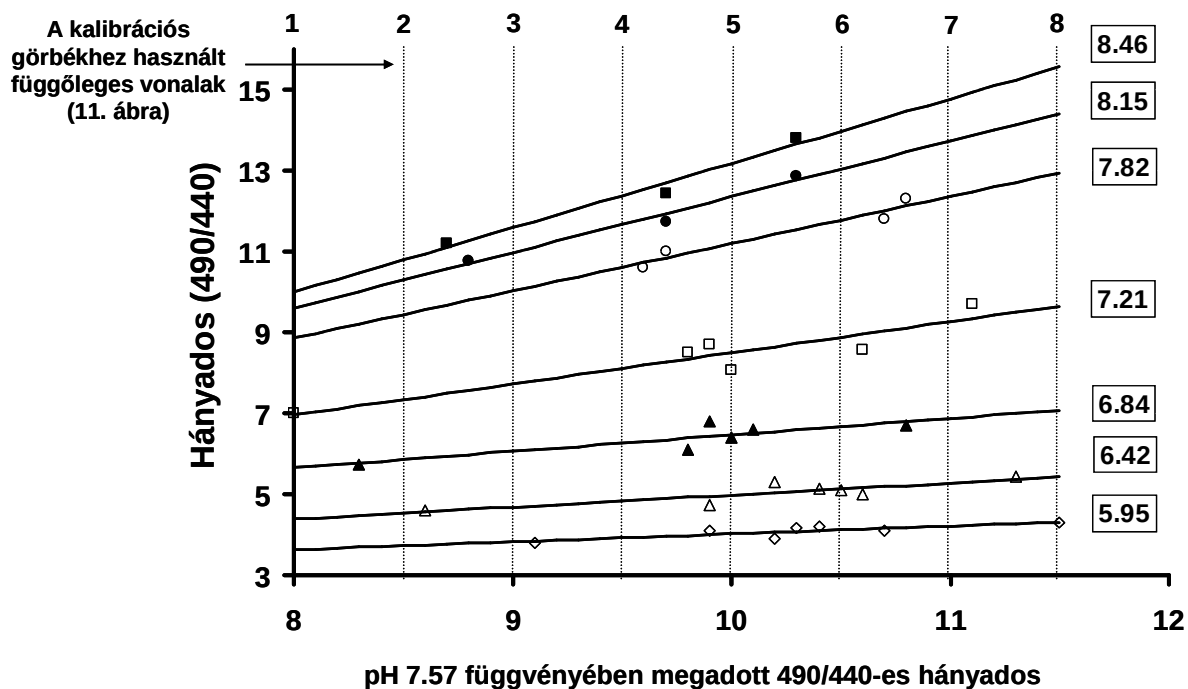
kaptunk a kísérlet során. A 8. ábrán látható egyenes vonalak az azonos pH-hoz tartozó 490/440-es hányadosokat kötik össze. Fontos megjegyezni, hogy az összekötő vonalak meredeksége minden egyes pH esetén különbözik. Minél magasabb a pH értéke annál meredekebb a görbe. A BCECF-fel történt kísérletek esetében korábban a 490/440-es fluoreszcens hányadoshoz mindössze egy pH_i értéket rendeltek (standard kalibrációs görbe) ^(53, 90, 165). Kísérleteink igazolták, hogy festékvésztes miatt a 490/440-es hányados változik, ezért amennyiben csak egy értéket használunk, akkor a kísérlet végén már nem tudjuk pontosan meghatározni az intracelluláris pH-t. Ráadásul, mivel minden kísérletnél változik a sejten belüli festékkoncentráció mértéke és sok esetben a záróablak mérete sem állandó, a kezdeti 490/440-es hányados minden egyes kísérletnél is különböző lehet. Annak érdekében, hogy a kísérletek közötti és alatti 490/440-es hányados azonos pH melletti különbözőségét kivédjük, egy adott pH-hoz tartozó emissziós hányadost, mindig egy másik pH-hoz tartozó hányados függvényében kell megadnunk. Kísérleteink során a 7,57-es értéket választottuk önkényesen referencia pH-nak. Ha jól megfigyeljük a 8. ábrát, akkor jól látható, hogy a kísérlet elején a 8,5-es hányados 7.21-es pH-t jelent, amivel egyidőben a referencia pH-hoz (7,57) tartozó hányados értéke 9,8. A kísérlet végén viszont a 9.6-os emissziós hányados jelenti a 7,21-es pH-t, amivel egyidőben a referencia pH (7,57) hányadosa 11,2. Azaz jól látható, hogy egy hányadoshoz tartozó pH-t mindig csak egy másik pH és hányados függvényében tudjuk pontosan megadni. Annak érdekében, hogy elkészíthessük a kalibrációs görbéket, 10 különböző duktuszon 36 különböző pH esetben (5,95 és 8,46 között) rögzítettük a 490/440-es emissziós hányados értékét (9. ábra). Ezen adatok értékeléséhez a fluoreszcens hányadosokat minden esetben a 7,57-es pH-nál rögzített 490/440-es hányados függvényében adtuk meg (9. és 10. ábra). A 10. ábrán látható keresztmetszeti vonalak az adott pH-hoz (5.95, 6,42, 6,84, 7,21, 7,82, 8,15, 8,46) tartozó értékekre állított regressziós vonalak. Az adott mérési

