MTA Doktori Értekezés

# A GASZTROINTESZTINÁLIS EPITÉL SEJTEK IONTRANSZPORT FOLYAMATAINAK JELENTŐSÉGE ÉP ÉS KÓROS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT



# Dr. Venglovecz Viktória

Szegedi Tudományegyetem

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

2018

# Tartalom

1.	RÖV	DÍTÉSEK JEGYZÉKE 5 -
2.	BEVI	- 7 -
3.	IROI	ALMI ÁTTEKINTÉS 9 -
3	.1. A	z epitél sejtek általános jellemzése 9 -
3	.2. E	piteliális iontranszport folyamatok 11 -
	3.2.1.	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> kicserélő 11 -
	3.2.2.	Na <sup>+</sup> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> kotranszporter 13 -
	3.2.3.	Cl <sup>-</sup> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> kicserélő 14 -
	3.2.4.	Cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR) 16 -
3	.3. 0	asztrointesztinális epitél sejtek 19 -
	3.3.1.	Pankreász epitél sejtek 19 -
	3.3	1.1 Acinus sejtek 20 -
	3.3	1.2 Duktális sejtek 21 -
	3.3.2.	Nyelőcső epitél sejtek 27 -
3	.4. Az	epitél sejtek szerepe GI betegségekben 28 -
	3.4.1.	Akut pankreatitisz 28 -
	3.4.2.	Barrett-nyelőcső 31 -
4.	3.4.2. CÉLI	Barrett-nyelőcső 31 - KITŰZÉS 33 -
4. 5.	3.4.2. CÉLI ANY	Barrett-nyelőcső
4. 5.	3.4.2. CÉLI ANY 5.1. A	Barrett-nyelőcső
4. 5.	3.4.2. CÉLI ANY 5.1. A 5.1.1.	Barrett-nyelőcső
<b>4</b> . <b>5</b> .	3.4.2. CÉLI ANY 5.1. A 5.1.1. 5.1.2.	Barrett-nyelőcső - 31 -   KITŰZÉS - 33 -   AGOK ÉS MÓDSZEREK - 35 -   nyagok - 35 -   Állatok - 35 -   Sejtvonalak - 35 -
<b>4.</b> <b>5.</b> 5	3.4.2. CÉLI ANY 5.1. A 5.1.1. 5.1.2. 5.1.3.	Barrett-nyelőcső - 31 -   KITŰZÉS - 33 -   AGOK ÉS MÓDSZEREK - 35 -   nyagok - 35 -   Állatok - 35 -   Sejtvonalak - 35 -   Betegek - 35 -
<b>4</b> . <b>5</b> .	3.4.2. CÉLI ANY 5.1. A 5.1.1. 5.1.2. 5.1.3. 5.1.4.	Barrett-nyelőcső
<b>4. 5.</b> 5	3.4.2. <b>CÉLI</b> <b>ANY</b> 5.1. <i>A</i> 5.1.1. 5.1.2. 5.1.3. 5.1.4. 5.2. N	Barrett-nyelőcső - 31 -   XITŰZÉS - 33 -   AGOK ÉS MÓDSZEREK - 35 -   nyagok - 35 -   Állatok - 35 -   Sejtvonalak - 35 -   Betegek - 35 -   Vegyszerek és oldatok - 36 -   Iódszerek - 38 -
<b>4. 5</b>	3.4.2. <b>CÉLI</b> <b>ANY</b> 5.1. <i>A</i> 5.1.1. 5.1.2. 5.1.3. 5.1.4. 5.2. N 5.2.1.	Barrett-nyelőcső - 31 -   KITŰZÉS - 33 -   AGOK ÉS MÓDSZEREK - 35 -   nyagok - 35 -   Állatok - 35 -   Sejtvonalak - 35 -   Betegek - 35 -   Vegyszerek és oldatok - 36 -   Iódszerek - 38 -   Intra-interlobuláris pankreász duktuszok izolálása - 38 -
<b>4.</b> 5. 5	3.4.2. <b>CÉLI</b> <b>ANY</b> 5.1. <i>A</i> 5.1.1. 5.1.2. 5.1.3. 5.1.4. 5.2.1. 5.2.2.	Barrett-nyelőcső - 31 -   KITŰZÉS - 33 -   AGOK ÉS MÓDSZEREK - 35 -   nyagok - 35 -   Állatok - 35 -   Sejtvonalak - 35 -   Betegek - 35 -   Vegyszerek és oldatok - 36 -   Iódszerek - 38 -   Intra-interlobuláris pankreász duktuszok izolálása - 38 -   Pankreász duktuszok mikroperfűziója - 38 -
<b>4.</b> 5. 5	3.4.2. <b>CÉLI</b> <b>ANY</b> 5.1. <i>A</i> 5.1.1. 5.1.2. 5.1.3. 5.1.4. 5.2.1. 5.2.2. 5.2.3.	Barrett-nyelőcső - 31 -   KITŰZÉS - 33 -   AGOK ÉS MÓDSZEREK - 35 -   nyagok - 35 -   Állatok - 35 -   Sejtvonalak - 35 -   Betegek - 35 -   Vegyszerek és oldatok - 36 -   Iódszerek - 38 -   Intra-interlobuláris pankreász duktuszok izolálása - 38 -   Pankreász duktuszok mikroperfűziója - 38 -   Fluoreszcens vizsgáló módszerek - 38 -
<b>4.</b> 5	3.4.2. CÉLI ANY. 5.1. A 5.1.1. 5.1.2. 5.1.3. 5.1.4. 5.2.1. 5.2.2. 5.2.3. 5.2.3.	Barrett-nyelőcső - 31 -   KITŰZÉS - 33 -   AGOK ÉS MÓDSZEREK - 35 -   nyagok - 35 -   Állatok - 35 -   Sejtvonalak - 35 -   Betegek - 35 -   Vegyszerek és oldatok - 36 -   Iódszerek - 38 -   Intra-interlobuláris pankreász duktuszok izolálása - 38 -   Pankreász duktuszok mikroperfúziója - 38 -   S1. Intracelluláris pH (pHi) mérés - 39 -
<b>4.</b> 5	3.4.2. <b>CÉLI</b> <b>ANY</b> 5.1. <i>A</i> 5.1.1. 5.1.2. 5.1.3. 5.1.4. 5.2.1. 5.2.2. 5.2.3. 5.2.3. 5.2.2.	Barrett-nyelőcső $-31 - 33 - 33 - 33 - 33 - 33 - 33 - 33 $
<b>4.</b> 5. 5	3.4.2. CÉLI ANY. 5.1. A 5.1.1. 5.1.2. 5.1.3. 5.1.4. 5.2.1. 5.2.2. 5.2.3. 5.2. 5.2.3. 5.2. 5.2.3.	Barrett-nyelőcső- 31 -SITŰZÉS- 33 -AGOK ÉS MÓDSZEREK- 35 -nyagok- 35 -Állatok- 35 -Sejtvonalak- 35 -Betegek- 35 -Vegyszerek és oldatok- 36 -Iódszerek- 38 -Intra-interlobuláris pankreász duktuszok izolálása- 38 -Fluoreszcens vizsgáló módszerek- 38 -31.Intracelluláris pH (pH <sub>i</sub> ) mérés- 39 -32.Intracelluláris Ca <sup>2+</sup> ((Ca <sup>2+</sup> )i) mérés- 39 -33.Intracelluláris ATP (ATP <sub>i</sub> ) mérés- 39 -

5.2.3.	5. Mitokondriális permeábilitás tranzíciós pórus (mPTP) mérés 40 -
5.2.4.	HCO3 <sup>-</sup> szekréció mérése 41 -
5.2.5.	Patch clamp technika 41 -
5.2.6.	Transzmissziós elektronmikroszkópia 42 -
5.2.7.	Immunhisztokémia 42 -
5.2.8.	Apoptózis vizsgálat 43 -
5.2.9.	Western blot 43 -
5.2.10.	Valós idejű PCR technika 43 -
5.2.11.	Kísérletes akut pankreatitisz modell 45 -
5.2.12.	Statisztikai analízis 46 -
5.3. Etil	cai engedély 46 -
6. EREDN	1ÉNYEK 47 -
6.1. Az	epesavak és az alkohol hatása a pankreász duktális sejtekre 47 -
6.1.1.	A kenodezoxikólsav hatásának vizsgálata 47 -
6.1.1.	1. A kenodezoxikólsav K <sup>+</sup> csatornákat aktivál a pankreász duktális sejteken
47 -	
6.1.1.	2. A kenodezoxikólsav által aktivált K <sup>+</sup> csatornák karakterizálása 49 -
6.1.1.	3. A K <sup>+</sup> csatornák szerepe a kenodezoxikólsav-indukálta duktális HCO3 <sup>-</sup>
szekré	- 50 -
6.1.1.	4. A K <sup>+</sup> csatornák lokalizációja a pankreász duktális sejteken 52 -
6.1.1.	5. Epesav transzporterek vizsgálata a pankreász duktális sejteken 53 -
6.1.2.	Az urzodezoxikólsav hatásának a vizsgálata 53 -
6.1.2.	1. Az urzodezoxikólsav hatása a pankreász duktális sejtek iontranszport
folyar	nataira 53 -
6.1.2.	2. Az urzodezoxikólsav előkezelés nem védi ki a kenodezoxikólsav-indukálta
$Ca^{2+}s$	- 56 -
6.1.2.	3. Az urzodezoxikólsav védő hatása a mitokondriális funkcióra és morfológiára
	- 57 -
6.1.2.	4. Az urzodezoxikólsav kivédi a kenodezoxikólsav-indukálta sejthalált 60 -
6.1.2.	5. Az urzódezoxikólsav védő szerepe epesav-indukálta pankreatitiszben 61 -
6.1.3.	Az alkohol és nem-oxidatív metabolitjainak a hatásának a vizsgálata 64 -
6.1.3.	1. Az alkohol és nem-oxidatív metabolitjainak a hatása a CFTR csatorna
aktivi	tására 64 -

	6.1.3.2	2. Az alkohol és nem-oxidatív metabolitjainak a hatását az intracellulári	s ATP
	szint c	csökkenése közvetíti	68 -
	6.1.3.3	3. Az intracelluláris ATP adása helyreállítja a CFTR csatorna működésé	t-71 -
6.2	. Az	epesavak hatása a nyelőcső epitél sejtekre	73 -
6	5.2.1.	pH szabályozó mechanizmusok a nyelőcső epitél sejteken	73 -
6	5.2.2.	Az epesavak intracelluláris acidózist indukálnak a nyelőcső epitél sejtekbe	n- 77
-			
6	5.2.3.	Az epesavak megemelik az intracelluláris Ca <sup>2+</sup> szintet a nyelőcső epitél sejt - 79 -	tekben
6	5.2.4.	Az epesavak akut hatása az iontranszporterek aktivitására	81 -
6	5.2.5.	Az epesavak krónikus hatása az iontranszporterek kifejeződésére	83 -
7. N	MEGBI	ESZÉLÉS	87 -
7.1	A pank	kreász duktális epitél sejtek működése patofiziológiás körülmények között	87 -
7	'.1.1 Az	z epesavak hatása	89 -
	7.1.1.1	1 A kenodezoxikólsav hatása	ATP - 68 - - 71 - - 73 - - 73 - - 73 - n- 77 ekben - 81 - - 83 - - 87 - - 87 - - 87 - - 89 - - 92 - - 96 - - 97 - 100 - 101 - 106 - 108 - 105 - 135 - k- 136
	7.1.1.2	2 Az urzodezoxikólsav hatása	92 -
	7.1.1.3	3 Az epesavak hatásmechanizmusa	96 -
7	.1.2. Az	z etanol hatása	97 -
	7.1.2.1	1 Az etanol hatásmechanizmusa	- 100 -
7.2	A nyel	őcső epitél sejtek működése patofiziológiás körülmények között	- 101 -
8. Ú	Ú <b>J ME</b>	GÁLLAPÍTÁSOK	- 104 -
9. ŀ	KUTAT	rásaink jelentősége, jövőbeni tervek	- 106 -
10. I	RODA	LMI HIVATKOZÁSOK	- 108 -
11. F	KÖZLE	EMÉNYEK	- 135 -
11.	1. A	A doktori dolgozat alapját képező <i>in extenso</i> közlemények	- 135 -
11.	2. A	A doktori dolgozat témájához nem kapcsolódó egyéb in extenso közleménye	k- 136
-			
11.	3. A	A PhD értekezésben szereplő közlemények	- 139 -
12. 8	SCIENT	FOMETRIAI ADATOK	- 140 -
13. F	KÖSZÖ	DNETNYÍLVÁNÍTÁS	- 140 -

# 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Ac	acetaldehid
AP	akut pankreatitisz
ATPi	intracelluláris ATP
BAC	epesav koktél ("bile acid coctail")
BAPTA-AM	1,2-bisz-o-aminofenoxietán-N,N,N,N-tetraecetsav
BCECF-AM	2.7-bisz-2-karboxietil-5-(és-6-)karboxifluoreszcein acetoximetil észter
BE	Barrett-nyelőcső
BK <sub>Ca</sub>	nagy konduktanciájú Ca <sup>2+</sup> -aktiválta K <sup>+</sup> csatorna
BNPP	bisz-(4-nitrofenil)foszfát
BSA	szarvasmarha szérum albumin
cAMP	ciklikus adenozin monofoszfát
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>i</sub>	intracelluláris Ca <sup>2+</sup>
CaCC	Ca <sup>2+</sup> -aktiválta Cl <sup>-</sup> csatorna
СССР	karbonil cianid m-klorofenil hidrazon
CDCA	kenodezoxikólsav
CFTR	cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor
$\Delta \Psi_m$	mitokondriális membránpotenciál
DC	dezoxikólsav
DMSO	dimetil szulfoxid
DOG	2-dezoxiglükóz
DRA	downregulated in adenoma
EGTA	etilén glikol-bisz(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraecetsav
EtOH	etanol
FA	zsírsav ("fatty acid")
FAEE	zsírsav etil-észter ("fatty acid ethyl ester")
GAPDH	gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz
GC	glikokólsav
GCDC	glikokenodezoxikólsav
GDC	glikodezoxikólsav
GERD	gastroesophagealis reflux
IAA	iodoacetamid
IBT	iberiotoxin

<i>J</i> (B <sup>-</sup> /min)	ionok áramlási sebessége			
IK <sub>Ca</sub>	közepes konduktanciájú Ca <sup>2+</sup> -aktiválta K <sup>+</sup> csatorna			
H <sub>2</sub> DIDS	4,4'-Diisothiocyanatodihydrostilbene-2,2'-diszulfonsav, disodium só			
HOE-642	N-(Aminoiminomethyl)-4-(1-methylethyl)-3-			
	(methylsulfonyl)benzamide			
FURA 2-AM	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)-,(acetiloxi)metil észter			
IP <sub>3</sub>	inozitol-trifoszfát			
HPRT	hipoxantin-guanin foszforiboziltranszferáz			
mPTP	mitokondriális permeabilitás tranzíciós pórus			
NBC	Na <sup>+</sup> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> kotranszporter			
NHE	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> kicserélő			
NS11021	1-(3,5-bisz-trifluorometilfenil)-3-(4-bromo-2-(1H-tetrazol-5-yl)-fenil)-			
	tiourea			
PAT-1	putative anion transporter-1			
pHi	intracelluláris pH			
PBS	foszfát puffer sóoldat			
POA	palmitolsav			
POAEE	2 palmitolsav etil-észter			
ROS	reaktív oxigén származék			
SK <sub>Ca</sub>	kis konduktanciájú Ca <sup>2+</sup> -aktiválta K <sup>+</sup> csatorna			
ТС	taurokólsav			
TCDC	taurokenodezoxikólsav			
TDC	taurodezoxikólsav			
UDCA	urzodezoxikólsav			

## 2. BEVEZETÉS

Az epitél sejtek a szervezet egyik fő sejttípusát alkotják, melyek mind morfológiájukat, mind pedig funkciójukat tekintve nagy változatosságot mutatnak. Epitél sejtek borítják a test külső felszínét, a gasztrointesztinális és urogenitális rendszerek, a légutak illetve az erek belső falát, de megtalálhatóak a külső és belső elválasztású mirigyekben is. 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, mely a szervezet megfelelő működése szempontjából elengedhetetlen. 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, s ez által alapvetően hozzájárul a szervezet homeosztázisának fenntartásához. 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. A transzport fehérjék összehangolt működésének köszönhetően az epitél sejtek fontos szerepet játszanak a szervezet normál ionháztartásának a fenntartásában.

Érdeklődésem a gasztrointesztinális epitél sejtek tanulmányozására esett, ezen belül is a pankreász illetve a nyelőcső epitél sejtek vizsgálatára. Bár funkciójukat tekintve a pankreász 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 pankreász esetében az epiteliális iontranszport biztosítja a pankreász 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 pankreászt 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 pankreászt 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 patológiás körülmények között. Munkám során célul tűztem 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 alapkutatásra szorítkoztak, reményeim szerint eredményeink nem csak elméleti, hanem egyszer majd *klinikai szempontból is jelentőséggel bírnak*.

# 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 3.1. 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, tápcsatornát, a kardiovaszkuláris, légző-, urogenitálisа 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 kommunkációt is biztosítják. Az epitél sejtek alakjuk és működésük szempontjából nagyon sokfélék lehetnek, van azonban néhány tulajdonság, amely ezen sejteket általánosan jellemzi.

- 1. Polarizáltság: Az epitél sejtek polarizáltak, vagyis bazális és apikális felszínt különböztethetünk meg rajtuk (1. ábra). A két membrán mind funcionálisan mind biokémiailag eltér egymástól, ami lehetővé teszi az anyagok egyirányú mozgását. A bazális membrán egy vékony hártyához kapcsolódik (alaphártya), mely egyrészt rögzíti a sejteket, másrészt lehetővé teszi az egyes anyagok diffúzióját a mélyebben lévő kötőszöveti rétegek felől vagy felé. A tápanyagok illetve az oxigén ezen a membránon keresztül jut el az epitél sejtekhez a vér felől, továbbá az alaphártya fontos szerepet játszik a sejtek osztódásának, metabolizmusának vagy differenciálódásának a szabályozásában is. Az apikális membrán a bazális membránnal ellentétben a lumen vagy a külső környezet felé néz és ide is adja le szekrétumát. Az apikális és bazális membránon különböző membránfehérjék fejeződnek ki melyek speciális eloszlást mutatnak, biztosítva ez által a sejt polaritását.
- 2. Adhézió: Az epitél sejtek alapvetően 3 szerkezeti struktúrán keresztül képesek egymáshoz kapcsolódni, ezek a zonula adherens, a dezmoszómák és a tight junction-ök. A zonula adherens vagy övdezmoszóma egy mechanikai sejtkapcsoló struktúra, amely övszerűen öleli körül az epitél sejteket. Az aktin filamentumokhoz horgonyzódik ki és jellemzően az apikális membránhoz közelebb helyezkednek el. A foltdezmoszómák (macula adherens) a sejtek közötti patent-szerű kapcsolódást biztosítják, melyek

elszórtan helyzekednek el a sejt felszínén. A tight junction-ök (zonula occludens) elszigetelik a sejtet a környezettől azáltal, hogy megakadályozzák az egyes molekulák diffúzióját a felszín felől az epitél sejtek laterális felszíne felé. A réskapcsolatok (gap junction) a sejtek laterális oldalán található sejtkapcsoló struktúrák, melyeket speciális membránfehérjék építenek fel, kapcsolatot biztosítva a szomszédos sejtek között. Míg a zonula adherens és a dezmoszómák csak mechanikai feladatot látnak el a réskapcsolatok a sejtek közötti kommunikációért is felelősek.

- 3. Regeneráció: Az epitél sejtek folyamatos mechanikai és kémiai stressznek vannak kitéve. Az epitélium az őssejtek révén képes az elöregedett vagy sérült sejteket folyamatosan pótolni, ezáltal az epitélium integritását megőrizni. A többrétegű epitél sejtek esetében, mint amilyen a nyelőcsövet bélelő mukóza réteg, a stem sejtek az alsóbb rétegekben találhatóak és a felső réteg felé történő migrációja során laphámmá differenciálódnak.
- 4. Avaszkularizáció: Az epitélium vérereket nem tartalmaz, a tápanyag és az oxigén diffúzióval jut el a sejtekhez a kötőszövetek felől.
- 5. *Érzékelés*: Egyes hámszövetek idegvégződéseket is tartalmaznak, ezáltal a szaglásban vagy ízérzékelésben töltenek be fontos szerepet.



