

MTA Doktori Tézisek

**A GASZTROINTESTINÁLIS EPITÉL SEJTEK
IONTRANSZPORT FOLYAMATAINAK
JELENTŐSÉGE ÉP ÉS KÓROS KÖRÜLMÉNYEK
KÖZÖTT**



Dr. Venglovecz Viktória

Szegedi Tudományegyetem

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

2018

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék.....	2
2. Rövidítések jegyzéke.....	3
3. Bevezetés.....	4
4. Irodalmi áttekintés.....	5
4.1. Az epitél sejtek általános jellemzése	5
4.2. Epiteliális iontranszport folyamatok.....	5
4.3. Gasztrointesztinális epitél sejtek	7
4.3.1. Pankréász duktális epitél sejtek	8
4.3.2. Nyelőcső epitél sejtek.....	9
4.4. Az epitél sejtek szerepe GI betegségekből	10
4.4.1. Akut pankreatitisz.....	10
4.4.2. Barrett nyelőcső.....	11
5. Célkitűzések	13
6. Anyagok és Módszerek	14
6.1. Állatok	14
6.2. Sejtvonalak	14
6.3. Betegek.....	14
6.4. Intra-interlobuláris pankréász duktuszok izolálása és mikroperfúziója.....	14
6.5. Fluoreszcens vizsgáló módszerek.....	15
6.6. HCO_3^- szekréció mérése	16
6.7. Patch clamp technika.....	16
6.8. Transzmissziós elektronmikroszkópia.....	17
6.9. Molekuláris biológiai technikák	17
6.10. Apoptózis vizsgálat	18
6.11. Kísérletes akut pankreatitisz modell.....	19
6.12. Statisztikai analízis	19
6.13. Etikai engedély	19
7. Eredmények és következtetések.....	20
7.1. A kenodezoxikólsav hatása a pankréász duktális sejtekre.....	20
7.1.1. A kenodezoxikólsav K^+ csatornákat aktivál a pankréász duktális sejteken.....	20
7.1.2. A K^+ csatornák szerepe a kenodezoxikólsav-indukálta duktális HCO_3^- szekrécióban..	21
7.1.3. A K^+ csatornák lokalizációja és az epesav transzporterek expressziója pankréász duktális sejteken	21
7.2. Az urzodezoxikólsav hatása a pankréász duktális sejtekre	22
7.2.1. Az urzodezoxikólsav hatása a pankréász duktális sejtek iontranszport folyamataira és a $(\text{Ca}^{2+})_i$ szintre	22
7.2.2. Az urzodezoxikólsav védő hatása a kenodezoxikólsav-indukálta mitokondriális károsodással szemben.....	24
7.2.3. Az urzodezoxikólsav csökkenti a kenodezoxikólsav-indukálta sejthalál mértékét és a pankreatitisz súlyosságát	25
7.3. Az etanol és nem-oxidatív metabolitjainak a hatása a pankréász duktális sejtekre.....	26
7.3.1. Az alkohol és nem-oxidatív metabolitjainak a hatása a CFTR csatorna aktivitására.....	26
7.3.2. Az ATP szerepe az alkohol és nem-oxidatív metabolitjainak a hatásában.....	28
7.4. Az epesavak hatása a nyelőcső epitél sejtekre.....	29
7.4.1. pH szabályozó mechanizmusok a nyelőcső epitél sejteken.....	29
7.4.2. Az epesavak intracelluláris megemelik a $(\text{Ca}^{2+})_i$ szintet a nyelőcső epitél sejtekben.....	30
7.4.3. Az epesavak akut és krónikus hatása az iontranszporterek aktivitására	31
8. Új eredmények összefoglalása	34
9. Kutatásaink jelentősége, jövőbeni tervek	36
10. Tézisek alapját képező közlemények jegyzéke	37
11. Scientometriai adatok	38
12. Köszönetnyilvánítás	40

2. Rövidítések jegyzéke

Ac	acetaldehid
AP	akut pankreatitisz
ATP_i	intracelluláris ATP
BAC	epesav koktél („bile acid cocktail”)
BAPTA	1,2-bisz-o-aminofenoxietán-N,N,N,N-tetraecetsav
BCECF	2,7-bisz-2-karboxietil-5-(és-6-)karboxifluoreszcein
BE	Barrett nyelőcső
BK_{Ca}	nagy konduktanciájú Ca ²⁺ -aktiválta K ⁺ csatorna
BNPP	bisz-(4-nitrofenil)foszfát
BSA	szarvasmarha szérum albumin
cAMP	ciklikus adenzin monofoszfát
(Ca²⁺)_i	intracelluláris Ca ²⁺
CaCC	Ca ²⁺ -aktiválta Cl ⁻ csatorna
CCCP	karbonil cianid m-klorofenil hidrazon
CDCA	kenodezoxikólsav
CFTR	cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor
ΔΨ_m	mitokondriális membránpotenciál
DC	dezoxikólsav
DMSO	dimetil szulfoxid
DOG	2-dezoxiglükóz
EGTA	etilén glikol-bisz(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraecetsav
FA	zsírsav
FAEE	zsírsav etil-észter
GAPDH	gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz
GC	glikokólsav
GCDC	glikokenodezoxikólsav
GDC	glikodezoxikólsav
GERD	gastroesophagealis reflux
IAA	iodoacetamid
IBT	iberiotoxin
J(B/min)	ionok áramlási sebessége
IK_{Ca}	közepes konduktanciájú Ca ²⁺ -aktiválta K ⁺ csatorna
H₂DIDS	4,4'-Diisothiocyanatodihydrostilbene-2,2'-diszulfonsav, disodium só
FURA 2	5-oxazolecarboxilik sav, 2-(6-(bisz(2-((acetoxi)metoxi)-2-oxoetil)amino)-5-(2-(2-(bisz(2-((acetiloxi)metoxi)-2-oxoetil)amino)-5-metilfenoxi)etoxi)-2-benzofuranil)
IP₃	inozitol-trifoszfát
HPRT	hipoxantin-guanin foszforiboziltranszferáz
mPTP	mitokondriális permeabilitás tranzíciós pórus
NBC	Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ kotranszporter
NHE	Na ⁺ /H ⁺ kicserélő
NS11021	1-(3,5-bisz-trifluorometilfenil)-3-(4-bromo-2-(1H-tetrazol-5-yl)-fenil)-tiourea
pH_i	intracelluláris pH
PBS	foszfát puffer sóoldat
POA	palmitolsav
POAEE	palmitolsav etil-észter
SK_{Ca}	kis konduktanciájú Ca ²⁺ -aktiválta K ⁺ csatorna
TC	taurokólsav
TCDC	taurokenodezoxikólsav
TDC	taurodezoxikólsav
UDCA	urdezoxikólsav

3. Bevezetés

Az epitél sejtek a szervezet egyik fő sejtípusát alkotják, melyek mind morfológiájukat, mind pedig funkciójukat tekintve nagy változatosságot mutatnak. Mivel számos helyen előfordulnak, változatos funkciókat láthatnak el, úgy mint a szervezet védelme a külső behatásokkal (kórokozók, szennyeződések) szemben, szerepük lehet az egyes terek elhatárolásában, illetve rajtuk keresztül fontos transzport folyamatok mennek végbe. Ezen transzport folyamatok közé tartozik a szekréció és abszorpció, mely a különböző ionok, víz, tápanyag, enzimek vagy akár szabályozó fehérjék egyes kompartmentek közötti transzportját biztosítja. Talán az egyik legfontosabb transzport folyamat az epitél sejteken keresztüli iontranszport, melyben transzport fehérjék vesznek részt. Ezek a fehérjék eltérőképpen expresszálódnak az epitél sejtek vér felőli, azaz bazális illetve lumen felőli, azaz apikális membránján, mely az epitél sejtek polarizáltságát adja.

Érdeklődésem a gasztrointesztinális epitél sejtek tanulmányozására esett, ezen belül is a pankréász illetve a nyelőcső epitél sejtek vizsgálatára. Bár funkciójukat tekintve a pankréász epitél sejtek a mirigyhámok, a nyelőcső epitél sejtek pedig a fedőhámok közé tartoznak, rajtuk keresztül fontos iontranszport folyamatok mennek végbe, mely mind fiziológiás mind pedig patofiziológiás körülmények között meghatározóak lehetnek. A pankréász esetében az epiteliális iontranszport biztosítja a pankréász nedv megfelelő ionösszetételét és pH-ját, ami az emésztés szempontjából nélkülözhetetlen. A nyelőcső epitél sejteken keresztüli iontranszport folyamatok pedig elsősorban a refluxátumban található gyomorsav károsító hatásával szemben látnak el fontos védelmi funkciót. Köztudott, hogy az epiteliális iontranszport zavara számos betegség kialakulásában szerepet játszik, úgy mint a cisztás fibrózis vagy a diarrhea. Az utóbbi évek kutatásai mutattak rá arra, hogy a megváltozott iontranszport jelentőséggel bír a pankréaszt érintő, gyulladásos megbetegedések (pankreatitisz) illetve a nyelőcsövet érintő szöveti elváltozások (Barrett nyelőcső) pathomechanizmusában is. Az akut pankreatitisz (AP) az egyik leggyakoribb, akut emésztőszervi megbetegedés (13-18 beteg/100 000 lakos), melyben a morbiditás és mortalitás még ma is magas. Az esetek döntő többsége enyhe vagy közepes lefolyású, míg a betegek kb. 20%-a a súlyos betegcsoportba tartozik. Bár az elmúlt évek alatt sokat fejlődtek mind a diagnosztikus eljárások mind pedig a belgyógyászati és sebészi terápia, a súlyos esetekben a halálozás akár a 30%-ot is elérheti. Ez az elfogadhatatlanul magas szám, többek közt azzal magyarázható, hogy a betegség pathomechanizmusa a mai napig nem teljesen ismert, ami megnehezíti hathatós terápiák kidolgozását. A másik emésztőszervi megbetegedés, amely szintén sok embert érint (a lakosság kb. 30-40%-át) a nyelőcső reflux, mely nagymértékben ronthatja az életminőséget és sokszor gyógyszeres kezelést is igényelhet. A hosszú időn át fennálló reflux szövődményeként Barrett nyelőcső (BE) alakulhat ki, amely egy premalignus elváltozás és nagymértékben növelheti a diszplázia majd később a nyelőcső adenokarcinóma kialakulását. Jelenleg nem ismert pontosan milyen mechanizmus hatására indulnak meg a normál nyelőcső nyálkahártyában a morfológiai elváltozások illetve a malignus folyamatok, ezért a BE-diszplázia-adenokarcinóma szekvenciában szerepet játszó mechanizmusok feltérképezése akár prognosztikus vagy diagnosztikus markerként is szolgálhat.

Mind a pankréaszt mind a nyelőcsövet érintő gyulladásos megbetegedések világszerte növekvő tendenciát mutatnak, főként az iparilag fejlett országokban, nagy terhet róva az egészségügyre. A több mint 10 éves kutatómunkám során az epiteliális ionháztartás fenntartásában fontos szerepet játszó transzportereket és szignalizációs útvonalakat tanulmányoztam normál és patológias körülmények között. Munkám során célul tűztam ki, hogy megvizsgáljam az iontranszport folyamatok szerepét az AP és BE kialakulásában és progressziójában, illetve olyan terápiás célpontokat azonosítsak, melyek ígéretes kiindulópontot jelenthetnek az említett betegségek kezelésében. Bár vizsgálataim kizárólag az alap kutatásra szorítkoztak, reményeim szerint eredményeink nem csak elméleti, hanem egyszer majd *klinikai szempontból is jelentőséggel bírnak.*

4. Irodalmi áttekintés

4.1. Az epitél sejtek általános jellemzése

Az epitélium vagy hámszövet egyike az 5 alap szövetnek. Az embrionális fejlődés során mindhárom csiralemezből kialakulhat és a szervezetben szinte mindenhol előfordul, ahol elsődleges szerepe, hogy védelmet biztosítson a külső, káros hatásokkal szemben. Emellett az epitél sejtek fontos szerepet játsznak az abszorpcióban (belek), a szekrécióban (mirigyek), az exkrécióban (vese) illetve a gázok cseréjében (tüdő és vérerek). Epitélium alkotja a bőrt, egyes érzékhámokat, a tápcsatornát, a kardiovaszkuláris, légző-, urogenitális- illetve nyirokérrendszert bélelő hámokat, valamint a külső és belső elválasztású mirigyeket. Az epitélium jellemzője, hogy szorosan kapcsolódó epitél sejtek építik fel, melyek speciális struktúrákon keresztül kapcsolódnak egymáshoz, amik egyben a sejtek közötti kommunikációt is biztosítják. Az epitél sejtek alakjuk és működésük szempontjából nagyon sokfélék lehetnek, van azonban néhány tulajdonság, amely ezen sejteket általánosan jellemzi. Ezek közül az egyik a *polarizáltság*, ami azt jelenti, hogy a bazális és apikális membrán mind funkcionálisan mind biokémiaileg eltér egymástól, ami lehetővé teszi az anyagok egyirányú mozgását. Az *adhézió* az epitél sejtek egymás közötti kommunikációját biztosítja, illetve megakadályozza az egyes molekulák diffúzióját a felszín felől az epitél sejtek laterális felszíne felé. Az epitél sejtek *regenerációs* képessége teszi lehetővé, hogy az előregedett vagy sérült sejteket képes folyamatosan pótolni, ezáltal az epitélium integritását megőrizni. Az *avaszkularizáció* alapvetően jellemzi az epitéliumot, a tápanyag és az oxigén diffúzióval jut el a sejtekhez a kötőszövetek felől. Egyes hámszövetek idegvégződéseket is tartalmaznak, ezáltal az *érzékelésben* (szaglás vagy ízérzékelés) töltenek be fontos szerepet. Az epitél sejtek csoportosítása több szempont szerint is történhet. Funkció alapján megkülönböztetünk fedőhámot, érzékhámot, felszívóhámot, pigmenthámot és mirigyhámot. Ezek közül munkám során a gasztrointesztinális fedő-, és mirigyhámok szekréciós folyamatait vizsgáltam, különös tekintettel az epiteliális iontranszport folyamatokra.

4.2. Epiteliális iontranszport folyamatok

Az epitél sejtek egyik fő funkciója, hogy tereket határolnak el egymástól, melyek különböző ionösszetételűek, pH-júak vagy ozmolaritásúak lehetnek. Ezen képességük az iontranszporter fehérjéknek köszönhető, melyek polarizáltan helyezkednek el az epitél sejtek membránján lehetővé téve ez által az ionok egyirányú mozgását. Az iontranszporterek emellett fontos szerepet játszanak a sejten belüli pH egyensúly vagy sejtterefogat fenntartásában is. A főbb iontranszporterek melyek az epitél sejteken előfordulnak a következők:

Na⁺/H⁺ kicserélő

A Na⁺/H⁺ kicserélő (NHE) egy elektroneutrális, másodlagosan aktív transzporter 1 Na⁺:1 H⁺ sztöchiometriával. Az NHE alapvető szerepet játszik az intracelluláris pH (pH_i) és a sejt térfogat szabályozásában, valamint meghatározza a sejten belüli [Na⁺]-t is. A transzporterén keresztül 1 extracelluláris Na⁺ cserélődik 1 intracelluláris H⁺-ra, így a pH alkalizálásában van szerepe. A csatorna különböző stresszhatásokra aktiválódik, úgy mint a sejtzsugorodás, acidózis, hipoxia és mechanikai stimulus. Jelenleg 10 izoformája ismert (NHE1-10), melyek 25-75% aminosav egyezést mutatnak. Az NHE izoformák közül az NHE1 szinte minden sejten előfordul, a többi izoforma pedig szövetspecifikus kifejeződést mutat. Az NHE1 fehérjét az *SLC9A1* gén kódolja. A fehérje 815 aminosavból álló

glikoprotein, mely 12 transzmembrán domén-el rendelkezik. A plazmamembránon elhelyezkedő NHE-k biokémiai analízise azt mutatja, hogy a fehérje leginkább dimér formában fordul elő. A hidrofil, C-terminális domén foszforilálódik aktiváció során. A transzporter normál körülmények között inaktív, legfőbb stimulusa a pH_i csökkenés. A H^+ kötődése egy konformációváltozást indukál a fehérjében, ami a fehérje aktivációját fogja eredményezni. A sejten belüli pH szabályozása mellett az NHE fontos szerepet játszik a sejtterefogat meghatározásában, egyes sejtek apoptotikus folyamataiban, sejtosztódásban, vagy differenciálódásban.

Na^+/HCO_3^- kotranszporter

A Na^+/HCO_3^- kotranszporter (NBC) egy elektrogén transzporter, amely elsődleges szerepe a sejten belüli pH egyensúly fenntartása. Az NBC két vagy három HCO_3^- és egy Na^+ transzportját szabályozza. A transzport irányát elsősorban a HCO_3^- és a Na^+ elektrokémiai gradiense határozza meg és elég nagy szöveti eltéréseket mutat. A vesében 1 Na^+ és 3 HCO_3^- transzportját mediálja a sejtől kifelé, míg a pankréász duktális sejtekben 1 Na^+ és 2 HCO_3^- sejtbe történő felvételét szabályozza. Az NBC működése során a HCO_3^- , CO_3^{2-} vagy $NaCO_3^-$ formában is transzportálódhat. A transzporter nem permeabilis más organikus anionokra, valamint a Na^+ sem helyettesíthető Li^+ -al vagy K^+ -al. Az NBC1 gén 3 splice variánst kódol, a kNBC1 variánst melyet elsőként veséből klónozták, a pNBC1 variánst melyet először a pancreas-ból izoláltak, illetve az rb2NBC variánst, melyet patkány agyból klónoztak és kizárólag az agyban fordul elő. A pNBC1 variáns aktivitását az inozitol-1,4,5-trifoszfát receptor kötő fehérje (IRBIT) jelentősen fokozza, feltehetőleg közvetlen úton, a fehérjéhez történő kötődés révén. A transzporter aktivitását a protein kináz C fehérje aktiválódása is szabályozza, melyben az NBC foszforilációja játszhat szerepet.

Cl^-/HCO_3^- kicserélő

A Cl^-/HCO_3^- kicserélő a sejtől vagy a sejtbe történő HCO_3^- transzportot szabályozza, ezáltal alkalizálja vagy acidifikálja a sejtet. Számos izoforma tartozik ebbe a családba, melyeket az SLC4A és SLC26A géncsalád valamelyik tagja kódol. Munkám során elsősorban az SLC26A család tagjait vizsgáltam, közül is az SLC26A3, és -6 izoformákat. Az SLC26A6 fehérje elsősorban a vesébe lokalizálódik, ahol a proximális tubulusokban, a Henle kacsban, a macula densa sejtekben illetve a gyűjtő csatorna epitél sejtjeiben fordulnak elő. Emellett a fehérje előfordul a duodenum mikrovillusaiban illetve a szívben. A pankréászban mind az A6 (PAT-1) mind pedig az A3 (DRA) izoforma megtalálható a duktális sejtek apikális membránján, ahol összehangoltan működnek mind egymással mind pedig a CFTR Cl^- csatornával. Ennek az összehangolt működésnek az eredményeként, illetve az A3 és A6 izoformák eltérő lokalizációjának köszönhetően (az A6 proximálisan míg az A3 disztálisan helyezkedik el), a duktális sejtek, akár 140 mM HCO_3^- szekréciójára képesek. Az A3 és A6 izoforma legfontosabb különbsége, hogy eltérő sztöhiometriával szekretálják a HCO_3^- -ot. Mind az A3 mind pedig az A6 izoforma elektrogén. Az SLC26A6 2:1 arányban transzportál HCO_3^- -ot és Cl^- -ot, míg az A3 izoforma esetében ez az arány 1:2-höz. SLC26A6 génkiütött egereken végzett vizsgálatok kimutatták, hogy az izoformák képesek egymás hatását kompenzálni, ugyanis az A6 izoforma hiányában sem a HCO_3^- szekréció mértéke sem pedig a szekretált folyadék mennyisége nem csökken. Ez feltehetőleg azzal magyarázható, hogy ezekben az egerekben jelentősen megnő az A3 izoforma kifejeződése, amely képes az A6 izoforma hiányában is biztosítani a megfelelő szekréciót. Mind az SLC26A6 mind pedig az A3 esetében az extracelluláris $[Cl^-]$ meghatározza a transzporter irányát. Magas lumenális Cl^- jelenlétében (124 mM lumenális Cl^- és 25 mM lumenális HCO_3^-) mindkét transzporter Cl^- -ot vesz fel és HCO_3^- -ot szekretál. Alacsony lumenális Cl^- (~ 7mM) mellett mindkét transzporter működése megfordul és Cl^- -ot szekretálnak HCO_3^- ellenében. A transzporterek elsősorban Cl^- és HCO_3^- ionokra szelektívek, de más molekulák is transzportálódhatnak rajtuk keresztül, bár ezekre nézve a

transzportereknek kisebb permeabilitása van. Így az SLC26A6 képes transzportálni oxalátot, szulfátot és OH^- -t, míg az SLC26A3 bromidot, nitrátot, acetátot, szulfátot és oxalátot. A transzporternek jelenleg nincs specifikus gátlószere. A nem-specifikus gátlószerek közül legszélesebb körben a DIDS használatos, amely nem-szelektív módon gátolja az anion cserét.

Cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR)

A CFTR Cl^- csatorna az ATP-kötő kazetta (ABC) géncsalád egyik tagja. Az epitél sejtek apikális membránján helyezkedik el, megtalálható a tüdőben, a bélben illetve a külső elválasztású mirigyekben (pankréasz, nyálmirigy), ahol a víz és sók transzportját szabályozza. A csatorna alapvetően a Cl^- -ra szelektív de más ionok, úgy mint a I^- , Br^- , F^- vagy akár HCO_3^- is képes áthaladni rajta. A fehérje 1480 aminosavból épül fel és két egymással homológ doménből áll. Mindkét domén 6 transzmembrán szegmenst (M1-M6 és M7-M12) és egy nukleotid-kötő domént tartalmaz (NBD-1 és NBC-2). A két homológ domén egy úgynevezett R-domén-en keresztül kapcsolódik egymáshoz, amely számos foszforilációs helyet tartalmaz. A csatorna leginkább a Cl^- -ra szelektív. Az anionok és kationok közötti megkülönböztetésben az intracellulárisan elhelyezkedő töltés szelektivitás filter ezen belül is az M6 szegmensben 352-es pozícióban található, pozitív töltésű arginin játszik szerepet, amely egy elektrosztatikus akadályt képez a kationokkal szemben. Az Arg-352 hiányában a csatorna Na^+ áteresztő képessége többszöröse nő. A csatorna nyitódását két tényező befolyásolja, az egyik a foszforiláció a másik pedig az ATP megkötése és hidrolízise. A foszforilációs helyek az R domén-en találhatóak, melyek a protein kinázok (protein kináz A és C (PKA és PKC)) számára hozzáférhetőek. A foszforiláció növeli ugyan a csatorna nyitódását, de nem elégséges hozzá. Egyes tanulmányok szerint R domén hiányában is működőképes a csatorna, annyi különbséggel, hogy MgATP jelenlétében, foszforiláció nélkül is konstitutívan aktív. Az R domén hiánya emellett csökkenti a csatorna konduktanciáját illetve kevésbé stabil a pirofoszfát (PPi) által indukált nyitott állapot, ami arra utal, hogy az R domén valamilyen mértékben befolyásolja a nukleotidok és az NBD közötti kölcsönhatást. A csatorna nyitott és zárt állapotáért az ATP a felelős, amely az NBD-n keresztül képes kötődni a csatornához. Az ATP hidrolízise indukálja a csatorna nyitódását, majd a képződött ADP leválik. A jelenleg leginkább elfogadott nézet szerint, az NBD-1 domén-en történő hidrolízis nyitja, míg az NBD-2 domén-en történő hidrolízis zárja a csatornát. A csatorna nyitódása során a két NBD összekapcsolódik ami egy konformációs változást indukál a transzmembrán doménekben, melynek eredményeként az eddig intracellulárisan elhelyezkedő szubsztrátkötő hely az extracelluláris oldalra kerül, elősegítve ezáltal a Cl^- vagy más szubsztrát transzportját. Kísérleti adatok vannak arra nézve, hogy az NBD-1 domén-ben bekövetkező mutáció csökkenti a csatorna nyitódását, míg az NBD-2-ben bekövetkező mutáció a CFTR záródását lassítja. Ezek alapján elmondható, hogy a CFTR nyitódási/záródási frekvenciájában és időtartamában jelentős szereppel bír az NBD doménekben történő ATP hidrolízis. A CFTR deaktivációjában protein foszfatázok (PP2C és PP2A) vesznek részt, melyek defoszforilálják az R domént.

4.3. Gasztrointesztinális epitél sejtek

A gasztrointesztinális (GI) epitél sejtek több liter folyadékot szekretálnak és abszorbeálnak naponta, amely biztosítja a tápanyagok megemésztését és felszívódását. A napi ~7 liter mennyiségű, különböző ionokat és emésztőenzimeket tartalmazó szekréta a nyálmirigyek (~1 L), a gyomor (~1,5-2 L), a vékonybél (~1-1,5 L), a pankréasz (~1-1,5 L) és a máj (~1 L) működésének köszönhető. A termelt szekréta a vékony- és vastagbelen keresztül nagyrészt visszaszívódik és csak elenyésző mennyiség (0,2-0,3 L) távozik a széklettel. A kiválasztó és felszívó folyamatok különböző membránfehérjék, iontranszporterek és vízcsatornák összehangolt működése révén valósul meg. Munkám során az

epiteliális iontranszport folyamatokat és az ehhez kapcsolódó sejten belüli szignalizációs útvonalakat vizsgáltam a pankréaszban illetve a nyelöcsőben.

4.3.1. Pankréasz duktális epitél sejtek

A pankréasz egy kettős elválasztású mirigy, endokrin és exokrin részt különíthetünk el benne. Az endokrin részt a Langerhans szigetek alkotják, melyek főként α és β sejtekből épülnek fel és a szénhidrát anyagcsere szabályozásában játszanak döntő szerepet. Az exokrin pankréaszban a két fő sejt típus az acinus és a duktális sejtek. Az acinus sejtek felelősek az emésztőenzimek szintéziséért, melyeket inaktív formában szekretálnak a pankréasz nedvébe. A duktális sejtek az ionok és víz szekréciójában játszanak szerepet, ami a pankréasz nedv térfogatának nagy részét adja. Bár a duktális sejtek az exokrin pankréasz tömegének elenyésző részét képezik, azonban funkciójukat tekintve nélkülözhetetlenek a normális homeosztázis fenntartásában. A duktális sejtek az intercelluláris kanalikulusokból indulnak melyek intra- és interlobuláris duktuszokká szedődnek össze, majd az interlobuláris duktuszok a fő duktális vezetékbe (Wirsung vezeték) torkollanak. A Wirsung vezeték a duodénumba nyílik a közös epevezetékkel a Vater ampullánál. A duktális sejtek cuboidális vagy piramis alakú sejtek, melyek nagy mennyiségű mitokondriumot tartalmaznak, ami az energiaigényes ionfolyamatok miatt szükséges, míg egyéb sejtalkotók, úgy mint a Golgi apparátus vagy a durva ER viszonylag kis számban fordulnak elő. A duktuszok és acinusok határán található centroacináris sejtek, duktális karakterisztikát mutatnak és átmenetet képeznek az acinus és duktális sejtek között. A szekretórikus duktális sejtek mellett mucinózus sejtek is előfordulnak a duktális fa minden egyes szegmensében, melyek a nyák termelésében töltenek be fontos szerepet. A duktális sejtek számos feladatot látnak el a pankréaszban: i) szerkezeti vázat biztosítanak az acinusoknak illetve az endokrin szövetnek, ii) vívőközeget biztosítanak a pankréasz által termelt makromolekuláknak (emésztőenzimek, mucin) iii) semlegesítik a gyomor felől érkező savas kémhatást, optimális körülményeket biztosítva az emésztőenzimek működéséhez, valamint iv) elősegítik a mucin szekréciót valamint hidratálják és oldatban tartják a mucin molekulákat megakadályozva a temelődött nyák besűrűsödését. A duktális sejtek által termelt alkalikus folyadék a naponta termelt 1-2 liter pankréasz nedv döntő többségét adja. A HCO_3^- szekréció több ion transzporter összehangolt működése révén valósul meg, melyek a duktális fa proximális és disztális végén eltérőképpen expresszálódnak. A duktális iontranszport folyamatok az acinusok által termelt izotóniás folyadék összetételét némiképp módosítják, melynek eredményeként a Cl^- nagy része visszaszívásra kerül, míg a Na^+ koncentrációja változatlan marad. Az acinusok és duktális sejtek összehangolt működéséeként a pankréasz nedv ionösszetétele az alábbiak szerint alakul: 160 mM Na^+ , 20 mM Cl^- , 140 mM HCO_3^- , 5 mM K^+ . Ezenkívül egyéb ionokat is tartalmaz kis mennyiségben, úgy mint Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} . A nedv ionösszetételét nagyban befolyásolja a szekréció mértéke is. Az 1980-as évekig úgy gondolták, hogy a pankréasz duktuszok egyetlen feladata, hogy egy mechanikus vázat biztosítanak az acinusok számára. Ez a nézet a 80-as évek elején dőlt meg, amikor Barry Argent és mtsai. olyan izolálási technikát dolgoztak ki, melyel lehetővé vált a duktális sejtek funkcionális vizsgálata. Ezeknek a vizsgálatoknak köszönhetően ismertté vált, hogy a duktális sejtek alapvető élettani funkciót is betöltenek, azaz egy HCO_3^- -ban gazdag, folyadékot szekretálnak. A humán pankréasz duktális epitél sejtek, akár 140 mM-os koncentrációban is képesek HCO_3^- szekretálni. A szekretált HCO_3^- legnagyobb része a vérből származik, ahonnan a HCO_3^- a bazolaterálisan elhelyezkedő NBC-n keresztül jut a sejtbe. Pankréasz duktális sejtekben az egyes izoforma található (NBC1), amely elektrogén transzporter (két HCO_3^- -ot és 1 Na^+ -ot juttat a sejtbe), ezáltal jelentős szerepet játszik a nyugalmi membránpotenciál fenntartásában, ami az apikális membránon keresztüli HCO_3^- szekrécióhoz elengedhetetlen. Egy másik lehetséges útvonal a HCO_3^- sejten belüli akkumulációjának, a CO_2 passzív diffúziója a sejt membránon keresztül. A sejtbe bejutott CO_2 szénsavvá alakul, majd a keletkezett szénsav disszociál HCO_3^- -ra és H^+ -ra. Mindkét folyamatot a szénsav-anhidráz enzim (CA) katalizálja.

Ezt követően a H^+ a bazolaterális NHE-n és H^+ -ATPáz-on keresztül hagyja el a sejtet, míg a HCO_3^- az apikális oldalon elhelyezkedő Cl^-/HCO_3^- cserélőn keresztül (SLC26A3 és A6) szekretálódik a lumenbe. A HCO_3^- szekréció másik kulcsfontosságú transzportere a CFTR Cl^- csatorna, amely szintén a dukális sejtek luminális membránján helyezkedik el és szoros összhangban működik az SLC26 anion kicserélővel. A legújabb vizsgálatok azt mutatják, hogy a CFTR csatorna R doménje kölcsönhat az SLC26 transzporter C terminálisán lévő STAS domén-el és ezt a kölcsönhatást az R domén foszforilációja méginkább fokozza. Sokáig uralkodott az a nézet, mely szerint a CFTR csatorna egyetlen feladata a Cl^-/HCO_3^- cseréhez szükséges luminális Cl^- koncentráció biztosítása. Az utóbbi évek kutatási eredményei azonban egyértelműen bizonyítják, hogy stimulált szekréció során a csatorna ionszelektivitása megváltozik.

Sokáig nem volt ismert, hogyan képesek a dukális sejtek fenntartani a HCO_3^- szekréciót egy HCO_3^- -ban gazdag luminális folyadékba, melynek koncentrációja akár a 140 mM-ot is elérheti. Több elmélet is született a HCO_3^- szekréció mechanizmusának a leírására, melyet végül Park és mtsai-nak sikerült azonosítani. A korea-i munkacsoport kísérletei során többféle módszertani eljárást alkalmazott, beleértve az izolált dukális sejteken történő patch clamp technikát is, melynek optimalizálásában jómagam is részt vettem. Newcastle-i tartózkodásom során szerencsém volt együtt dolgozni a közlemény egyik társszerzőjével, akinek megtanítottam a dukális sejt izolálás egy általam továbbfejlesztett változatát, melynek köszönhetően hatékonyabbá vált ezen sejtek elektrofiziológiai vizsgálata. Ezen vizsgálatoknak köszönhetően Park és mtsai. karakterizálták a CFTR csatorna működését alap és stimulált körülmények között és egyéb vizsgálatok mellett leírták a pankréász dukális sejtek HCO_3^- szekréciójának mechanizmusát

4.3.2. Nyelőcső epitel sejtek

A nyelőcső epitel sejteken keresztüli iontranszport folyamatokkal az utóbbi években kezdtem el foglalkozni. Normál körülmények között a nyelőcsövet egy többrétegű, el nem száradó laphám béleli, melyet mukózának nevezünk. A mukóza fontos védő funkciót tölt be, azáltal, hogy védi az alsóbb rétegeket a mechanikai és vegyi sérülésektől. A defenzív tényezők közé tartozik a nyáktermelés, a clearance illetve az epiteliális rezisztencia, melyet először Orlando és mtsai. írtak le. Az epiteliális rezisztenciában alapvetően 3 mechanizmus vesz részt: a pre-epiteliális, az epiteliális és a poszt-epiteliális védelem. A pre-epiteliális védelemben a nyelőcső mukóza nyák borítása, illetve a felszíni HCO_3^- szekréció tartozik, ami egy alkalikus mikrokörnyezetet alakít ki, védve a sejteket a savas expozíciótól. A poszt-epiteliális védekezésnek legfontosabb komponense a nyelőcső zavartalan vérellátása, ami a O_2 és HCO_3^- ellátás biztosítása révén járul hozzá a nyelőcső épségének fenntartásához. Mivel a pre- illetve poszt-epiteliális védekező mechanizmusok a nyelőcső esetében nem jelentősek, fontos szerep jut az epiteliális védekező mechanizmusoknak, melynek mind strukturális mind pedig funkcionális elemei vannak. A strukturális elemek közé elsősorban a tight junction-ök tartoznak, melyek mechanikus barrier-t képeznek a luminális tartalommal szemben. A funkcionális mechanizmusok közé tartozik az epitel sejtek proliferációja és helyreállítása, a puffer rendszerek (HCO_3^- és foszfát puffer rendszer), valamint az ion transzporterek a sejtek apikális és bazolaterális membránján. A nyelőcső epitel sejtek (EECs) apikális membránján eddig egy nem-szelektív kation csatornát sikerült azonosítani, ami egyformán permeabilis a Na^+ , Li^+ , K^+ ionokra illetve a H^+ -ra. A csatorna funkciója nem teljesen tisztázott. Tobey és mtsai. kimutatták, hogy a savas pH gátolja a csatorna aktivitását, ami feltehetőleg egy védekező mechanizmus a luminális sav-al szemben. Más tanulmányok azt találták, hogy a kationok transzportja mellett ez a csatorna fontos szerepet játszik a sejtek differenciációjában is, ezáltal a savas luminális pH a transzporter blokkolása révén gátolhatja a sejtek pótlását az alsóbb, nem differenciálódott rétegekből. Az EECs bazolaterális membránján lényegesen több ion transzportert sikerült azonosítani. Tobey és mtsai. egy Na^+ -függő és egy Na^+ -független Cl^-/HCO_3^- kicserélő jelenlétét azonosították nyúl EECs-en. A Na^+ -független Cl^-/HCO_3^- kicserélő a HCO_3^- lumenbe történő szekrécióját mediálja, ami a

sejtek acidózisában játszik szerepet. A Na^+ -független $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kicserélő ellentétesen működik és a HCO_3^- felvételét katalizálja, ezáltal a sejtet alkalizálja. Az anion kicserélő mellett NHE1 jelenlétét mind mRNS mind pedig fehérje szinten is sikerült azonosítani a patkány, nyúl és humán EECs-en, ahol a pH homeosztázis fenntartása mellett fontos szerepet játszik a sejtterefogat, proliferáció és sejttúlélés szabályozásában. Ezek a tanulmányok normál nyelőcső epitéliumon vizsgálták az ion transzporterek kifejeződését, míg ezen transzporterek jelenléte illetve aktivitása a nyelőcső gyulladásos megbetegedéseiben kevésbé tanulmányozott.

4.4. Az epitél sejtek szerepe GI betegségekben

4.4.1. Akut pankreatitisz

Az akut pankreatitisz (AP) a pankréasz gyulladásos megbetegedése, melyben a mortalitás és morbiditás még ma is nagyon magas. A betegség átlagos incidenciája 13-80 eset/100 000 lakos/év, mely a fejlett országokban egy növekvő tendenciát mutat. Az AP súlyosságát tekintve lehet enyhe, közepes és súlyos lefolyású. Az esetek döntő többsége (~ 80%) az enyhe betegcsoportba tartozik, míg a betegek 20%-ában a súlyos, széptikus állapot alakulhat ki, melyben a mortalitás akár a 30 %-ot is elérheti. A diagnózis felállításánál a felhasi fájdalom, az emelkedett szérumban amiláz és lipáz szint, valamint a pankréasz morfológiai elváltozásai a döntőek. A jelenleg leginkább elfogadott nézet szerint a betegség kialakulásában a tripszin idő előtti aktiválódása kulcs fontosságú lépés, bár a pontos pathomechanizmus a mai napig nem teljesen ismert. Az esetek 80%-áért az epekövesség és a túlzott alkoholfogyasztás a felelős. Az Opie-féle teória szerint a biliáris pankreatitisz kialakulásáért a Vater papillába beékelődött epeüti kő a felelős, amely ez által megakadályozza a pankréasz nedv elfolyását. A biliopancreaticus reflux során a duktális vezetékrendszerbe jutott epe károsíthatja a pankréaszt illetve elősegítheti az emésztőenzimek idő előtti aktiválódását. Az alkohol-indukált AP esetében a túlzott alkoholfogyasztás hatására megnő a pankréasz nedv elválasztása és ezzel egyidejűleg fokozódik a Vater papilla kontrakciója, megakadályozva a pankréasz nedv elfolyását. Emellett az etanol (EtOH) bomlása során olyan metabolitok képződnek, melyek károsíthatják az acinus sejteket és az enzimek aktiválódását okozhatják. Az utóbbi évek kutatásai egyre inkább előtérbe helyezték a duktális sejtek szerepét az AP pathomechanizmusában. A 90-es években Czako és mtsai. cerulein-indukált akut kísérleti pankreatitisz vizsgálata során a cerulein injekciót követő néhány órában megnövekedett folyadékszekréciót tapasztaltak, mely a pankréasz nedvhez képest hipoproteinémiás volt és megelőzte a pankréasz morfológiai elváltozásait. Hasonló hipoproteinémiás hiperszekréció volt megfigyelhető Na^+ -taurokolsav retrográd infúziója során is patkányban. A betegség progressziója során a hiperszekréciót hiposzekréció illetve a pankréasz szövet károsodása követte. Ezek az eredmények egyfajta aspecifikus védőmechanizmus jelenlétére utalnak, mely az AP korai szakaszában még a szövet károsodása előtt megpróbálja a pankréasz lumenéből kimosni a károsító tényezőket. Az AP kialakulásában a két fő etiológia tényező a túlzott alkohol fogyasztás illetve az epekövesség. Ezen ágensek a duktális folyadék és HCO_3^- és folyadékszekréciót dózisfüggő módon befolyásolják:

Etanol hatása a duktális sejtekre

Ishiguro és mtsai. azt találták, hogy 0,3-30 mM-os koncentrációban az EtOH fokozza a szekretin-stimulálta duktális folyadékszekréciót, míg nagy dózisú alkohol esetén (100 mM) ez erőteljesen gátlódik. Nem ismert, hogy az EtOH serkentő és gátló hatásában milyen sejten belüli mechanizmuson vesznek részt. A CFTR Cl^- csatorna fontos szerepet játszik a duktális HCO_3^- szekrécióban, azáltal, hogy a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kicserélő működéséhez szükséges Cl^- -ot biztosítja. Számos tanulmányban leírták, hogy a CFTR csatorna génjében bekövetkező mutáció nemcsak a CF-el, de pankreatitisz-el is társul, azonban

az EtOH hatását a csatorna konduktanciájára nem vizsgálták még. Raju és mtsai. kimutatták, hogy léguti epitél sejtek 24 órás inkubációja EtOH-al (100 mM) erőteljesen gátolja a CFTR csatornát, azáltal, hogy befolyásolja a sejten belüli cAMP szintet.

Munkánk során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az EtOH illetve metabolitjainak a hatását a duktális CFTR csatorna működésére, melynek segítségével egy teljesebb képet kaphatunk az EtOH hatásának sejtszintű mechanizmusairól, amely elősegítheti az alkohol-indukálta pankreatitisz pathomechanizmusának jobb megértését.

Epesavak hatása a duktális sejtekre

1) Korábbi vizsgálataink során leírtuk, hogy a CDCA alacsony koncentrációban (100 μ M) fokozza a duktális HCO_3^- szekréciót, egy inozitol-trifoszfát (IP_3)-mediálta Ca^{2+} felszabaduláson keresztül, míg a nagy dózisú CDCA (1mM) mind a lumenális mind pedig a bazolaterális membrán felől adva gátolta a transzporterek működését. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a pankréász duktuszok a károsító noxákra hiperszekrécióval reagálnak. Ez a fokozott szekréció megpróbálja kimosni a pankréászból a károsító tényezőket, aktiválódott enzimeket. Amennyiben ez a „wash-out” mechanizmus nem oldja meg a károsító tényezők szintjének csökkenését (pl. az epekő továbbra is beékelődve van a papillába vagy a noxa továbbra is fenn áll és a pankreatitisz továbbfejlődik), akkor a szekréció erősen gátódik súlyosbítva ezzel a pankreatitisz lezajlását.