pontok szórása a regressziós vonalhoz képest minimális. A 10. ábrán az is jól látszik, hogy minél magasabb a pH érték annál meredekebb a pH-hoz tartozó regressziós vonal.

pH	490/440 hányados pH_i	490/440 hányados pH_i = 7,57
8,46	11,2	8,7
	12,5	9,7
	13,8	10,3
8,15	10,8	8,8
	11,7	9,7
	12,9	10,3
7,82	10,6	9,6
	11,0	9,7
	11,8	10,7
	12,3	10,8
7,21	7,0	8,0
	8,5	9,8
	8,7	9,9
	8,1	10,0
	8,6	10,6
	9,7	11,1
6,84	5,7	8,3
	6,1	9,8
	6,8	9,9
	6,4	10,0
	6,6	10,1
	6,7	10,8
6,42	4,6	8,6
	4,8	9,9
	5,3	10,2
	5,1	10,4
	5,1	10,5
	5,0	10,6
	5,4	11,3
5,95	3,8	9,1
	4,1	9,9
	3,9	10,2
	4,1	10,3
	4,2	10,4
	4,1	10,7
	4,3	11,5

9. ábra. A különböző pH-jú oldatok során mért 490/440-es hányados a pH=7,57-es referencia pH-hoz viszonyítva.

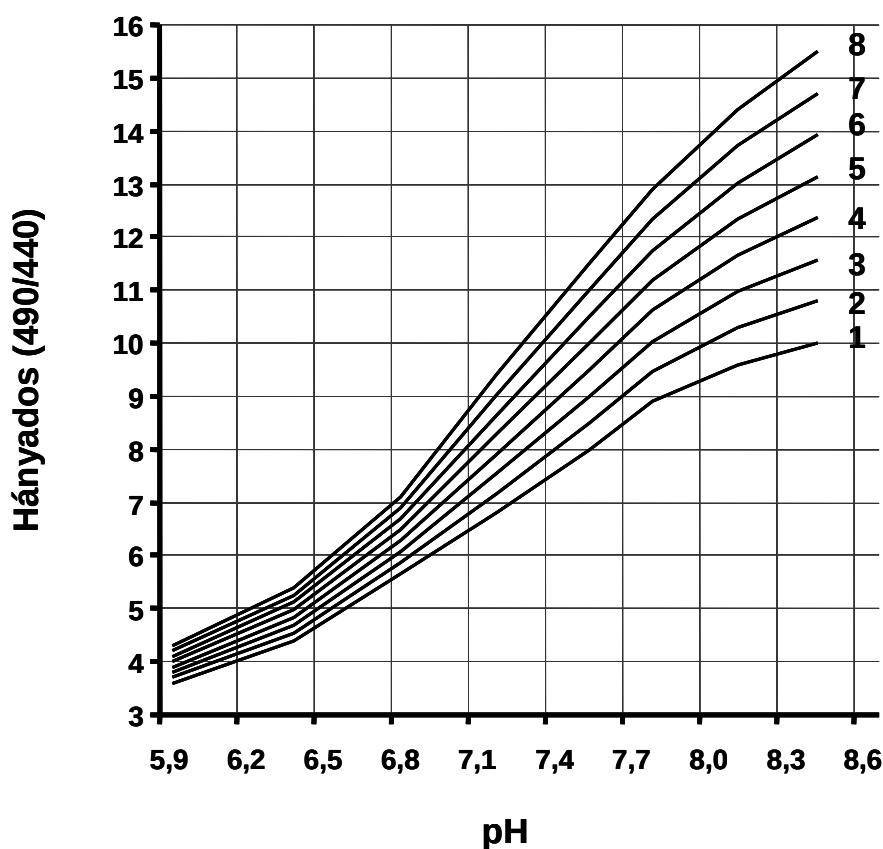
Az első oszlop az extracelluláris oldalt pH-ját mutatja, ami nigericin adása mellett megegyezik az intracelluláris pH-val. A második oszlop az ehhez tartozó 490/440-es hányadosokat mutatja. A 8. ábra második oszlopában jól látható, hogy a kísérlet alatt a pH-hoz tartozó hányados változik, ezért a pH-hoz tartozó hányadost mindig csak egy másik pH és hányados függvényében tudjuk pontosan megadni. Ezért a harmadik oszlopba feltüntettünk egy referencia pH-t, ami által megállapítható a pH egységek és a hányados egységei közötti viszony megállapítására. A táblázat 10 duktuszon végzett 36 mérést tartalmaz. Ezeket a pontokat a 10. ábra grafikonján ábráztuk.