Apikális oldal

1. ábra. Epitél sejt sematikus képe. Az epitél sejtekre általános jellemző, hogy egy bazális membránon ülnek a sejtek, amely egyrészt rögzití a sejteket, másrészt biztosítják az epitél sejtek és az alatt lévő kötőszöveti réteg közötti anyagforgalmat. A sejtmag általában a bazális membránhoz közel helyezkedik el. Az apikális membrán egyes epitél sejtek esetében kesztyűújszerű kitüremkedésekkel rendelkezik (mikrovillusok vagy csillók), melyek a felszívásban vagy a folyadék illetve szilárd részecskék mozgatásában játszik fontos szerepet.

Bazális oldal

Az epitél sejtek csoportosítása több szempont szerint is történhet. Morfológia alapján megkülönböztetünk laphámot, köbhámot illetve hengerhámot, míg rétegezettség alapján egyrétegű illetve többrétegű hámokat. Az egyrétegű laphámon keresztül történik a gázok és

tápanyagok diffúziója, ezért ilyen típusú hám borítja a tüdőt és vérereket. A köb- és hengerhámok az abszorpciós és szekréciós folyamatokban vesznek részt, elsősorban a vékonybélben, egyes mirigyekben és a vesében fordulnak elő. Többrétegű hámok általában nagyobb mechanikai vagy kémiai stressznek vannak kitéve és a több rétegnek köszönhetően védik az alsóbb rétegeket. Többrétegű elszarusodó laphám alkotja a bőrünket, míg el nem szarusodó laphám borítja a nyelőcsövet. Az 1. táblázat az epitél setjek morfológia szerinti csoportosítását, előfordulását és funkcióját mutatja. Az epitél sejteket funkció alapján is lehet csoportosítani. Ez 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.

## 3.2. 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 sejttérfogat fenntartásában is. A főbb iontranszporterek melyek az epitél sejteken előfordulnak a következők:

### 3.2.1. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> kicserélő

A Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> kicserélő (NHE) egy elektroneutrális, másodlagosan aktív transzporter 1 Na<sup>+</sup>:1 H<sup>+</sup> sztöhiometriával. Az NHE alapvető szerepet játszik az intracelluláris pH (pH<sub>i</sub>) és a sejt térfogat szabályozásában, valamint meghatározza a sejten belüli [Na<sup>+</sup>]-t is. A transzporteren keresztül 1 extracelluláris Na<sup>+</sup> cserélődik 1 intracelluláris H<sup>+</sup>-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),[1, 2] melyek 25-75% aminósav egyezést mutatnak.[2, 3] Az NHE izoformák közül az NHE1 szinte minden sejten előfordul, a többi izoforma pedig szövetspecifikus kifejeződést mutat. Számos NHE izoforma található a vesében (NHE2, -3 and -8)[2, 4, 5, 6] és a GI traktusban (NHE3, -4)[7, 8], ahol elsősorban az epitél sejtek bazális membránján helyezkednek el, de vannak intracellulárisan lokalizálódó izoformák is (NHE6-9)[1, 9], melyek az egyes sejtorganellumok pH szabályozásában vesznek részt.

Sejt	Előfordulás	Funkció
Egyrétegű laphám	Tüdőhólyagok, a szív, a vér- és nyirokerek felülete	Elősegíti az anyagok diffúzióval vagy filtrációval történő mozgását
Egyrétegű köbhám	Vesetubulusok és kisebb mirigyek kivezető csövei	Szekréciós és abszorpciós feladatokat lát el
Egyrétegű hengerhám	Bronchusok, húgycső, méh, epehólyag és a bél csillóval nem borított felülete	Enzimeket és mucint szekretál valamint abszorpciós feladatokat lát el
Többmagsoros hengerhám	A légcső és a felső légutak boritása	Mucint szekretál
Többrétegű laphám	A nyelőcső, szájüreg és hüvely boritása	A sérülésekkel szemben védi az alsóbb rétegeket
Többrétegű köbhám	A verejték-, nyál- és tejmirigyek kivezető csövének borítása	Védő szövet
Többrétegű hengerhám	A férfi húgycső és néhány mirigy kivezető csöve	Szekretál és védi az alsóbb rétegeket
Átmeneti epitélium	Húgycső, húgyvezeték és húgyhólyag borítása	Lehető teszi a húgyrendszer tágulását

**1. táblázat. Az epitél sejtek morfológia szerinti csoportosítása.** Forrás: Anatomy and Physiology. Chapter 4. The Tissue Level of Organization. Epithelial Tissue.

Az izoformák közül az NHE1 a leginkább tanlumányozott. Az NHE1 fehérjét az SLC9A1 gén kódolja. A fehérje 815 aminósavból 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.[10, 11] A hidrofil, C-terminális domén foszforilálódik aktiváció során.[12] A transzporter normál körülmények között inaktív, legfőbb stimulusa a pH<sub>i</sub> csökkenés. A H<sup>+</sup> kötődése egy konformációváltozást indukál a fehérjében, ami a fehérje aktivációját fogja eredményezni.[13, 14] Bár az NHE működése nem energiaigényes folyamat, ATP hiányában a transzporter funkcionálisan inaktív.[15] Egy lehetséges magyarázat erre, hogy az ATP hidrolízise a fehérje foszforilációjához szükséges, bár egyes tanulmányok kimutatták, hogy az ATP hiánya nem befolyásolja az NHE foszforilációját.[16] Sokkal inkább elfogadható az a nézet, hogy a fehérje ATP kötő helyel rendelkezik, így az ATP közvetlenül befolyásolja az aktivitását.[17] A sejten belüli pH szabályozása mellett az NHE fontos szerepet játszik a sejttérfogat meghatározásában is. A H<sup>+</sup> sejtből történő kipumpálása 1 Na<sup>+</sup> felvételével jár, amihez a víz ozmotikus mozgása társul. Ezen kívül a fehérje szerepet játszik még egyes sejtek apoptotikus folyamataiban, [18] sejtosztódásban, [13] vagy differenciálódásban. [19] A transzporternek számos szelektív és nem-szelektív farmakológiai gátlószere ismert,[20] úgy mint az amiloride vagy az EIPA,[21] amelyek nem szelektív gátlószerek, az összes NHE izoformát blokkolják különböző mértékben. A cariporide (HOE-642) hatása dózis-függő.[22] 1 µM-os koncentrációban csak az NHE1-et gátolja, míg 50 µM-os koncentrációban az NHE-1 és -2 izoformát is. A HOE-694 szintén dózis-függően fejti ki a hatását az NHE-1 és -3 izoformára.[23] Kevésbé használt és nem specifikus gátlószerek még a cimetidine, clonidine és harmaline.[24]

#### 3.2.2. Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kotranszporter

A Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kotranszporter (NBC) egy elektrogén transzporter, amely elsődleges szerepe a sejten belüli pH egyensúly fenntartása. Az NBC két vagy három HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> és egy Na<sup>+</sup> transzportját szabályozza. A transzport irányát elsősorban a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> és a Na<sup>+</sup> elektrokémiai gradiense határozza meg és elég nagy szöveti eltéréseket mutat.[25] A vesében 1 Na<sup>+</sup> és 3 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transzportját mediálja a sejtből kifelé, míg a pankreász duktális sejtekben 1 Na<sup>+</sup> és 2 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> sejtbe történő felvételét szabályozza.[26, 27] Az NBC működése során a HCO<sub>3</sub>, CO<sub>3</sub><sup>2-:</sup> vagy NaCO<sub>3</sub><sup>-</sup> formában is transzportálódhat. A transzporter nem permeábilis más organikus anionokra,[28] valamint a Na<sup>+</sup> sem helyettesíthető Li<sup>+</sup>-al vagy K<sup>+</sup>-al.[29] Az NBC1 gén 3 spice variánst kódol. A kNBC1 variáns elsőként veséből klónozták és elsősorban a szemben és a

vesében előforduló, 116 kDa méretű fehérje. 12 transzmembrán doménből áll, az N- illetve Cterminális régió intracellulárisan helyezkedik el, melyen számos foszforilációs és glikolizációs hely található. A pNBC1 szinte minden szövetben előforduló variáns, melyet először a pancreas-ból izoláltak. A fehérje közel 120 kDa nagyságú, mely 1079 aminósavból épül fel. Az első két variáns az N-terminális régióban mutat eltéréseket. A harmadik variáns az rb2NBC, az előző kettőtől teljesen eltérő COOH-terminális régióval rendelkezik, melyet patkány agyból klónoztak és kizárólag az agyban fordul elő. A fehérje 1094 aminósavból épül fel és 130 kDa méretű. Mindhárom izoforma szövetspecifikusan expresszálódik aktivitásuk azonban eltérő lehet.[30] McAlear és mtsai. Xenopus Laevis oocitába expresszálódó splice variánsok összehasonlítása során azt találták, hogy a kNBC forma aktivitása messzemenően nagyobb mint a másik két variánsé,[31] valamint az N-terminális régió részleges deléció fokozza a pNBC és rb2NBC aktivitását. Specifikus aktiváció figyelhető meg az egyes variánsok esetében is. A pNBC1 variáns aktivitását az inozitol-1,4,5-trifoszfát receptor kötő fehérje (IRBIT) jelentősen fokozza, feltehetőleg közvetlen úton, a fehérjéhez történő kötődés révén.[32] A transzporter aktivitását a protein kináz C fehérje aktiválódása is szabályozza, melyben az NBC foszforilációja játszhat szerepet.[33] A transzporter gátlószerei közül a 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic sav (DIDS), dinitro-stilbene-disulfonate (DNDS), harmaline, furosemid és a bumetanide az ismertebbek.

### 3.2.3. Cl<sup>-</sup>/HCO3<sup>-</sup> kicserélő

A Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő a sejtből vagy a sejtbe történő HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transzportot szabályozza, ezáltal alkalizálja vagy acidifikálja a sejtet. Számos izoforma tartozik ebbe a családba, melyeket az SLC4A és SLC26A géncsalád valamelyik tagja kódol.[34] Az SLC4A családba tartozó transzporterek közé tartozik az NBC, valamint a Na<sup>+</sup>-függő (SLC4A8 és -10) és Na<sup>+</sup>-független (SLC4A1-3) Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélők. Az SLC26A család közül Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélőként funkcionál az SLC26A3, -4, -6, -7 illetve -9 izoformák. Az SLC4A és -26A család tagjai között a különbséget az adja, hogy az SLC4A elektroneutrális míg a -26A elektrogén transzportot mediál. Ezen felül a családon belül az egyes tagok közötti különbséget az eltérő sztöhiometria, a transzport iránya, az apikális vagy bazális lokalizáció vagy a szövetspecifikus kifejeződés adhatja.

Az elektroneutrális, Na<sup>+</sup>-független SLC4A család tagjai jellemzően egy citoplazmikus N- és C-terminálissal illetve egy transzmembrán domén-el rendelkeznek, melyen keresztül a Cl<sup>-</sup> és HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cseréje történik.[35, 36] A család tagjai 12-14 transzmembrán domén-el rendelkeznek, az egyes izoformák közötti szerkezeti eltérések az N- és C-terminális domének hosszából adódik. Ezenkívül a transzmembrán domén szekvenciája közel 80%-os hasonlóságot mutat.[34] Az SLC4A család tagjai a C-terminális doménen keresztül kölcsönhatásba lépnek a karbon anhidráz enzimmel egy metabolon-t képezve, amely egyrészt pozicionálja az enzimet másrészt elősegíti a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transzportját növelve ez által a transzporter aktivitását.[37] Jellemzően, az SLC4A1 izoforma a vörösvértestekben, a vesében illetve a szívben fordul elő,[38] az SLC4A2 szinte mindenhol megtalálható,[39] míg az SLC4A3 főként az agyban, szívben és a retinában fordul elő.[40] Az 1-es és 2-es izoforma az epitél sejtek bazális membránjára lokalizálódik, míg a 3-as izoforma nem fordul elő az epitél sejtekben.

A Na<sup>+</sup>-függő SLC4A család 2 tagja ismert, az NDBCE (SLC4A8) és az NCBE (SLC4A10). Az NDCBE elsősorban az agyban, herékben, szívizomban és az oocitákban fordul elő, míg az NCBE a vesében, méhben, idegsejtekben, a szívizomban valamint a choroid plexus bazolaterális membránján ahol alapvető szerepet játszik a cerebrospinális folyadék termelésében.[41, 42] Az utóbbi évek kutatásai kimutatták, hogy az NCBE transzporter sokkal inkább működik Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kotranszporterként, mint Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélőként, így szokták NBCn2-nek is nevezni, utalva az NBCn1-re.[43]

Az SLC26A család tagjait eredetileg szulfát transzporterekként azonosították.[44] A fehérjére szerkezetileg jellemző, hogy 10-14 transzmembrán domén-el rendelkezik, illetve az N- és C-terminális régió a citoplazmában végződik.[45] Az SLC26A család tagjai egy 22 aminosavból álló "szulfát transzportáló motif"-al rendelkeznek az N-terminális régióban, amely feltehetőleg az aniontranszportban vesz részt. Ezen felül egy "szulfát transzporterek és anti-szigma antagonisták" (STAS) nevezetű domén is megfigyelhető a C-terminálisban, melynek a szerepe még nem teljesen tisztázott, de feltehetőleg a fehérje-fehérje kölcsönhatásokban vesz részt, elősegítve ez által az anion kicserélő és a CFTR csatorna közötti interakció létrejöttét, valamint kötőhelyet biztosít a karbonanhidráz enzim számára.[46, 47, 48]

Az SLC26A izoformák közül munkám során mélyrehatóbban az SCL26A6 és A3 izoformákkal foglalkoztam. 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.[49] Emellett a fehérje előfordul a duodénum mikrovillusaiban illetve a szívben.[50, 51] A pankreászban 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<sup>-</sup> csatornával.[48, 52, 53] 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<sub>3</sub> szekréciójára képesek. Az A3 és A6 izoforma legfontosabb különbsége, hogy eltérő sztöhiometriával szekretálják a HCO3-ot. Mind az A3 mind pedig az A6 izoforma elektrogén. Az SLC26A6 2:1 arányban transzportál HCO3<sup>-</sup>-ot és Cl<sup>-</sup>-ot, míg az A3 izoforma esetében ez az arány 1:2-höz.[54] SLC26A6 génkiütött egereken végzett vizsgálatok kimutatták, hogy az izoformák képesek egymás hatását kompenzálni, ugyanis az A6 izoforma hiányában sem a HCO3-szekréció mértéke sem pedig a szekretált folyadék mennyisége nem csökken.[55] 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. [55] Mind az SLC26A6 mind pedig az A3 esetében az extracelluláris [Cl-] meghatározza a transzporter irányát. Magas luminális Cl<sup>-</sup> jelenlétében (124 mM luminális Cl<sup>-</sup> és 25 mM luminális HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) mindkét transzporter Cl<sup>-</sup> -ot vesz fel és HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> -ot szekretál.[56] Alacsony luminális Cl (~ 7mM) mellett mindkét transzporter működése megfordul és Cl<sup>-</sup> -ot szekretálnak HCO3<sup>-</sup> ellenében.[56] A transzporterek elsősorban Cl<sup>-</sup> és HCO3<sup>-</sup> ionokra szelektívek, de más molekulák is transzportálódhatnak rajtuk keresztül, bár ezekre nézve a transzportereknek kisebb permeabilitása van. Így az SLC26A6 képes transzportálni oxalátot, [57] szulfátot [58] és OH-t, [45] míg az SLC26A3 bromidot, nitrátot, acetátot, szulfátot és oxalátot.[59, 60, 61] A transzporternek jelenleg nincs specifikus gátlószere. A nemspecifikus gátlószerek közül legszélesebb körben a DIDS használatos, amely nem-szelektív módon gátolja az anion cserét.[62, 63]

Az SLC26A gének meghibásodása három, recesszíven öröklődő genetikai megbetegedést okozhatnak. Az SLC26A2 génben bekövetkező mutáció diasztrofikus diszpláziát,[64] az SLC26A3 gén meghibásodása veleszületett hasmenést,[65] míg az SCL26A4 gén hibája Pendred szindrómát okoz.[66]

### 3.2.4. Cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR)

A CFTR Cl<sup>-</sup> csatorna az ATP-kötő kazetta (ABC) géncsalád egyik tagja.[67] Az epitél sejtek apikális membránján helyezkedik el, megtalálható a tüdőben, a bélben illetve a külső elválasztású mirigyekben (pankreász, nyálmirigy), ahol a víz és sók transzportját szabályozza. A csatorna alapvetően a Cl<sup>-</sup> -ra szelektív de más ionok, úgy mint a I<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, F<sup>-</sup> vagy akár HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> is képes áthaladni rajta.[68, 69] A fehérje 1480 aminósavból 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). (**2. ábra**) A két homológ domén egy

úgynevezett R-domén-en keresztül kapcsolódik egymáshoz, amely számos foszforilációs helyet tartalmaz.[67] A csatorna leginkább a Cl<sup>-</sup> -ra szelektív. Az anionok és kationok közötti megkülönböztetésben az intracellulárisan elhelyezkedő töltés szelektívitás filter ezen belül is az M6 szegmensen 352-es pozicióban található, pozitív töltésű arginin játszik szerepet, amely egy elektrosztatikus akadályt képez a kationokkal szemben.[70] Az Arg-352 hiányában a csatorna Na<sup>+</sup> áteresztő képessége többszörösére nő.[71] A csatorna nyitódását két tényező befolyásolja, az egyik a foszforiláció a másik pedig az ATP megkötése és hidrolízise.[72, 73, 74] A foszforilációs helyek az R domén-en találhatóak, melyek a protein kinázok (protein kináz A és C (PKA és PKC)) számára hozzáférhetőek.[67, 72, 73, 74] A foszforiláció növeli ugyan a csatorna nyitódását, [72, 75] de nem elégséges hozzá. Egyes tanulmányok szerint R domén hiányában is működőképes a csatorna, [76, 77] 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.[77, 78] A csatorna nyitott és zárt állapotáért az ATP a felelős, amely az NBD-n keresztül képes kötődni a csatornához.[72, 73, 74] 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. [72, 74] 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<sup>-</sup> 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 bekövetekző mutáció a CFTR záródását lassítja.[79, 80, 81] Ezek alapján elmondható, hogy a CFTR nyitódási/záródási frekvenciájában és időtartamában jelentős szereppel bír az NBD doméneken történő ATP hidrolízis. A CFTR deaktivációjában protein foszfatázok (PP2C és PP2A) vesznek részt, melyek defoszforilálják az R domént.[82, 83]

A CFTR hiánya vagy nem megfelelő működése a leggyakoribb örökletes megbetegedés a cisztás fibrózis (CF) kialakulásához vezet.[84, 85] A CF egy autoszómális recesszív megbetegedés, amelyet a CFTR génben bekövetkező mutáció okoz. A leggyakoribb mutáció, ami a betegek 70-90 %-át érinti, az 508-as pozicióban lévő fenilalanin deléciója (ΔF508).[86] Ezenkívül további mutációkat is leírtak, melyek a CFTR csatorna funkcióját különbözőképpen befolyásolják és ennek megfelelően eltérőek a betegség tünetei. A CF jelenleg a leggyakoribb örökletes megbetegedés, melynek incidenciája 1/3500, a kaukázusi populációban.[87, 88] A CFTR csatorna nem megfelelő működése több szervet is érint, melyek közül a tüdő és a pankreász a leginkább érintettek. A tüdőben a csökkent folyadékszekréció miatt sérül a mukociliáris "clearance" mechanizmus, melynek eredményeként nem megfelelően tisztul a tüdő, melegágyat biztosítva a különböző baktériumok elszaporodásának és gyulladások kialakulásának.[89] A pankreászban a CFTR hiányában képződő vastag nyák felszívódási zavarokat, steatorrhoea-t, illetve pankreatitiszt okozhat. Az utóbbi 20 évben nagyon dinamikusan fejlődött a betegség terápiája. A jelenleg elérhető terápiáknak (ASL helyreállítása, gyulladásgátló és antibakteriális szerek, enzimpótló készítmények, tüdő transzplantáció) és az új megközelítéseknek (génterápia; ivacaftor/lumacaftor) köszönhetően a betegek átlag életkora mára már 38 év-re kitolódott, de nem ritka az 50 év feletti életkor sem.[90, 91]



**2. ábra. A cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR) csatorna szerkezeti képe**. MSD: transzmembrán domén, NBD: nukleotid-kötő domén, PKA: protein kináz A.