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, milyen mechanizmuson keresztül valósul meg a CDCA szekréciót stimuláló hatása elektrofiziológiai méréseket végeztünk a patch clamp technika, teljes sejt konfigurációját alkalmazva. Mivel a CDCA-indukált stimuláció összefüggésben áll a sejten belüli megnövekedett Ca^{2+} szinttel, ezért elsősorban olyan ioncsatornák vizsgálatára fókuszáltunk, melyek aktivációjában a megemelkedett (Ca^{2+})_i központi szerepet játszik.

2) Az urzodezoxikólsav (UDCA) egy másodlagos, hidrofíli epesav, melyet különböző epebetegségekben hatékonyan használnak elsősorban az epekövek oldására, de emellett kedvező hatását tapasztalták egyes epeuti megbetegedésekben, úgy mint primer biliáris cirrózis vagy szklerotizáló kolangitisz. Az UDCA védő hatásának a mechanizmusa nem teljesen ismert, de alapvetően három koncepciót feltételeznek: 1) hepatobiliáris szekréció stimulálása, 2) a hidrofób, toxikus epesavak koncentrációjának csökkentése és 3) sejtvédő funkció a hidrofób epesavak károsító hatásával szemben. Az UDCA sejtvédő hatását számos, hepatocitákon végzett tanulmányban vizsgálták, mely során kimutatták, hogy az UDCA előkezelés jelentősen lecsökkenti az epesavak-indukálta mitokondriális tranzíciós pórus nyitódását és ez által az epesavak apoptizáló hatását. Ezen eredmények arra utalnak, hogy az UDCA védő hatásában a mitokondriális membrán stabilizálása fontos szerepet játszik.

Korábban kimutattuk, hogy a nagy dózisú CDCA duktális sejtekre kifejtett gátló hatása szorosan összefügg a CDCA-indukálta mitokondriális károsodással, ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy az UDCA előkezelés képes-e ezt a gátló hatást kivédeni.

4.4.2. Barrett nyelőcső

A nyelőcsövet érintő, egyik leggyakoribb megbetegedés a gastro-oesophagealis reflux betegség (GORB), mely során a savas gyomortartalom, a nyelőcső záróizmának nem megfelelő működése miatt a nyelőcsőbe visszaáramlik és ez tüneteket okoz. A GORB legjellemzőbb tünete a gyomortáji illetve szegycsont mögötti égő érzés, de egyéb extraoesophageális tünetek is jelentkezhetnek, úgy mint a köhögés, rekedtség vagy gégegyulladás. A betegség a népesség kb. 30 %-át érinti és jellemzően a

fejlettebb országok lakossága érintett, azonban a betegség előfordulása növekvő tendenciát mutat a világ többi részén is. A tünetek eltérő intenzitással és gyakorisággal jelentkezhetnek kezdve a klinikailag enyhe tünetektől a súlyos komplikációkig. A nyelőcső reflux egészséges emberekben is előforduló folyamat, ami időben korlátozott hosszúságú és nem okoz tüneteket. Abban az esetben, ha a reflux gyakrabban fordul elő vagy folyamatosan fennáll, szerkezeti illetve működésbeli elváltozásokat okozhat. A betegség hátterében mind anatómiai, genetikai eltérések mind pedig környezeti tényezők szerepet játszhatnak. Ezek közül kiemelendő a nyelőcső megváltozott motilitása, ami csökkenti a nyelőcső clearance sebességét, így a gyomorbennék tartósan a nyelőcsőben marad. A nyelőcsőbe regurgitált gyomortartalomban lévő sósavnak tulajdonítanak alapvető szerepet a nyelőcső gyulladásos folyamataiban, bár egyéb ágensek, úgymint az epesavak vagy pepszin is súlyos szövődmények kialakulását okozhatják. Állatkísérletes vizsgálatok azt igazolták, hogy a nyelőcső relatíve rezisztens kizárólag sósav terhelésre, hacsak nem nagyon magas koncentrációban van jelen ($\text{pH} < 1$). Pepszin jelenlétében már magasabb pH-n ($\text{pH} < 2$) is megjelent a gyomorsav károsító hatása. Nyúl nyelőcsővön végezett kísérletekben az epesav is károsnak bizonyult: a konjugált epesavak savas, míg a nem-konjugált epesavak neutrális pH-n károsították a mucosát. A fent említett hipotézist alátámasztja még az a megfigyelés is, hogy bár a savszekréciót gátló proton-pumpa inhibitorokkal (PPI) való kezelés hatásosnak bizonyult a reflux oesophagitis gyógyításában, a páciensek jelentős százaléka továbbra is észlelt tüneteket, illetve a PPI gyakran nem bizonyul hatásosnak a betegség extra-oesophageális tüneteivel szemben, úgymint laryngitis vagy krónikus köhögés. Illetve a PPI használata nem csökkentette kellő mértékben a Barrett-nyelőcső illetve annak adenocarcinomába való átmenetének gyakoriságát. A GORB leggyakoribb szövődményei közé a reflux oesophagitis, nyelőcsővérzés, fekély, stricturák kialakulása, az ún. Barrett-nyelőcső (BE), illetve súlyosabb esetekben a nyelőcső adenokarcinóma (EAC) tartozik. A BE praecancerosus állapot, melyben a többrétegű laphám helyét hengerhám foglalja el. Előfordulása a nyugati populációban 1,6 %, míg azoknál a betegeknek, akik igazoltan GORB-ban szenvednek ez akár 4,4% is lehet. Szövettanilag fundus, cardia illetve intesztinális-típusú metapláziákat különíthetünk el. A fundus-típusú metapláziában parietális és fő sejtek, a cardia-típusú metapláziában a cardia nyálkahártyára jellemző nyákkiválasztó sejtek, míg az intesztinális-típusú metapláziában intesztinális hám, kehely és endokrin sejtek vannak jelen. Jelen ismereteink szerint a hengerhám a mukózában található multipotens őssejtekből származik, illetve egyes feltételezések szerint a Schaffer mirigyekből is eredeztethetőek. Az így kialakult hengerhám lényegesen ellenállóbb a sav károsító hatásaival szemben mind a laphám. A betegség a nyelőcső különböző hosszúságú szakaszát érintheti mely alapján hosszú (3 cm felett) illetve rövid (3 cm alatt) szegmens BE-t különböztethetünk meg. A jelenleg elfogadott nézet szerint az intesztinális-típusú metaplázia okozza a nyelőcső súlyosabb funkcionális zavarait, illetve ez a stádium növeli leginkább az EAC kialakulásának a kockázatát. Az EAC megjelenése előtt low majd high grade diszplázia alakul ki, mely egy neoplasztikus állapot, amely a daganatos átakalkulás jeleit mutatja. Több vizsgálat is igazolta, hogy a metaplázia-diszplázia-adenokarcinóma szekvencia progressziójában a sósav és az epesavak is szerepet játszhatnak az által, hogy fokozzák a sejtek proliferációját és differenciálódását, valamint károsíthatják a DNS-t, fokozva ezáltal a genetikai instabilitást, a mechanizmus azonban nem teljesen ismert. Mivel az iontranszport folyamatok nagymértékben hozzájárulnak, mint a nyelőcső clearance mind pedig az epiteliális rezisztencia fenntartásában, a nyelőcső epiteliális transzportfolyamatok ismerete mind fiziológiás mind pedig patofiziológiás körülmények között nagy jelentőséggel bír. Az iontranszporterek jelenlétét többnyire normál nyelőcső hámiban karakterizálták, míg a metaplasztikus hengerhámiban alig lelhető fel adat, annak ellenére, hogy fontos védő szerepet játszhatnak a reflux-indukálta további nyelőcső károsodás kivédésében.

Jelen tanulmányban célunk volt, hogy azonosítsuk a sav/bázis transzport folyamatokat BE-ben, illetve karakterizáljuk a sósav illetve epesavak hatását az iontranszporterek aktivitására és kifejeződésére.

5. Célkitűzések

Kísérleteink során céljaink közt szerepelt, hogy karakterizáljuk a pankreász illetve nyelőcső epitél sejtek iontranszport folyamatainak a szerepét fiziológiás és patofiziológiás körülmények között. Célunk egyrészt a hasnyálmirigyet illetve a nyelőcsövet érintő gyulladásos betegségek pathomechanizmusának jobb megértése, másrészt pedig olyan új célpontok azonosítása, amelyek a pankreatitisz vagy a Barrett nyelőcső terápiájának fejlesztésében új kiindulópontot jelenthetnek. Vizsgálataink során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- 1. Milyen mechanizmus révén serkeni a CDCA a pankreász duktális HCO_3^- szekréciót?**
 - a) A CDCA hatására aktiválódnak-e ioncsatornák a duktális sejteken? Ha igen, hova lokalizálódik a csatorna?
 - b) A sejten belüli Ca^{2+} milyen szerepet játszik a csatorna aktivációjában?
 - c) A csatorna specifikus farmakonok általi aktivációja okoz-e HCO_3^- szekréció fokozódást?
 - d) Az epesavak milyen mechanizmus révén jutnak a duktális sejtekbe?
- 2. Az UDCA hogyan befolyásolja a CDCA duktális sejtekre kifejtett toxikus hatását?**
 - a) Az UDCA képes-e kivédeni a CDCA gátló hatását a duktális HCO_3^- szekrécióra? Ha igen, akkor ez az intracelluláris Ca^{2+} szint csökkenésén keresztül valósul-e meg?
 - b) Az UDCA képes-e kivédeni a CDCA mitokondrium károsító hatását, illetve képes-e csökkenteni a CDCA-indukálta apoptózis mértékét?
 - c) Az UDCA védő hatása *in vivo* körülmények között is megfigyelhető-e?
- 3. Hogyan befolyásolja az EtOH és metabolitjai a duktális CFTR csatorna aktivációját?**
 - a) Az EtOH és metabolitjainak a hatása dózisfüggő-e?
 - b) Az intracelluláris ATP milyen szerepet játszik az EtOH és metabolitjainak CFTR csatornára kifejtett hatásában?
 - c) Van-e különbség az EtOH hatásában a tengerimalacból izolált és a humán duktális sejtek között?
- 4. Hogyan és milyen mechanizmusok révén befolyásolja a gyomorsav illetve az epesavak a nyelőcső epitél sejtek iontranszport folyamatait?**
 - a) Milyen sav/bázis transzporterek találhatók a metapláziás nyelőcső epitél sejteken és ezek funkcionálisan aktívak-e?
 - b) Hogyan befolyásolják az epesavak az intracelluláris pH-t és a sav/bázis transzportereket, és van-e különbség a hatásukban savas és neutrális pH-n?
 - c) Az epesavak közvetítette hatásban van-e szerepe az intracelluláris Ca^{2+} szint változásnak, és ha igen milyen mechanizmusok révén?
 - d) Az epesavak krónikus adása, hogyan befolyásolja a transzporterek mRNS és fehérje kifejeződését?
 - e) Normál és metaplasztikus humán biopsziás minták esetén hogyan alakul a transzporterek kifejeződése?

6. Anyagok és Módszerek

6.1. Állatok

Az intra-interlobuláris pankreász duktuszokat standard körülmények között tartott, 150-200 g tömegű (4-8 hetes) tengerimalacokból izoláltuk. A pankreatitisz indukciója 180-300 g tömegű hím Wistar patkányokon történt. Mind a tengerimalacokat mind pedig a patkányokat szobahőmérsékleten tartottuk, 12-12 órás sötét-világos ciklust biztosítva. Az állatoknak szabad hozzáférésük volt a vízhez illetve a standard laboratóriumi rágcsló táphoz. A kísérletek elvégzése előtt az állatok az I. sz. Belgyógyászati klinika állatházában akklimatizálódtak, legalább 1 hétig.

6.2. Sejtvonalak

Kísérleteink során kétféle nyelőcső sejtvonalat használtunk. A CP-A sejtvonal, humán nyelőcső metaplázia, nem-diszpláziás szakaszából lett izolálva (American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA), míg a CP-D sejtvonal, humán nyelőcső diszpláziából származik (Peter Rabinovich, University of Washington, Seattle, WA, USA). A sejteket MCDB-153 médiumban tenyésztettük melyet 1% (v/v) penicillin/streptomycin-el illetve különböző szérumokkal és növekedési faktorokkal egészítettünk ki. A sejteket 5%-os CO₂-tartalom mellett növesztettük 37°C-on és 10-30 passzázs szám között használtuk.

6.3. Betegek

A kísérletekbe 14 ismert Barrett nyelőcső-vel rendelkező beteget vontunk be az SZTE I. sz. Belgyógyászati klinikán. A betegekkel minden esetben írásos beleegyező nyilatkozatot íratunk alá. A rendszeres ellenőrzés céljából végzett endoszkópos beavatkozás standard, nagy felbontású endoszkóppal történt (GIF-Q165, Olympus Hungary Kft., Budapest, Magyarország). A nyelőcső metaplázia meghatározása a prágai-i C&M kritérium szerint történt. A mintavétel során 4 db. biopsziás mintát vettünk a Barrett nyelőcsőből valamint további 4 mintát a normál, többrétegű hámból. 2-2 biopsziás mintát formalin-ban fixáltunk szövettani vizsgálatok céljából, míg a maradék 2-2 mintát RNA later oldatba helyeztük valós-idejű PCR vizsgálatok elvégzése céljából és felhasználásig -20°C-on tároltuk.

6.4. Intra-interlobuláris pankreász duktuszok izolálása és mikroperfúziója

Az intra-interlobuláris pankreász duktuszokat 150-200 g tömegű tengerimalacokból izoláltuk. A hasnyálmirigyet eltávolítást illetve tisztítást követően izoláló oldattal befecskendeztük, majd kisebb darabokra vágtuk és rázó vízfürdőben 30 percig inkubáltuk, 37°C-on. Az inkubációt követően az intra/interlobuláris duktuszokat fénymikroszkóp alatt, mikrodisszekciós módszerrel izoláltuk. Az így nyert intakt duktuszokat 24 órán keresztül inkubáltuk (37°C-on, 5% CO₂-ot tartalmazó inkubátorban), majd kísérleteinkhez használtuk. Az inkubáció alatt a duktuszok két vége leforr és a folyadékszelekcióknak köszönhetően a duktuszok felhízhatnak, ezáltal könnyen elkülöníthetővé válnak az esetlegesen kiizolált vérerektől. A kísérletek egy részében szükségessé vált a duktuszok lumenális membrán felőli perfúziója, melyet a mikroperfúziós technika alkalmazásával értünk el. A perfundáláshoz egy külső, vastagabb átmérőjű tartó pipettát illetve egy belső, vékonyabb átmérőjű perfúziós pipettát készítettünk vertikális pipettahúzó és microforge segítségével. A perfundálás előtt az intakt duktuszok egyik végét levágtuk, majd a másik végét a tartó pipettába szívtuk egy fecskendő

segítségével. Ezt követően a perfúziós pipettát a duktusz lumenébe inzertáltuk és rajta keresztül különböző ionösszetételű oldatot vezettünk a duktusz lumenébe, mely a levágott végen keresztül hagyta el a duktuszt. A luminális perfúzió sebessége 10-30 $\mu\text{l}/\text{perc}$, míg a külső, bazolaterális perfúzió sebessége 4-5 ml/perc volt.

6.5. Fluoreszcens vizsgáló módszerek

A fluoreszcens mérések során perfúziós kádat használtunk, melynek az alját egy üveglemez (24 mm^2) képezte. A kádat egy IX71 inverz kutató mikroszkóp (Olympus Hungary Kft., Budapest, Magyarország) tárgyasztalára helyeztük, majd 4-5 ml/perc sebességgel perfundáltuk különböző oldatokkal, 37°C-on. A pankreász duktuszkokat egy speciális szövetragasztó (poly-l-lizin) segítségével rögzítettük az üveglemezhez, míg a sejtkultúrák esetében 10^5 sejtet szélesztettünk az üveglemezre, melyet 24 órás inkubációt követően használtunk fel. A kísérletek során 1 mintában 4-5 területet („region of interest” röviden ROI) jelöltünk ki, melyek egyenként 5-10 sejtet foglaltak magukba. A mintáról egy töltés-csatolt eszköz vagy angolul charge-coupled device (CCD) kamera segítségével másodpercenként készítettünk felvételt. A CCD kamera egy Xcellence képalkotó rendszerhez illeszkedik, amely a fluoreszcens intenzitás értékeket hányadossá konvertálja illetve kiszűri a háttér zajokat.

Intracelluláris pH (pH_i) mérés

Az intracelluláris pH (pH_i) mérése pH-érzékeny fluoreszcens festék, BCECF-AM segítségével történt. A sejteket 30 percreg inkubáltuk 2 μM BCECF-AM-el szobahőn. A festék az észter csoportnak köszönhetően membrán permeabilissá válik így könnyen a sejtbe diffundál, ahol nem specifikus észterázok az acetoxi-metilészter csoportot lehasítják, melynek eredményeként a festék a sejtben csapdázódik és felhalmozódik. Ezt követően a festéket 440 illetve 490 nm hullámhosszú fényrel gerjesztettük majd a 490/440 emissziós arányt 535 nm hullámhosszon mértük. A fluoreszcens hányados kalibrációját a magas K^+ /nigericin technika segítségével végeztük.

Intracelluláris Ca^{2+} ($(\text{Ca}^{2+})_i$) mérés

Az intracelluláris Ca^{2+} -ban ($(\text{Ca}^{2+})_i$) bekövetkező változások detektálásához Fura 2-AM fluoreszcens festéket használtunk. A sejteket 60 percreg keresztül inkubáltunk 5 μM Fura-2 AM-el szobahőn. A festéket DMSO-ban oldottuk, melyet 20 % Pluronic-F127-el egészítettünk ki. A pH_i méréshez hasonlóan a sejteket felváltva gerjesztettük 340 és 380 nm-en, az emissziós arányt pedig 510 nm-en mértük.

Intracelluláris ATP (ATP_i) mérés

A sejtben belüli ATP vizsgálatát az előzőkhez hasonlóan, fluoreszcens festék felhasználásával végeztük. Erre a célra Mg-Green-AM festéket használtunk, mely a Mg^{2+} -ot megkötve válik fluoreszcensé. Alap állapotban a Mg^{2+} nagy része ATP-hez kötött formában van jelen. Az ATP hidrolízise során a Mg^{2+} felszabadul és fluoreszcensen detektálhatóvá válik. Így a fluoreszcens intenzitásban bekövetkező emelkedés az ATP_i csökkenését mutatja. A festéket 476 nm-en gerjesztettük az emittált fényt pedig 535 nm-en mértük.

Mitokondriális membrán potenciál ($\Delta\Psi_m$) mérés

A mitokondriális membrán potenciál ($\Delta\Psi_m$) mérése a membrán permeabilis, mitokondrium-szelektív fluoreszcens festék, TMRM felhasználásával történt. A festék mitokondriumban történő

felhalmozódása a $\Delta\Psi_m$ -tól függ. A kísérletek során a duktuszokat 30 percen keresztül inkubáltuk 37°C-on, majd a korábban említett poly-L-lizin segítségével a perfúziós kamra aljához rögzítettük. A duktuszokat ezt követően folyamatosan perfundáltuk 2-2,5 ml/perc sebességgel, 37°C-on. A perfúziós oldatot 100 nM TMRM-el egészítettük ki, hogy csökkentsük a festék vesztés mértékét. A $\Delta\Psi_m$ -ben bekövetkező változásokat Fluo View 10i-W konfokális mikroszkóp (Olympus Hungary Kft., Budapest, Magyarország) segítségével rögzítettük. A festéket 543 nm-en gerjesztettük az emittált fényt pedig 560 és 650 nm-en mértük. A $\Delta\Psi_m$ -ben bekövetkező változás megbecslése a „dequench” technika segítségével történt. A TMRM alkalmazott koncentrációjánál a mitokondrium depolarizációja a festék citoszolba történő diffúzióját eredményezi, ahol a fluoreszcens intenzitása megnő. Ennek megfelelően, a fluoreszcens intenzitásban tapasztalt növekedés a $\Delta\Psi_m$ csökkenésére utal. A fluoreszcens szignálokat a kezdő fluoreszcens intenzitásra normalizáltuk (F/F_0) és relatív fluoreszcenciaként ábrázoltuk.