10. ábra. A különböző pH-jú oldatok során mért 490/440-es hányados és a pH=7,57-es referencia pH egymáshoz való viszonya. Az itt ábrázolt adatokat a 9. ábra tartalmazza. Az X tengely a 7,57-es pH-hoz tartalmazó hányadost mutatja, míg az Y tengely a jobb oldalon feltüntetett pH-hoz tartozó hányadost (lásd 9. táblázat). Az egyes szimbólumok különböző pH-t jelentenek. A horizontális vonalak az adott pH-hoz tartalmazó pontokra állított regressziós egyenesek. A kalibrációs görbék elkészítéséhez 8 függőleges vonalat jelöltünk be az ábrán. A kalibrációs görbéket a 11. ábra tartalmazza.

8 kalibrációs görbét vettünk fel a 10. ábrán látható függőleges vonalak mentén. A függőleges vonalak a vízszintes regressziós vonalakat metszették, ezáltal az adott függőleges vonalak mentén 7 pH értéket tudtunk a 490/440 hányados függvényében (Y tengely) felvenni, kihangsúlyozva azt, hogy ezen értékek mellé 8.-nak a referencia pH-hoz (7,57) tartozó 490/440 hányadost is ismerjük (X tengely metszéspontja). Természetesen ezzel a módszerrel számtalan kalibrációs görbe vehető fel a 7,57-es referencia pH-hoz tartozó 490/440 hányados függvényében. Az általunk kiválasztott 8 kalibrációs görbét a 11. ábra mutatja. A görbéket 1-8 között számoztuk meg, melyek megegyeznek a 10. ábrán látható függőleges vonalakról gyűjtött pontokkal. Fontos megjegyezni, hogy ezen

kalibrációs görbék nem párhuzamosak egymással. Az egyes görbék közötti távolság a pH emelkedésével folyamatosan nő.

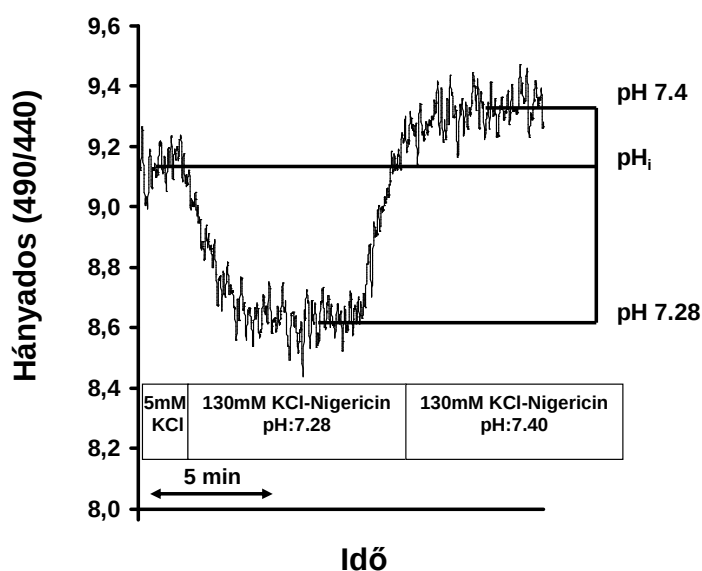


11. ábra. Kalibrációs görbék. A kalibráció menetét a 8-10. ábra tartalmazza. Az egyes kalibrációs görbék a 9. ábrán függőleges vonallal bejelölt pH pontok 490/440-es hányadoshoz való viszonyát mutatja. A kalibrációs görbék nem párhuzamosak egymással. Az egyes görbék közötti távolság a pH emelkedésével folyamatosan nő.