A csatorna legszélesebb körben használt, specifikus aktivátora a forskolin, amely a cAMP szint emelésén keresztül aktiválja a PKA-t.[92] Emellett, a genistein egy CFTR potentiator, amely kölcsönhat az NBD1 és 2-el, ezáltal stabilizálja a két domén dimerizációját.[93] A 3-izobutil-1-metilxantin (IBMX) indirekt módon a foszfodiészteráz gátlása révén aktiválja a csatornát.[94] A CFTR gátlószerek közül a CFTR(inh)-172 a leginkább elterjedt, amely a csatorna nyitódását gátolja azáltal, hogy kölcsönhat a 347-es pozicióban lévő arginin-el.[95] További specifikus gátlószerek még a GlyH-101, amely az extracelluláris oldal

felől, feszültség-függő módon, eltömíti a csatorna pórusát illetve a glibenclamide, ami pedig számos helyen kölcsönhat a csatorna pórusával.[96]

### 3.3. Gasztrointesztinális epitél sejtek

A gasztrointesztinális traktust 4 réteg építi fel. A legbelső réteg a mukóza, amely a több rétegben elhelyezkedő epitél sejteket tartalmazza. Az epitél sejtek egy vékony hártyán a lamina proprián ülnek, mely alatt egy vékony simaizomréteg található. A szubmukóza réteg egy vékony laza rostos kötőszöveti réteg, amelyben a vér- és nyirokerek valamint idegek futnak. Ezt követi az izomréteg, amely egy belső körkörös és egy külső hosszanti izomrétegből áll és a GI traktus perisztaltikáját biztosítja. Az izomréteget kötőszövet borítja, melyet savós hártyának vagy serosa-nak is nevezünk és vérereket, idegeket és zsírszövetet tartalmaz. Ez a 4 réteg szinte az egész GI traktusban megfigyelhető, bár egyes területeken szerkezeti eltérések figyelhetőek meg, ami egy adott funkcióra ellátására specializálódott. Így például a szájüreg, garat és nyelőcső esetében többrétegű, el nem szarusodó laphám található, melynek elsődleges feladata az alsóbb rétegek védelme. Szekretórikus epitél sejtek felelősek az emésztőenzimek, ionok és víz elválasztásáért, a gyomorban illetve a pankreászban. Felszívóhám béleli a vékonybelet, amely a tápanyagok felszívásában vesz részt, míg a vastagbelet borító nyálkahártya réteg a víz visszaszívásában és a nyák termelésében játszik szerepet. Alapvetően elmondható, hogy a GI epitél setjek több liter folyadékot szekretálnak és abszorbeálnak naponta, amely biztosítja a tápanyagok megemésztését és felszívódását. A napi ~7 liter mennyiségű, különböző ionokat és emésztőenzimeket tartalmazó szekrétum a nyálmirigyek (~1 L), a gyomor (~1,5-2 L), a vékonybél (~1-1,5 L), a pankreász (~1-1,5 L) és a máj (~1 L) működésének köszönhető. A termelt szekrétum 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 pankreászban illetve a nyelőcsőben.

### 3.3.1. Pankreász epitél sejtek

A pankreász egy kettős elválasztású mirigy, endokrín és exokrín részt különíthetünk el benne. Az endokrín részt a Langerhans-szigetek alkotják, melyek főként  $\alpha$  és  $\beta$  sejtekből épülnek fel és a szénhidrát anyagcsere szabályozásában játszanak döntő szerepet. Az exokrín pankreászban a két fő sejt típus az acinus és a duktális sejtek. Az acinus sejtek felelősek az emésztőenzimek szintéziséért, melyeket inaktív formában szekretálnak a pankreász nedvbe. A duktális sejtek az ionok és víz szekréciójában játszanak szerepet, ami a pankreász nedv térfogatának nagy részét adja.

### 3.3.1.1 Acinus sejtek

Az acinus sejtek az exokrín pankreász tömegének kb. 80%-át teszik ki.[97] Az acinus sejtek a pankreász funkcionális egységét képezik, melyek szintetizálják, tárolják és szekretálják az emésztőenzimek inaktív formáját. Az acinus sejtek jellegzetes piramis alakúak, kis apikális és nagy bazális membrán-al. Az emésztőenzimeket tartalmazó szekretórikus granulomok az apikális membrán közelében helyezkednek el és innen szekretálódnak az acinusok központi lumenébe, az intercelluláris kanalikulusokba. Az acinusok által termelt emésztőenzimek három fő kategóriába sorolhatóak. Az  $\alpha$ -amiláz a szénhidrátok, a lipázok a zsírok, míg a proteázok a fehérjék bontásában vesz részt. Az enzimek szintézise a riboszómákban történik majd az endoplazmatikus retikulumba (ER) kerülve további módosításokon (foszforiláció, diszulfid hidak képződése, glikolizáció, konformáció változás) mennek át. A fehérjék az ER-ból a Golgi apparátusba kerülnek, ahol további poszttranszlációs módosításokon esnek át, illetve itt történik a fehérjék koncentrálása. A Golgi apparátusban történik továbbá az egyes fehérjék szétválasztása és megfelelő kompartmentbe juttatása. Az emésztőenzimek a zimogén granulumokban kerülnek, míg a lizoszómális hidrolázok, mint a katepszin-B, a lizoszómákba. Az emésztőenzimek szekréciója exocitózissal történik, különböző endokrin, parakrin illetve neurokrin hatásokra, melyet az étel tápcsatornába kerülése vált ki. Az exocitózis során a zigmogén granulumok fúzionálnak a plazmamembránnal és tartalmukat az intercelluláris kanalikulusokba ürítik. A neurohormonális hatások közül az kolecisztokinin (CCK), az acetilkolin (Ach) az (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> szint emelésén és a PKC aktiváció révén, míg a szekretin illetve vazointesztinális polipeptid (VIP) a cAMP szint emelésén és a PKA aktiváció révén stimulálják a granulumok ürítését.[97]

Az acinus sejtek kis mennyiségű, izotónikus, plazma-szerű folyadékot szekretálnak, ami gazdag Na<sup>+</sup>-ban és Cl<sup>-</sup> -ban. A Cl<sup>-</sup> a bazálisan elhelyezkedő Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> (NKCC) kotranszporteren keresztül jut a sejtbe,[98, 99, 100] majd az apikális membránon található Cl<sup>-</sup> csatornán keresztül (feltehetőleg TMEM16a) szekretálódik a lumenbe.[101, 102] A Na<sup>+</sup> többnyire paracelluláris útvonalon a tight junction-ökön keresztül transzportálódik a lumenbe,[103, 104, 105] melynek a fő hajtóereje a bazálisan elhelyezkedő Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPáz.[106]

Az acinus sejtek fluid szekrécióját a  $(Ca^{2+})_i$  szint emelkedése iniciálja,[107, 108, 109] míg a cAMP/PKA rendszer fokozza. A megemelkedett  $(Ca^{2+})_i$  szint egyrészt hatással van az apikális Cl<sup>-</sup> csatorna működésére, másrészt aktiválja a bazolaterális oldalon elhelyezkedő Ca<sup>2+</sup>-aktiválta K<sup>+</sup> csatornák működését,[106, 110] ami fokozza az elektrokémiai hajtóerőt a Cl<sup>-</sup> szekrécióra a luminális membránon.

### 3.3.1.2 Duktális sejtek

A pankreász duktális vagy másnéven vezeték sejtek az exokrin pankreász 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 (**3. ábra**). A Wirsung vezeték a duodénumba nyílik a közös epevezetékkel a Vater ampullánál.[97]



**3. ábra. A pankreász duktális rendszer felépítése**. A pankreász működési egységét az acinusok képezik, melyek szekrétumukat a sejtközötti csatornákba jutattják. Innen az interkaláris duktuszokon keresztül az intralobuláris duktuszok vezetik tovább a szekrétumot, amely 1-1 acinus lobulusból indul ki. Az intralobuláris duktuszok interlobuláris duktuszokká szedődnek össze, melyek végül a fő pankreász vezetékben torkollanak.

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.[103] 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 pankreászban: i) szerkezeti vázat biztosítanak az acinusoknak illetve az endokrin szövetnek, ii) vivőközeget biztosítanak a pankreász által termelt makromolekuláknak (emésztőenzimek, mucin) iii) semlegesítik a gyomor felől érkező savas kémhatást, optimális körülményeket biztosítva az emésztőenzimek működéséhez, valamint iv) elősegitik 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 pankreász nedv döntő többségét adja.[111, 112, 113] A HCO3<sup>-</sup> 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 működéseként a pankreász nedv ionösszetétele az alábbiak szerint alakul: 160 mM Na<sup>+</sup>, 20 mM Cl<sup>-</sup>, 140 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 5 mM K<sup>+</sup>. Ezenkívül egyéb ionokat is tartalmaz kis mennyiségben, úgy mint Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>.[103, 111, 112, 113] A nedv ionösszetételét nagyban befolyásolja a szekréció mértéke is. Az 1980-as évekig úgy gondolták, hogy a pankreász 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.[114] Ezeknek a vizsgálatoknak köszönhetően ismerté vált, hogy a duktális sejtek alapvető élettani funkciót is betöltenek, azaz egy HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-ban gazdag, folyadékot szekretálnak. A humán pankreász duktális epitél sejtek, akár 140 mM-os koncentrációban is képesek HCO3<sup>-</sup> szekretálni, melyben résztvevő transzportereket a 4. ábra szemlélteti. A szekretált HCO3<sup>-</sup> legnagyobb része a vérből származik, ahonnan a HCO3<sup>-</sup> a bazolaterálisan elhelyezkedő NBC-n keresztül jut a sejtbe. Pankreász duktális sejtekben az egyes izoforma található (NBC1), amely elektrogén transzporter (két HCO3<sup>-</sup>-ot és 1 Na<sup>+</sup>-ot juttat a sejtbe), ezáltal jelentős szerepet játszik a nyugalmi membránpotenciál fenntartásában, ami az apikális membránon keresztüli HCO3<sup>-</sup> szekrécióhoz elengedhetetlen.[115, 116] Egy másik lehetséges útvonal a HCO3<sup>-</sup> sejten belüli akkumulációjának, a CO2 passzív diffúziója a sejt membránon keresztül. A sejtbe bejutott CO2 szénsavvá alakul, majd a keletkezett szénsav disszociál HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-ra és H<sup>+</sup>-ra. Mindkét folyamatot a szénsav-anhidráz enzim (CA) katalizálja. Ezt követően a H<sup>+</sup> a bazolaterális NHE-n és H<sup>+</sup>-ATPáz-on keresztül hagyja el a sejtet, míg a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> az apikális oldalon elhelyezkedő Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cserélőn keresztül (SLC26A3 és A6) szekretálódik a lumenbe.[53, 54, 117] A HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréció másik kulcsfontosságú transzportere a CFTR Cl<sup>-</sup> csatorna, amely szintén a duktális sejtek luminális membránján helyezkedik el és szoros összhangban működik az SLC26 anion kicserélővel.[105, 118] 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.[48] Sokáig uralkodott az a nézet, mely szerint a CFTR csatorna egyetlen feladata a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cseréhez szükséges luminális Cl<sup>-</sup> koncentráció biztosítása. Az utóbbi évek kutatási eredményei azonban egyértelműen bizonyítják, hogy stimulált szekréció során a csatorna ionszelektivitása megváltozik.[119]



**4. ábra. A pankreász duktális HCO**<sub>3</sub><sup>-</sup> **szekrécióban részt vevő transzporterek.** A HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> direkt úton a bazolaterális Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kotranszporteren keresztül jut be az epitél sejtbe. Ezen a folyamaton kívül a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> sejten belüli akkumulációjában a szénsav-anhidráz (CA) enzim is részt vesz, mely a sejtbe diffundáló CO<sub>2</sub>-ból és vízből HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> és H<sup>+</sup> ionokat katalizál. Az így keletkező H<sup>+</sup>, a H<sup>+</sup>-pumpán vagy a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> cserélőn keresztül hagyja el a sejtet. A HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréciója az apikális membránon elhelyezkedő Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cserélőn illetve a CFTR Cl<sup>-</sup> csatornán megy végbe.

A  $HCO_3^-$  szekrécióhoz az energiát a  $Na^+/K^+$  ATPáz biztosítja, amely nagy számban fordul elő a duktális sejtek bazális membránján. A pumpa a szintén bazálisan elhelyezkedő  $K^+$ csatornákkal együtt  $Na^+$  és  $K^+$  gradienst tart fenn a membrán két oldalán. A  $K^+$  gradiens negatív membrán potenciált hoz létre, amely egy elektrokémiai hatjóerőt biztosít a luminális membránon keresztüli anion szekrécióhoz, míg a  $Na^+$  gradiens elősegíti a  $HCO_3^$ akkumulációját az NBC-n keresztül. A duktális folyadék és elektrolit szekréciót számos szabályozó fehérje befolyásolja. Ezek a szabályozó fehérjék egy adaptor fehérjén, úgynevezett PDZ fehérjén keresztül kapcsolódnak egymáshoz illetve a célfehérjéhez egy több komponensű hálózatot létrehozva. Az egyik ilyen fontos szabályozó fehérje az NHE szabályozó faktor (NHERF), melynek három izoformája ismert (NHERF1-3).[120, 121] Ez a fehérje fontos szerepet játszik a CFTR illetve az NHE foszforilációjában valamint a memránra történő szállításában. A WNK (lizin-mentes kináz) család tagjai a transzporter fehérjék expresszióját csökkentik a SPAK/OSR1 útvonalon keresztül, azáltal hogy foszforilálják ezen fehérjéket és fokozzák a lebontásukat.[122, 123, 124] A WNK/SPAK útvonal a duktális sejtek nyugalmi állapotának fenntartásában játszik fontos szerepet. Továbbá meg kell említeni az IRBIT fehérjét, amely az IP3 receptor IP3-kötő doménjével kölcsönhat.[125] Ez a fehérje összetett szerepet játszik mind a nyugalmi mind pedig stimulált duktális HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekrécióban.[111] Egyrészt a duktális Ca<sup>2+</sup> szignalizációt gátolja azáltal, hogy az IP3-al verseng a receptoriális kötőhelyért, [125, 126] másrészt pedig képes kötődni a NBC és CFTR transzporter fehérjékhez és jelentősen megnöveli azok aktivitását.[32, 127] Nyugalmi állapotban a bazolaterális NHE3 illetve NBC fehérjékhez kötődve a HCO3<sup>-</sup> akkumulációját segíti elő, míg stimulált állapotban a HCO3<sup>-</sup> szekrécióját elősegítő transzporterekkel kölcsönhatva gátolja a WNK/SPAK-indukálta foszforilációt és endocitózist, megnövelve ezen transzporterek expresszióját.[111] Sokáig nem volt ismert, hogyan képesek a duktális sejtek fenntartani a HCO3<sup>-</sup> szekréciót egy HCO3<sup>-</sup>-ban gazdag luminális folyadékba, melynek koncentrációja akár a 140 mM-ot is elérheti. Több elmélet is született a HCO3<sup>-</sup> szekréció mechanizmusának a leírására, melyet végül Park és mtsai-nak sikerült azonosítani.[119] A korea-i munkacsoport kísérletei során többféle módszertani eljárást alkalmazott, beleértve az izolált duktális 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 duktális 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 pankreász duktális sejtek HCO3<sup>-</sup> szekréciójának mechanizmusát (5. ábra), mely megjelenése óta több mint 100 idézetet kapott.

A duktális HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréció egy bonyolult folyamat, teljesüléséhez többféle feltételnek is teljesülnie kell. Egyrészt szükséges hozzá, hogy a duktális sejtben megfelelő koncentrációban legyen jelen a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, melyet a bazolaterális oldalon lévő transzporterek biztosítanak,

elsősorban az NBC. Emellett szükséges, hogy a luminális membránon lévő transzporterek képesek legyenek a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> -ot a magas luminális HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> koncentráció ellenére is a lumenbe szekretálni, melyhez a hajtóerőt a negatív luminális membránpotenciál biztosítja. A HCO3<sup>-</sup> szekréció eltérően zajlik a proximális és disztális duktuszokban, melynek kétlépcsős modelljét az 5. ábra szemlélteti. Alap állapotban a HCO3<sup>-</sup> ionok az anion kicserélőn kereszül szekretálódnak a lumenbe mindaddig, amig a  $HCO_3^-$  koncentrációja el nem éri a ~ 70 mM-t. Stimuláció hatására (étkezés) a vágusz idegekből szekretin illetve vazointesztinális peptid szabadul fel, ami a pankreász duktális sejteket stimulálja és cAMP felszabadulást indukál.[103] A proximális duktuszokban a felszabaduló cAMP hatására fokozódik a CFTR-indukálta HCO3<sup>-</sup> szekréció a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélőn keresztül. Továbbá az IRBIT gátolja a WNK/SPAK/OSR1 útvonalat, fokozva ez által a HCO3<sup>-</sup> szekrécióját az SLC26A6 transzporteren keresztül. A folyamathoz szükséges luminális [Cl<sup>-</sup>]-t a CFTR csatorna biztosítja. Mivel az SLC26A6 két HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> -ot szekretál 1 Cl<sup>-</sup> ellenében, ezért a lumenben folyamatosan nőni fog a [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>], míg a [Cl<sup>-</sup>] jelentősen lecsökken (~100 mM HCO3<sup>-</sup> és ~60 mM Cl<sup>-</sup>). A disztális duktuszok felé az alacsony luminális [Cl<sup>-</sup>] miatt a CFTR csatornán keresztül több Cl<sup>-</sup> fog szekretálódni, ami a [Cl<sup>-</sup> ]<sub>i</sub> csökkenéséhez vezet. Az alacsony [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> aktiválja a WNK/SPAK/OSR1 útvonalat, mely egyrészt megváltoztatja a CFTR szelektivitását és permeábilisebbé válik a HCO3<sup>-</sup> ionok számára, másrészt a foszforiláció révén legátolja az anion cserélő működését, megakadályozva ez által a HCO3<sup>-</sup> reabszopcióját. Ezen két mechanizmusnak köszönhetően a továbbra is fennálló hajtóerő (negatív luminális membrán potenciál) a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ionokat a CFTR csatornán kereszül juttatja a lumenbe, létrehozva ez által egy HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> -ban gazdag (~ 140 mM) szekrétumot.[119] A másik anion csatorna, amely a CFTR mellett a duktális sejtek apikális membránján megtalálható, a Ca<sup>2+</sup> aktiválta Cl<sup>-</sup> csatorna (CACC), melyet a (Ca<sup>2+</sup>); szint emelkedése (10 nM-1 μM) aktivál.[128] A jelenlegi ismereteink alapján ez a csatorna is hozzájárul a luminális Cl<sup>-</sup> koncentráció fenntartásához szekréció alatt.