Mitokondriális permeabilitás tranzíciós pórus (mPTP) mérés

A mitokondriális membrán permeabilizáció vagy más néven a mitokondriális permeabilitás tranzíciós pórus (mPTP) nyitott/zárt állapotának a vizsgálatához a kalcein-kobalt „quenching” technikát alkalmaztuk. A kalcein-AM egy lipidoldékony fluoreszcens festék, amely felhalmozódik az összes sejtalkotóban, beleértve a mitokondriumokat is. A Co^{2+} egy kétértékű kation, amely a citoplazmában akkumulálódik, viszont a mitokondriumba nem jut be. Az mPTP átmeneti nyitódása során a Co^{2+} a mitokondriumba diffundál és kioltja a kalcein fluoreszcenciáját. Így a fluoreszcens intenzitásban bekövetkező csökkenés az mPTP nyitódására utal. A kísérletek során a pankréász duktuszokat 30 percig inkubáltuk kalcein-AM-el (1 μM), majd további 10 percig CoCl_2 -al (1 mM). Ezt követően a duktuszokat a korábban leírt módszer szerint perfundáltuk különböző oldatokkal. A festéket 495 nm-en gerjesztettük és az emittált fényt 515 nm-en mértük. A fluoreszcens szignálokat a kezdő fluoreszcens intenzitásra normalizáltuk (F/F_0) és relatív fluoreszcenciaként ábrázoltuk.

6.6. HCO_3^- szekréció mérése

Az alkalikus terhelés vagy NH_4Cl pulzus technika alkalmazásával a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kicserélő aktivitására tudunk következtetni. A kísérletek során az intra-interlobuláris duktuszokat 3 percig perfundáltuk 20 mM NH_4Cl -ot tartalmazó oldattal, mely egy azonnali pH_i növekedést eredményezett. Az alkalózisból történő regeneráció kezdeti szakasza (első 30 másodperc) a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kicserélő aktivitását tükrözi, HCO_3^- jelenlétében. A pH_i csökkenés mértékét ($\Delta\text{pH}/\Delta t$) lineáris regressziós analízis segítségével számoltuk ki. A pH_i -ban bekövetkező változásokat bázis árammá ($J(\text{B}/\text{min})$) konvertáltuk a következő egyenlet segítségével: $J(\text{B}/\text{min}) = (\Delta\text{pH}/\Delta t) \times \beta_{\text{totál}}$, ahol $\beta_{\text{totál}}$ a sejt teljes pufferkapacitását jelöli. A $\beta_{\text{totál}}$ -t a Henderson-Hasselbach egyenlet segítségével számoltuk ki: $\beta_{\text{totál}} = \beta_i + \beta_{\text{HCO}_3^-} = \beta_i + 2,3 \times [\text{HCO}_3^-]_i$. A kifelé irányuló áramokat $-J(\text{B}/\text{min})$ -ként, míg a befelé irányuló áramokat $J(\text{B}/\text{min})$ -ként jelöltük.

6.7. Patch clamp technika

A teljes sejtes áramokat EPC-7 erősítő segítségével mértük 21-23°C-on. A pipettákat boroszilikát üvegapillárisokból készítettük P-97 Flaming/Brown mikropipetta húzó készülék segítségével, melyeknek a rezisztenciája a hőpolírozást követően 3-5 $\text{M}\Omega$ között volt. A K^+ áramok mérésére az alábbi feszültség protokoll-t alkalmaztuk: -80 mV-os membrán potenciál (V_m) mellett -120 – +60 mV-ig terjedő feszültséglépcsőt alkalmaztunk, 20 mV-os lépésközzel, melyek egyenként 500 ms hosszúak voltak és az egyes feszültséglépcsők között 800 ms idő telt el. A keletkező áramokat 2 kHz-en szűrtük és 1 kHz-en digitalizáltuk. Az áram/feszültség (I/V) görbék elkészítéséhez az adott

feszültségen mért áramerősség utolsó 5 ms-ának az átlagát használtuk. A „reverz” vagy más néven megfordulási potenciált (Erev) regressziós elemzéssel határoztuk meg az I/V görbékből, miután egy harmadik fokú polinomiális egyenest illesztettünk a görbére. Az áramerősséget a sejtkapacitásra normalizáltuk (pA/pF) és ± 60 mV-nál ábráztuk. A pankréász duktális sejtek átlagos kapacitása $6,1 \pm 0,3$ pF-nak bizonyult. A soros ellenállást (R_s) 50-70%-ban kompenzáltuk. A patch pipettákat magas K^+ tartalmú intracelluláris oldattal töltöttük fel melynek az összetétele az alábbi volt: 120 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 0,2 mM elilén glikol-bisz(b-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacetik sav (EGTA), 10 mM Hepes és 1 mM Na_2ATP . Az intracelluláris oldat pH-ját KOH-al (1 M) 7,2-re állítottuk, az ozmolaritása ~ 240 mOsm/L volt. Az intra- és extracelluláris oldat között az eltérő ionösszetétel miatt további potenciálkülönbség lépett fel, melyet a JPCalc szoftver segítségével kompenzáltunk.

6.8. Transzmissziós elektronmikroszkópia

Az elektron mikroszkópos vizsgálatokhoz az intra-interlobuláris duktuszokat 2,5%-os glutáraldehidbe fixáltuk az izolálást illetve epesavas kezelést követően. A duktuszokat ezután 1%-os ozmium tetroxid oldatba helyeztük, majd EtOH-al dehidratáltuk és epoxi gyantába ágyaztuk. Az ultravékony metszeteket 0,25 %-os uranil acetát (30 perc, 40°C) illetve Reynolds-féle ólom-citrát oldat (5 perc, 20°C) hozzáadásával kontrasztosítottuk és transzmissziós elektron mikroszkóp alatt vizsgáltuk (CM10; Philips, Eindhoven, Hollandia). A képeket analySIS szoftver segítségével készítettük el.

6.9. Molekuláris biológiai technikák

Immunhisztokémia

A nyelőcső illetve pankréász mintákat 4 %-os formalinba fixáltuk majd paraffin-ba ágyaztuk és 5 μ m-es metszeteket készítettünk. A metszeteket ezt követően automata rendszer segítségével festettük. Röviden, a metszetek deparaffinnálását követően (2-szer 10 percig xilol-os, majd 2-szer 5 percig EtOH-os mosás) az endogén peroxidáz blokkolását 3%-os H_2O_2 adásával végeztük 10 percig. PBS-el történő mosást követően az antigén feltáráshoz a metszeteket citrát puffer-el (0,01 M, pH 6) mostuk 120°C-on, 3 percig. Annak érdekében, hogy minimalizáljuk a nem-specifikus festődést, a metszeteket további 30 percig inkubáltuk 2%-os sovány tejpörrel, szobahőmérsékleten. Ezt követően a tengerimalac pankréász metszeteket anti-BK (1:400 hígítás; Alomone Labs, Jerusalem, Israel) poliklonális ellenanyaggal, míg a humán nyelőcső metszeteket anti-NHE1 (1:100 hígítás; Abcam, Cambridge, Anglia) és anti-NHE2 (1:50 hígítás; Chemicon, Temecula, CA, USA) monoklonális ellenanyaggal 30 percen át inkubáltuk, szobahőn. Az antigén ellenanyag kapcsolódást streptavidin-peroxidáz-al mutattuk ki. Az immunreaktivitást 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB) kromagénnel vizualizáltuk. Pozitív festődést sötétbarna kromagén jelölt. A negatív kontroll-ként alkalmazott metszeteknél az elsődleges ellenanyag helyett PBS-el inkubáltuk a metszeteket. Továbbá az elsődleges ellenanyag specifikitásának ellenőrzése végett egér IgG1 illetve csirke IgY izotípus kontroll-t alkalmaztunk.

Western blot

A CP-A illetve CP-D sejtvonalakból hagyományos módszerrel összfehérjét izoláltunk. A fehérje koncentrációt Bradford módszer szerint marha szérum albumin standard oldat segítségével határoztuk meg. 30 μ g denaturált fehérjét NuPAGE Bis-Tris 4-12% választottuk el. Az elektrotranszfert követően az Immobilon-P membránokat 5% tejpót tartalmazó Tris-t tartalmazó sóoldatban (TBST) blokkoltuk. A specifikus, elsődleges ellenanyagokat a blokkoló oldatban hígítottuk a következők szerint: anti-NHE1 és anti-NHE2 (1:200 hígítás; Alomone Labs, Jerusalem, Israel), anti-NBC (1:500 hígítás; Abcam, Cambridge, MA, US) és anti-Slc26a6 (1:200 hígítás; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX,

US). Az elsődleges ellenanyagokkal egy éjszakán át inkubáltuk a membránokat 4°C-on. Belső kontrollként gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz-t (GAPDH) használtunk. Az inkubálást követően a membránokat TBST-ben mostuk, majd a megfelelő torma peroxidáz-konjugált másodlagos ellenanyaggal (1:10000 hígításban) 1 órán keresztül inkubáltuk. A célfehérjéket kemilumineszcens detektoros rendszerrel tettük láthatóvá és a kapott jelet fényérzékeny röntgen filmre rögzítettük.

Valós idejű PCR technika

A CP-A illetve CP-D sejtekből totál RNS-t izoláltunk Macherey-Nagel RNS izoláló kit felhasználásával a gyártó utasításának megfelelően. A mintákat felhasználásig 80°C-on tároltuk 30 U Prime RNáz inhibitor jelenlétében. Az izolált RNS mennyiségét spektrofotométerrel ellenőriztük. Az NHE1, NHE2, NBC és Slc26a6 génexpresszió tanulmányozásához RotorGene 3000 és TaqMan próbát használtunk. Nagy kapacitású cDNS Archive kit segítségével 3 µg totál RNS-t cDNS-é írtunk át a gyártó előírása szerint. A reverz transzkripciót termosztát-ban végeztük az alábbi hőmérséklet protokoll-t alkalmazva: 10 perc szobahőn, 2 óra 37°C-on, 5 perc 4°C-on, végül pedig 10 perc 75°C-on az enzim inaktiválása végett. A PCR reakcióhoz 1 µl hígított cDNS-t használtunk. A valós idejű PCR (RT-PCR) reakciókhoz TaqMan Univerzális Master Mix-et használtunk. Minden egyes reakció elegy 1 µl primer-TaqMan próbát, 1 µl cDNS-t valamint 18 µl Master Mix-et tartalmazott. Az RT-PCR reakciót az alábbi protokoll szerint végeztük: 15 perc 95°C-on majd 45 ciklus (15 másodperc 95°C-on, 1 perc 60°C-on, 30 másodperc 72°C-on). A fluoreszcens festék (FAM) intenzitását minden ciklus után detektáltuk. A mérések 96-os plate-n triplikátumokban történtek, a kontrol génnel párhuzamos reakcióban. Kontrol génként a konstitutívan expresszáldó, humán hipoxantin-guanin foszforiboziltranszferáz (HPRT) háztartási gén-t használtunk. Továbbá minden egyes gén esetében cDNS-t nem tartalmazó, úgynevezett „non-template” kontrol-t is futtatunk a primer-dimer képződmények ellenőrzése végett. A vizsgált géneket (NHE1, NHE2, NBC és SCL26A6) a kontrol génre (HPRT) normalizáltuk az alábbi képletet alkalmazva: ΔC_T (célgén) - ΔC_T (referencia gén), ahol ΔC_T az átlagolt küszöbérték ciklus számot jelöli a reakció exponenciális fázisában. A sejtvonalak esetében a relatív változás a gén expresszióban a $\Delta\Delta C_T$ metodika alapján lett meghatározva az alábbi egyenletet használva: $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ (kezelt sejtek) - ΔC_T (kezeletlen, kontrol sejtek). Az n-szeres expressziós különbséget $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -n ábrázoltuk. 0,5 vagy annál kisebb értéket expressziós csökkenésnek (downreguláció), míg 2 vagy annál nagyobb értéket expressziós növekedésnek (upreguláció) tekintettünk. Azokat az eseteket, ahol a $\Delta\Delta C_T$ érték 0,51 és 1,99 közé esett, nem tekintettük szignifikánsan eltérőnek. A biopsziás minták esetén, a relatív gén kifejeződést a normál illetve Barrett nyelőcsőves mintákban doboz diagram-on ábrázoltuk és a csoportok közötti összehasonlításra Wilcoxon tesztet alkalmaztunk.

6.10. Apoptózis vizsgálat

Az apoptotikus sejthalál detektálására a terminál dezoxiribonukleotidil transzferáz-mediált dUTP-digoxigenin nick-end jelölésű (TUNEL) próbát alkalmaztuk (Roche Magyarország Kft., Budaörs, Magyarország). Az intra-interlobuláris pankreász duktuszokat különböző epesavakkal kezeltük, majd a kezelt és kontroll duktusz szegmenseket 4%-os paraformaldehidbe fixáltuk éjszakán át. A fixálást követően 10 µm-es fagyasztott metszeteket készítettünk, melyeket a TUNEL keverékkel (enzim valamint jelölő festék) a gyártó utasításainak megfelelően inkubáltuk. A CDCA-kezelt csoportot a fixálást megelőzően, 3 órán keresztül inkubáltuk az epesav-al. A képeket egy Zeiss AxioImager fluoreszcens fénymikroszkóp (Carl Zeiss Micro Imaging, Thornwood, NY, USA) segítségével készítettük.

6.11. Kísérletes akut pankreatitisz modell

Hím Sprague Dawley (SPRD) patkányokat használtunk a kísérletekhez, melyeket a kísérletek megkezdése előtt 12 órával éhezettünk. Az állatokat 4 csoportba osztottuk (n=6) az alábbiak szerint: (1) kontrol (intraduktálisan adott fiziológiás sóoldat), (2) UDCA (a patkányok száján át UDCA-t kaptak), (3) CDCA (intraduktális CDCA-val pankreatitist váltottunk ki), (4) UDCA+CDCA (a patkányok száján át UDCA-t kaptak és intraduktális CDCA-val pankreatitist váltottunk ki). Az UDCA-t (Dr. Falk Pharma Ltd.) 2 mL csapvízben oldottuk és két héten keresztül, száján át adtuk (250 mg/ttkg/nap) az UDCA-val kezelt állatoknak. A patkányokat 50 mg/ttkg Ketamin és 10 mg/ttkg Xylazin intraperitoneális injektálásával altattuk. Medián laparotómia után a 1 ml/ttkgk 1%-os Na-CDCA sóoldatot (a kontrol állatokok esetében fiziológiás sóoldatot) retrográd adagoltunk 1 ml/perc sebességgel egy infúziós pumpa segítségével. A műtött állatokat 24 órával később feláldoztuk. A szérum amiláz aktivitást kolorimetriás módszerrel határoztuk meg a kit-ben leírt utasításoknak megfelelően. Az abszorbanciát 405 nm hullámhosszon mértük egy FLUOstar OPTIMA mikroplate olvasó segítségével. A formaldehidbe fixált mintákat paraffinba ágyaztuk és 4 µm-es metszeteket készítettünk belőle. A metszeteket hematoxylin-eozin festékekkel festettük. A gyulladás mértékét két független szakértő értékelte az alábbi szempontok szerint: intersticiális ödéma (0-3 pont), bevérzés (0-3 pont), leukocita infiltráció (0-3 pont) és az acinusok nekrozisának mértéke (totál pankreász terület %-a). A sejtkárosodás mértékének a megállapításához az Image J szoftvert használtuk.

6.12. Statisztikai analízis

Két csoport esetén az adatokat kétmintás t-próba segítségével hasonlítottuk össze, míg három vagy több, normál eloszlású csoport összehasonlításánál egy tényezős ANOVA-t használtunk. Az oszlopdiagramokon az eredmények számtani középérték $\pm$ szórás (SE) tüntették fel, n a kísérletek elemszámát jelöli. A szignifikancia határát $p \leq 0,05$ értékben határoztuk meg.

6.13. Etikai engedély

Az állatkísérleteket az SZTE, Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság (MÁB) mind pedig a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH) Állategészségügyi Igazgatóság engedélye alapján végeztük. Az állatkísérletek a nemzetközi előírások (National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) szerint történtek. A humán mintákon végzett kísérleteknél minden esetben beleegyező nyilatkozatot írtunk alá a beteggel, továbbá a kísérleteket a regionális humán orvosi biológiai kutatásetikai bizottság engedélyével (No. 2348) végeztük.

7. Eredmények és következtetések

7.1. A kenodezoxikólsav hatása a pankreász duktális sejtekre

7.1.1. A kenodezoxikólsav K^+ csatornákat aktivál a pankreász duktális sejteken

Kísérleti eredmények: Mivel az epesavak a GI traktus számos epitél sejtjében fokozzák a K^+ áramok konduktanciáját, első lépésben megvizsgáltuk vajon a CDCA képes-e K^+ csatornákat aktiválni a pankreász duktális sejteken. 100 μ M CDCA három-négyszeresére növelte a sejten mérhető áramerősséget, a vizsgált sejtek 75 %-ában. Az aktiváció feszültség-függő volt mely a pozitív potenciáloknál jelentkezett, valamint az aktiváció hatására az E_{rev} a negatív irányba tolódott el ($-18,4 \pm 2,8$ mV), ami arra utal, hogy az aktivált áramok nagy része K^+ szelektív volt. A CDCA hatása 4-5 perc után érte el a maximumot. A nagy konduktanciájú Ca^{2+} -aktiválta K^+ csatorna (BK_{Ca}) gátlószer iberiotoxin (IBT) hatására a CDCA-aktiválta áramok szinte teljesen gátlódtak és a membrán potenciál $25,5 \pm 6,8$ mV-al depolarizálódott. Megfigyelhető, hogy az IBT adására az áramerősség a kontroll érték alá csökkent, amely arra utal, hogy a duktális BK_{Ca} csatornák alap állapotban is mutatnak némi aktivációt. A közepes (IK_{Ca}) és kis (SK_{Ca}) konduktanciájú Ca^{2+} -aktiválta K^+ csatornák specifikus gátlószerei, a TRAM 34 illetve az UCL 1684, nem befolyásolták a CDCA-indukálta K^+ áramokat, ami arra utal, hogy ezen epesav szelektív módon, a BK_{Ca} csatornákat aktiválja a duktális sejteken. Mivel a megnövekedett $(Ca^{2+})_i$ alapvető szerepet játszik a BK_{Ca} csatornák aktivációjában, megvizsgáltuk, hogy a CDCA, K^+ csatornát stimuláló hatása a $(Ca^{2+})_i$ emelkedésén keresztül valósul-e meg. Az $(Ca^{2+})_i$ megkötése teljes mértékben gátolta a CDCA BK_{Ca} csatornákra kifejtett aktiváló hatását, míg a CDCA külső Ca^{2+} hiányában is képes volt fokozni a K^+ konduktanciát. 2 mM extracelluláris Ca^{2+} adása tovább növelte a CDCA hatását. A CDCA elvonását követően az áramerősség a kezdeti, kontroll értékre csökkent. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a CDCA maximális aktiváló hatásához mind az intra- mind pedig az extracelluláris Ca^{2+} szükséges.

Következtetések: Jelen ismereteink szerint eddig két kation csatornát azonosítottak patkány duktális sejteken. Az egyik egy Ca^{2+} -aktiválta, nem-szelektív kation csatorna, ami mind a bazális mind pedig az apikális membránon megtalálható és permeabilis mind a Na^+ , K^+ és Cs^+ ionokra. A másik csatorna a duktális sejtek bazolaterális membránjára lokalizálódik és cAMP illetve Ca^{2+} szint emelkedés hatására aktiválódik. Kutya pankreász duktális sejtek bazolaterális membránján egy karibdotoxin-érzékeny, Ca^{2+} -aktiválta K^+ csatornát sikerült azonosítani, amely feltehetőleg a közepes konduktanciájú K^+ csatornák családjában tartozik. Bár a BK_{Ca} csatorna jelenlétét számos szekretáló epitélum apikális membránján sikerült azonosítani, a pankreász duktális sejtek esetén munkacsoportunk tette meg először ezt a felfedezést. A BK_{Ca} csatornák fontos szerepet játszanak a nyálmirigy szekréciós folyamataiban. Ezen csatorna deléciója a fültő- illetve állkapocs alatti mirigy acinus sejtjeiben jelentősen lecsökkenti a szekréciót mennyiségét és megváltoztatja az ionösszetételét. Sertés méhnyálkahártyában az SK_{Ca} csatornák aktivációja fokozza a Ca^{2+} -aktiválta anion szekréciót. A gyomormirigyben a Ca^{2+} -aktiválta K^+ csatornák szintén fontos szerepet játszanak a savszekrécióban. Ezen adatok alapján feltételezzük, hogy hasonlóan a többi szekretórikus epitélumhoz, a duktális sejtekben is esszenciális szerepet játszik a BK_{Ca} csatorna az anion szekrécióban.