5.1.4 A pankreász duktális vezetéksejtek nyugalmi intracelluláris pH-jának meghatározása

Ezt követően úgy gondoltuk, hogy ezt a kalibrációs technikát adaptáljuk a pankreász vezetéksejtek pH_i méréséhez. Erre kétféle lehetőségünk is volt: i) minden egyes kísérlet esetén a sejteken elvégezzük a pH_i kalibrációt vagy ii) keresünk egy olyan referencia pH-t amihez a megfelelő kalibrációs görbét kiválaszthatjuk. Az első lehetőség nehezen kivitelezhető, hiszen minden egyes kísérlet esetén végig kellene csinálni a pH kalibrációt magas $[K^+]$ koncentrációjú oldatban feloldott nigericin adása mellett. A második

lehetőség viszont kivitelezhetőnek látszott, ha a sejtek nyugalmi pH értékét vesszük referencia pH-nak. Hipotézisünk szerint azonos kondíciók mellett a pankreász vezetéksejtek intracelluláris pH_i -nak közel azonosnak kell lenniük. Amennyiben a hipotézisünk beigazolódik akkor a kísérletek elején mért 490/440-es hányadoshoz tartozó referencia pH egyenlőnek tekinthető a nyugalmi pH-val. A kérdés eldöntése céljából a pankreász vezetéksejteket HEPES oldattal perfundáltuk (pH 7,4) (12. ábra). Ezt követően 8 percen keresztül magas $[K^+]$ koncentrációjú $10\mu M$ nigericint tartalmazó (pH 7,28) oldatra váltottunk. A kísérlet végén a sejteket pH 7,4-es magas $[K^+]$ koncentrációjú oldattal perfundáltuk (12. ábra). Rövid idő alatt mindössze két kalibrációs pontot vizsgáltunk, a nyugalmi pH meghatározását a Thomas féle klasszikus lineáris technikával végeztük (12. ábra). 8 kísérlet elvégzése során azt kaptuk, hogy a pankreász vezetéksejtek nyugalmi pH-ja $7,36 \pm 0,01$. A legkisebb pH érték 7,32, míg a legnagyobb 7,41 volt. Ezen eredmények egyértelműen igazolják, hogy azonos típusú sejtek pH-ja nyugalmi körülmények között, azonos kondíciók mellett megközelítőleg állandó.



12. ábra. A pankreász vezetéksejtek nyugalmi pH-jának meghatározása. A pankreász vezetéksejteket standard HEPES oldattal perfundáltuk (pH 7,4), majd ezt követően 8 percen keresztül magas $[K^+]$ koncentrációjú $10\mu M$ nigericint tartalmazó (pH 7,28) oldatra váltottunk. A kísérlet végén a sejteket pH 7,4-es magas $[K^+]$ koncentrációjú oldattal perfundáltuk. A nyugalmi pH meghatározását a Thomas féle klasszikus lineáris technikával végeztük.

5.1.5 Az intracelluláris pH meghatározása rövid idejű kísérletek esetén.

Tekintettel arra, hogy a sejtek nyugalmi pH-ja ismert (7,36), a kísérletek kezdeti 490/440-es hányadosát pedig megmérjük, a megfelelő kalibrációs görbe könnyedén kiválasztható. Ezáltal minden egyes kísérlet elején a pH és a fluoreszcens hányados viszony ismertté válik. Az élettani szempontból érdekes pH tartományban a kalibrációs görbék közel egyenesek, de nem párhuzamosak egymással, ezért egy meredekségi viszonyszámot (v) kell minden görbéhez megadnunk. Az adott görbéhez tartozó viszonyszám azt határozza meg, hogy 1 egységnyi 490/440 hányados változás mekkora mértékű pH változásnak felel meg. A 10. és 11. ábra jól mutatja, hogy minél magasabb a nyugalmi pH-hoz tartozó hányados annál kisebb a viszonyszám. Például, amikor a kezdetben mért 490/440 hányados 8,9, akkor a $v = 0,22$, azaz, 1 egységnyi változás a fluoreszcens hányadosban 0.22 egység pH változásnak felel meg. Ha a kezdetben mért 490/440 hányados 7,8, akkor a $v = 0,27$, stb.. Ezen megfigyelés egyenletben összefoglalva:

$$pH_i = pH_{i \text{ nyugalmi}} + v * (Hányados_{mért} - Hányados_{nyugalmi})$$

ahol:

pH_i a sejt intracelluláris pH értéke a kísérlet közben

pH_{i nyugalmi} a sejt nyugalmi pH-ja (7,36)

v viszonyszám

Hányados_{mért} a kísérlet alatt mért 490/440 nm emissziós hányados

Hányados_{nyugalmi} az a hányados, amit a kísérletek elején mérünk nyugalmi (pH=7,36) során