A duktális  $HCO_3^-$  szekréció hormonális szabályozásában több mechanizmus is szerepet játszik, melyek serkentő vagy gátló hatást fejhetnek ki. A serkentő mechanizmusok közül a szekretin az egyik legfontosabb szabályozó elem, amely a cAMP szint emelésén keresztül fokozza a PKA aktivitást, melynek eredményeként nő a CFTR csatorna konduktanciája és ez által a  $HCO_3^-$  szekréció is.[103, 129] Emellett serkentőleg hat a véráram felől az Ach, a hisztamin és angiotenzin II valamint a lumen felől az ATP és Ca<sup>2+</sup> is, melyek alapvetően a  $(Ca^{2+})_i$  emelésén keresztül stimulálják a  $HCO_3^-$  elválasztását.[130, 131, 132, 133, 134]



**5. ábra. A pankreász duktális HCO**<sup>3-</sup> szekréció jelenleg leginkább elfogadott mechanizmusa. A cAMP hatására a CFTR-függő Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő aktivitása többszörösére nő, melynek eredményeként fokozatosan nő a luminális HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> és csökken a luminális Cl<sup>-</sup> koncentráció. A luminális Cl<sup>-</sup> csökkenése stimulálja a CFTR csatorna működését, melynek hatására csökken a sejten belüli Cl<sup>-</sup> koncentráció. Ennek hatására aktiválódik a WNK1-OSR1/SPAK útvonal, melynek hatására fokozódik a CFTR csatorna permeabilitása HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> -ra és gátlódik a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő működése. *Forrás: Park et al. Gastroenterology 2010;139:620-631* 

A szekréciót gátló mechanizmusok közül egyes szerek indirekt módon fejtik ki a hatásukat, a kolinerg rendszer aktivitásának a csökkentése, vagy az adrenerg rendszer aktivitásának a növelése révén. Ezzel szemben a subtance P (SP) a duktális sejtekre közvetlenül fejti ki gátló hatását a cAMP szint csökkentésén keresztül.[135] Direkt gátló hatás igazolódott még az arginin-vasopresszin és az 5-hidroxitriptamin (szerotonin) esetében is melyek a  $(Ca^{2+})_i$  csökkenésén keresztül gátolják a  $HCO_3^-$  szekréciót.[136, 137, 138]

#### 3.3.2. Nyelőcső epitél sejtek

A nyelőcső epitél sejteken keresztüli iontranszport folyamatokkal az utóbbi években kezdtem el foglalkozni. Normál körülmények között a nyelőcsövet egy többrétegű, el nem szarusodó 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. írták le.[139, 140] Az epiteliális rezisztenciában alapvetően 3 mechanizmus vesz részt: a pre-epiteliális, az epiteliális és a poszt-epiteliális védelem. A pre-epiteliális védelembe a nyelőcső mukóza nyák borítása, illetve a felszíni HCO3<sup>-</sup> szekréció tartozik, ami egy alkalikus mikrokörnyezetet alakít ki, védve a sejteket a savas expozíciótól. A posztepiteliális védekezésnek legfontosabb komponense a nyelőcső zavartalan vérellátása, ami a O2 és HCO3<sup>-</sup> 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 epitél sejtek proliferációja és helyreállítása, a puffer rendszerek (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> és foszfát puffer rendszer), valamint az ion transzporterek a sejtek apikális és bazolaterális membránján.[140, 141] A nyelőcső epitél sejtek (EECs) apikális membránján eddig egy nem-szelektív kation csatornát sikerült azonosítani, ami egyformán permeábilis a Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ionokra illetve a H<sup>+</sup>-ra.[142] 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.[143] 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.[142] Az EECs bazolaterális membránján lényegesen több ion transzportert sikerült azonosítani. Tobey és mtsai. egy Na<sup>+</sup>függő és egy Na<sup>+</sup>-független Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő jelenlétét azonosították nyúl EECs-en.[144] A Na<sup>+</sup>-független Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> lumenbe történő szekrécióját mediálja, ami a sejtek acidózisában játszik szerepet. A Na<sup>+</sup>-független Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő ellentétesen működik és a HCO3<sup>-</sup> 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 sejttérfogat, proliferáció és sejttúlélés szabályozásában.[145, 146, 147] Ezek a tanulmányok normál nyelőcső epitéliumon vizsgálták az ion transzporterek kifejeződését, míg ezen transzporterek jelenléte illetve aktivitása a nyelőcső gyulladásos megbetegedéseiben kevésbé tanulmányozott.

## 3.4. Az epitél sejtek szerepe GI betegségekben

### 3.4.1. Akut pankreatitisz

Az akut pankreatitisz (AP) a pankreász 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. [148] Az esetek döntő többsége (~ 80%) az enyhe betegcsoportba tartozik, míg a betegek 20%-ában a súlyos, szeptikus állapot alakulhat ki, melyben a mortalitás akár a 30 %-ot is elérheti. [149, 150] A diagnózis felállításánál a felhasi fájdalom, az emelkedett szérum amiláz és lipáz szint, valamint a pankreász morfológiai elváltozásai a döntőek. A jelenleg leginkább elfogadott nézet szerint a betegség kialakulásában a tripszin idő előtti aktiválódása kulcs fontosságú lépés, [151] bár a pontos pathomechanizmus a mai napig nem teljesen ismert. Az esetek 80%-áért az epekövesség és a túlzott alkoholfogyasztás a felelős.[152, 153] (6. ábra) Az Opie-féle teória szerint a biliáris pankreatitisz kialakulásáért a Vater papillába beékelődött epeúti kő a felelős, amely ez által megakadályozza a pankreász nedv elfolyását.[154] A biliopancreaticus reflux során a duktális vezetékrendszerbe jutott epe károsíthatja a pankreászt illetve elősegítheti az emésztőenzimek idő előtti aktiválódását. Az alkohol-indukálta AP esetében a túlzott alkoholfogyasztás hatására megnő a pankreász nedv elválasztása és ezzel egyidejűleg fokozódik a Vater papilla kontrakciója, megakadályozva a pankreász nedv elfolyását.[155, 156] Emellett az etanol (EtOH) bomlása során olyan metabolitok képződnek, melyek károsíthatják az acinus sejteket és az enzimek aktiválódását okozhatják.[157, 158, 159]

Az utóbbi évek kutatásai egyre inkább előtérbe helyezték a duktális sejtek szerepét az AP pathomechanizmusában. A 90-és években Czakó és mtsai. cerulein-indukált akut kísérleti pankreatitisz vizsgálata során a cerulein injekciót követő néhány órában megnövekedett folyadékszekréciót tapasztaltak, mely a pankreász nedvhez képest hipoproteinémiás volt és megelőzte a pankreász morfológiai elváltozásait.[160, 161] Hasonló hipoproteinémiás hiperszekréció volt megfigyelhető Na<sup>+</sup>-taurokolsav retrográd infúziója során is

patkányban.[160, 161] A betegség progressziója során a hiperszekréciót hiposzekréció illetve a pankreász szövet károsodása követte. Ezek az eredmények egyfajta aspecifikus védőmechanizmus jelenlétére utalnak, mely az AP korai szakaszában még a szövet károsodása előtt megpróbálja a pankreász lumenéből kimosni a károsító tényezőket. Ahogy korábban említettem az AP kialakulásában a két fő etiológia tényező a túlzott alkohol fogyasztás illetve az epekövesség. Ezen ágensek a duktális folyadék és HCO3<sup>-</sup> és folyadékszekréciót dózisfüggő módon befolyásolják.[162, 163, 164]



#### 6. ábra. Az akut pankreatitisz etiológiája.

#### Az EtOH hatása a duktális epitél 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.[164] Nem ismert, hogy az EtOH serkentő és gátló hatásában milyen sejten belüli mechanizmuson vesznek részt. A CFTR Cl<sup>-</sup> csatorna fontos szerepet játszik a duktális HCO3<sup>-</sup> szekrécióban, azáltal, hogy a Cl<sup>-</sup>/HCO3<sup>-</sup> kicserélő működéséhez szükséges Cl<sup>-</sup>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.[165]

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 alkoholindukálta pankreatitisz pathomechanizmusának jobb megértését.[166]

#### 2018

#### Az epesavak hatása a duktális epitél sejtekre:

1) Korábbi vizsgálataink során leírtuk, hogy a CDCA alacsony koncentrációban (100  $\mu$ M) fokozza a duktális HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréciót, egy inozitol-trifoszfát (IP<sub>3</sub>)-mediálta Ca<sup>2+</sup> felszabaduláson keresztül, míg a nagy dózisú CDCA (1mM) mind a luminális mind pedig a bazolaterális membrán felől adva gátolta a transzporterek működését.[163] Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a pankreász duktuszok a károsító noxákra hiperszekrécióval reagálnak. Ez a fokozott szekréció megpróbálja kimosni a pankreászból 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 gátlódik 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 sejtes konfigurációját alkalmazva. Mivel a CDCA-indukált stimuláció összefüggésben áll a sejten belüli megnövekedett Ca<sup>2+</sup> szinttel, ezért elsősorban olyan ioncsatornák vizsgálatára fókuszáltunk, melyek aktivációjában a megemelkedett (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> központi szerepet játszik.[167]

2) Az urzodezoxikólsav (UDCA) egy másodlagos, hidrofil 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.[168, 169, 170, 171] 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 tranziciós pórus nyitódását és ez által az epesavak apoptizáló 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.[177]

#### 3.4.2. Barrett-nyelőcső

A nyelőcsövet érintő, egyik leggyakoribb megbetegedés a gastro-oesophagealis reflux betegség (GORB), mely során a savas gyomortartalom, a nyelőcső záróizmainak nem megfelelő működése miatt a nyelőcsőbe visszaáramlik, és ez tüneteket okoz.[178, 179] 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, [180] azonban a betegség előfordulása növekvő tendenciát mutat a világ többi részén is.[179, 181] 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. [182, 183] Állatkísérletes vizsgálatok azt igazolták, hogy a nyelőcső relatíve rezisztens kizárólag sósav terhelésre, hacsak nem nagyon magas koncentrációban van jelen (pH<1). Pepszin jelenlétében már magasabb pH-n (pH<2) is megjelent a gyomorsav károsító hatása.[182] Nyúl nyelőcsövön végzett kísérletekben az epesav is károsnak bizonyult: a konjugált epesavak savas, míg a nem-konjugált epesavak neutrális pH-n károsították a mucosát.[183] 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 oesohagitis 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.[184] Illetve a PPI használata nem csökkentette kellő mértékben a Barrett-nyelőcső illetve annak adenocarcinomába való átmenetének gyakoriságát.[184] 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.[185] A BE előfordulása a nyugati populációban 1,6 %,[186] míg azoknál a betegeknél, akik igazoltan GORB-ban szenvednek ez akár 4,4% is lehet.[187] Szövettanilag fundus, cardia illetve intesztinális-típusú metapláziákat különíthetünk el. A fundus-típusú metapláziában parietális és fő sejtek, a cardiatípusú 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.[188, 189] Az így kialakult hengerhám lényegesen ellenállóbb a sav károsító hatásaival szemben mind a laphám.[190, 191] A betegség a nyelőcső különböző hosszúságú szakaszát érintheti mely alapján hosszú (3 cm felett) illetve rövid (3 cm alatt) szegmens BE-t különböztethetünk meg.[192] A jelenleg elfogadott nézet szerint az intesztinális-tipusú metaplázia okozza a nyelőcső súlyosabb funkcionális zavarait, illetve ez a stádium növeli leginkább az EAC kialakulásának a kockázatát.[193] Az EAC megjelenése előtt low majd high grade diszplázia alakul ki, mely egy neoplasztikus állapot, amely a daganatos átalakulás jeleit mutatja. Jellemzője a szerkezeti és sejtszintű abnormalitások jelenléte.[194] 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 mind a sósav mind pedig egyes epesavak károsíthatják a DNS-t, fokozva ez által a genetikai instabilitást, [139, 195, 196, 197, 198, 199] a mechanizmus azonban nem teljesen ismert. Mivel az iontranszport folyamatok nagymértékben hozzájárulnak, mint a nyelőcső clearence 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 hámban karakterizálták, [142, 144, 145, 146, 147] míg a metaplasztikus hengerhámban 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.[200]

# 4. CÉLKITŰZÉS

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 serkenti a CDCA a pankreász duktális HCO<sub>3</sub>szekréciót?
  - a) A CDCA hatására aktiválódnak-e ioncsatornák a duktális sejteken? Ha igen, hova lokalizálódik a csatorna?
  - b) A sejten belüli Ca<sup>2+</sup> milyen szerepet játszik a csatorna aktivációjában?
  - c) A csatorna specifikus farmakonok általi aktivációja okoz-e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 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<sub>3</sub><sup>-</sup> szekrécióra? Ha igen, akkor ez az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> szint csökkenésén keresztül valósul-e meg?
  - b) Az UDCA képes-e kivédeni a CDCA mitokondrium károsító hatását, illetve képese 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 találhatóak 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<sup>2+</sup> 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?

## 5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

## 5.1. Anyagok

### 5.1.1. Állatok

Az intra-interlobuláris pankreász duktuszokat standard körülmények között tartott, 150-200 g tömegű (4-8 hetes) tengerimalacokból izoláltuk. Az állatokat a Charles River Laboratories Magyarország Kft-től szereztük be. A pankreatitisz indukciója 180-300 g tömegű hím Wistar patkányokon történt. A patkányokat a Szegedi Tudományegyetem (SZTE), Általános Orvostudományi Kar (ÁOK), Domaszéki állatházából szereztük be. Mind a tengerimalacokat mind pedig a patkányokat szobahőmérsékleten tartottuk, 12-12 órás sötétvilágos ciklust biztosítva. Az állatoknak szabad hozzáférésük volt a vízhez illetve a standard laboratóriumi rágcsáló táphoz (Biofarm, Zagyvaszántó). A kísérletek elvégzése előtt az állatok az I. sz. Belgyógyászati Klinika állatházában akklimatizálódtak, legalább 1 hétig.

### 5.1.2. 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 az alábbi összetevőkkel egészítettünk ki: 10 % (v/v) fötális borjú szérum, 4 mM L-glutamin, 0,4 µg/ml hidrokortizon, 20 mg/L adenin, 20 ng/L rekombináns humán epidermális növekedési faktor, 8,4 µg/L kolera toxin, 140 µg/mL szarvasmarha hipofízis kivonat, 1 X ITS kiegészítő oldat (5 µg/mL inzulin; 5 µg/mL transzferrin; 5 ng/mL Na<sup>+</sup>-szelenit valamint 1% (v/v) penicillin/streptomicin. A sejteket 5%-os CO<sub>2</sub>-tartalom mellett növesztettük 37°C-on. A sejtkonfluenciát fázis kontraszt mikroszkóp segítségével ellenőriztük és a sejteket 95-100 % konfluencia elérése után 0,01 % tripszint és 0,02 % etilén-diamin-tetraecetsav-at (EDTA) tartalmazó oldattal passzáltuk. A sejteket 10-30 passzázs szám között használtuk.

### 5.1.3. 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 írattunk 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 prága-i C&M kritéria 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. A betegek adatait az 2. táblázat tartalmazza.

Beteg száma	Neme	Életkora	Metaplázia tipusa	Metaplázia hossza
1.	Férfi	82	intesztinális	c0m3
2.	Férfi	76	intesztinális	c3m4
3.	Férfi	57	intesztinális	c2m4
4.	Férfi	49	intesztinális	c3m4
5.	Nő	70	intesztinális	c1.5m5
6.	Nő	65	intesztinális	c8m10
7.	Nő	62	intesztinális	c1m3
8.	Férfi	47	Nem-intesztinális	c1m1
9.	Nő	81	Nem-intesztinális	c1m2
10.	Nő	61	Nem-intesztinális	c0m1.5
11.	Nő	58	Nem-intesztinális	c0m1
12.	Nő	56	Nem-intesztinális	c0m1
13.	Nő	55	Nem-intesztinális	c0m1
14.	Nő	50	Nem-intesztinális	c0m0.5

2. táblázat. A betegek adatai.

### 5.1.4. Vegyszerek és oldatok

2',7'-bisz-(2-karboxietil)-5-(és-6)-karboxi-fluoreszcein-acetoximetil-észter-t А (BCECF-AM), oxazolekarboxilik, az 5-2-(6-(bis(karboximetil) amino)-5-(2-(2-(bisz(karboximetil)amino)-5-metilfenoxi)etoxi)-2-benzofuranil)-5-oxazolekarboxilik acetoximetil-észter-t (FURA 2-AM), az 1,2-bisz(o-aminofenoxi)etán- N,N,N9,N9-tetraacetik sav-at (BAPTA-AM), a kalcein acetoximetil-észter-t (kalcein-AM), a tetrametilrodamin metil észter-t (TMRM), a Magnézium Green acetoximetil-észter-t (MgGreen-AM) és a dihidro-4,4'diizotiocianostilbén-2,2'-diszulfonsavat (H2DIDS) a Life Technologies Magyarország Kft.-től (Budapest, Magyarország) szereztük be. A 4-izopropil-3-metilszulfonilbenzoil-guanidin metánszulfonátot (HOE-642) a Sanofi Aventis (Frankfurt, Németország) biztosította. A
nigericint abszolút alkoholban, a BCECF-AM-et, a BAPTA-AM-et, a MgGreen-t, TMRM-et, a kalcein-AM-et, a H<sub>2</sub>DIDS-et illetve a HOE-642-t dimetilszulfoxid-ban (DMSO), míg a FURA 2-AM-et 20 % (v/v) pluronik savat tartalmazó DMSO-ban oldottuk és felhasználásig -20°C-on tároltuk. A kromatográfiás tisztaságú kollagenázt a Worthington cégtől szereztük be (Lakewood, NJ, USA). Az összes többi laboratóriumi vegyszert a Sigma-Aldrich Kft.-től (Budapest, Magyarország) rendeltük.

A fluorescens illetve patch clamp kísérletekhez felhasznált oldatok összetételét a 3. táblázat tartalmazza. A Hepes-t tartalmazó oldatokat 100% O<sub>2</sub>-vel gázoltattuk a pH értéküket pedig 7,4-re állítottuk be 1 M-os NaOH illetve 1 M-os HCl oldat segítségével. A HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-ot tartalmazó oldatokat 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>-ot tartalmazó gázkeverékkel gázoltattuk, melynek eredményként az oldatok pH-ja 7,4 körüli értékre állt be. A KCl-ot tartalmazó pipetta oldat pH-ját 7,2-re állítottuk be 1 M-os KOH oldat segítségével. A kísérletek során az oldatokat 37°C-on használtuk. Az extracelluláris oldatok ozmolaritása ~300 mOsm/L, míg az intracelluláris oldatok ozmolaritása ~240 mOsm/L volt.

	Standard Hepes	Standard HCO3 <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> Cl Hepes	Magas-K <sup>+</sup> Hepes	NH4Cl HCO3 <sup>-</sup>	Na <sup>+</sup> -mentes Hepes	Cl <sup>-</sup> -mentes Hepes	Cl <sup>-</sup> -mentes HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
NaCl	130	115	110	5	95			
KCl	5	5	5	130	5	5		
MgCl <sub>2</sub>	1	1	1	1	1	1		
CaCl <sub>2</sub>	1	1	1	1	1	1		
Na-Hepes	10		10	10				
Glükóz	10	10	10	10	10	10	10	10
NaHCO <sub>3</sub>		25			25			25
NH <sub>4</sub> Cl			20		20			
Hepes							10	
NMDG-Cl						10		
Na-gluconate						140	140	115
Mg-glükönát							1	1
Ca-glükonát							6	6
K-szulfát							5	2.5

3. táblázat. Az extracelluláris oldatok összetétele mM-ban megadva.

## 5.2. Módszerek

#### 5.2.1. Intra-interlobuláris pankreász duktuszok izolálása

Az intra-interlobuláris pankreász duktuszokat 150-200 g tömegű tengerimalacokból izoláljuk. A hasnyálmirigyet eltávolítást illetve tisztítást követően izoláló oldattal befecskendezzük, majd kisebb darabokra vágjuk és rázó vízfürdőben 30 percig inkubáljuk, 37°C-on. Az izoláló oldat 100 U/mL kollagenáz-t, 0,1 mg/mL tripszin inhibitor-t valamint 1 mg/mL szarvasmarha szérum albumin-t (BSA) tartalmaz Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient (DMEM) F-12 Ham tápfolyadékban feloldva. Az inkubációt követően az intra/interlobuláris duktuszokat fénymikroszkóp alatt, mikrodisszekciós módszerrel izoláljuk.[114] Az így nyert intakt duktuszokat 24 órán keresztül inkubáljuk (37°C-on, 5% CO<sub>2</sub>-ot tartalmazó inkubátorban), majd kísérleteinkhez felhasználjuk. Az inkubáció alatt a duktuszok két vége leforr és a folyadékszekréciónak köszönhetően a duktuszok felhíznak, ezáltal könnyen elkülöníthetővé válnak az esetlegesen kiizolált vérerektől.

## 5.2.2. Pankreász duktuszok mikroperfúziója

A kísérletek egy részében szükségessé vált a duktuszok luminális membrán felőli perfűziója, melyet a mikroperfűziós technika alkalmazásával értünk el. A perfundáláshoz egy külső, vastagabb átmérőjű tartó pipettát illetve egy belső, vékonyabb átmérőjű perfűziós 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 perfűziós 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 perfűzió sebessége 10-30 µl/perc, míg a külső, bazolaterális perfűzió sebessége 4-5 ml/perc volt.