7.1.2. A K^+ csatornák szerepe a kenodezoxikólsav-indukálta duktális HCO_3^- szekrécióban

Kísérleti eredmények: A következő kísérletsorozatban azt vizsgáltuk, hogy a CDCA szekréciót stimuláló hatása a BK_{Ca} csatornák aktivációján keresztül valósul-e meg. Ennek eldöntésére a CDCA stimuláló hatását lumenálisan adott IBT jelenlétében vizsgáltuk. Ezeket a kísérleteket intakt intra-, interlobuláris pankreász duktuszokon végeztük, melyeket mind a lumenális mind pedig a bazolaterális membrán felől perfundáltunk. A bazolaterális oldal felől adott IBT nem befolyásolta jelentősen a CDCA-indukálta HCO_3^- szekréció mértékét, azonban a lumenális membrán felől adott IBT jelenlétében a CDCA-indukálta HCO_3^- szekréció jelentősen lecsökkent. Ezzel szemben a lumenálisan adott IBT nem befolyásolta a szekretin (100 nM), karbakol (10 μ M) vagy a lumenális ATP (10 μ M) indukálta HCO_3^- szekréció mértékét. Ezen eredmények azt sugallják, hogy (1) a BK_{Ca} csatornák a duktális sejtek lumenális membránjára lokalizálódnak illetve (2) a CDCA-stimulálta duktális szekréció a BK_{Ca} csatornák aktivációján keresztül valósul meg. Ezek alapján arra gondoltunk, hogy a BK_{Ca} csatornák farmakológiai aktivációja hasonló mértékű HCO_3^- szekréció fokozódást okoz mint a CDCA. Ehhez megvizsgáltuk a specifikus BK_{Ca} csatorna aktivátor, 1-(3,5-bis-trifluoromethylphenyl)-3-(4-bromo-2-(1H-tetrazol-5-yl)-phenyl)-thiourea (NS11021) hatását a HCO_3^- szekrécióra az NH_4Cl pulzus technika alkalmazásával. A lumenális membrán felől adott 3 μ M NS11021 fokozta a HCO_3^- szekréciót, míg ezen szer inaktív formája (NS13558, 3 μ M) nem befolyásolta számottevően a szekréció mértékét.

Következtetések: A szekretin-indukálta HCO_3^- szekréció a cAMP szint emelésén keresztül valósul meg, míg a karbakol illetve a lumenális ATP hatásában a megemelkedett Ca^{2+} szintnek van szerepe. Eredményeink azt mutatták, hogy a BK_{Ca} csatornák nem vesznek részt ezen szekretagógok stimuláló hatásában, mely meglepő volt főként a karbakol illetve a lumenális ATP esetében, amelyek egy $[Ca^{2+}]_i$ szint emelkedést indukálnak a duktális sejtekben. Egy lehetséges magyarázat erre, hogy a karbakol vagy a lumenális ATP által kiváltott Ca^{2+} szignál nem elég nagy ahhoz, hogy aktiválja a BK_{Ca} csatornákat, illetve az is elképzelhető, hogy ezen szekretagógok indukálta Ca^{2+} polarizáltan, a duktális sejtek bazális oldalán szabadul fel, így nem képes aktiválni a lumenális membránra lokalizálódó BK_{Ca} csatornákat. Ezen eredmények azt sugallják, hogy a BK_{Ca} csatornák aktivációjának nagyobb jelentősége van patofiziológiás mind fiziológiás körülmények között, azáltal, hogy a fokozott szekréció révén védi a pankréaszt az epesavak károsító hatásával szemben, amely akár terápiás jelentőséggel is bírhat biliáris pankreatitiszben. Ennek alátámasztására egy specifikus BK_{Ca} csatorna aktivátor NS11021 jelenlétében vizsgáltuk a duktális HCO_3^- szekréciót. Az NS11021 egy speciális, tiourea származék, amely szelektíven aktiválja a BK_{Ca} csatornát. Azt találtuk, hogy a lumenális membrán felől adva ezen farmakon szignifikánsan növelte a HCO_3^- szekréció mértékét, míg az inaktív forma esetében (NS13558) nem detektáltunk változást. Állatkísérletekben kimutatták, hogy az NS11021 csökkenti az iszkémia vagy reperfüzió-indukálta infarktus nagyságát és növeli a mitokondriumok energetikai teljesítményét, ezáltal kardioprotektív hatású. Kísérleteink során elsőként mutattuk ki ezen vegyület kedvező hatását a duktális HCO_3^- szekrécióra. Hipotézisünk szerint a BK_{Ca} csatornák aktivációja hiperpolarizálja a membránt, ami fokozza az elektrokémiai hajtóerőt az anion szekrécióhoz a Cl^-/HCO_3^- kicserélőn és a CFTR Cl^- csatornán keresztül.

7.1.3. A K^+ csatornák lokalizációja és az epesav transzporterek expressziója pankreász duktális sejteken

Kísérleti eredmények: Korábbi mérési eredményeink alapján azt feltételeztük, hogy a BK_{Ca} csatornák a tengerimalac pankreász duktális sejtek lumenális membránjára lokalizálódnak. Annak érdekében, hogy ezt a feltételezést alátámasszuk, immunfestést hajtottunk végre tengerimalac pankréáson. Az

immunfestés a BK_{Ca} csatorna erős festődését mutatta az intra-interlobuláris duktuszokon illetve a Langerhans szigeteken, ezzel szemben nem detektáltunk festődést az acinusokon valamint az intersticiumban. A következő lépésben kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon a CDCA duktális sejtekre kifejtett hatása epesav transzporterek közvetítésével valósul-e meg. A G-fehérje kapcsolt epesav receptor 1 (Gpbar1) egy újonnan azonosított epesav transzporter. Immunhisztokémiai eljárást alkalmazva sikerült kimutatnunk ezen fehérje jelenlétét a tengerimalac acinus sejteken, azonban a duktális sejtek esetében nem tapasztaltunk festődést.

Következtetések: A Gpbar1 egy membrán-kötött epesav receptor, melynek jelenlétét a pankreász acinusok lumenális membránján kimutatták és azt találták, hogy kritikus szerepet játszik az epe-indukálta pankreatitisz pathomechanizmusában. Ezen receptor sokféle szerepet játszik a szervezetben. Egyrészt gátolja az epesavak indukálta proliferációt és apoptózist, fokozza a vékonybél motilitását és a szekréciót, valamint befolyásolja a sejtek metabolizmusát azáltal, hogy szabályozza a vércukorszintet és stabilizálja az energiaháztartást. Kísérleteink során nem sikerült ezen transzporter jelenlétét kimutatni a tengerimalac duktális sejtekben, amely feltételezi, hogy a CDCA felvétele nem ezen a transzporterén keresztül valósul meg. Elképzelhető, hogy mivel a CDCA sem glicin-el sem pedig taurin-al nem konjugált ezért kevésbé hidrofíl és valamilyen mértékben átjut a sejtmembránon és kifejti specifikus hatását. Illetve máj hepatocitákon végzett kísérletekben kimutatták, hogy ezen epesav transzportjában szerepet játszhat az organikus anion transzporter polipeptid (OATP) B1-es és B3-as izoformája is, bár ezen epesavtranszporter jelenlétét a duktális sejteken nem vizsgáltuk.

Eredményeinket összefoglalva elmondható, hogy azonosítottunk egy új ioncsatornát a duktális sejtek apikális membránján, amely patofiziológias körülmények között fontos szerepet játszik a pankreász duktális HCO₃⁻ szekrécióban. Eredményeink azt sugallják, hogy a BK_{Ca} csatornák aktivációja szintetikus farmakonok által egy új terápiás lehetőséget vet fel a biliáris pankreatitisz kezelésében.

7.2. Az urzodezoxikólsav hatása a pankreász duktális sejtekre

7.2.1. Az urzodezoxikólsav hatása a pankreász duktális sejtek iontranszport folyamataira és a (Ca²⁺)_i szintre

Kísérleti eredmények: Korábbi kísérleteink során kimutattuk, hogy a CDCA hatására jelentősen lecsökkent a duktális sejtek pH-ja, ezért kíváncsiak voltunk, hogy vajon az eltérő biokémiai tulajdonságokkal rendelkező UDCA adására is megfigyelhető-e ilyen mértékű acidifikáció. Az UDCA hatására egy dózis-függő pH csökkenés következett be. Érdekességgént a Hepes-el bufferolt oldat esetében nagyobb mértékű különbség volt megfigyelhető a CDCA és az UDCA pH_i-ra kifejtett hatása között, mint a HCO₃⁻-tartalmú oldat esetén. Ez feltehetőleg azzal magyarázható, hogy HCO₃⁻ jelenlétében a sejt pufferkapacitása megnő. A nagy dózisú (1 mM) CDCA hatására gátlódik a sav-bázis transzporterek működése, ami a duktális HCO₃⁻-szekréció csökkenését eredményezi. A következő kísérletsorozatban azt vizsgáltuk, hogy vajon a duktális sejtek UDCA előkezelése képes-e kivédeni a CDCA iontranszporterekre kifejtett gátló hatását. Az iontranszporterek aktivitását az NH₄Cl pulzus technika segítségével vizsgáltuk. A kísérletek során két NH₄Cl pulzust alkalmaztunk. Az első pulzus volt a kontroll a második pedig a teszt. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az epesavak hatását, a CDCA-t (1 mM) illetve az UDCA-t (0,1 – 1mM) 3 perccel a pulzus előtt, a pulzus alatt valamint 5 perccel a pulzus után is adtunk. Az UDCA önmagában nem befolyásolta sem az acidózisból sem pedig az alkalózisból történő regenerációt. Ezzel szemben, a CDCA hatására erőteljesen csökkent a

transzporterek működése. Az UDCA és CDCA együttes adása nem befolyásolta számottevően a CDCA gátló hatását, az UDCA egyik dózisában sem. Mivel számos tanulmány utal arra, hogy az UDCA védő hatása hosszabb inkubáció során alakul ki, megvizsgáltuk az UDCA előkezelés hatását a CDCA iontranszporter gátló hatására. Ehhez a következő lépésben különböző ideig (5 és 24 óra) előkezeltek a duktális fragmenteket UDCA-val majd megvizsgáltuk a CDCA iontranszporterekre kifejtett hatását. A duktuszok 5 órás UDCA előkezelése (0,1 – 1 mM) nem befolyásolta a CDCA-ra kapott választ. Ezzel szemben, a duktuszok 24 órás UDCA előkezelése szignifikánsan csökkentette a CDCA gátló hatását mind Hepes mind pedig HCO_3^- jelenlétében. Az UDCA védő hatása 0,5 mM-nál bizonyult a leghatékonyabbnak, ezért a további kísérleteket az UDCA ezen koncentrációjával folytattuk tovább. Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a duktális fragmentek előkezelése UDCA-val jelentősen csökkentette a CDCA gátló hatását mind az NHE, mind a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kicserélő, mind pedig az NBC aktivitására.

Számos tanulmányban leírták, hogy az epesavak-indukálta toxikus Ca^{2+} szignál egy kezdeti lépés az AP kialakulásába. Korábbi kísérleteink során kimutattuk, hogy a CDCA magas koncentrációban (1 mM) jelentős mértékben megnöveli a sejten belüli Ca^{2+} szintet és ez a tartósan magas Ca^{2+} károsíthatja a sejten belüli folyamatokat, ami kihatással lehet az iontranszporterek működésére is. Mivel az UDCA előkezelés kedvezőnek bizonyult a CDCA iontranszporterekre kifejtett gátló hatásában, megvizsgáltuk, hogy vajon ez a védő hatás a CDCA-indukálta Ca^{2+} felszabadulás csökkentése révén valósul-e meg. 0,5 mM UDCA nem okozott jelentősebb változást az $(\text{Ca}^{2+})_i$ szintben. 1 mM CDCA hatására egy nagymértékű, részben reverzibilis Ca^{2+} emelkedés volt megfigyelhető. A duktális fragmentek 0,5 mM UDCA-val történő 24 órás kezelése nem befolyásolta a CDCA-indukálta Ca^{2+} szint emelkedést, ami arra utal, hogy az UDCA védő hatása nem a megemelkedett Ca^{2+} szint kivédésén keresztül valósul meg.

Következtetések: Az UDCA koncentrációját irodalmi adatok alapján választottuk, mely alapján 0,1-1 mM koncentráció tartományban teszteltük. Azt találtuk, hogy a legkisebb hatékony koncentráció aminél az UDCA kifejtette védő hatását 0,5 mM volt. A koncentráció emelésével az UDCA védő hatása nem fokozódott. A 0,5 mM-os koncentráció egy nagyságrendel nagyobb mint az epesavak koncentrációja a vérben és néhány nagyságrendel kisebb mint az epesav koncentrációja az epehólyagban (10-100 mM). Az inkubációs idő tekintetében megvizsgáltuk az UDCA akut és krónikus (5 és 24 órás) hatását. A legoptimálisabbnak a 24 órás UDCA kezelés bizonyult, ami azt is igazolja, hogy a védő hatás kialakulásához akár transzkripciós/transzlációs szintű változások (szignalizációs folyamatokban vagy apoptózisban szerepet játszó fehérjék megváltozott kifejeződése) is szükségesek. Jelen tanulmányban azt találtuk, hogy a pankréász duktuszok 24 órás előkezelése UDCA-al jelentősen lecsökkentette a CDCA sav-bázis transzporterekre kifejtett gátló hatását. A pankréász acinus sejteken elvégzett tanulmányok szerint a hidrofíli epesav károsító hatása a megemelkedett $(\text{Ca}^{2+})_i$ szinttel magyarázható. Korábban kimutattuk, hogy 1 mM CDCA hatására nagy fokú $(\text{Ca}^{2+})_i$ felszabadulás figyelhető meg a duktális sejtekben, ezért megvizsgáltuk, hogy az UDCA védő hatása a CDCA-indukálta Ca^{2+} szignál kivédésén alapszik-e. A pankréász duktuszok 24 órás előkezelése nem volt képes kivédeni a CDCA $(\text{Ca}^{2+})_i$ -ra kifejtett hatását, ami összefüggésben áll korábbi megfigyeléseinkkel mely szerint a Ca^{2+} kelátor, BAPTA-AM-el történő előkezelés nem befolyásolta a CDCA sav-bázis transzporterekre kifejtett gátló hatását. Kísérleteink során az UDCA előkezelés hatását csak a citoplazmában szabad állapotban lévő Ca^{2+} szintjére vizsgáltuk, míg a sejten belüli, totál $(\text{Ca}^{2+})_i$ szintben bekövetkező változásokat nem vizsgáltuk. Elképzelhető, hogy az UDCA védő hatása a Ca^{2+} túlterhelés csökkentéséből vagy a szabad gyök képződés gátlásából származtatható.

7.2.2. Az urzodezoxikólsav védő hatása a kenodezoxikólsav-indukálta mitokondriális károsodással szemben

Kísérleti eredmények: Korábbi vizsgálataink során kimutattuk, hogy a CDCA kezelés hatására erőteljesen károsodik a duktális sejtek mitokondriális funkciója, csökken a sejten belüli ATP szint, ami feltehetőleg kihatással lehet az iontranszport folyamatokra az energetikai egyensúly zavara miatt. Annak eldöntésére, hogy az UDCA képes-e kivédeni a CDCA-indukálta mitokondriális károsodást, mind funkcionális mind morfológiai vizsgálatokat végeztünk az UDCA-val előkezelt duktuszokon. A sejten belüli ATP szint (ATP_i) jól tükrözi a mitokondriumok működési állapotát. Az első lépésben megvizsgáltuk a CDCA hatását az (ATP_i) szintre, UDCA előkezelés (24 óra, 0,5 mM) nélkül és mellett. 1 mM CDCA hatására jelentősen lecsökkent az (ATP_i) szint, ezzel szemben, 24 órás UDCA előkezelés mérsékelte a CDCA hatására kialakuló ATP depléciót. Az UDCA kezelés önmagában nem befolyásolta az (ATP_i) szintet. Annak érdekében, hogy tovább vizsgáljuk az UDCA védő hatását a mitokondriumokra, megvizsgáltuk a $\Delta\Psi_m$ (mitokondriális membránpotenciál) és az mPTP (mitokondriális permeabilitás tranzíciós pórus), hogyan változik az epesavak adására. A $\Delta\Psi_m$ -ban bekövetkező változások detektálásához 1 μM TMRM-el inkubáltuk a duktuszokat. A mitokondriális fluoreszcencia stabilizáció után, 1 mM CDCA-t adtunk a sejtekhez és a fluoreszcens intenzitásban bekövetkező változásokat rögzítettük. CDCA adására jelentősen megnövekedett a fluoreszcens intenzitás, ami arra utal, hogy a CDCA hatására egy nagyfokú mitokondriális depolarizáció következett be, melyet az UDCA-val történő előkezelése jelentős mértékben lecsökkentett. Az mPTP indukció vizsgálatához a kalcein-kobalt technikát alkalmazva, azt találtuk, hogy 1 mM CDCA-val történő kezelés mérsékli a kalcein fluoreszcens intenzitását nagyjából 1 perc-el az epesav adását követően. A $\Delta\Psi_m$ kísérletekhez hasonlóan, a 24 órás UDCA előkezelés (0,5 mM) azonban védő hatást fejtett ki és csökkentette a CDCA-indukálta mPTP nyitódást. Az UDCA önmagában nem befolyásolta az mPTP-t. A mitokondriumok morfológiáját elektronmikroszkóp segítségével tanulmányoztuk. A mitokondriumok átlagos száma megegyezett a kontroll, a CDCA-kezelt, az UDCA-kezelt illetve a CDCA+UDCA-kezelt pankreasz metszetekben. Nem tapasztaltunk morfológiai eltérést a kontroll illetve UDCA-kezelt csoportokban. A duktuszok 5 perces inkubációja 1 mM CDCA-val mitokondriális hízáshoz és a mitokondriális belső membránszerkezet felbomlásához vezetett. Az UDCA-val előkezelt duktuszokban a CDCA nem okozott ilyen jellegű elváltozást a mitokondriumokban.

Következtetések: Számos tanulmányban igazolták, hogy az epesavak-indukálta sejtkárosodásban a mitokondriumok központi szerepet játszanak és az UDCA előkezelés képes csökkenteni a hidrofób epesavak mitokondriumokra kifejtett károsító hatását. Ezért megvizsgáltuk az UDCA védő hatását a duktális mitokondriumok funkciójára és morfológiájára. A CDCA adása a mitokondriális pórus, mPTP nyitódását indukálta, ami a sejthalál egy korai lépése, mely során a mitokondriumok külső membránjának a permeabilitása megváltozik és a mitokondrium eredeti térfogatának többszörösére hízik. Az mPTP nyitódása a mitokondriális membrán potenciált megváltoztatja, a mitokondrium nem megfelelő működése miatt pedig az ATP szintézis zavart szenved. A CDCA mitokondriumra kifejtett hatását patkány hepatocitákon is demonstrálták, ahol kimutatták, hogy a specifikus mPTP gátlószer, ciklosporin A jelenlétében a CDCA hatása teljesen megszűnt, ami azt mutatja, hogy a CDCA specifikusan hat az mPTP működésére. Egy másik tanulmányban azt találták, hogy a CDCA hatására fokozódik a mitokondriális membrán fluiditása és a citokróm c felszabadulás, ami hozzájárul az mPTP nyitódáshoz. A CDCA-val szemben az UDCA adása nem okozott szignifikáns eltérést a mitokondriális funkcióban, azonban CDCA-val kombinációban kivédte a CDCA-indukálta mPTP nyitódást, a belső kriszta szerkezet átalakulását, valamint a membrán potenciál csökkenését. Továbbá az UDCA előkezelés képes volt kivédeni a CDCA-indukálta (ATP_i) csökkenést, ami további bizonyítékot szolgáltat arra vonatkozóan, hogy az UDCA előkezelés kedvezően hat a CDCA-indukálta mitokondriális károsodással

szemben. Ezen megállapításunkat elektronmikroszkópos vizsgálatokkal is sikerült igazolnunk. 1 mM-os CDCA kezelés hatására a mitokondriumok belső membrán szerkezete szétbomlott illetve a mitokondriumok megduzzadtak. Az UDCA előkezelés ezen morfológiai elváltozásokat kivédte. Az mPTP nyitódás egyik fő induktora a megemelkedett $(Ca^{2+})_i$ szint illetve a szabadgyökök képződése. Kísérleteink során az UDCA előkezelés hatását csak a citoplazmában szabad állapotban lévő Ca^{2+} szintjére vizsgáltuk, míg a sejtben belüli, totál $(Ca^{2+})_i$ szintben bekövetkező változásokat nem vizsgáltuk. Hasonlóan az iontranszportereknel leírtakhoz, az UDCA mitokondriumokra kifejtett védő hatása a Ca^{2+} túlterhelés csökkentéséből vagy a szabad gyök képződés gátlásából származtatható.

7.2.3. Az urzodezoxikólsav csökkenti a kenodezoxikólsav-indukálta sejthalál mértékét és a pankreatitisz súlyosságát

Kísérleti eredmények: A mitokondriális károsodás sok esetben együtt jár a sejthalállal, ezért a következő lépésben megvizsgáltuk, hogy a CDCA mitokondriumokra kifejtett toxikus hatása apoptózissal társul-e. Ehhez a duktuszokat 5 percen keresztül inkubáltuk 1 mM CDCA-al, majd további 3 órán keresztül normál tápfolyadékban, annak érdekében, hogy időt hagyjunk a sejthalál kialakulására. A sejthalál detektálása TUNEL festéssel történt. A duktuszok CDCA-al történő inkubációja jelentős mértékben megnövelte a sejthalált a kezeletlen és UDCA-al kezelt duktuszokhoz képest. Bár a TUNEL festéssel mind az apoptózist mind pedig a nekrozist lehet detektálni, az intakt sejtorganelumok és membrán jelenléte, valamint a celluláris zsugorodás arra utal, hogy a CDCA hatására apoptózis következik be nem pedig nekrosis. A 24 órás UDCA előkezelés csak kismértékű DNS fragmentációt okozott, azonban szingifikánsan csökkentette a CDCA-indukálta programozott sejtelhalást.

Annak érdekében, hogy az UDCA védő hatását *in vivo* körülmények közt is megvizsgáljuk, egy CDCA-indukálta pankreatitisz model-t alkalmaztunk. Model állatként patkányokat használtunk, mivel a tengerimalac esetében kivitelezhetetlen volt a CDCA intraduktális alkalmazása az anatómiai sajátosságok miatt. A CDCA retrográd infúziója a pankréasz duktuszba szignifikánsan megemelte a szérum amiláz szintet a kontroll, fiziológiás sóoldatot kapott csoporthoz képest. A két hetes UDCA előkezelés nem befolyásolta a szérum amiláz szintet, azonban szignifikánsan csökkentette az UDCA + CDCA csoportban a CDCA csoporthoz képest. A pankréasz károsodás mértékét leginkább a szöveti nekrosis nagyságából lehet megítélni. A fiziológiás sóoldat intraduktális adása illetve az orális UDCA nem okozott nekrotikus sejtelhalást. Ezzel szemben a CDCA retrográd infúziója jelentős mértékű acinus károsodást eredményezett, amit az UDCA előkezelés jelentősen lecsökkentett. A CDCA adására jelentősen megnőtt a pankréasz víztartalma, melyet az UDCA előkezelés számottevően nem befolyásolt, azonban az UDCA+CDCA csoportban szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a CDCA csoporthoz képest.

Következtetések: A mitokondriális károsodás gyakran társul sejthalállal. Ennek egyik oka lehet a csökkent ATP szintézis, a másik pedig, hogy a mitokondriális membrán permeabilitásának a megváltozása miatt apoptózist indukáló szignálmolekulák diffundálhatnak a citoplazmába, ami apoptotikus folyamatokat indíthat el. A CDCA kezelés hatására jelentős mértékű DNS töredezettség volt megfigyelhető a duktális sejtekben. Feltételezzük, hogy a mitokondriális károsodás fontos szerepet játszik ebben a folyamatban, de elképzelhető, hogy egyéb szignalizációs útvonalak is bekapcsolnak. A CDCA és egyéb hidrofób epesavak apoptotikus hatását elsősorban hepatocitákban vizsgálták, ahol kimutatták, hogy az epesavak hatására fokozódott a reaktív oxigén gyökök (ROS) termelődése, az mPTP nyitódás mértéke, a citokróom c felszabadulás, valamint a kaszpázok aktivitása. Ezenkívül a CDCA glicin-el konjugált formája egy mitokondriumtól független útvonalon, a Fas receptor aktiválásán keresztül indukál apoptózist hepatocitákban. A 24 órás UDCA előkezelés hatására jelentősen lecsökkent a CDCA-indukálta apoptózis a duktális sejtekben, ami alátámasztja az UDCA sejtvédő szerepét. Az

UDCA védő hatásának pontos mechanizmusát nem vizsgáltuk, de irodalmi adatok alapján feltételezzük, hogy az mPTP gátlásán keresztül képes csökkenti a CDCA toxikus hatását. A következőkben kíváncsiak voltunk arra, hogy az UDCA védő hatása *in vivo* körülmények között is megfigyelhető-e. Mivel nincs olyan elfogadott, metodikai eljárás, amelyel tengerimalacban pankreatitist lehetne kiváltani, ezért kísérleteink során patkányokban váltottunk ki pankreatitist, CDCA intraduktális injektálásával. A CDCA adása acinus sejt nekrozist illetve emelkedett szerum amiláz szintet eredményezett. Izolált acinus sejteken végzett kísérletekben azt találták, hogy a szintén hidrofób epesav, taurolitokólsav hatására károsodtak a mitokondriumok, toxikus Ca^{2+} szignalizáció volt megfigyelhető, illetve fokozódott a ROS termelés. Feltehetőleg hasonló sejten belüli mechanizmusok mennek végbe a CDCA hatására is. A két hetes UDCA kezelés hatására jelentősen lecsökkent a CDCA-indukálta nekrozis és ödéma mértéke, amely feltételezi, hogy az UDCA védő hatását nem csak a duktális sejtekre, hanem az acinusokra is kifejti. Ennek vizsgálatához egér és patkány acinusokat izoláltunk és megnéztük az epesavak hatását a viabilitásra. Sajnos többszöri próbálkozás ellenére sem sikerült az UDCA esetleges védő hatását megvizsgálni, mivel az izolált acinusok lényegesen érzékenyebbek, mint az intakt duktuszok, emiatt a krónikus epesav kezelést a sejtek nem bírták. Továbbá az epesavak már igen kis koncentrációban lecsökkentették az acinusok viabilitását (még az UDCA is), amely tovább nehezítette a vizsgálatokat. Eredményeink klinikai jelentősége abból állhat, hogy azoknál a betegeknél, akiknél epekő okozta elzáródás van, az UDCA szájon át történő alkalmazása, csökkentheti a pankreatitisz kialakulásának a veszélyét. Az UDCA kedvező hatását idiopátiás rekurrens pankreatitisz-ben demonstrálták, ahol a hosszú távú UDCA kezelés csökkentette a pankreatitisz kiújulásának az esélyét. A szájon át alkalmazott UDCA hatása nagyban függ a szervezeten belüli metabolizmusától. Patkányban az UDCA nagy része TUDCA-vá alakul, melynek szintén sejtvédő hatása van. Emberben az UDCA metabolizmusa során izoUDCA képződik, ami az UDCA 3β -hidoxi epimerje és sokkal hatékonyabb mint az UDCA. Bár ebben a tanulmányban nem vizsgáltuk az UDCA koncentrációját a vérben, úgy gondoljuk, hogy kellően magas koncentrációban adtuk ahhoz, hogy a védő hatását kifejtsse.

A hidrofób epesavak indukálta sejtkárosodás pontos mechanizmusának az ismerete elengedhetetlenül fontos, ahhoz, hogy a biliáris pankreatitisz-ben új terápiás célpontokat azonosítsunk. Ebben a tanulmányban megerősítettük illetve kiterjesztettük azon megfigyelésünket, hogy a CDCA-indukálta sejtkárosodásban a mitokondriumoknak fontos szerepük van. Az UDCA, CDCA-val szembeni védő hatása feltehetőleg a mitokondriális membrán stabilizálásán keresztül valósul meg, azáltal, hogy gátolja a mitokondriális membrán depolarizációját illetve az mPTP nyitódását. Eddigi ismereteink szerint az UDCA klinikai alkalmazására a májat és epevezeteket érintő megbetegedések kapcsán kerül sor. Eredményeink azt mutatják, hogy az UDCA akár egy új, kezelési lehetőséget nyithat az epesavak-indukálta pankreász duktális károsodás kivédésében, a biliáris pankreatitisz esetén.

7.3. Az etanol és nem-oxidatív metabolitjainak a hatása a pankreász duktális sejtekre

7.3.1. Az alkohol és nem-oxidatív metabolitjainak a hatása a CFTR csatorna aktivitására

Kísérleti eredmények: Az EtOH 1 mM-os koncentrációban nem befolyásolta sem az alap sem pedig a forskolin-stimulált CFTR áramot, 15 perc adás után sem. 10 mM koncentráció esetén az alap áram szignifikánsan megemelkedett, az EtOH 15 perces adását követően, míg 100 mM-os koncentrációban már 5 perc után erőteljesen fokozta a csatorna konduktanciáját. A forskolin-stimulált CFTR áramot ezzel szemben mind 10 mind pedig 100 mM-os koncentrációban, feszültségfüggő módon gátolta az EtOH.

Mind a serkentő mind pedig a gátló hatás az EtOH kimosása után reverzibilis volt. A következő lépésben megvizsgáltuk, hogy az EtOH milyen mechanizmus révén fejti ki a hatását a CFTR csatornára. A plazmamembránon átjutva az EtOH vízmolekulákat köt meg, melynek eredményeként a sejtek dehidratálódnak. Ilyen körülmények között a víz és ionok sejten keresztüli mozgása megváltozhat. Annak eldöntésére, hogy vajon az EtOH indirekt módon, az ozmotikus viszonyok megváltoztatása révén befolyásolja-e a CFTR-t, vagy közvetlenül hat a csatornára vagy annak szabályozására, a sejteket mannitol-al kezeltük. A mannitol a sejtekre nézve impermeábilis molekula, amely a sejtek dehidratációját okozza a víz elvonása révén. Az EtOH-al ozmotikusan megegyező koncentrációjú mannitol (177 mM) négyszeresére növelte az alap CFTR áramokat. A mannitol-indukálta csatorna aktivitás mértéke megegyezett az EtOH-indukálta stimuláció mértékével, amely arra utal, hogy a nagy koncentrációjú EtOH hatása a CFTR csatornára feltehetőleg közvetetten az ozmosis megváltozása révén valósul meg. Mannitol adására a forskolin-stimulált áramok szintén szignifikánsan megnöttek, ami arra utal, hogy az EtOH a stimulált CFTR áramokra kifejtett gátló hatása specifikus.

Az oxidatív EtOH bomlás végterméke az acetaldehid (Ac), míg a nem-oxidatív degradáció zsírsav-etil-észtereket eredményez (FAEEs). Az Ac nem befolyásolta sem az alap, sem pedig a forskolin-stimulált CFTR áramokat, 1 illetve 5 mM-os koncentrációban. A palmitolsav etil-észter (POAEE; 10-200 μ M) az EtOH bomlásából származó, telítetlen zsírsav, amely az EtOH-hoz hasonlóan nem hatott az alap áramokra, azonban a stimulált áramokat jelentősen csökkentette 200 μ M-os koncentrációban. A telítetlen zsírsav, palmitolsav (POA), alacsony koncentrációban (10 μ M) nem befolyásolta sem az alap sem pedig a forskolin-al stimulált CFTR áramot. Ezzel szemben magasabb koncentrációban (100 és 200 μ M) egy dózis-függő gátlást okozott mind az alap mind pedig a stimulált CFTR áramban. A POAEE és a POA gátló hatása 5 és 15 perc adás után ért el maximumot és a kimosást követően az áramok amplitúdója visszaállt a kiindulási szintre.

A FAEE képződése az EtOH-ból és a zsírsavakból a FAEE szintáz által katalizált folyamat, míg a FAEE hidroláz felelős a reverz folyamatért. A FAEE szintáz/hidroláz aktivitása a májban és a pankréaszban a legnagyobb. Számos FAEE szintáz azonosítottak, melyek közül a pankréász koleszterol észter szintáz illetve a pankréász karboxilészter szintáz rendelkezik FAEE szintáz aktivitással. A következő lépésben kíváncsiak voltunk arra, hogy a POAEE gátló hatásának a hátterében ezen észter molekula hidrolízise áll-e. Ehhez kezeltük a sejteket 200 μ M bisz-(4-nitrofenil) foszfát-al (BNPP), amely a FAEE hidroláz specifikus gátlószere. A sejtek 15 perces BNPP kezelése nem befolyásolta az alap vagy a forskolin-stimulált CFTR áramokat, amely arra utal, hogy a BNPP-nek önmagában nincs hatása a csatorna aktivitására. Ezzel szemben a BNPP kezelés szinte teljesen megszüntette a POAEE gátló hatását a forskolin-stimulált ionáramokra, amely azt mutatja, hogy a POA képződése alapvetően fontos szerepet játszik a POAEE/EtOH gátló hatásában.

Következtetések: Mérsékelt alkoholfogyasztás után a véralkohol szint 1 mM körül van. Ennél a koncentrációnál az EtOH nem befolyásolta sem az alap sem pedig a forskolin-stimulált CFTR áramot. Magasabb koncentrációnál (10 és 100 mM), ami közel letális lehet az emberre nézve, az EtOH hatására megnőtt az alap és lecsökkent a forskolin-stimulált CFTR áram nagysága. Ezen eredményeink összhangban állnak korábbi megfigyelésekkel, mely szerint az EtOH dóziszfüggően befolyásolja a duktális szekréciót. Annak eldöntésére, hogy az EtOH hatása specifikus, megvizsgáltuk 100 mM EtOH-al ekvivalens koncentrációjú mannitol hatását a CFTR áramokra. Mivel a mannitol hatására hasonló aktivitást tapasztaltunk a CFTR csatorna konduktanciájában, úgy gondoljuk, hogy az EtOH aktiváló hatása feltehetőleg egy nem-specifikus mechanizmus, mely során a sejt adaptálódik a megváltozott ozmolaritású környezethez. Ezzel szemben mannitol hatására nem változott a stimulált áram nagysága, ami azt mutatja, hogy az EtOH gátló hatása valószínűleg valamilyen specifikus mechanizmuson keresztül valósul meg.

Számos tanulmányban leírták az EtOH metabolitok szerepét a pankreatitisz kialakulásában. Az EtOH oxidatív metabolizmusa elsősorban a hepatocitákban zajlik, amit az alkohol dehidrogenáz enzim katalizál. Azonban azt is kimutatták, hogy a pankreász acinusok is tartalmazzák az EtOH metabolizmusához szükséges enzimeket, így ezek a sejtek is képesek az alkohol metabolizálására. Kimutatták, hogy az Ac sejten belüli akkumulációja negatívan befolyásolja az NF κ B aktivitást és a CCK-indukálta szekréciót izolált patkány acinus sejtekben, magasabb koncentrációban pedig a pankreász morfológiai elváltozását okozza. Jelen tanulmányban azt találtuk, hogy az Ac adására nem változott a CFTR csatorna aktivitása és nem okozott morfológiai elváltozásokat a duktális sejteken még 5 mM-os koncentrációban sem.

Az oxidatív metabolizmussal szemben az EtOH nem-oxidatív metabolizmusának nagy hányada a pankreászban történik. A FAEE szintáz aktivitás itt lényegesen magasabb, mint a májban. Ennek eredményeként a nem-oxidatív metabolitok, úgy mint a zsírsav (FA) vagy FAEE koncentrációja magasabb a pankreászban mint bármelyik más szervben. Acinusokon végzett vizsgálatok során kimutatták, hogy a FAEE-k toxikus Ca^{2+} szignált indukálnak és károsítják a mitokondriális oxidatív láncot, ami ATP deplécióhoz, végül pedig setjhalálhoz vezet. A FAEE-k fontos szerepét a pankreászban mutatja az is, hogy akut alkohol intoxikációban elhunyt személyek illetve krónikus alkoholfogyasztók pankreászában jelentős mennyiségű FAEE-t találtak. Ebben a tanulmányban elsőként mutattuk ki, hogy a telítetlen zsírsav, POA és észter-kötött formája a POAEE, reverzibilisen és idő-függő módon gátolja a CFTR aktivitást a duktális sejtekben.

7.3.2. Az ATP szerepe az alkohol és nem-oxidatív metabolitjainak a hatásában

Kísérleti eredmények: A következő lépésben megvizsgáltuk a sejten belüli mechanizmust, amely révén az EtOH és a nem-oxidatív metabolitok kifejtik a gátló hatásukat a CFTR csatornára. Korábbi tanulmányok azt mutatják, hogy az EtOH és a telítetlen zsírsavak, mint a POA, indukálják az mPTP nyitódását, amely végső soron a sejt halálához vezet. Mivel a zsírsavak hatását a mitokondriális funkcióra korábban senki nem vizsgálta a duktális sejtekben, a következő lépésben megnéztük az EtOH és nem-oxidatív metabolitjainak a hatását a mitokondriális károsodásra, a mikrofluorimetriás technika alkalmazásával. A duktális sejteket feltöltöttük egy Mg^{2+} érzékeny fluorescens festékkel (MgGreen-AM), amely a sejten belüli ATP közvetett vizsgálatát teszi lehetővé. 100 mM EtOH hatására a sejtek 75%-ában egy kismértékű csökkenést figyeltünk meg az ATP_i szintben, míg a POA és POAEE esetében (200 μM) jelentősen megnőtt a MgGreen fluoreszcens intenzitása, amely körülbelül 5 perc adás után ért el egy plató fázist. Korábban kimutattuk, hogy az oxidatív és glikolikus metabolizmus gátlása, karbonil cianid m-klorofenil hidrazon-al (CCCP, 100 μM) és 2-deoxiglükóz/iodoacetamid-al (DOG/IAA, 10 mM), jelentős mértékű és irreverzibilis ATP_i depléciót okoz a tengerimalac duktális sejtekben. Annak eldöntésére, hogy az EtOH, POA és POAEE gátló hatása az ATP_i csökkenésen keresztül valósul-e meg, megvizsgáltuk a CCCP/DOG/IAA hatását a CFTR áramokra. Eredményeink azt mutatták, hogy a gátlószerek kombinációja hasonló mértékben blokkolták a CFTR áramokat, mint az EtOH, POA és POAEE. A CCCP/DOG/IAA elvonását követően, az ionáramok nem tértek vissza a kiindulási szintre, ami arra utal, hogy az ATP_i elvonása irreverzibilis gátlást okozott a CFTR csatorna aktivitásában.

A következő lépésben kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon az ATP_i helyreállítása hogyan befolyásolja az EtOH, POA és POAEE, CFTR csatornára kifejtett gátló hatását. Az ATP szint emelése a pipettában 1, 2 vagy 5 mM-ra nem eredményezett számottevő változást az alap vagy forskolin-stimulált CFTR áramban. A pipettaoldat 2 mM ATP-vel történő kiegészítése nem befolyásolta sem az EtOH sem pedig a nem-oxidatív metabolitok gátló hatását a CFTR áramokra. Ezzel szemben, amikor az ATP koncentrációját 5 mM-ra emeltük, teljesen kivédte az EtOH, POAEE és POA, CFTR csatornára kifejtett gátló hatását. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a CFTR csatorna gátlása feltehetőleg az ATP_i szint csökkenésével vagy az ATP_i-CFTR interakció megváltozásával magyarázható. Annak

érdekében, hogy vizsgálatainkat humán duktális sejtekre is kiterjesszük, a POA illetve az ATP hozzáadásnak a hatását megvizsgáltuk a Capan-1 sejtvonalon is. A Capan-1 sejtvonal egy humán pankréász duktális sejtvonal, amely expresszálja a CFTR csatornát. A tengerimalac pankréász duktális sejtekhez hasonlóan 200 μM POA csökkentette a forskolin-stimulált CFTR áramokat. 2 mM ATP_i adása nem befolyásolta a POA gátló hatását, azonban 5 mM ATP_i jelenlétében a POA gátló hatása szignifikánsan lecsökkent.

Következtetések: A CFTR Cl⁻ csatorna, az ATP-kötő kazetta (ABC) transzporter család egyik tagja, mely a PKA által aktiválódik. Mivel a csatorna nyitódása függ az ATP kötődésétől, ezért az ATP jelenléte esszenciális a normális CFTR működéshez. Mivel a FA-k és FAEE-k ATP depléciót okoznak patkány pankréász acinusokban és alveoláris makrofágokban, kíváncsiak voltunk, hogy az EtOH, POA és POAEE hogyan befolyásolja a CFTR aktivitást pankréász duktális sejtekben. Eredményeink azt mutatták, hogy mindhárom ágens hatására csökken az ATP a sejten belül. A POA hatására szignifikánsan nagyobb csökkenést tapasztaltunk, mint a POAEE esetében. Továbbá kimutattuk, hogy 200 μM POA hatására olyan mértékben lecsökkent az ATP_i szint, hogy hosszabb inkubációs idő hatására sem tapasztaltunk további csökkenést. Ezzel összhangban a glikolitikus és mitokondriális ATP termelés csökkenése, hasonló mértékű CFTR gátlást indukált, mint az EtOH, POA és POAEE, ami arra utal, hogy az ATP_i szint csökkenése egy kulcs lépés ezen ágensek CFTR gátló hatásában. Az ATP szerepének fontosságát mutatja az is, hogy az ATP adása a patch pipettán keresztül majdnem teljesen kivédte az EtOH és bomlástermékeinek a CFTR-ra kifejtett gátló hatását. Hasonló eredményeket kaptunk a Capan-1 sejtvonal esetén is. Arra vonatkozóan, hogy az ATP adása hogyan fejt ki kedvező hatását további vizsgálatok szükségesek. Elképzelhető, hogy gátolja a CFTR csatorna PKA-függő foszforilációját, illetve lehetséges, hogy az ATP kötődése révén stabilizálja a csatorna működését. A pankreatitisz pathomechanizmusával kapcsolatban a legújabb kutatások azt mutatják, hogy a mitokondriális károsodás és az ATP depléciónak fontos szerepet játszik a pankreatitisz kialakulásában. Az acinus sejtekben a FA-k toxikus Ca²⁺ szignált generálnak, ami rontja a mitokondriális funkciókat és ez által az ATP termelést. ATP hiányában, a Ca²⁺-aktiválta ATPázok az ER-ban illetve a plazmamembránon nem képesek a Ca²⁺-ot visszapumpálni az ER-ba vagy kipumpálni a sejtől, melynek eredményeként a (Ca²⁺)_i tartósan magas szinten marad, mely végső során sejthalált indukál. Az ATP helyreállítása azonban képes csökkenteni a toxikus Ca²⁺ szintet.