## 5.2.3. Fluoreszcens vizsgáló módszerek

A fluoreszcens mérések során perfúziós kádat használtunk, melynek az alját egy üveglemez (24 mm<sup>2</sup>) képezte. A kádat egy IX71 inverz kutató mikroszkóp (Olympus Hungary Kft., Budapest, Magyarország) tárgyasztalára helyeztük, majd 4-5 ml/perc sebeséggel perfundáltuk különböző oldatokkal, 37°C-on. A pankreász duktuszokat egy speciális szövetragasztó (poly-l-lizin) segítségével rögzítettük az üveglemezhez, míg a sejtkultúrák esetében 10<sup>5</sup> 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 fluorescens intenzitás értékeket hányadossá konvertálja illetve kiszűri a háttér zajokat.

## 5.2.3.1. Intracelluláris pH (pH<sub>i</sub>) mérés

Az intracelluláris pH (pH<sub>i</sub>) mérése pH-érzékeny fluoreszcens festék, BCECF-AM segítségével történt. A sejteket 30 percig inkubáltuk 2 μM BCECF-AM-el szobahőn. A festék az észter csoportnak köszönhetően membrán permeabilissá vállik 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 hullám hosszúságú fénnyel gerjesztettük majd a 490/440 emissziós arányt 535 nm hullámhosszon mértük. A fluoreszcens hányados kalibrációját a magas K<sup>+</sup>/nigericin technika segítségével végeztük.[201, 202]

## 5.2.3.2. Intracelluláris Ca2+ ((Ca2+)i) mérés

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

## 5.2.3.3. Intracelluláris ATP (ATP<sub>i</sub>) 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 fluoreszcenssé. 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<sub>i</sub> csökkenését mutatja. A festéket 476 nm-en gerjesztettük az emittált fényt pedig 535 nm-en mértük.

#### 2018

#### 5.2.3.4. Mitokondriális membrán potenciál ( $\Delta \Psi_m$ ) mérés

A mitokondriális membrán potenciál ( $\Delta \Psi_m$ ) mérése a membrán permeabilis, mitokondrium-szelektív fluorescens festék, TMRM felhasználásával történt. A festék mitokondriumban történő felhalmozódása a  $\Delta \Psi_m$ -től 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 sebességel, 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. 5-10 ROI-t jelöltünk ki egy preparátumon. 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<sub>0</sub>) és relatív fluoreszcenciaként ábrázoltuk.

## 5.2.3.5. Mitokondriális permeábilitás tranzíciós pórus (mPTP) mérés

A mitokondriális membrán permeabilizáció vagy más néven a mitokondriális permeábilitás 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 pankreász duktuszokat 30 percig inkubáltuk kalcein-AM-el (1  $\mu$ M), majd további 10 percig CoCl<sub>2</sub>-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<sub>0</sub>) és relatív fluoreszcenciaként ábrázoltuk.

## 5.2.4. HCO3<sup>-</sup> szekréció mérése

Az alkalikus terhelés vagy NH<sub>4</sub>Cl pulzus technika alkalmazásával a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő aktivitására tudunk következtetni. A kísérletek során az intra-interlobuláris duktuszokat 3 percig perfundáltuk 20 mM NH<sub>4</sub>Cl-ot tartalmazó oldattal, mely egy azonnali pH<sub>i</sub> növekedést eredményezett. Az alkalózisból történő regeneráció kezdeti szakasza (első 30 másodperc) a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő aktivitását tükrözi, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> jelenlétében. A pH<sub>i</sub> csökkenés mértékét ( $\Delta$ pH/ $\Delta$ t) lineáris regressziós analízis segítségével számoltuk ki. A pH<sub>i</sub>-ban bekövetkező változásokat bázis árammá (*J*(B<sup>-</sup>/min)) konvertáltuk a következő egyenlet segítségével: *J*(B<sup>-</sup>/min) = ( $\Delta$ pH/ $\Delta$ t) X  $\beta$ totál, ahol  $\beta$ totál a sejt teljes pufferkapacitását jelöli. A  $\beta$ totál-t a Henderson-Hasselbach egyenlet segítségével számoltuk ki:  $\beta$ totál =  $\beta$ <sub>i</sub> +  $\beta$ <sub>HCO3</sub> =  $\beta$ <sub>i</sub> + 2,3 X [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>]<sub>i</sub>. A kifelé irányuló áramokat -*J*(B<sup>-</sup>/min)-ként, míg a befelé irányuló áramokat *J*(B<sup>-</sup>/min)-ként jelöltük.

## 5.2.5. Patch clamp technika

A teljes sejtes áramokat EPC-7 (List electronic, Darmstadt, Németország) erősítő segítségével mértük 21-23°C-on. A pipettákat boroszilikát üvegkapillárisokból (Harvard Apparatus) készítettük P-97 Flaming/Brown (Sutter instrument, Novato, CA, USA) mikropipetta húzó készülék segítségével, melyeknek a rezisztenciája a hőpolírozást követően 3-5 mΩ között volt. A K<sup>+</sup> áramok mérésére az alábbi feszültség protokollt alkalmaztuk: -80 mV-os membrán potenciál (Vm) 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 kHzen digitalizáltuk (Model 1401, Cambridge Electronic Devices, Cambridge, UK). 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 polinómiális egyenest illesztettünk a görbére. Az áramerősséget a sejtkapacitásra normalizáltuk (pA/pF) és ±60 mV-nál ábrázoltuk. A pankreász duktális sejtek átlagos kapacitása 6,1 ± 0,3 pFnak bizonyult. A soros ellenállást (R<sub>s</sub>) 50-70%-ban kompenzáltuk. A patch pipettákat magas K<sup>+</sup> tartalmú intracelluláris oldattal töltöttük fel melynek az összetétele az alábbi volt: 120 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM elilén glikol-bisz(b-aminoetil éter)-N,N,N8, N8-tetraacetik sav (EGTA), 10 mM Hepes és 1 mM Na<sub>2</sub>ATP. 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.

## 5.2.6. 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 Reynoldsféle ólom-citrát oldat (5 perc, 20°C) hozzáadásával kontrasztosítottuk és transzmissziós elekron mikroszkóp alatt vizsgáltuk (CM10; Philips, Eindhoven, Hollandia). A képeket analySIS szoftver segítségével készítettük el.

## 5.2.7. Immunhisztokémia

A nyelőcső illetve pankreász mintákat 4 %-os formalinba fixáltuk majd paraffin-ba ágyaztuk és 5 µm-es metszeteket készítettünk. A metszeteket ezt követően automata rendszer segítségével festettük (Autostain, Dako, Glostrup, Dánia). Röviden, a metszetek deparafinnálását követően (2-szer 10 percig xilol-os, majd 2-szer 5 percig EtOH-os mosás) az endogén peroxidáz blokkolását 3%-os H2O2 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 tejporral, szobahőmérsékleten. Ezt követően a tengerimalac pankreász metszeteket anti-BK (1:400 hígitás; Alomone Labs, Jerusalem, Israel) poliklonális ellenanyaggal, míg a humán nyelőcső metszeteket anti-NHE1 (1:100 hígitás; Abcam, Cambridge, Anglia) és anti-NHE2 (1:50 hígitás; Chemicon, Temecula, CA, USA) monoklonális ellenanyaggal 30 percen át inkubáltuk, szobahőn. Az antigén ellenanayag kapcsolódást streptavidin-peroxidáz-al (LSAB2 kit, Dako, Glostrup, Dánia) mutattuk ki. Az immunreaktivitást 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB) kromagénnel vizualizáltuk. Pozitív festődést sötétbarna kromagén jelölte. A negatív kontrollként alkalmazott metszeteknél az elsődleges ellenanyag helyett PBS-el inkubáltuk a metszeteket. Továbbá az elsődleges ellenanyag specifitásának ellenőrzése végett egér IgG1 illetve csirke IgY izotipus kontroll-t alkalmaztunk.

#### 5.2.8. Apoptózis vizsgálat

Az apoptotikus sejthalál detektálására a terminál dezoxiribonukleotidil transzferázmediált 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.

#### 5.2.9. Western blot

A CP-A illetve CP-D sejtvonalakból hagyományos módszerrel összfehérjét izoláltunk. A fehérje koncentrációt Bradford módszer szerint (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, US) marha szérum albumin standard oldat segítségével határoztuk meg. 30 µg denaturált fehérjét NuPAGE Bis-Tris 4-12% gélen (Life Technologies, Carlsbad, CA, US) választottuk el. Az elektrotranszfert követően az Immobilon-P membránokat (Millipore, Billerica, MA, US) 5% tejpot 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 (1:10000 hígítás, Merck, Millipore, Burlington, MA, US). 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 (Amersham, ECL vagy ECL Prime, GE Healthcare, Life Sciences, Pittsburhg, PA, US) és a kapott jelet fényérzékeny röntgen filmre rögzítettük (Kodak Biomax Light filmk, Rochester, NY, US).

#### 5.2.10. Valós idejű PCR technika

A CP-A illetve CP-D sejtekből totál RNS-t izoláltunk Macherey-Nagel RNS izoláló kit (Nucleospin RNA II kit, Macherey-Nagel, Düren, Germany) felhasználásával a gyártó utasításának megfelelően. A mintákat felhasználásig -80°C-on tároltuk 30 U Prime RNáz inhibitor (Fermentas, Litvánia) jelenlétében. Az izolált RNS mennyiségét spektrofotométerrel (NanoDrop 3.1.0, Rockland, DE, US) ellenőriztük. Az NHE1, NHE2, NBC és Slc26a6 génexpresszió tanulmányozásához RotorGene 3000 készüléket (Corbett Research, Sydney, Ausztália) és TaqMan próbát (Applied Biosystem, Foster City, CA, US) használtunk. Nagy kapacitású cDNS Archive kit (Applied Biosystem, Foster City, CA, US) segítségével 3 µg totál RNS-t cDNS-é írtunk át a gyártó előírása szerint. A reverz transzkripciót termosztát-ban (MJ Research, Waltham, MA, US) 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 (Applied Biosystem, Foster City, CA, US) 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 fluorescens festék (FAM) intenzitását minden ciklus után detektáltuk. A mérések 96-os plate-n triplikátumokban történtek, a kontrol génnel párhuzamos reakcióban. Kontrol génként a konstitutívan expresszálódó, 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:  $\Delta C_T$  (célgén) -  $\Delta C_T$  (referencia gén), ahol  $\Delta C_T$  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) –  $\Delta C_T$  (kezeletlen, kontrol sejtek). Az n-szeres expressziós különbséget  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -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-nyelőcsöves mintákban doboz diagram-on ábrázoltuk és a csoportok közötti összehasonlításra Wilcoxon tesztet alkalmaztunk.

#### 5.2.11. Kísérletes akut pankreatitisz modell

Hím Sprague Dawley (SPRD) paktányokat használtunk a kísérletekhez, melyeket a kísérletek megkezdése előtt 12 órával éheztettünk. Az állatokat 4 csoportba osztottuk (n-6) az alábbiak szerint: (1) kontrol (intraduktálisan adott fiziológiás sóoldat), (2) UDCA (a patkányok szájon át UDCA-t kaptak), (3) CDCA (intraduktális CDCA-val pankreatitiszt váltottunk ki), (4) UDCA+CDCA (a patkányok szájon át UDCA-t kaptak és intraduktális CDCA-val pankreatitiszt váltottunk ki). Az UDCA-t (Dr. Falk Pharma Ltd.) 2 mL csapvízben oldottuk és két héten keresztül, szájon át adtuk (250 mg/ttkg/nap) az UDCA-val kezelt állatoknak. Az előkezelési protokollt irodalmi adatok alapján választottuk.[203, 204] A kontroll állatokat ugyanolyan mennyiségű csapvízzel itattuk. Az utolsó UDCA kezelést egy nappal a pankreatitisz indukció előtt hajtottuk végre. A patkányokat 50 mg/ttkg Ketamin és 10 mg/ttkg Xylazin intraperitoneális injektálásával altattuk. Medián laparotómia után a duodénumot átlyukasztottuk egy 26-os átmérőjű steril injekciós tűvel. A lyukon keresztül 0,4 mm átmérőjű polietilén csövet helyeztünk a pankreász kivezető csövébe, melyen keresztül 1 ml/kg 1%-os Na-CDCA sóoldatot (a kontrol állatokok esetében fiziológiás sóoldatot) retrográd adagoltunk 1 ml/perc sebességgel egy infúziós pumpa (TSE System GmbH, Hamburg, Németország) segítségével. Annak érdekében, hogy megakadályozzuk az epesav szivárgását a csövet egy csomóval rögzitettük a hasnyálmirigy vezetékéhez, a proximális epevezetéket pedig egy mikroklippel elzártuk. Az infúzió befejeztével mind a mikroklippet mind pedig az infúziós csövet eltávolítottuk és a duodénumot és a hasfalat összezártuk. A műtött állatokat 24 órával később feláldoztuk. Az altatást 50 mg/ttkg Na-pentobarbitálal végeztük. Az állatokat a vena cava inferioron keresztül kivéreztettük, majd a hasnyálmirigyet a lehető leggyorsabban eltávolítottuk. Ezt követően a pankreászt megtisztítottuk a zsírtól és egyéb kötőszövetes állománytól, lemértük és a pankreász farki részét eltávolítottuk. A pankreász fejet illetve testet hosszanti irányban kettévágtuk és egyik felét azonnal folyékony nitrogénbe tettük és a további felhasználásig -80°C-on tároltuk, míg a másik felét 6%-os formaldehid oldatba helyeztük. A vért lecentrifugáltuk (2500 g, 4 °C, 15 perc) és felhasználásig -20°C-on tároltuk. A szérum amiláz aktivitást kolorimetriás módszerrel (Diagnostikum, Budapest, Magyarország) határoztuk meg a kit-ben leírt utasításoknak megfelelően. Az abszorbanciát 405 nm hullámhosszon mértük egy FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, IronMaas Consulting Kft., Budapest, Magyarország) mikroplate olvasó segítségével. A formaldehidbe fixált mintákat paraffinba ágyaztuk és 4 µmes metszeteket készítettünk belőle. A metszeteket hematoxylin-eozin festékkel 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 nekrózisának mértéke (totál pankreász terület %-a). A sejtkárosodás mértékének a megállapításához az Image J szoftvert (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) használtuk.

## 5.2.12. 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 oszlopdiagrammokon az eredmények számtani középérték  $\pm$  szórás (SE) tüntettük fel, n a kísérletek elemszámát jelöli. A szignifikancia határát p≤0,05 értékben határoztuk meg.

## 5.3. 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 írattunk alá a beteggel, továbbá a kísérleteket a regionális humán orvosbiológiai kutatásetikai bizottság engedélyével (No. 2348) végeztük.

## 6. EREDMÉNYEK

# 6.1. Az epesavak és az alkohol hatása a pankreász duktális sejtekre

Az AP kialakulásában az epekövesség illetve a túlzott alkoholfogyasztás játszik elsődlegesen szerepet, ezért munkánk során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk mind az EtOH mind pedig az epesavak duktális sejtekre kifejtett hatását. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a hidrófób epesav, CDCA hatása a duktális HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekrécióra dózisfüggő. Alacsonyabb koncentrációban a CDCA serkenti, míg magasabb koncentrációban erőteljesen gátolja a duktális sejtek iontranszport folyamatait, különös tekintettel a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekrécióra.[163] Hasonló eredményeket kaptunk az EtOH vizsgálata során is, mely szintén eltérően befolyásolta a duktális HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréciót alacsonyabb illetve magasabb koncentrációban.[205] Annak érdekében, hogy feltárjuk azon sejten belüli folyamatokat, melyek e kettős hatás hátterében állnak további vizsgálatokat folytattunk. Jelen disszertációban azokat a jelátviteli útvonalakat szeretném bemutatni, melyek szerepet játszanak az epesavak illetve alkohol közvetítette hatásban illetve olyan új terápiás célpontokra szeretnék rávilágítani, amely talán kiindulópontot jelenthet a pankreatitisz terápiájának fejlesztésében.

## 6.1.1. A kenodezoxikólsav hatásának vizsgálata

## 6.1.1.1. A kenodezoxikólsav K<sup>+</sup> csatornákat aktivál a pankreász duktális sejteken

A pankreász duktális  $HCO_3^-$  szekréció több ion transzporter összehangolt működése révén valósul meg. A luminális membránon keresztüli szekrécióban közvetlenül a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő illetve a CFTR Cl<sup>-</sup> csatorna játszik alapvető szerepet. A CFTR csatorna mellett a luminális Cl<sup>-</sup> koncentráció fenntartásáért a CaCC felelős. Mivel a CaCC aktivációjához szükséges a megemelkedett (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> szint, feltételeztük, hogy a CDCA-stimulálta HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréció, a CaCC aktivációján keresztül valósul meg. Ennek igazolására patch clamp módszert alkalmazva megvizsgáltuk a CDCA hatását a csatorna aktivációjára. CsCl-tartalmú pipetta oldatot alkalmazva 100  $\mu$ M CDCA a vizsgálatok 20 %-ban (5/26 sejt) volt képes növelni a teljes sejtes áramot, melyből egyedül egy esetben sikerült igazolni a CaCC aktivációját. A fennmaradó 4 esetben feltehetőleg nem-szelektív kation áramot detektáltunk. Mivel az epesavak a GI traktus számos epitél sejtjében fokozzák a K<sup>+</sup> áramok konduktanciáját,[206, 207] a következőkben megvizsgáltuk vajon a CDCA képes-e K<sup>+</sup> csatornákat aktiválni. Ehhez a pipettaoldat összetételét megváltoztattuk és a CsCl helyett 120 mM KCl-ot alkalmaztunk. Ilyen körülmények között 100  $\mu$ M CDCA három-négyszeresére növelte a sejten mérhető áramerősséget, a vizsgált sejtek 75 %-ában (**7A ábra**). Az alap áramok erőssége 98 ± 18 pA/pF-ról 302 ± 45 pA/pF-ra emelkedett +60 mV-on. Az aktivált áramok jellegzetes kinetikát mutattak (**7B ábra**). Az aktiváció feszültség-függő volt mely a pozitív potenciáloknál jelentkezett, valamint az aktiváció hatására az E<sub>rev</sub> a negatív irányba tolódott el (-18,4 ± 2,8 mV), ami arra utal, hogy az aktivált áramok nagy része K<sup>+</sup> szelektív volt. A 7C összefoglaló ábrán jól látható, hogy a CDCA hatása 4-5 perc után érte el a maximumot.



7. ábra. A kenodezoxikólsav hatása a tengerimalac duktális sejtek ionáramaira. Az áramerősség méréséhez - 120 mV és +60 mV közötti feszültséglépcsőt alkalmaztunk 20 mV-os lépésekben, -80 mV-os tartófeszültségen. (A) Reprezentatív feszültséglépcsők a kezdeti (i), a CDCA-val stimulált (ii) illetve a CDCA kimosást követő (iii) állapotokat mutatják. (B) Az áram/feszültség (I/V) görbék elkészítéséhez az adott feszültségen mért áramerősség utolsó 5 ms-ának az átlagát használtuk. Az áramerősséget mind az alap (négyzet), a CDCA-val stimulált (gyémánt) illetve a CDCA kimosását követően (háromszög) mértük. Megfigyelhető, hogy a CDCA adása során az Erev a K<sup>+</sup> egyensúlyi vagy ekvilibrium potenciálja felé tolódott el. (C) A CDCA hatása az áram denzitásra +60 mV-nál. A CDCA hatása 2-3 perc után jelentkezik és 5 percnél éri el a maximumát. Az adatokat átlag  $\pm$  standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* = p≤0,05 vs. Kontroll.

## 6.1.1.2. A kenodezoxikólsav által aktivált K<sup>+</sup> csatornák karakterizálása

A következő lépésben célul tűztük ki, hogy azonosítjuk a CDCA által aktivált K<sup>+</sup> csatornát. Mivel korábbi eredményeink azt mutatták, hogy a CDCA hatására megemelkedik a  $(Ca^{2+})_{i}$ , ezért úgy gondoltuk, hogy a CDCA feltehetőleg valamilyen  $Ca^{2+}$ -aktiválta K<sup>+</sup> csatornát stimulál. Ismereteink szerint 3  $Ca^{2+}$ -aktiválta K<sup>+</sup> csatornát azonosítottak eddig: a nagy-konduktanciájú (BK<sub>Ca</sub> or maxi-K<sup>+</sup>), a közepes-konduktanciájú (IK<sub>Ca</sub>) és a kis-konduktanciájú (SK<sub>Ca</sub>)  $Ca^{2+}$ -aktiválta K<sup>+</sup> csatornát.