Eredményeinket összefoglalva, elsőként sikerült kimutatnunk, hogy az EtOH, POA és POAEE magas koncentrációja erőteljesen gátolja az epiteliális CFTR aktivitást, feltehetőleg a mitokondriumok károsítása és következetesen az ATP_i szint csökkenése révén. Mivel a CFTR csatorna fontos szerepet játszik a duktális folyadék és HCO₃⁻ szekrécióban, a csatorna nem megfelelő vagy csökkent működése közrejátszhat a pankreatitisz patomechanizmusában. Egy fontos új megállapítás, hogy az ATP szint helyreállítása képes kivédeni az EtOH és metabolitjainak a gátló hatását, ami felveti az ATP adásának terápiás lehetőségét alkohol-indukálta pankreatitiszben.

7.4. Az epesavak hatása a nyelőcső epitél sejtekre

7.4.1. pH szabályozó mechanizmusok a nyelőcső epitél sejteken

Kísérleti eredmények: A kísérletek első részében a nyelőcső epitél sejtek kezdő pH értékét határoztuk meg. A mérések alapján a CP-A illetve CP-D sejtek kezdő pH-ja $7,32 \pm 0,03$ -nak és $7,31 \pm 0,03$ -nak bizonyult. A kezdő pH nem változott jelentősebben az egyes mérések között. A következő lépésben célul tűztük ki, hogy azonosítjuk a fontosabb sav-bázis transzportereket a sejteken. A fluoreszcens

technikát és többféle megközelítést alkalmazva sikerült kimutatnunk két alkalizáló (NHE és NBC) és egy acidifikáló ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kicserélő) transzportert. Az NHE-k közül az NHE1 és -2 izoforma fordul elő a CP-A és CP-D sejteken, míg a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kicserélők közül az Slc26a6 anion transzporter, más néven PAT-1. A következő lépésben megvizsgáltuk az epesavak illetve a sósav hatását a transzporterek működésére. Annak érdekében, hogy mimikáljuk a GERD során fellépő patológiás körülményeket, egy epesav kóktélt (BAC) készítettünk, mely 7 db, a refluxátumban előforduló epesavat tartalmazott. A BAC hatását mind neutrális (pH 7,5) mind pedig acidikus (pH 5,5) körülmények között teszteltük a pH_i -ra. A neutrális pH-n 100 illetve 300 μM BAC-nak nem volt hatása a pH_i -ra, míg magasabb koncentrációnál (500 μM) az epesavak enyhén csökkentették a CP-A sejtek pH_i -ját. Ezzel szemben, pH 5,5-nél az epesavak egy robosztus acidózist indukáltak. Az epesavak hatása dózis-függő volt, és az epesavak elvonását követően a pH_i teljes mértékben regenerálódott. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy az epesavak hatása specifikus megnéztük a savas pH hatását önmagában a CP-A sejtek pH_i -ra. Bár az 5,5-ös pH-jú Hepes oldat kis fokú, reverzibilis acidózist indukált a sejtekben az epesavakkal kombinációban lényegesen nagyobb pH_i csökkenést okozott. Továbbá megvizsgáltuk az epesavak sejtbe jutásának a sebességét is. Az eredményeink azt mutatták, hogy a $-J(\text{B}^-)$ lényegesen nagyobb volt 5,5-ös pH-n, mint 7,5-ön. Az egyes epesavak hatását (100 μM) a pH_i -ra szintén teszteltük. Az epesavak közül a DC okozta a legnagyobb pH_i csökkenést és a hatása kétszer akkora volt savas pH-n mint neutrális pH-n. A konjugált epesavak hatása 7,5-ös pH-n elenyésző volt, míg 5,5-ös pH-n nagyfokú acidózist indukáltak.

Következtetések: Az epesavak dózisfüggően lecsökkentették a sejtek pH-ját, mely hatás savas körülmények között még erőteljesebb volt, összhangban korábbi megfigyelésekkel. Az epesavak közül a legerőteljesebb hatása a DC-nak volt, mind neutrális mind pedig savas körülmények között, mely egér nyelőcső epitél sejtekben is acidózist indukál. Az epesavak toxicitását a hidrofobicitás mellett a pKa értékük határozza meg. A nem-konjugált epesavak, mint például a DC, pKa értéke 5,2 és 6,2 között van, ezért neutrális pH-n többnyire ionizált formában van és a membránon nem képes áthaladni. Savas pH-n azonban a nem-konjugált epesavak kevésbé ionizáltak, képesek a sejtbe bejutni és hatásukat kifejteni. A konjugált epesavaknak ezzel szemben alacsonyabb pKa értéke van. A taurin-konjugált epesavak esetén 1,8-1,9, míg a glicin-konjugált epesavak esetén ez az érték 4,3-5,2 közé esik. Emiatt a neutrális (7,5) és enyhén savas (5,5) pH-n ezen epesavak nagy része ionizált formában van emiatt kisebb hatást képesek kifejteni a sejtre, mint a nem-konjugált társaik. Mindenesetre meg kell említeni, hogy nem csak a pKa érték határozza meg egy adott epesav hatását. Az epesavak detergens tulajdonságainak köszönhetően, képesek bizonyos mértékben fokozni a sejtmembrán permeabilitását különböző ionokkal szemben, ami szintén közrejátszhat, nem-specifikus sejtkárosító hatásukban. Továbbá a savas pH csökkenti a plazmamembrán integritását, ami szintén elősegítheti az epesavak sejtbe történő bejutását.

7.4.2 Az epesavak intracelluláris megemelik a $(\text{Ca}^{2+})_i$ szintet a nyelőcső epitél sejtekben

Kísérleti eredmények: Mivel az epesavak ionofor tulajdonságokkal rendelkeznek, megvizsgáltuk a hatásukat a $(\text{Ca}^{2+})_i$ -ra, neutrális és savas körülmények között. Hasonlóan a pH-hoz 100 és 300 μM -os koncentrációban, az epesavak nem befolyásolták lényegesen a $(\text{Ca}^{2+})_i$ szintet. A 5,5-ös pH-jú Hepes oldat, szintén csak marginális hatást fejtett ki. Ezzel szemben, 500 μM -os koncentrációban, az epesavak egy reverzibilis emelkedést okoztak, ami savas pH-n még hangsúlyozottabb volt. A következő lépésben megpróbáltuk azonosítani a felszabaduló Ca^{2+} forrását. Az epesavak hatását a $(\text{Ca}^{2+})_i$ -ra kétféleképpen vizsgáltuk, egyrészt az extracelluláris Ca^{2+} elvonásával, másrészt különböző inhibitorok alkalmazásával. A Ca^{2+} elvonása a külső oldatból kis mértékben csökkentette a $(\text{Ca}^{2+})_i$ szintet ami egy bizonyos mértékű $(\text{Ca}^{2+})_i$ deplációval magyarázható. Ilyen körülmények között, 500 μM BAC hatására kismértékű $(\text{Ca}^{2+})_i$

emelkedés volt megfigyelhető, ami arra utal, hogy az epesavak hatására az intracelluláris organellumokból szabadul fel a Ca^{2+} . A következő lépésben megpróbáltuk azonosítani a Ca^{2+} forrását. A Ruthenium Red (RR) és a koffein, a rianodin (RY) és az IP_3 receptorok specifikus inhibitora. $10\ \mu\text{M}$ RR nem befolyásolta az epesavak-indukálta (Ca^{2+})_i szignált, Ca^{2+} mentes extracelluláris oldatban. Ezzel szemben, $20\ \text{mM}$ koffein teljes mértékben blokkolta azt, ami azt sugallja, hogy az epesavak hatására létrejövő Ca^{2+} szignál az endoplazmatikus retikulumból szabadul fel. Az epesavak hatását gadolinium (Gd^{3+}), plazma membrán Ca^{2+} csatorna gátló, jelenlétében is vizsgáltuk. $1\ \mu\text{M}$ Gd^{3+} hatására csökkent a BAC hatása a (Ca^{2+})_i szintre, ami arra utal, hogy amellet, hogy az epesavak indukálják a Ca^{2+} felszabadulását az intracelluláris organellumokból, az extracelluláris Ca^{2+} beáramlást is fokozzák.

Következtetések: A pH_i csökkentése mellett az epesavak megemelték a (Ca^{2+})_i szintet, mely hatás savas pH -n még kifejezettebb volt. Az epesavak (Ca^{2+})_i-ra kifejtett hatása összhangban áll korábbi megfigyelésekkel, mely szerint a DC vagy a savas pH Ca^{2+} szignalizációt indukál egér és humán nyelőcső epitél sejtekben. Továbbá sikerült kimutatnunk, hogy az IP_3R gátlószer, koffein hatására teljesen megszűnt az epesavak (Ca^{2+})_i-ra kifejtett hatása, Ca^{2+} -mentes extracelluláris körülmények között, amely azt sugallja, hogy a folyamat feltehetőleg egy IP_3R -mediálta útvonalon keresztül valósul meg. Hasonló mechanizmust írtak le a vastagbél kripták, hepatociták, pankreász duktuszok és acinusok esetén is. Amellet, hogy az epesavak fokozzák az IP_3R -mediálta Ca^{2+} felszabadulást, elősegítik az extracelluláris Ca^{2+} beáramlását a sejtekbe, bár a mechanizmus nem pontosan ismert. Patkány hepatocitákban az epesavak közvetlenül stimulálják a „store-operated” Ca^{2+} csatornákat a sejtmembránon, azonban további vizsgálatok szükségesek, hogy azonosítsuk azokat a Ca^{2+} csatornákat, amelyek az epesavak hatását közvetítik a nyelőcső epitél sejteken.

7.4.3. Az epesavak akut és krónikus hatása az iontranszporterek aktivitására

Kísérleti eredmények: A következő lépésben kíváncsiak voltunk arra, hogy az epesavak hogyan befolyásolják a nyelőcső epitél sejtek sav/bázis transzportereinek az aktivitását és kifejeződését. Hepes-pufferolt oldat esetében az epesavak dózis-függően csökkentették az acidózisból történő regenerációt, ami arra utal, hogy az epesavak gátolják az NHE aktivitást a CP-A sejtekben. Annak érdekében, hogy azonosítsuk melyik NHE izoforma érintett az epesavak gátló hatásában, az epesavak hatását megvizsgáltuk az NHE gátlószer, HOE-642 jelenlétében is. $1\ \mu\text{M}$ HOE-642 az acidózisból történő regenerációt jelentősen csökkentette, melyet az $500\ \mu\text{M}$ BAC adása tovább csökkentett. Mivel $500\ \mu\text{M}$ BAC önmagában $77,15 \pm 3,2\ \%$ -ban gátolta az acidózisból történő regenerációt és az NHE aktivitás közel 77% -a az NHE1 izoformának köszönhető, ezen eredmények arra utalnak, hogy az epesavak az NHE1 gátlása mellett az NHE2 aktivitást is blokkolják. $50\ \mu\text{M}$ HOE-642 jelenlétében az acidózis teljesen gátlódott, amit az epesavak további adása nem befolyásolt. HCO_3^- jelenlétében az epesavak kisebb mértékben gátolták az acidózisból történő regenerációt, mint Hepes-bufferolt oldatban. HCO_3^- jelenlétében mind az NHE mind pedig az NBC aktív. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az epesavak hatását az NBC működésére, az NHE működést $50\ \mu\text{M}$ HOE-642 adásával teljesen gátoltuk. Az NHE gátlószer csökkentette az acidózisból történő regenerációt, így a fennmaradó aktivitás az NBC-nek tudható. $500\ \mu\text{M}$ BAC adására az acidózisból történő regeneráció jelentősen megnőtt, ami arra utal, hogy az epesavak fokozzák az NBC aktivitását. Ahogy azt már korábban is kimutattuk, az alkalózisból történő regeneráció kezdeti szakasza a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kicserélő aktivitását mutatja, HCO_3^- jelenlétében. Az epesavas kezelés hatására a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kicserélő aktivitása dózis függően megnőtt a CP-A sejtekben, ami arra utal, hogy az epesavak fokozzák a HCO_3^- szekréciót. Az epesavak hatását megvizsgáltuk a CP-D sejtvonalon is, ahol azt kaptuk, hogy az epesavak hatására megnőtt mind Hepes-ben mind pedig HCO_3^- jelenlétében az acidózisból történő regeneráció illetve az alkalózisból történő regeneráció mértéke, ami arra utal, hogy a CP-D sejtek sav-bázis transzporterei fokozott aktivitással válaszolnak az

epesavas terhelésre. A következő lépésben kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon az epesavak hatásának közvetítésében szerepet játszik-e a $(Ca^{2+})_i$. Ennek eldöntésére a sejteket előkezeltük a Ca^{2+} kelátor BAPTA-AM-el, majd ezt követően megvizsgáltuk az epesavak hatását. Az előkezelés hatására szignifikánsan lecsökkent mind a stimuláló mind pedig a gátló hatása a BAC-nak, ami arra utal, hogy az epesavak iontranszporterekre kifejtett hatása $(Ca^{2+})_i$ szint emelkedésén keresztül valósul meg.

A következő lépésben megvizsgáltuk, hogy vajon a sejtek hosszabb távú („krónikus”) kezelése epesavakkal hogyan befolyásolja a transzporterek kifejeződését. A CP-A és CP-D sejteket 70-80% konfluenciáig növesztettük, és 100 illetve 500 μM BAC-al kezeltük 7,5 illetve 5,5-ös pH-n az Anyagok és Módszerek részben leírtaknak megfelelően. A 7 napos kezelés hatására szignifikánsan megnőtt az NHE1, NHE2, NBC és a Cl^-/HCO_3^- kicserélő Slc26a6 izoformájának az mRNS kifejeződése a CP-A sejtekben, 7,5-ös pH-n. A CP-D sejtek esetén szintén megnőtt a transzporterek kifejeződése az epesavas kezelés hatására, azonban szignifikáns növekedés csak az NHE1 és az NBC iontranszporterek esetén volt megfigyelhető. A CP-A sejtekben, savas körülmények között (5,5-ös pH) az iontranszporterek kifejeződése nem változott szignifikánsan az epesavak adása ellenére sem. Azonban a sejtszámban csökkenés volt megfigyelhető a kontroll csoporthoz képest. A CP-D sejtek esetén egy jelentős emelkedés volt megfigyelhető az NHE1 expresszióban az epesavas kezelést követően 5,5-ös pH-n. Az NHE1-nél tapasztalható mRNS emelkedést fehérje szinten is sikerült detektálnunk. Az Slc26a6 izoforma fehérje kifejeződése szintén megemelkedett a CP-A sejtekben, összhangban a PCR eredményekkel, azonban az NHE2 és NBC transzporterek esetében nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a fehérje expresszióban a kontroll és epesav-al kezelt csoportok között. A következő lépésben megvizsgáltuk az iontranszporterek kifejeződését 14 pár biopsziás mintában, melyeket BE betegekből gyűjtöttünk. 1-1 biopsziás mintát vettünk a normál és a BE területről melyeket további mRNS és fehérje vizsgálatokhoz használtunk fel. Eredményeink azt mutatták, hogy az NHE1, NHE2, NBC és PAT-1 iontranszporterek mRNS kifejeződése megemelkedett az intesztinális és nem-intesztinális metapláziák esetén a normál mukózához képest. Az NHE1 és NHE2 izoformák fehérje expresszióját immunohisztokémiával vizsgáltuk. Eredményeink a RT-PCR eredményekkel összhangban, fokozott NHE-1 és NHE-2 expressziót mutatott a metapláziás mintákban a normál-hoz képest.

Következtetések: Az epesavak hatását az iontranszport folyamatokra mind akut mind pedig krónikus körülmények között vizsgáltuk. Az epesavak adása dózis-függően csökkentette az NHE aktivitást, míg az NBC és PAT-1 működését fokozta a CP-A sejtekben. Az NHE csökkent működése feltehetőleg szerepet játszik az epesavak pH_i csökkentő hatásában. A pH_i csökkenést ellensúlyozandó, megnövekedett NBC aktivitás, a HCO_3^- felvétele révén képes valamilyen szinten pufferni az acidifikáció mértékét. Emellett a HCO_3^- kiáramlása a Cl^-/HCO_3^- kicserélőn keresztül neutralizálja a sejt közvetlen környezetét csökkentve ez által a sav/epesavak károsító hatását. Összeségében elmondható, hogy az NBC és PAT-1 megnövekedett aktivitása feltehetőleg egy kompenzatórikus mechanizmus a csökkent NHE aktivitással szemben, amely a sejten belüli sav/bázis egyensúly fenntartásában játszik szerepet. A CP-D sejtek esetén, az epesavas kezelés hatására fokozódott az NHE aktivitás, ami feltehetőleg a CP-D sejtek előrehaladottabb állapotával magyarázható. Patológias körülmények között a diszpláziás Barrett mukóza nagyobb mértékű savas/epesavas refluxnak van kitéve, ezért sokkal ellenállóbb a GERD-indukálta stimulusokkal szemben, mint a CP-A sejtek.

A Ca^{2+} kelátor BAPTA-AM jelenlétében megszűnt az epesavak transzporterekre kifejtett gátló és stimuláló hatása, ami feltételezi, hogy a megemelkedett $(Ca^{2+})_i$ esszenciális szerepet játszik ezekben a folyamatokban. Korábbi tanulmányokban kimutatták, hogy a Cl^-/HCO_3^- kicserélő aktivitása összefüggésbe hozható egyéb, Ca^{2+} -aktiválta Cl^- vagy K^+ csatornákkal, de a pontos mechanizmus nem ismert. Az anion kicserélővel szemben az NHE működését a megemelkedett $(Ca^{2+})_i$ szint erőteljesen gátolja. Hasonló eredményeket mutattak ki ileum kefeszegélyben illetve vese proteoliposzómákban,

ahol a megnövekedett (Ca^{2+})_i szint a Ca^{2+} /calmodulin kaszkádon keresztül gátolja a kicserélő működését. Összeségében megállapítható, hogy a megemelkedett (Ca^{2+})_i szint feltehetőleg közvetetten befolyásolja az iontranszporterek működését, azonban további vizsgálatok szükségesek, hogy azonosítsuk azokat a sejten belüli útvonalakat, melyek ebben a folyamatban részt vesznek. Az epesavak krónikus hatásának vizsgálata során a CP-A és CP-D sejteket 7 napon keresztül kezeltük epesavakkal, melynek eredményeként az összes iontranszporter kifejeződése megemelkedett a CP-A sejtekben, valamint az NHE1 és NBC expressziója a CP-D sejtekben. Savas körülmények között, a transzporterek kifejeződése nem változott szignifikánsan a CP-A sejtekben, míg a CP-D sejtek esetén jelentős mértékű NHE1 fokozódást tapasztaltunk. A megnövekedett NHE1 kifejeződést fehérje szinten is sikerült detektálnunk. A transzporterek fokozott kifejeződése feltehetőleg egy védő vagy adaptív folyamat része, amely által a sejtek próbálják kompenzálni az epesavak toxikus hatását. Az iontranszporterek megnövekedett kifejeződése intesztinális és nem-intesztinális humán biopsziás mintákban is megfigyelhető volt a normál mukózához képest.

Eredményeink azt mutatják, hogy a metaplasztikus hengerhám jobban alkalmazkodik a savas környezethez a normál laphámhoz képest. Először is a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kicserélő megnövekedett aktivitásának köszönhetően, fokozott HCO_3^- szekrécióra képes, ami hatékonyan semlegesíti a nyelőcső reflux során fellépő savas kémhatást. Másrészt az alkalizáló transzporterek (NHE és NBC) fokozott expressziója szintén védi a sejtet a celluláris acidifikációtól. Eredményeink alapján azt gondoljuk, hogy az iontranszporterek megváltozott kifejeződése és aktivitása egy adaptációs folyamat része, mely során a nyelőcső epitél sejtek a megváltozott környezethez alkalmazkodnak csökkentve ez által az epesavak/sósav-indukálta nyelőcső károsodást.