**8. ábra. Az iberiotoxin hatása a kenodezoxikólsav-indukálta K**<sup>+</sup> **áramokra. (A)** A teljes sejtes áramokat az 6. ábránál leírtak alapján mértük. A reprezentatív feszültséglépcsők (i) a kezdeti (Kontroll), (ii) 100  $\mu$ M CDCA-val stimulált, valamint (iii) 100  $\mu$ M CDCA + 100 nM IBT jelenlétében regisztrált állapotokat mutatják. (**B**) Az áram/feszültség (I/V) görbék elkészítéséhez az adott feszültségen mért áramerősség utolsó 5 ms-ának az átlagát használtuk. Az áramerősséget mind az alap (négyzet), a CDCA-val stimulált (gyémánt) illetve a CDCA kimosását követően (háromszög) mértük. Az adatokat átlag ± standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* = p≤0,05 vs. Kontroll.

Iberiotoxin (IBT) a BK<sub>Ca</sub> csatornákat képes specifikusan gátolni.[208] A 8A ábrán jól látható, hogy 100 nM IBT hatására a CDCA-aktiválta áramok szinte teljesen gátoltak és a membrán potenciál  $25,5 \pm 6,8$  mV-al depolarizálódott (**8B ábra**). Ezen eredmények összefoglalását mutatja az **8C ábra**. Megfigyelhető, hogy az IBT adására az áramerősség a kontroll érték alá csökkent, amely arra utal, hogy a duktális BK<sub>Ca</sub> csatornák alap állapotban is mutatnak némi aktivációt. TRAM 34 illetve az UCL 1684 specifikus gátlószerei a IK<sub>Ca</sub> és SK<sub>Ca</sub>

csatornáknak.[209, 210] 100 nM TRAM 34 vagy 300 nM UCL 1684 adása nem befolyásolta a CDCA-indukálta K<sup>+</sup> 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<sub>Ca</sub> csatornák aktivációjában, megvizsgáltuk, hogy a CDCA K<sup>+</sup> csatornát stimuláló hatása a  $(Ca^{2+})_i$  emelkedésén keresztül valósul-e meg. Első lépésben a citoplazmatikus  $Ca^{2+}$ -ot kelátoltuk EGTA-tartalmú pipetta oldat alkalmazásával. Ilyen körülmények között 5 mM EGTA adása teljes mértékben gátolta a CDCA BK<sub>Ca</sub> csatornákra kifejtett aktiváló hatását (**9A ábra**). Ezt követően megvizsgáltuk az extracelluláris  $Ca^{2+}$  elvonás hatását a CDCA-stimulálta K<sup>+</sup> áramokra, standard 0,2 mM EGTA-t tartalmazó pipettaoldatot alkalmazva. A 9B összefoglaló ábrán jól látható, hogy a CDCA a külső  $Ca^{2+}$  hiányában is képes volt fokozni a K<sup>+</sup> konduktenciát 110 ± 15 pA/pF-ról 183 ± 33 pA/pF-ra (+60 mV-nál). 2 mM extracelluláris  $Ca^{2+}$  adása további 31,5 ± 7,7 %-al növelte a CDCA hatását (263 ± 18 pA/pF +60 mV-nál). 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.



9. ábra. A Ca<sup>2+</sup> elvonás hatása a kenodezoxikólsav-indukálta K<sup>+</sup> áramokra. (A) A CDCA (100  $\mu$ M) hatása a teljes sejtes áramokra 5  $\mu$ M intracelluláris EGTA jelenlétében. (B) A CDCA (100  $\mu$ M) hatása a teljes sejtes áramokra Ca<sup>2+</sup>-mentes extracelluláris oldatban. Az adatokat átlag ± standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* = p≤0,05 vs. Kontroll.

## 6.1.1.3. A K<sup>+</sup> csatornák szerepe a kenodezoxikólsav-indukálta duktális HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekrécióban

A következő kísérletsorozatban azt vizsgáltuk, hogy a CDCA szekréciót stimuláló hatása a BK<sub>Ca</sub> csatornák aktivációján keresztül valósul-e meg. Ennek eldöntésére a CDCA stimuláló hatását luminálisan adott IBT jelenlétében vizsgáltuk. Ezeket a kísérleteket intakt

intra-, interlobuláris pankreász duktuszokon végeztük, melyeket mind a luminális mind pedig a bazolaterális membrán felől perfundáltunk. A  $HCO_3^-$  szekréció mértékét az  $NH_4Cl$  pulzus technika alkalmazásával mértük (**10A ábra**). Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy az alkalózisból történő regeneráció kezdeti szakaszának (az első 30 másodperc) meredeksége ( $\Delta pH/\Delta t$ ) a  $Cl^-/HCO_3^-$  kicserélő aktivitását tükrözi. A bazolaterális oldal felől adott IBT nem befolyásolta jelentősen a CDCA-indukálta  $HCO_3^-$  szekréció mértékét (**10A és B ábra**). Azonban a luminális membrán felől adott IBT jelenlétében a CDCA-indukálta  $HCO_3^-$  szekréció  $37,2 \pm 1,5$  mM/perc-ről  $19,1 \pm 0,7$  mM/perc-re csökkent. Ezzel szemben a luminálisan adott IBT nem befolyásolta a szekretin (100 nM), karbakol (10  $\mu$ M) vagy a luminális ATP (10  $\mu$ M) indukálta  $HCO_3^-$  szekréció mértékét.



**10. ábra. Az iberiotoxin hatása a CDCA-indukálta HCO3<sup>-</sup> szekréció mértékére.** A pankreász duktális  $HCO3^-$  szekréció mértékét (-*J*(B<sup>-</sup>/min)) az NH<sub>4</sub>Cl pulzus technika segítségével vizsgáltuk. (**A**) Reprezentatív pH<sub>i</sub> görbék 100 µM CDCA hatását mutatják bazolaterális illetve luminális iberiotoxin (100 nM) jelenlétében. (**B**) Összefoglaló oszlopdiagramm az NH<sub>4</sub>Cl pulzus

Ezen eredmények azt sugallják, hogy (1) a  $BK_{Ca}$  csatornák a duktális sejtek luminális 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<sub>4</sub>Cl pulzus technika alkalmazásával (**10C ábra**). A luminális membrán felől adott 3  $\mu$ M NS11021 fokozta a  $HCO_3^-$  szekréciót 72,2 ± 10,6%-al (28,3 ± 1,0 mM/perc), míg ezen szer inaktív formája (NS13558, 3  $\mu$ M) nem befolyásolta számottevően a szekréció mértékét.

## 6.1.1.4. A K<sup>+</sup> csatornák lokalizációja a pankreász duktális sejteken

Korábbi mérési eredményeink alapján azt feltételeztük, hogy a BK<sub>Ca</sub> csatornák a tengerimalac pankreász duktális sejtek luminális membránjára lokalizálódnak. Annak érdekében, hogy ezt a feltételezést alátámasszuk, immunfestést hatjtottunk végre tengerimalac pankreászon. Az elsődleges ellenanyag a BK<sub>Ca</sub> csatorna  $\alpha$  alegységével szemben lett termeltetve. Az immunfestés a BK<sub>Ca</sub> csatorna erős festődését mutatta az intra-interlobuláris duktuszokon illetve a Langerhans-szigeteken, ezzel szemben nem detektáltunk festődést az acinusokon valamint az intersticiumban (**11A ábra**). A **11B ábra** egy intralobuláris duktusz nagyított képét mutatja. A képen jól látható, hogy a BK<sub>Ca</sub> csatornák a duktusz luminális membránjára lokalizálódnak, míg a bazolaterális membrán nem mutatott festődést. A kontroll metszet esetében (elsődleges ellenanyag nélküli) nem tapasztaltunk festődést (**11C ábra**). Pozitív kontroll-ként tengerimalac epehólyagot használtunk.



11. ábra. A BK<sub>Ca</sub> csatornák lokalizációja tengerimalac pankreászban. Paraffinba ágyazott tengerimalac pankreász metszetek fénymikroszkópos felvétele. (A) A BK<sub>Ca</sub> csatornák erős festődése figyelhető meg a duktális sejtek apikális membránján illetve a Langerhans-szigetekben. Ezzel szemben az intersticium illetve az acinus sejtek nem mutattak specifikus festődést. (B) Interlobuláris duktusz nagyított képén jól látható, hogy a BK<sub>Ca</sub> csatornák a sejtek apikális membránjára lokalizálódnak. (C) A kontroll metszet esetében (nincs elsődleges ellenanyag) nem tapasztaltunk festődést. A: acinus, Ct: kötőszövet, D: pankreász duktusz, L: lumen.

## 6.1.1.5. Epesav transzporterek vizsgálata a pankreász duktális sejteken

A következő lépésben kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon a CDCA duktális sejekre 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 (**12. ábra**).



**12. ábra. Gpbar 1 festődés.** Az (A) illetve (B) ábrán formalin-fixált, fagyasztott tengerimalac pankreász immunfestése látható. (A) Pozitív Gpbar 1 festődés látható az acinusok apikális membránján, míg a duktális sejtek egyáltalán nem festődtek. (B) A kontroll metszet esetében (nincs elsődleges ellenanyag) nem tapasztaltunk festődést. A: acinus, D: pankreász duktusz.

## 6.1.2. Az urzodezoxikólsav hatásának a vizsgálata

## 6.1.2.1. Az urzodezoxikólsav hatása a pankreász duktális sejtek iontranszport folyamataira

Korábbi kísérleteink során kimutattuk, hogy a CDCA hatására jelentősen lecsökkent a duktális sejtek pH-ja (**13A és C ábra**) mind Hepes mind pedig HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-tartalmú extracelluláris oldatban.[163] Kíváncsiak voltunk, hogy vajon az eltérő biokémiai tulajdonságokkal rendelkező UDCA adására is megfigyelhető-e ilyen mértékű acidifikáció. Az UDCA növekvő koncentrációjával (0,1 - 1 mM-ig) vizsgáltuk izolált tengerimalac duktális fragmenteken a pH<sub>i</sub>-ben bekövetkező változásokat a korábban már leírt BCECF-AM, fluorescens festéket használva. A 13B és D ábrán jól látható, hogy az UDCA hatására egy dózis-függő pH csökkenés következett be. Érdekességként a Hepes-el bufferolt oldat esetében nagyobb mértékű különbség

2018



13. ábra. Az epesavak hatása az intracelluláris pH-ra izolált, tengerimalac pankreász duktuszokban. A pankreász duktális fragmenteket 0,1-1 mM kenodezoxikólsav-al (CDCA; A és C ábra) illetve urzodezoxikólsav-al (UDCA; B és D ábra) kezeltuk Hepes- (A és B ábra) illetve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-tartalmú (C és D ábra) extracelluláris oldatban 5 percig. Az epesavak elvonását követően az intracelluláris pH-t visszaállt a kiindulási szintre. Az összefoglaló oszlopdiagrammok a maximális pH változást mutatják ( $\Delta pH_{max}$ ) Hepes-t (E) illetve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>2</sub> –ot (F) tartalmazó oldat jelenlétében. A  $\Delta pH_{max}$  számításánál a kezdő pH-nak közvetlenül az epesav adása előtti pH értéket vettük. Az eredményeket átlag ± standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* = p≤0,05 vs. CDCA. n= 32-34 ROIs 4-5 duktuszból.

A nagy dózisú (1 mM) CDCA hatására gátlódik a sav-bázis transzporterek működése, ami a duktális HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-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 NH<sub>4</sub>Cl pulzus technika segítségével vizsgáltuk. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> hiányában az acidózisból történő regenerációban az NHE vesz többnyire részt. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> jelenlétében az alkalózisból történő regeneráció kezdeti szakaszáért a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő a felelős, míg az acidózisból történő regenerációban mind az NHE mind pedig az NBC szerepet játszik. Így ez a technika többféle iontranszporter egyidejű vizsgálatát teszi lehetővé. A kísérletek során két NH<sub>4</sub>Cl 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.





hatására erőteljesen csökkent az iontranszporterek aktivitása mind Hepes- (A) mind HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-tartalmú (C) extracelluláris oldatban. 0,5 illetve 1 mM UDCA előkezelés nagymértékben kivédte a CDCA gátló hatását mind az acidózisból mind pedig az alkalózisból történő regeneráció tekintetében. Az acidózisból történő regeneráció, Hepes-pufferolt oldat esetén a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> kicserélő aktivitását mutatja (C), míg HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>2</sub>-pufferolt oldat esetében a regeneráció az acidózisból (D) illetve alkalózisból (E) a Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kotranszporter és a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő aktivitását is tükrözi. Az eredményeket átlag ± standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* = p≤0,05 vs. kontroll. n = 36-41 ROIs 4-6 duktusztból. N.D.: nem detektálható.

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,[176, 211, 212, 213] megvizsgáltuk az UDCA előkezelés hatását a CDCA iontranszporter gátló hatására. Ehhez a következő lépésben különböző ideig (5 és 24 óra) előkezeltük 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 hatása 0,5 mM-nál bizonyult a leghatékonyabbnak, ezért a további kísérleteket az UDCA ezen koncentrációjával folytattuk tovább. A 14B, D és E ábrán a bázis áramok összefoglalása látható. A duktális fragmentek előkezelése UDCA-val jelentősen csökkentette a CDCA gátló hatását mind az NHE (**14B ábra**), mind a Cl<sup>-</sup>/HCO3<sup>-</sup> kicserélő (**14D ábra**), mind pedig az NBC (**14E ábra**) aktivitására.

## 6.1.2.2. Az urzodezoxikólsav előkezelés nem védi ki a kenodezoxikólsavindukálta Ca<sup>2+</sup> szignált

Számos tanulmányban leírták, hogy az epesavak-indukálta toxikus Ca<sup>2+</sup> szignál egy kezdeti lépés az AP kialakulásában.[109, 214, 215, 216] Korábbi kísérleteink során kimutattuk, hogy a CDCA magas koncentrációban (1 mM) jelentős mértékben megnöveli a sejten belüli Ca<sup>2+</sup> szintet.[163] A tartósan magas Ca<sup>2+</sup> 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<sup>2+</sup> felszabadulás csökkentése révén valósul-e meg. 0,5 mM UDCA nem okozott jelentősebb változást az (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> szintben. 1 mM CDCA hatására egy nagymértékű, részben reverzibilis Ca<sup>2+</sup> emelkedés volt megfigyelhető (**15A és B ábra**). A duktális fragmentek 0,5 mM UDCA-val történő 24 órás kezelése nem befolyásolta a CDCA- indukálta Ca<sup>2+</sup> szint emelkedést (**15A és B ábra**), ami arra utal, hogy az UDCA védő hatása nem a megemelkedett Ca<sup>2+</sup> szint kivédésén keresztül valósul meg.



**15. ábra. Az epesavak hatása a tengerimalac pankreász duktuszok intracelluláris Ca<sup>2+</sup> szintjére.** (A) Reprezentatív görbék a kenodezoxikólsav (CDCA; 1 mM) hatását mutatják önmagában, illetve 24 órás urzodezoxikólsav (UDCA; 0,5 mM) előkezelést követően. Az UDCA előkezelés nem volt képes kivédeni a CDCA Ca<sup>2+</sup> mobilizáló hatását. (B) Összefoglaló oszlopdiagramm a fluoreszcens intenzitásban bekövetkező maximális változást mutatja. Az eredményeket átlag ± standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* = p≤0,05 vs. kontroll. n = 35-40 ROIs 6-7 duktusztból.

## 6.1.2.3. Az urzodezoxikólsav védő hatása a mitokondriális funkcióra és morfológiára

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.[162] 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)<sub>i</sub> jól tükrözi a mitokondriumok működési állapotát. Az első lépésben megvizsgáltuk a CDCA hatását az (ATP)<sub>i</sub> szintre, UDCA előkezelés (24 óra, 0,5 mM) nélkül és mellett. Ahogy a 16A ábrán is látható 1 mM CDCA hatására jelentősen lecsökkent az (ATP)<sub>i</sub> szint. Ezzel szemben, 24 órás UDCA előkezelés mérsékelte a CDCA hatására kialakuló ATP csökkenést 57,6  $\pm$  3,6%-al, míg az UDCA kezelés önmagában nem befolyásolta az (ATP)<sub>i</sub> szintet (**16B ábra**).

Annak érdekében, hogy tovább vizsgáljuk az UDCA védő hatását a mitokondriumokra, megvizsgáltuk a  $\Delta \Psi_m$  és az mPTP, hogyan változik az epesavak adására. A  $\Delta \Psi_m$ -ban bekövetkező változások detektálásához 1  $\mu$ M TMRM-el inkubáltuk a duktuszokat. A

mitokondriális fluoreszcencia stabilizáció után, 1 mM CDCA-t adtunk a sejtekhez és a fluoreszcens intenzitásban bekövetkező változásokat rögzítettük. Ahogy a 17A ábrán látható, CDCA adására jelentősen megnövekedett a fluoreszcens intenzitás, ami arra utal, hogy a CDCA hatására egy nagyfokú mitokondriális depolarizáció következett be.



16. ábra. Az epesavak hatása a tengerimalac pankreász duktuszok intracelluláris ATP szintjére. (A) Reprezentatív görbék a kenodezoxikólsav (CDCA; 1 mM) hatását mutatják önmagában, illetve 24 órás urzodezoxikólsav (UDCA; 0,5 mM) előkezelést követően az intracelluláris ATP (ATP<sub>i</sub>) szintre. Az UDCA előkezelés jelentős mértékben csökkentette a CDCA ATP<sub>i</sub> depléciót okozó hatását. (B) Összefoglaló oszlopdiagramm a fluoreszcens intenzitásban bekövetkező maximális változást mutatja. Az eredményeket átlag  $\pm$ standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* = p≤0,05 vs. kontroll. n = 35-40 ROIs 6-7 duktusztból.



17. ábra. Az epesavak hatása a tengerimalac pankreász duktuszok mitokondriális membrán potenciáljára. (A) Reprezentatív görbék a kenodezoxikólsav (CDCA; 1 mM) hatását mutatják önmagában, illetve 24 órás urzodezoxikólsav (UDCA; 0,5 mM) előkezelést követően a mitokondriális membrán potenciálra ( $\Delta \Psi_m$ ). Az UDCA előkezelés jelentős mértékben csökkentette a CDCA-indukálta membrán depolarizációt. (B) Összefoglaló oszlopdiagramm a fluoreszcens intenzitásban bekövetkező maximális változást mutatja. Az eredményeket átlag ± standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* = p≤0,05 vs. kontroll. n = 35-40 ROIs 6-7 duktusztból.

A duktuszok UDCA-val történő előkezelése csökkentette a CDCA-indukálta depolarizáció mértékét 69,4  $\pm$  4,6 %-al (**17B ábra**). Mivel az ATP szint csökkenés illetve a mitokondriális membrán depolarizáció az mPTP indukció eredménye, a következő lépésben

megvizsgáltuk az epesavak hatását az mPTP nyitódására a kalcein-kobalt technikát alkalmazva. A kalcein-el előkezelt pankreász duktuszok 1 mM CDCA-val történő kezelése lecsökkentette a kalcein fluoreszcens intenzitását nagyjából 1 perccel az epesav adását követően (**18A ábra**). A  $\Delta\Psi_m$  kísérletekhez hasonlóan, a 24 órás UDCA előkezelés (0,5 mM) védő hatását fejtett ki a mitokondriumokra és csökkentette a CDCA-indukálta mPTP nyitódást 72,1 ± 4%-al. Az UDCA önmagában nem befolyásolta az mPTP-t (**18B ábra**).



18. ábra. Az epesavak hatása a tengerimalac pankreász duktuszok mitokondriális permeabilitás tranziciós pórusára. (A) Reprezentatív görbék a kenodezoxikólsav (CDCA; 1 mM) hatását mutatják önmagában, illetve 24 órás urzodezoxikólsav (UDCA; 0,5 mM) előkezelést követően a mitokondriális permeabilitás tranziciós pórusra (mPTP). Az UDCA előkezelés jelentős mértékben csökkentette a CDCA-indukálta mPTP nyitódást. (B) Összefoglaló oszlopdiagramm a fluoreszcens intenzitásban bekövetkező maximális változást mutatja. Az eredményeket átlag  $\pm$  standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* = p $\leq$ 0,05 vs. kontroll. n = 35-40 ROIs 6-7 duktusztból.