8. Új eredmények összefoglalása

- 1/a) Sikertült elsőként azonosítanunk a BK csatornák jelenlétét a pankreász duktális sejtek apikális membránján illetve sikertült kimutatnunk, hogy a nem-konjugált epesav, CDCA (0,1 mM) hatására a BK csatornák aktiválódnak.
- 1/b) A BK csatornák aktivációjában fontos szerepet játszik a CDCA hatására felszabaduló Ca^{2+} . Mivel a CDCA csak a lumenális membrán felől képes aktiválni a csatornát, feltételezhető, hogy az apikális membrán mentén lokálisan felszabaduló Ca^{2+} játszik alapvető szerepet ebben a folyamatban.
- 1/c) A BK csatornák aktivációja fokozza a duktális HCO_3^- szekréciót, azáltal, hogy megváltozik a duktális sejtek membránpotenciálja. A BK csatornák duktális HCO_3^- szekrécióban betöltött szerepét támasztja alá az is, hogy a BK csatorna specifikus aktivátor, NS11021 hatására fokozódott a HCO_3^- szekréció mértéke.
- 1/d) A BK csatornák specifikus gátlásával a CDCA-indukálta hiperszekréció kivédhető, ami alátámasztja a BK csatornák szerepét a pankreász epesavakra adott válaszában.
- 2/a) A CDCA magas koncentrációban (1mM) gátolja a pankreász duktális sejtek sav-bázis transzportereinek a működését, mely gátló hatást az UDCA (0,5 mM) előkezelés (24 h) képes kivédeni.
- 2/b) Az UDCA előkezelés jelentős mértékben csökkentette a CDCA hatására bekövetkező mitokondriális károsodást és sejthalált, valamint a CDCA-indukálta pankreatitisz súlyosságát, azonban nem befolyásolta számottevően a CDCA hatására bekövetkező Ca^{2+} szignalizációt.
- 2/c) Az UDCA védő hatását feltehetőleg a mitokondriális membrán stabilizálásán keresztül fejti ki, mely során csökkenti a CDCA hatására bekövetkező membrán depolarizációt illetve mPTP nyitódást.
- 3/a) Az EtOH dózisfüggő módon fokozza a CFTR csatorna működését, míg a stimulált CFTR áramokat erőteljesen gátolja. Az EtOH stimuláló hatása feltehetőleg egy nem-specifikus, ozmotikus hatásnak tudható be, míg a gátló hatást specifikusan a csatorna működésének blokkolása révén fejti ki.
- 3/b) Az EtOH oxidatív metabolitja, az Ac nem befolyásolta jelentősen sem az alap sem pedig a stimulált CFTR áramot. A nem-oxidatív metabolitok közül a POAEE szintén nem befolyásolta az alap CFTR áramokat, viszont dózisfüggően gátolta a stimulált áramokat. A zsírsav, POA mind az alap mind pedig a stimulált áramokat erőteljesen gátolta.
- 3/c) A POAEE hatásában a POA képződése egy kritikus lépés.
- 3/d) Az EtOH, POA és POAEE (ATP)_i csökkenést indukál a duktális sejtekben, míg az ATP intracelluláris pótlása kivédi az EtOH, POA és POAEE CFTR csatornára kifejtett gátló hatását.
- 3/e) EtOH hatására csökken a duktális sejtek CFTR aktivitása feltehetőleg a mitokondriális károsodás révén, amely szerepet játszhat az alkohol-indukálta pankreatitisz patomechanizmusában

- 4/a) Az epesavak hatására csökken a nyelőcső epitél sejtek pH-ja és megnő az $(\text{Ca}^{2+})_i$ szint, mely enyhén savas pH-n (5,5) erőteljesebb volt mint neutrális pH-n (7,5). Az epesavak közül a legnagyobb hatást a $(\text{pH})_i$ -ra a nem-konjugált, DC fejtette ki.
- 4/b) Az epesavak egyrészt IP_3 -mediálta útvonalon keresztül szabadítanak fel Ca^{2+} -ot a sejtekben, másrészt potenciózzák a plazmamembránon keresztüli Ca^{2+} felvételt.
- 4/c) Az akut epesavas kezelés az NHE aktivitást csökkentette, míg az NBC és AE aktivitást növelte a metapláziás CP-A sejtekben. A diszpláziás CP-D sejtekben a kezelés hatására fokozódott a sav-bázis transzporterek aktivitása.
- 4/d) A krónikus epesavas kezelés hatására az NHE1 mRNS és fehérje expressziója megemelkedett mind a CP-A mind pedig a CP-D sejtekben, neutrális és savas pH-n egyaránt.
- 4/e) A human biopsziás minták esetén megnövekedett NHE1, NHE2, NBC és Slc26A6 kifejeződést detektáltunk mind az intesztinális és nem-intesztinális metaplasztikus hámban. Az NHE1 és NHE2 megemelkedett szintjét fehérje szinten is sikerült igazolnunk.
- 4/f) A nyelőcső epiteliális ion transzporterek megváltozott működése és kifejeződése egy adaptációs folyamat része, mely során a nyelőcső epitél sejtek alkalmazkodnak a megváltozott környezethez növelve ez által a sejt túlélését.

9. Kutatásaink jelentősége, jövőbeni tervek

Az epitél sejtek szinte mindenhol előfordulnak az emberi szervezetben, ahol elsődleges feladatuk a szervezet védelme. Ebben a folyamatban nagyon fontos szerepet játszik ezen sejtek polarizáltsága, amely biztosítja az egyes szervek integritását és megfelelő működését. Az epitél sejtek tanulmányozása leginkább a daganatos elváltozások patomechanizmusának felderítése miatt áll a kutatások középpontjában. Az “epithelia” és “cancer” kifejezésre 6552 találatot kínál fel a Pubmed, az “epithelia” és “inflammation” esetén 1532-t, míg az “epithelia” és “secretory defect” esetén 36 találatot, annak ellenére, hogy számos olyan GI megbetegedés van, amiben az epitél sejtek abnormális szekréciója szerepet játszik. Munkám során próbáltam feltérképezni azokat az epiteliális útvonalakat, amelyek a pankréaszt vagy nyelőcsövet érintő gyulladásos megbetegedések kialakulásában szerepet játszhatnak. Mind a pankréász mind pedig a nyelőcső esetében az epitél sejteken keresztül folyó ion transzport folyamatok egy olyan pH környezetet teremtenek, mely egyrészt optimális körülményeket biztosít a sejt működéséhez, másrészt ellenállóbbá teszi a sejtet a káros ágensekkel szemben. Ezek a transzport folyamatok patológias körülmények között károsodhatnak, melynek eredményeként felborul a sejt belüli homeosztázis, abnormális folyadéksekreció vagy sejthalál következhet be. Kutatásaink során amellet, hogy karakterizáltuk a pankréász és nyelőcső epitél sejtek ion transzport folyamatait patológias körülmények között, célunk volt olyan terápiás célpontok azonosítása is melyek talán kiindulópontot jelenthetnek a pankreatitisz vagy BE terápiájában. Kutatásaink jelentőségét az alábbi pontok részletezik:

- ***BK csatorna aktivátorokat egyes kardiológiai megbetegedésekben sikerrel alkalmaznak. A csatorna aktivációja, fontos szerepet játszhat az epe-indukálta pankréász károsodás kivédésében, a HCO_3^- szekréció fokozása által***
- ***Az UDCA-t bizonyos máj- és epeuti megbetegedésekben évek óta alkalmazzák. A pankréász esetén még ezidáig nem merült fel védő hatása. Azáltal, hogy képes csökkenteni a hidrofób epesavak sejtkárosító hatását, kedvező lehet a biliáris, rekurrens pankreatitisz terápiájában***
- ***A sejt belüli energiaháztartás zavartalan működése elengedhetetlen a sejt normál működéséhez. Az intracelluláris ATP koncentráció emelése, az energetikai károsodás helyreállításával kedvező hatású lehet pankreatitiszben***

Összeségében elmondható, hogy az iontranszport folyamatok károsodása a sejt túlélését és védekező képességét jelentősen lecsökkenti. A transzport folyamatok támogatása ATP bevitellel vagy specifikus aktivátor molekulákkal, ha a betegséget nem is orvosolja teljes mértékben, a lefolyását talán enyhíti, ami hozzájárulhat a betegek túlélésének javításához. Mivel a pankreatitisz esetén nincs specifikus terápia, a kapott eredményeink kiindulópontot jelenthetnek új terápiák kifejlesztéséhez, melyben az *ion transzporterek aktivációjának talán egyszer fontos szerepe lesz.*

Jövőbeni terveink közt szerepel, hogy vizsgálatainkat humán epitél sejtekre is kiterjesszük. Az organoid sejtkultúrák használata egyre inkább teret hódít, amely az egyes epitél sejtek funkcionális vizsgálatát is lehetővé teszi. Az egyes szervek esetében akár 3D-s organoid kultúra létrehozása is megvalósítható, ami az egyes sejttípusok közötti kapcsolatok tanulmányozására is alkalmas, illetve a sejtműködéseket intaktabb körülmények között lehet vizsgálni. Az organoid kultúrák segítségével még pontosabb képet kapunk arról, hogy melyek azok a sejt belüli kulcs mechanizmusok, melyek a pankreatitisz vagy BE kialakulásában és lefolyásában meghatározóak és talán közelebb kerülünk ezen betegségek esetén a hatékonyabb terápia kifejlesztéséhez. Ezen cél eléréséhez fontosnak tartom, hogy az alapkutatók és klinikusok egymással szorosan együttműködve dolgozzanak, melynek eredményeként a laboratóriumi kutatások eredményei a klinikai gyakorlatban is alkalmazásra kerülhetnek.

10. Tézisek alapját képező közlemények jegyzéke

1. Laczkó D., Rosztóczy A., Birkás K., Katona M., Rakonczay Z. Jr., Tiszlavicz L., Róka R., Wittmann T., Hegyi P., **Venglovecz V.** Role of ion transporters in the bile acid-induced esophageal injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2016; 311(1):G16-31. **IF: 3.798**
2. Katona M., Hegyi P., Kui B., Balla Zs., Rakonczay Z Jr., Rázga Zs., Tiszlavicz L., Maléth J., **Venglovecz V.** A novel, protective role of ursodeoxycholate in bile-induced pancreatic ductal injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2016;310(3):G193-204. **IF: 3.798**
3. Judák L, Hegyi P, Rakonczay Z Jr, Maléth J, Gray MA, **Venglovecz V.** Ethanol and its non-oxidative metabolites profoundly inhibit CFTR function in pancreatic epithelial cells which is prevented by ATP supplementation. *Plfúgers Arc-Eur J Physiol* 2014;466(3):549-62. **IF: 4.101**
4. **Venglovecz V.**, Hegyi P, Rakonczay Z Jr, Tiszlavicz L, Nardi A, Grunnet M, Gray MA. Pathophysiological relevance of apical large-conductance Ca^{2+} -activated potassium channels in pancreatic duct epithelial cells. *Gut* 2011;60:361-369. **IF: 10.111**
5. Maléth J., Hegyi P., Rakonczay Z Jr, **Venglovecz V.** Breakdown of bioenergetics evoked by mitochondrial damage in acute pancreatitis: Mechanism and consequences. *Pancreatology* 2015;15:18-22 *Konferencia kiadvány*
6. **Venglovecz V.**, Rakonczay Z Jr, Gray MA, Hegyi P. Potassium channels in pancreatic duct epithelial cells: their role, function and pathophysiological relevance. *Plfúgers Arc-Eur J Physiol* 2015;467(4):625-640 **IF: 4.101**
7. Maléth J., Balla Z, Kui B, Balázs A, Katona M, Judák L, Németh I, Pallagi P, Kemény L, Rakonczay Z Jr, **Venglovecz V.**, Földesi I, Pető Z, Somorácz A, Borka K, Pedomo D, Lukács G, Gray MA, Monterisi S, Zaccolo M, Sandler M, Mayerle J, Kühn JP, Lerch MM, Sahin-Tóth M, Hegyi P. Alcohol disrupts levels and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to promote development of pancreatitis. *Gastroenterology* 2015;148(2):427-439 **IF: 16.716**
8. Maléth J, Rakonczay Z Jr., **Venglovecz V.**, Dolman NJ, Hegyi P. Central role of mitochondrial injury in the pathomechanism of acute pancreatitis. *Acta Physiologica* 2013;2:226-235. **IF: 4.251**
9. **Venglovecz V.**, Rakonczay Z. Jr., Hegyi P. The effects of bile acids on pancreatic ductal cells. *The Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base* 2012. DOI: [10.3998/panc.2012.8](https://doi.org/10.3998/panc.2012.8)
10. Maléth J, **Venglovecz V.**, Rázga Zs, Tiszlavicz L, Rakonczay Z. Jr, Hegyi P. The non-conjugated chenodeoxycholate induces severe mitochondrial damage and inhibits bicarbonate transport mechanisms in pancreatic duct cells. *Gut* 2011;60:136-138. **IF: 10.111**
11. Park HW, Nam JH, Kim JY, Namkung W, Yoon JS, Lee JS, Kim KS, **Venglovecz V.**, Gray MA, Kim KH, and Lee MG. Dynamic regulation of CFTR bicarbonate permeability by $[\text{Cl}^-]_i$ and its role in pancreatic bicarbonate secretion. *Gastroenterology* 2010;139(2):620-631. **IF.: 12.032**
12. **Venglovecz V.**, Rakonczay Z Jr., Ózsvári B, Takács T, Lonovics J, Varró A, Mike A. Gray, Barry E. Argent and Hegyi P. Effects of bile acids on pancreatic ductal bicarbonate secretion in guinea pig. *Gut* 2008;57(8):1102-12. **IF.: 9.766**

11. Scientometriai adatok

Venglovecz Viktória tudományos és oktatási munkásságának összefoglalása
MTA V. Orvostudományi Osztály (2018.07.25.)

Tudományos és oktatási közlemények	Szám		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Folyóiratcikk²	36	---	---	---
szakcikk, nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	27	398	611
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	0	0	0
szakcikk, magyar nyelvű	---	2	0	0
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként ³	---	0	0	0
összefoglaló közlemény	---	3	20	31
rövid közlemény	---	4	22	50
II. Könyv	0	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, tankönyv szerkesztőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	0	0	0
IV. Konferenciaközlemény⁴	1	---	2	6
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)		0	0	0
Tudományos közlemények összesen (I.-IV.)	---	37	442	698
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I.-IV.)	37	---	442	698

V. További tudományos művek	3	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkeket is	---	0	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	3	1	3

VI. Idézett absztraktok⁵	2	---	1	4
--	---	-----	---	---

Idézettség száma¹	---	---	444	705
Hirsch index⁶	16	---	---	---
g index⁶	27	---	---	---

Speciális tudományometriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős folyóiratcikkek száma ^{2*}	4	97
Utolsó szerzős folyóiratcikkek száma ^{2*}	6	33
Az utolsó tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2008 -) teljes tudományos folyóiratcikkek	31	554
Az utolsó 10 év (2008-2018) tudományos, teljes, lektorált folyóiratcikkeinek száma	34	633
A legmagasabb idézettségű közlemény idézettsége (az összes idézettség százalékában)	105	14,89%
További, az MTMT-ben nyilvántartott idézetek száma, amelyek nem szerepelnek a WOS és/vagy Scopus rendszerben	65	
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	0	0

*Az MTMT nem tudja szolgáltatni a megosztott első és megosztott utolsó szerzőség adatokat. Ezeket a kérelmezőnek a doktori eljárás folyamán a 3. sz. adatlapon kell feltüntetnie.

Megjegyzések:

¹ kizárólag a WOS és/vagy Scopus rendszerben nyilvántartott idézetek száma az egyéb adatbázisokból, egyéb típusú idézőkből, valamint disszertációkból az MTMT-be feltöltött, azonosítószámmal rendelkező idézők nélkül

² lektorált, tudományos folyóiratban

³ a szerző írásban nyilatkozik, hogy érdemi szerzői hozzájárulásával készültek szerzőként jegyzett közleményei, és az érdemi hozzájárulást dokumentálni tudja

⁴ konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben

⁵ nem idézett absztrakt itt nem kerül az összesítésbe

⁶ a disszertáció és egyéb típusú idéző nélküli összes idézővel számolva

⁷ közreműködés esetén a csoportos szerzőségű közlemények idézettsége külön értékelendő, és nem számítható be az összesített idézetek közé

12. Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni **Prof. Dr. Hegyi Péter** egyetemi tanárnak, aki bevezetett a hasnyálmirigy kutatás alapjaiba, nagyban segítette beilleszkedésemet a magyar és nemzetközi tudományos világba, nélkülözhetetlen szakmai segítséget nyújtott a kutatásaimban és hasznos tanácsokkal látott el és lát el a mai napig. Péter munka iránti elhivatottsága és kitartása példaértékű, tanácsai és útmutatásai nagyban meghatározták pályafutásomat.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. ifj. Rakonczay Zoltán**, egyetemi tanárnak, akinek szakmai tudása, építő jellegű kritikái és tanácsai nagyban hozzájárultak szakmai fejlődésemhez és tudományos szemléletem kialakításához. Hálás vagyok, hogy tanácsaival körültekintő gondolkodásra és önálló kutatómunkára tanított.

Hálával tartozom **Prof. Dr. Varró Andrásnak** az SZTE, ÁOK, Farmakológiai és Farmakoterápiai intézet igazgatójának, aki mindamellett, hogy biztosította az eredményes kísérletes munkához szükséges feltételeket, hasznos szakmai tanácsokkal látott el és messzemenően támogatott.

Köszönettel tartozom továbbá **Prof. Dr. Lonovics Jánosnak** és **Prof. Dr. Wittmann Tibornak**, az SZTE, ÁOK, I. sz. Belgyógyászati Klinika volt igazgatóinak akik lehetővé tették számomra, hogy a I. sz. Belgyógyászati Klinika pankréász laborjában kísérleteket végezhsek.

Nagyon hálás vagyok egykori PhD hallgatóimnak, **Dr. Judák Lindának**, **Dr. Kemény Lajosnak**, **Dr. Katona Máténak** és **Dr. Laczkó Dorottyának**, akik kitartó munkájának köszönhetően, ha csak egy kis mértékben is, de remélem sikerült hozzájárulnunk az epiteliális iontranszport folyamatok jobb megértéséhez. Nélkülük ez az értekezés nem jöhetett volna létre, amiért kifejezett hálával tartozom. Továbbá köszönet illeti jelenlegi PhD hallgatóimat (**Gál Eleonórárt**, **Becskeházi Esztert**, **Ébert Attilát**, **Stefán Glóriát** és **Korsós Margarétát**), akik rengeteget dolgoznak azért, hogy a pankréász és nyelőcső epitél sejtek világába jobb betekintést nyerjünk, továbbá külön köszönettel tartozom nekik a jó munkahelyi légkör megteremtéséért.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Mike Gray-nek**, **Prof. Dr. Barry Argent-nek** és **Prof. Dr. Varró Andrea-nak**, a Newcastle-i illetve Liverpool-i Tudományegyetem professzorainak, akik lehetővé tették számomra, hogy külföldi munkatapasztalatot szerezzek, amit hazaérve kamatoztathattam.

Köszönettel tartozom az SZTE, ÁOK, I. sz. Belgyógyászati Klinika és a Farmakológiai és Farmakoterápiai intézet munkatársainak akik támogatásukkal, szakmai tanácsaikkal sokat segítettek a nehézségek leküzdésében.

Hálás köszönettel tartozom asszisztensnőinknek (**Fuksz Zoltánné**, **Árva Miklósné**, **Horesnyiné Pritz Tünde**, **Fritz Rea** és **Magyarné Pálfi Edit**), akik rendületlenül mellettem álltak és mindenben támogattak magánemberként is. Szakmai tudásuk és több éves tapasztalatuk számos esetben hozzájárult egy-egy kísérlet sikeréhez, amiért megkülönböztetett hálával tartozom.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Kiss Antalnak** és **Dr. Raskó Tamásnak** akik az MTA, SZBK, Biokémiai Intézetében megtanítottak a tudományos kutatás alapjaira.

Hálásan köszönettel tartozom hazai és külföldi **társszerzőimnek, kollaborációs partnereimnek, tudományos diákkörös hallgatóimnak** akik színvonalas közreműködése nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre.

A kutatómunkához nélkülözhetetlen anyagi forrásokat hazai (Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFI), Társadalmi Megújulás Operatív Program (TÁMOP), Gazdaságfejlesztési és Innovációs Operatív Program (GINOP), Emberi Erőforrás Fejlesztési Operatív Program (EFOP) és a Magyar Tudományos Akadémia ösztöndíjai) és nemzetközi (The Royal Society, The Cystic Fibrosis Trust) pályázatok biztosították.

Megkülönböztetett köszönetemet szeretném kifejezni **édesanyámnak, Venglovecz Istváné-nak férjemnek, Dr. Ricza Tamás-nak és gyermekeimnek** (Krisztina (5é) és Dániel (3é)), akik mindvégig mellettem álltak, támogattak a munkám során és biztosították azokat a körülményeket, melyek mellett kisgyerekes anyukaként is kutatómunkát végezhettem.