A mitokondriumok morfológiáját elektronmikroszkóp segítségével tanulmányoztuk (19A-D ábra). A mitokondriumok átlagos száma megegyezett a kontroll, a CDCA-kezelt, az UDCA-kezelt illetve a CDCA+UDCA-kezelt pankreász metszetekben. Nem tapasztaltunk morfológiai eltérést a kontroll illetve UDCA-kezelt csoportokban (19A és B ábra). Ezzel szemben, a duktuszok 5 perces inkubációja 1 mM CDCA-val mitokondriális hízáshoz és a mitokondriális belső membránszerkezet felbomlásához vezetett (19C ábra). Az UDCA-val előkezelt duktuszokban a CDCA nem okozott ilyen jellegű elváltozást a mitokondriumokban (19D ábra).

- 59 -



**19. ábra. Az epesavak hatása a tengerimalac pankreász duktuszok mitokondriumára.** A reprezentatív elektronmikroszkópos képeken jól látható, hogy a kontroll (A) és a 24 órás urzodezoxikólsav-al (UDCA) előkezelt (B) pankreász duktuszok mitokondriumai normál szerkezetűek, míg az 1 mM kenodezoxikólsav-al (CDCA) 5 percig kezelt duktuszok (C) esetében a mitokondriumok felhíztak, normál, belső membránszerkezetűk eltűnt. Az UDCA előkezelés (D) nagymértékben kivédte a CDCA-indukálta mitokondriális károsodást. A nyilak a mitokondriumokat jelölik.

## 6.1.2.4. Az urzodezoxikólsav kivédi a kenodezoxikólsav-indukálta sejthalált

A mitokondriális károsodás sok esetben együtt jár a sejthalálal, ezért a következő lépésben megvizsgáltuk, hogy a CDCA mitokondriumokra kifejtett toxikus hatása apoptózis-al társul-e. Ehhez a duktuszokat 5 percen keresztül inkubáltuk 1 mM CDCA-al, majd további 3 órán keresztül normál tápfolyadékban, annak érdekében, hogy időd 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 nekrózist lehet detektálni, az intakt sejtorganellumok és membrán jelenléte valamint a celluláris zsugorodás arra utal, hogy a CDCA hatására apoptózis következik be nem pedig nekrózis. A 24 órás UDCA előkezelés csak kis mértékű DNS fragmentációt okozott, azonban szingifikánsan csökkentette a CDCA-indukálta programozott sejtelhalást  $63,3 \pm 5,7$  %-al (**20A és B ábra**).





**20. ábra. Az urzodezoxikólsav hatása a kenodezoxikólsav-indukálta sejtelhalásra.** (A) A TUNEL-pozitív és hematoxilin-eozin festett pankreász duktális metszeteken jól látható, hogy a kenodezoxikólsav-as (CDCA) előkezelés (bal alsó kép) hatására az apoptózis jelentősen megnőtt a kontroll, kezeletlen duktuszokhoz (bal, felső kép) képest. Az urzodezoxikólsav (UDCA) 5 perces adása (0,5 m) nem okozott számottevő sejtelhalást (jobb, felső kép), azonban a 24 órás UDCA előkezelés (jobb, alsó kép) csökkentette a CDCA-indukálta apoptózis mértékét. (B) Az oszlop diagramm a TUNEL pozitív sejtek számát mutatja a totál sejtszám százalékában. Az eredményeket átlag  $\pm$  standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* = p≤0,05 vs. Kontroll, # = p≤0,05 vs. 1 Mm CDCA. n = 3-4.

## 6.1.2.5. Az urzódezoxikólsav védő szerepe epesav-indukálta pankreatitiszben

Annak érdekében, hogy az UDCA védő hatását in vivo körülmények közt is megvizsgáljuk, egy CDCA-indukálta pankreatitisz modellt alkalmaztunk. Model állatként patkányokat használtunk, mivel a tengerimalac esetében kivitelezhetetlen volt a CDCA intraduktális alkalmazása az anatómiai sajátságok miatt. A CDCA retrográd infúziója a pankreász duktuszba szignifikánsan megemelte a szérum amiláz szintet (983 ± 100 U/l) a kontroll, fiziológiás sóoldatot kapott csoporthoz képest (396 ± 50 U/l). A két hetes UDCA előkezelés nem befolyásolta a szérum amiláz szintet (424,7  $\pm$  20 U/l), azonban szignifikánsan csökkentette az UDCA + CDCA csoportban (582,7  $\pm$  50 U/l) a CDCA csoporthoz képest (21A ábra). A pankreász károsodás mértékét leginkább a szöveti nekrózis nagyságából lehet megítélni. A fiziológiás sóoldat intraduktális adása illetve az orális UDCA nem okozott nekrotikus sejtelhalást (21B és 22. ábra). Ezzel szemben a CDCA retrográd infúziója jelentős mértékű acinus károsodást eredményezett (14 ± 2%), amit az UDCA előkezelés jelentősen lecsökkentett (6 ± 2%, 21B ábra). A CDCA adására jelentősen megnőtt a pankreász víztartalma, melyet az UDCA előkezelés számottevően nem befolyásolt,(21C ábra) azonban az UDCA+CDCA csoportban szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a CDCA csoporthoz képest.



**21. ábra. Az urzodezoxikólsav előkezelés hatása a kenodezoxikólsav-indukálta pankreatitiszre patkányban.** A szérum amiláz aktivitás (A), a pankreász ödéma (B) és nekrózis (C) mértéke jelentősen megnőtt a kenodezoxikólsav (CDCA) intraduktális alkalmazása során. Két hetes, orális urzodezoxikólsavas (UDCA) előkezelés szignifikánsan csökkentette az fentebb említett paramétereket. F.S.: fiziológiás sóoldat. Az eredményeket átlag  $\pm$  standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* = p≤0,05 vs. Kontroll, # = p≤0,05 vs. 1 mM CDCA. n = 6 állat minden csoportban. N.D.: nem detektálható.



**22. ábra. Az urzodezoxikólsav előkezelés hatása a kenodezoxikólsav-indukálta pankreatitiszre patkányban.** A reprezentatív szövettani képek a kontroll, az urzodezoxikólsav-al (UDCA) előkezelt, a kenodezoxikólsav-al (CDCA) indukált pankreatitisz-es, valamint az UDCA-al előkezelt CDCA-al indukált pankreatitisz-es állatcsoportok hasnyálmirigyéről készült. A kontroll állatok fiziológiás sóoldatot kaptak a CDCA helyett. P.O: per os, I.D: intraduktális, f.s.: fiziológiás sóoldat. A mérce 100 µm-t reprezentál.

## 6.1.3. Az alkohol és nem-oxidatív metabolitjainak a hatásának a vizsgálata

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

Első lépésben megvizsgáltuk az EtOH hatását az alap és forskolin-stimulált CFTR áramra. Az EtOH 1 mM-os koncentrációban nem befolyásolta sem az alap sem pedig a forskolin-stimulált CFTR áramot, 15 perc adás után sem (**23C és F ábra**). 10 mM koncentráció esetén az alap áram szignifikánsan megemelkedett  $32,6\pm10,2$  %-al (+60 mV-nál, **23A-C ábra**), az EtOH 15 perces adását követően, míg 100 mM-os koncentrációban már 5 perc után erőteljesen fokozta a csatorna konduktanciáját (110,1±7,2 %, +60 mV-nál, **23A-C ábra**). A forskolin-stimulált CFTR áramot ezzel szemben mind 10 mind pedig 100 mM-os koncentrációban, feszültségfüggő módon gátolta az EtOH (31,4±9,6 % és 66,5±5,4 %, 15 min, 60 mV-nál, **23D-F ábra**). 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 (24,4±3,5-ről 97,5±22 pA/pF-ra, +60 mV-nál, **24A ábra**). 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 ozmozis megváltozása révén valósul meg. Mannitol adására a forskolin-stimulált áramok szignifikánsan megnőttek (49,7±10,2 %), ami arra utal, hogy az EtOH specifikusan gátolja a csatornát (**24B ábra**).

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 μM) az EtOH bomlásából származó, telítetlen zsírsav,

amely az EtOH-hoz hasonlóan nem befolyásolta az alap áramokat (**25A-C ábra**), azonban a stimulált áramokat 56,1±12,3%-al csökkentette 200 µM-os koncentrációban (**25D-F ábra**).



23. ábra. Az etanol hatása az alap- és forskolin-stimulált CFTR áramra tengerimalac pankreász duktális sejtekben. Az áramerősség méréséhez -100 és +100 mV közötti feszültséglépcsőt alkalmaztunk 20 mV-os lépésekben, 0 mV-os tartófeszültségen. A-C: alap CFTR áram. (A) Reprezentatív feszültséglépcsők a kezdeti (i), a 100 mM etanol-al (EtOH), 15 percig stimulált (ii) illetve az EtOH kimosást követő (iii) állapotokat mutatják. (B) Az áram/feszültség (I/V) görbék elkészítéséhez az adott feszültségen mért áramerősség utolsó 5 ms-ának az átlagát használtuk. Az áramerősséget mind az alap áramon (gyémánt), az EtOH-al stimulált áramon (négyzet) illetve ez EtOH kimosást követő en (háromszög) mértük. (C) Az összefoglaló oszlopdiagramm az EtOH (1, 10 és 100 mM) hatását mutatja az áram denzitásra +60 mV-nál. Az adatokat átlag ± standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* =  $p \le 0,05$  vs.

2018

Kontroll, n=10-13. **D-F:** forskolin-stimulált CFTR áram. (**D**) Reprezentatív feszültséglépcsők az alábbi állapotokat mutatják: (i) kezdeti, (ii) forskolin-stimulált (5  $\mu$ M), (iii) 100 mM EtOH, 15 perces jelenlétében regisztált, (iv) az EtOH elvonását követően regisztrált, (v) a forskolin elvonását követően regisztrált feszültséglépcsők. (**E**) Az áram/feszültség (I/V) görbék elkészítéséhez az adott feszültségen mért áramerősség utolsó 5 ms-ának az átlagát használtuk. Az áramerősséget mind az alap áramon (gyémánt), a forskolin-al stimulált áramon (négyzet), az EtOH (100 mM) jelenlétében (háromszög), illetve a forskolin kimosását követően mértük (kör). (**F**) Az összefoglaló oszlopdiagramm az EtOH (1, 10 és 100 mM) hatását mutatja a forskolin-stimulált áram denzitásra +60 mV-nál. Az áram denzitást a sejt kapacitanciára normalizáltuk. Az adatokat átlag ± standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* = p≤0,05 vs. forskolin, n=10-13.



24. ábra. A mannitol hatása az alap- és forskolin-stimulált CFTR áramra pankreász duktális tengerimalac sejtekben. összefoglaló Az oszlopdiagramm a mannitol (177 mM) hatását mutatja az alap (A) és a forskolin-stimulált (B) áram denzitásra +60 mV-nál. Az áram denzitást a sejt kapacitanciára normalizáltuk. Az adatokat átlag ± standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* = p≤0,05 vs. forskolin, n=6-7.

A telítetlen zsírsav, palmitolsav (POA), alacsony koncentrációban (10  $\mu$ M) nem befolyásolta sem az alap sem pedig a forskolin-al stimulált CFTR áramot (**26C és F ábra**). Ezzel szemben magasabb koncentrációban (100 és 200  $\mu$ M) egy dózis-függő gátlást okozott mind az alap (63,6±5,2 és 68,4±5,5% 60 mV-nál, **26A-C ábra**) mind pedig a forskolin-stimulált (72,1±4,2 és 70,1±6,7% 60 mV-nál, **26D-F ábra**) CFTR áramban. A POAEE és a POA gátló hatása 5 és 15 perc adás után ért el maximumot és a kimosást követően az áramok amplitudója visszaállt a kiindulási szintre.



25. ábra. A palmitolsav etil-észter (POAEE) hatása az alap- és forskolin-stimulált CFTR áramra tengerimalac pankreász duktális sejtekben. A teljes sejtes áramokat a 22. ábránál leírtaknak megfelelően mértük. A-C: alap CFTR áram. (A) Reprezentatív feszültséglépcsők az alap állapotot (i), az 5 perces palmitolsav etil-észter (POAEE, 200  $\mu$ M) hatását (ii), a 10 perces POAEE (200  $\mu$ M) hatását (iii), a 15 perces POAEE (200  $\mu$ M) hatását (iv) illetve a POAEE kimosást követő (v) állapotokat mutatják. (B) Az áram/feszültség (I/V) görbék elkészítéséhez az adott feszültségen mért áramerősség utolsó 5 ms-ának az átlagát használtuk. Az áramerősséget mind az alap áramon (gyémánt), a 15 perces POAEE (200  $\mu$ M) adását követően (négyzet) illetve a POAEE kimosását követő (c) Az összefoglaló oszlopdiagramm a POAEE (10, 100 és 200  $\mu$ M) hatását mutatja az áram denzitásra +60 mV-nál. Az áram denzitást a sejt kapacitanciára normalizáltuk. Az adatokat átlag  $\pm$  standard hiba (SE) ábrázoltuk. n=9-12. D-F: forskolin-stimulált CFTR áram. (D) Reprezentatív feszültséglépcsők az alábbi állapotokat mutatják: (i) kezdeti, alap állapot, (ii) forskolin-stimulált (5  $\mu$ M), (iii) 200  $\mu$ M POAEE, 15 perces jelenlétében regisztált, (iv) a POAEE elvonását követően regisztrált, (v) a forskolin

elvonását követően regisztrált feszültséglépcsők. (E) Az áram/feszültség (I/V) görbék elkészítéséhez az adott feszültségen mért áramerősség utolsó 5 ms-ának az átlagát használtuk. Az áramerősséget mind az alap áramon (gyémánt), a forskolin-al stimulált áramon (négyzet), a POAEE (200  $\mu$ M) jelenlétében (háromszög), illetve a forskolin kimosását követően mértük (kör). (F) Az összefoglaló oszlopdiagramm a POAEE (10, 100 és 200  $\mu$ M) hatását mutatja a forskolin-stimulált áram denzitásra +60 mV-nál. Az áram denzitást a sejt kapacitanciára normalizáltuk. Az adatokat átlag ± standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* = p≤0,05 vs. forskolin, n=8-10.

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 pankreászban a legnagyobb. Számos FAEE szintázt azonosítottak, melyek közül a pankreász koleszterol észter szintáz illetve a pankreász 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 μM 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 forskolinstimulált ionáramokra (187,3±12,9-ről 141,6±4,7 pA/pF-ra; 15 perc-es POAEE adás +60 mVnál). Ezen eredmények azt mutatják, hogy a POA képződése alapvetően fontos szerepet játszik a POAEE/EtOH gátló hatásában.

## 6.1.3.2. Az alkohol és nem-oxidatív metabolitjainak a hatását az intracelluláris ATP szint csökkenése közvetíti

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 (ATP<sub>i</sub>) közvetett vizsgálatát teszi lehetővé. 100 mM EtOH hatására a sejtek 75%-ában egy kis mértékű csökkenést figyeltünk meg az ATP<sub>i</sub> szintben (**27A-C ábra**), míg a POA és POAEE esetében (200  $\mu$ M) jelentősen megnőtt a MgGreen fluoreszcens intenzitása, amely körülbelül 5 perc adás után ért el egy plató fázist (**27A-C ábra**).



26. ábra. A palmitolsav (POA) hatása az alap- és forskolin-stimulált CFTR áramra tengerimalac pankreász duktális sejtekben. A teljes sejtes áramokat a 22. ábránál leírtaknak megfelelően mértük. A-C: alap CFTR áram. (A) Reprezentatív feszültséglépcsők az alap állapotot (i), az 5 perces palmitolsav (POA, 200  $\mu$ M) hatását (ii), a 10 perces POA (200  $\mu$ M) hatását (iii), a 15 perces POA (200  $\mu$ M) hatását (iv) illetve a POA kimosást követő (v) állapotokat mutatják. (B) Az áram/feszültség (I/V) görbék elkészítéséhez az adott feszültségen mért áramerősség utolsó 5 ms-ának az átlagát használtuk. Az áramerősséget mind az alap áramon (gyémánt), a 15 perces POA (200  $\mu$ M) adását követően (négyzet) illetve a POA kimosását követően (háromszög) mértük. (C) Az összefoglaló oszlopdiagramm a POA (10, 100 és 200  $\mu$ M) hatását mutatja az áram denzitásra +60 mV-nál. Az áram denzitást a sejt kapacitanciára normalizáltuk. Az adatokat átlag ± standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* = p≤0,05 vs. kontroll, n=8-10. **D-F:** forskolin-stimulált CFTR áram. (**D**) Reprezentatív feszültséglépcsők az alábbi állapotokat mutatják: (i)

kezdeti, alap állapot, (ii) forskolin-stimulált (5  $\mu$ M), (iii) 200  $\mu$ M POA, 15 perces jelenlétében regisztált, (iv) a POA elvonását követően regisztrált, (v) a forskolin elvonását követően regisztrált feszültséglépcsők. (E) Az áram/feszültség (I/V) görbék elkészítéséhez az adott feszültségen mért áramerősség utolsó 5 ms-ának az átlagát használtuk. Az áramerősséget mind az alap áramon (gyémánt), a forskolin-al stimulált áramon (négyzet), a POA (200  $\mu$ M) jelenlétében (háromszög), illetve a forskolin kimosását követően mértük (kör). (F) Az összefoglaló oszlopdiagramm a POA (10, 100 és 200  $\mu$ M) hatását mutatja a forskolin-stimulált áram denzitásra +60 mV-nál. Az áram denzitást a sejt kapacitanciára normalizáltuk. Az adatokat átlag ± standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* = p≤0,05 vs. forskolin, n=8-10.

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<sub>i</sub> depléciót okoz a tengerimalac duktális sejtekben.[162] Annak eldöntésére, hogy az EtOH, POA és POAEE gátló hatása az ATP<sub>i</sub> 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<sub>i</sub> elvonása irreverzibilis gátlást okozott a CFTR csatorna aktivitásában.



27. ábra. Az etanol, palmitolsav és palmitolsav etil-észter csökkenti az intracelluláris ATP szintet tengerimalac duktális sejtekben. (A) Reprezentatív fluoreszcens görbék az etanol (EtOH, 100 mM), palmitolsav (POA, 200  $\mu$ M) és palmitolsav etil-észter (POAEE, 200  $\mu$ M) hatását mutatják az intracelluláris ATP (ATP<sub>i</sub>) szintre, 15 perc adás után. A fluoreszcens intenzitásban bekövetkező emelkedés az ATP<sub>i</sub> szint csökkenését jelenti. (B) Az összefoglaló oszlopdiagramm a fluoreszcens intenzitásban bekövetkező maximális változást mutatja. Az

2018

adatokat átlag ± standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* =  $p \le 0,05$  vs. Kontroll, n=25-30 ROIs/3-5 duktusz. (C) A fény (1) illetve fluoreszcens mikroszkópos (2 és 3) felvételeken izolált pankreász duktális sejtek láthatóak az EtOH (100 mM), POA (200  $\mu$ M) és POAEE (200  $\mu$ M) adása előtt (2) és után (3). (**D** és **E**) Az összefoglaló oszlopdiagramm a karbonil cianid m-klorofenil hidrazon (CCCP, 100  $\mu$ M) és 2-dezoxiglükóz/iodoacetamid (DOG/IAA, 10 mM) kombinált hatását mutatja az alap (**D**) és forskolin-stimulált (**E**) CFTR áram denzitásra +60 mV-nál. Az áram denzitást a sejt kapacitanciára normalizáltuk. Az adatokat átlag ± standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* =  $p \le 0,05$  vs. kontroll vagy forskolin, n=3. N.D.: nem detektálható.

## 6.1.3.3. Az intracelluláris ATP adása helyreállítja a CFTR csatorna működését

A következő lépésben kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon az ATP<sub>i</sub> helyreállítása hogyan befolyásolja az EtOH, POA és POAEE, CFTR csatornára kifejtett gátló hatását.



28. ábra. Intracelluláris ATP adása kivédi az etanol, palmitolsav és palmitolsav etil-észter CFTR csatornára kifejtett gátló hatását tengerimalac duktális sejteken. Az összefoglaló oszlopdiagramm az (A) etanol (100 mM), (B) palmitolsav etil-észter (200  $\mu$ M) és (C) palmitolsav (200  $\mu$ M) hatását mutatja a forskolin-stimulált áram denzitásra +60 mV-nál. (D) A palmitolsav (200  $\mu$ M) hatása az alap CFTR áram denzitásra +60 mV-nál. Az áram denzitást a sejt kapacitanciára normalizáltuk. Az adatokat átlag ± standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* = p≤0,05 vs. forskolin, \*\* = p≤0,05 vs. kontroll, n=5-10.

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, az ATP koncentrációjának emelése 5 mM-ra, teljesen kivédte az EtOH, POAEE és POA, CFTR csatornára kifejtett gátló hatását (**28A-D ábra**). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a CFTR csatorna gátlása feltehetőleg az ATP<sub>i</sub> szint csökkenésével vagy az ATP<sub>i</sub>-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 pankreász duktális sejteknez hasonlóan 200  $\mu$ M POA csökkentette a forskolin-stimulált CFTR áramokat 69,7±3,2%-al (86,7±7,1-ről 27,7±6,8 pA/pF-ra, +60 mV-nál, **29A és B ábra**). 2 mM ATP<sub>i</sub> adása nem befolyásolta a POA gátló hatását, azonban 5 mM ATP<sub>i</sub> jelenlétében a POA gátló hatása szignifikánsan lecsökkent 36,1±3,2%-ra.



**29. ábra. Intracelluláris ATP adása kivédi a palmitolsav CFTR csatornára kifejtett gátló hatását Capan-1 sejteken. (A)** Reprezentatív feszültséglépcsők a kezdeti (i), a forskolin-stimulált (5  $\mu$ M) (ii) és a 200  $\mu$ M palmitolsav (POA), 15 perces jelenlétében regisztált (iii) állapotokat mutatják 1 mM (felső sor) és 5 mM intracelluláris ATP (alsó sor) jelenlétében. (B) Az összefoglaló oszlopdiagramm a POA (200  $\mu$ M) hatását mutatja a forskolin-stimulált áram denzitásra +60 mV-nál. Az áram denzitást a sejt kapacitanciára normalizáltuk. Az adatokat átlag ± standard hiba (SE) ábrázoltuk. a = p≤0,05 vs. forskolin, b = p≤0,05 vs. 1 mM ATP, n=8-12.
## 6.2. Az epesavak hatása a nyelőcső epitél sejtekre

### 6.2.1. pH szabályozó mechanizmusok a nyelőcső epitél sejteken

A kísérletek első részében a nyelőcső epitél sejtek kezdő pH értékét határoztuk meg. A CP-A és CP-D sejteket 5 percig mostuk különböző pH-jú (7,28, 7,4 és 7,6), magas K<sup>+</sup>/nigericintartalmú Hepes oldattal. A kezdő pH meghatározásához a klasszikus lineáris modell-t alkalmaztuk.[201, 202] 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. Az NHE egy elektroneutrális transzporter, amely szabályozza a H<sup>+</sup> kiáramlását a sejtből ez által alkalizálja a sejtet. Az extracelluláris Na<sup>+</sup> elvonásával ezen transzporter aktivitását lehet vizsgálni. Na<sup>+</sup>-mentes Hepes oldatban egy gyors intracelluláris acidifikáció volt megfigyelhető a CP-A sejteknél, feltehetőleg az NHE gátlása miatt (30A ábra). A korábban már említett NH<sub>4</sub>Cl pulzus technika esetén, azt találtuk, hogy az acidózisból történő regeneráció Na<sup>+</sup> hiányában elmaradt (**30B ábra**), ami alátámasztja az NHE jelenlétét ezen sejteken. Hasonló eredményeket kaptunk a CP-D sejtek esetében is, ami arra utal, hogy mindkét sejtvonal funkcionálisan aktív NHE-t expresszál. Ismereteink szerint eddig 9 különböző NHE izoformát azonosítottak, melyek eltérő szabályozással és expressziós mintázattal rendelkeznek az emberi szervezetben. Annak érdekében, hogy azonosítsuk, hogy a CP-A illetve CP-D sejtek mely izoformákat expresszálják további funkcionális vizsgálatokat végeztünk. A HOE-642 szelektíven gátolja az NHE működését és hatása az egyes izoformákra dózisfüggő. 1 µM koncentrációban csak az NHE1 izoformát gátolja, míg 50 µM koncentrációban mind az NHE1 mind pedig az NHE2 működését blokkolja. Az NH<sub>4</sub>Cl pulzus technikát használva kimutattuk, hogy 1 µM HOE-642 77,3 ± 3,0 %-al gátolta az acidózisból történő regenerációt a CP-A sejtek esetében és 70,0  $\pm$  0,3 %-al a CP-D sejteknél. 50  $\mu$ M HOE-642 jelenlétében pedig nem tapasztaltunk regenerációt (30C és D ábra).

Az NHE mellett az NBC is fontos szerepet játszik az epitél sejtek pH szabályozásában.[105, 217, 218] Az NBC egy elektrogén transzporter, amely a Na<sup>+</sup> és HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> felvételét szabályozza 1:2 sztöhiometriával. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>2</sub> jelenlétében a sejtek pH<sub>i</sub>-ja gyorsan lecsökken a CO<sub>2</sub> sejtbe történő diffúziója révén (**31A ábra**). Egy kismértékű regeneráció megfigyelhető volt a pH<sub>i</sub>-ban, ami feltehetőleg a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> sejtbe történő felvételéből származik, az NBC-n keresztül.



**30. ábra. A Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> kicserélő aktivitásának a vizsgálata a nyelőcső epitél sejteken. (A)** A Na<sup>+</sup> elvonása a standard Hepes oldatból gyors és jelentős intracelluláris acidózist okozott a CP-A sejtekben, ami alátámasztja egy Na<sup>+</sup>-függő pH szabályozó mechanizmus jelenlétét. (B) Az acidózisból történő regeneráció a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> kicserélő (NHE) aktivitását tükrözi. A második NH<sub>4</sub>Cl pulzus esetében a Na<sup>+</sup>-ot elvontuk az extracelluláris oldatból 10 percel a pulzus előtt, a pulzus alatt és 10 percel a pulzus után. (C) A reprezentatív pH görbék az acidózisból történő regenerációt (J(B<sup>-</sup>)) mutatják 1 és 50  $\mu$ M HOE-642 jelenlétében. (D) Az összefoglaló oszlopdiagramm az acidózisból történő regeneráció mértékét mutatja az NHE szelektív inhibitor, HOE-642 jelenlétében. A *J*(B<sup>-</sup>) értékét a regeneráció első 60 másodpercében mért meredékségből ( $\Delta$ pH/ $\Delta$ t) számoltuk a sejt bufferkapacitását is figyelembe véve. Az eredményeket átlag ± standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* = p≤0,05 vs. Kontroll. n = 15-25. N.D.: nem detektálható.

A Na<sup>+</sup> elvonása hasonló mértékű acidózist indukált a CP-A sejtekben, mint a Hepes-tartalmú oldat esetén. Az NBC jelenlétének az igazolására további vizsgálatokat végeztünk. A H<sub>2</sub>DIDS gátolja mind az NBC mind pedig a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő működését. A CO<sub>2</sub>-indukálta acidózisból történő regenerációt 500  $\mu$ M H<sub>2</sub>DIDS teljes mértékben blokkolta, azonban a gátlószer elvonását követően a regeneráció megfigyelhető volt (**31B ábra**). Mivel a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő nem játszik szerepet az acidózisból történő regenerációban, úgy gondoljuk, hogy funkcionálisan aktív NBC van jelen a CP-A sejteken. A kísérleteket a CP-D sejteken is megismételtük, ahol szintén sikerült igazolni az NBC jelenlétét. Annak érdekében, hogy megbecsüljük az NHE és NBC részvételét a sejt alkalizálásában, a H<sub>2</sub>DIDS (500  $\mu$ M) és HOE-642 (50  $\mu$ M) hatását külön-külön illetve együtt adva vizsgáltuk az acidózisból történő regenerációra (**31C és D ábra**). Az H<sub>2</sub>DIDS és a HOE-642 ugyanakkora mértékben csökkentette az acidózisból történő regenerációt, míg együttes adásuk teljesen megszüntette.

Végül megvizsgáltuk, hogy a CP-A illetve CP-D sejtek rendelkeznek-e funkcionálisan aktív Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélővel. A Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő aktivitását az extracelluláris Cl<sup>-</sup> elvonásával vizsgáltuk a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> jelenlétében és hiányában. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> hiányában a Cl<sup>-</sup> elvonás csak egy nagyon kismértékű és reverzibilis alkalizációt indukált a CP-A sejtekben (**32A ábra**). Ezzel szemben a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>2</sub>-bufferolt oldatban lényegesen nagyobb alkalizáció volt megfigyelhető, ami arra utal, hogy a CP-A sejtek funkcionálisan aktív Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélőt expresszálnak (**32B ábra**). A CP-D sejtek esetében egy erőteljes alkalizáció szintén megfigyelhető volt a Cl<sup>-</sup> elvonását követően a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-ot tartalmazó externális oldaban, ami igazolja a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő jelenlétét a CP-D sejteken is.



**31.** ábra. A Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kotranszporter aktivitásának a vizsgálata a nyelőcső epitél sejteken. (A) A reprezentatív pH görbék a Na<sup>+</sup> elvonás hatását mutatják a CP-A sejteken HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> jelenlétében. (B) 500  $\mu$ M H<sub>2</sub>DIDS hatására teljesen megszűnt az acidózisból történő regeneráció. (C) A reprezentatív pH görbék a H<sub>2</sub>DIDS (500  $\mu$ M) és a HOE-642 (50  $\mu$ M) hatását mutatják az acidózisból történő regenerációra HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> jelenlétében. Az H<sub>2</sub>DIDS és

a HOE-642 1 percel az NH<sub>4</sub>Cl pulzus előtt és 2 percel a pulzus után lett adva. (**D**) Az összefoglaló oszlopdiagramm az NBC (HOE-642 jelenlétében) és NHE (H<sub>2</sub>DIDS jelenlétében) aktivitását mutatják. A regeneráció mértékét (J(B<sup>-</sup>)) a ábrán-nál leírt módon számoltuk. Az eredményeket átlag  $\pm$  standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* = p≤0,05 vs. Kontroll. n =15-25. N.D.: nem detektálható.



**32. ábra. A Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő aktivitásának a vizsgálata a CP-A sejteken.** A Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő aktivitását a Cl<sup>-</sup> elvonásos technikával vizsgáltuk a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> jelenlétében és hiányában. Hepes oldatban (**A**) a Cl<sup>-</sup> elvonása (5 perc) nem befolyásolta számottevően az intracelluláris pH-t. Ezzel szemben, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>2</sub>-tartalmú oldat esetén (**B**) jelentős alkalózis volt megfigyelhető, ami funkcionálisan aktív Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő jelenlétére utal a CP-A sejteken.

### 6.2.2. Az epesavak intracelluláris acidózist indukálnak a nyelőcső epitél sejtekben

Annak érdekében, hogy mimikáljuk a GERD során fellépő patológiás körülményeket, egy epesav koktélt (BAC) készítettünk, mely 7 db, a refluxátumban előforduló epesavat tartalmazott. [219] A BAC hatását mind neutrális (pH 7,5) mind pedig acidikus (pH 5,5) körülmények között teszteltük a pHi-ra. A neutrális pH-n 100 illetve 300 µM BAC-nak nem volt hatása a pH<sub>i</sub>-ra, míg magasabb koncentrációnál (500  $\mu$ M) az epesavak enyhén csökkentették a CP-A sejtek pH<sub>i</sub>-ját (0,1  $\pm$  0,03; **33A ábra**). 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<sub>i</sub> teljes mértékben regenerálódott (**33B ábra**). Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy az epesavak hatása specifikus megvizsgáltuk a savas pH hatását önmagában a CP-A sejtek pHi-ra. Bár az 5,5-ös pH-jú Hepes oldat kis fokú, reverzibilis acidózist indukált a sejtekben (7,32  $\pm$  0,01-ről 7,26  $\pm$  0,01-re; **33D ábra**) az epesavakkal kombinációban lényegesen nagyobb pHi csökkenést okozott. A pHi-ban bekövetkező maximális változásokat (ΔpH<sub>max</sub>) a 33C és D ábrán foglaltuk össze. Továbbá megvizsgáltuk az epesavak sejtbe jutásának a sebességét is  $(-J(B^{-}))$ . A  $-J(B^{-})$ -t az időegység alatti pH változásból számoltuk ( $\Delta pH/\Delta t$ ) az epesav adását követő 60 másodpercben. Az eredményeink azt mutatták, hogy a  $-J(B^{-})$  lényegesen nagyobb volt 5,5-ös pH-n (**33F ábra**), mint 7,5-ön (**33E ábra**).



**33. ábra. Az epesavak hatása a CP-A sejtek intracelluláris pH-jára.** A CP-A sejteket 100, 300 és 500  $\mu$ M epesav koktélal (BAC) kezeltük 5 percig pH 7.5-ön (A) és pH 5.5-ön (B). Összefoglaló oszlopdiagramm a BAC hatását mutatja a maximális intracelluláris pH változásra ( $\Delta pH_{max}$ ) (C és D) és a bázis áramra ((- $J(B^-)$ ) (E és F). A - $J(B^-)$  értékét az epesav adását követő 60 másodpercben mért meredékségből ( $\Delta pH/\Delta t$ ) számoltuk a sejt

bufferkapacitását is figyelembe véve. A  $-J(B^{-})$  számolásához a kezdő pH értéknek közvetlenül az epesav adását megelőző értéket vettük. (G) Az egyes epesavak hatása (100  $\mu$ M) a  $\Delta$ pH<sub>max</sub>-ra 7.5-ös és 5.5-ös pH-n. Az eredményeket átlag ± standard hiba (SE) ábrázoltuk. n = 15-25. N.D.: nem detektálható. DC: dezoxikólsav, TC: taurokólsav, TDC: taurodezoxikólsav, GC: glikokólsav, GDC: glikodezoxikólsav, GCDC: glikokenodezoxikólsav, TCDC: taurokenodezoxikólsav.

Az egyes epesavak hatását (100  $\mu$ M) a pH<sub>i</sub>-ra szintén teszteltük. Az epesavak közül a DC okozta a legnagyobb pH<sub>i</sub> csökkenést és a hatása kétszer akkora volt savas pH-n mint neutrális pH-n (**33G ábra**). A konjugált epesavak hatása 7,5-ös pH-n elenyésző volt, míg 5,5-ös pH-n nagyfokú acidózist indukáltak (**33G ábra**).

# 6.2.3. Az epesavak megemelik az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> szintet a nyelőcső epitél sejtekben

Mivel az epesavak ionofor tulajdonságokkal rendelkeznek, [220, 221] megvizsgáltuk a hatásukat a (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub>-ra, neutrális és savas körülmények között. Hasonlóan a pH-hoz 100 és 300 µM-os koncentrációban, az epesavak nem befolyásolták lényegesen a (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> szintet (**34A és B** ábra). A 5,5-ös pH-jú Hepes oldat, szintén csak marginális hatást fejtett ki (34D ábra). Ezzel szemben, 500 µM-os koncentrációban, az epesavak egy reverzibilis emelkedést okoztak, ami savas pH-n még hangsúlyozottabb volt (**34A és B ábra**). A következő lépésben megpróbáltuk azonosítani a felszabaduló  $Ca^{2+}$  forrását. Az epesavak hatását a  $(Ca^{2+})_i$  -ra kétféleképpen vizsgáltuk, egyrészt az extracelluláris Ca<sup>2+</sup> elvonásával, másrészt különböző inhibitorok alkalmazásával. A Ca<sup>2+</sup> elvonása a külső oldatból kis mértékben csökkentette a (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> szintet ami egy bizonyos mértékű (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> deplécióval magyarázható. Ilyen körülmények között, 500 µM BAC hatására kismértékű (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> emelkedés volt megfigyelhető, ami arra utal, hogy az epesavak hatására az intracelluláris organellumokból szabadul fel a Ca<sup>2+</sup> (34E ábra). A következő lépésben megpróbáltuk azonosítani a Ca<sup>2+</sup> forrását. A Ruthenium Red (RR) és a koffein, a rianodin (RY) és az IP3 receptorok specifikus inhibitora. 10 µM RR nem befolyásolta az epesavak-indukálta ( $Ca^{2+}$ )<sub>i</sub> szignált,  $Ca^{2+}$  mentes extracelluláris oldatban. Ezzel szemben, 20 mM koffein teljes mértékben blokkolta azt, ami azt sugallja, hogy az epesavak hatására létrejövő Ca<sup>2+</sup> szignál az endoplazmatikus retikulumból szabadul fel. Az epesavak hatását gadolinium (Gd<sup>3+</sup>), plazma membrán Ca<sup>2+</sup> csatorna gátló, jelenlétében is vizsgáltuk. 1 µM Gd<sup>3+</sup> hatására csökkent a BAC hatása a  $(Ca^{2+})_i$  szintre 58,83 ± 1,3 %-al (**34E ábra**), ami arra utal, hogy amellett, hogy az epesavak indukálják a Ca<sup>2+</sup> felszabadulását az intracelluláris organellumokból, az extracelluláris Ca<sup>2+</sup> beáramlást is fokozzák.



**34. ábra. Az epesavak hatása a CP-A sejtek intracelluláris Ca<sup>2+</sup> szintjére.** A reprezentatív kísérleti görbék a 100, 300 és 500  $\mu$ M epesav koktél (BAC) hatását mutatják 7,5-ös (A) illetve 5,5-ös (B) pH-n a CP-A sejtek intracelluláris Ca<sup>2+</sup> ((Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub>) szintjére. Az összefoglaló oszlopdiagrammok az epesav-indukálta (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> változásokat mutatják 7,5 (C) és 5,5-ös (D) pH-n. Az értékek a kezdeti (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> szint (F<sub>0</sub>) százalékában lettek kifejezve. (E) 500  $\mu$ M BAC hatása a (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> szintre extracelluláris Ca<sup>2+</sup> hiányában, koffeine (20 mM), ruthenium red (10  $\mu$ M) valamint gadolinium (1  $\mu$ M) jelenlétében. Az eredményeket átlag ± standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* = p≤0,05 vs. 500  $\mu$ M BAC. n =15-25. N.D.: nem detektálható.

#### 6.2.4. Az epesavak akut hatása az iontranszporterek aktivitására

A következő lépésben kíváncsiak voltunk arra, hogy az epesavak hogyan befolyásolják a nyelőcső epitél sejtek sav/bázis transzportereinek az aktivitását. 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 (35A és B ábra). Annak érdekében, hogy azonosítsuk melyik NHE izoforma érintett az epesavak gátló hatásában, az epesavak hatását megvizsgáltuk az NHE gátlószer, HOE-642 jelenlétében is. 1 µM HOE-642 az acidózisból történő regenerációt 7,68  $\pm$  1,11-ről 1,78  $\pm$  0,2-re csökkentette. 500  $\mu$ M BAC adása tovább csökkentette a regenerációt 0,56 ± 0,09-re (35C ábra). Mivel 500 µM 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 µM HOE-642 jelenlétében az acidózis teljesen gátlódott, amit az epesavak további adása nem befolyásolt. HCO3<sup>-</sup> jelenlétében az epesavak kisebb mértékben gátolták az acidózisból történő regenerációt (100  $\mu$ M BAC esetében 42,56  $\pm$  2,8 %, 300  $\mu$ M BAC esetében 47,09  $\pm$  2,6 %, 500  $\mu$ M BAC esetében 50  $\pm$  4,2 %; **35D és E ábra**) mint Hepes-bufferolt oldatban. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> jelenlétében mind az NHE mind pedig az NBC aktív. Annak érdekében, hogy megvizsgáltjuk az epesavak hatását az NBC működésére, az NHE működést 50 µM HOE-642 adásával teljesen gátoltuk. Az NHE gátlószer csökkentette az acidózisból történő regenerációt  $18,9 \pm 2,47$ -ről  $7,85 \pm 1,44$ -re, így a fennmaradó aktivitás az NBC-nek tudható. 500 µM BAC adására az acidózisból történő regeneráció  $14,88 \pm 1,42$ -re nőtt (**35F ábra**), ami arra utal, hogy az epesavak fokozzák az NBC aktivitását. Ahogy azt már korábban is kimutattuk, az alkalózisból történő regeneráció kezdeti szakasza a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő aktivitását mutatja, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> jelenlétében. Az epesavas kezelés hatására a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő aktivitása dózis függően megnőtt a CP-A sejtekben (**35D és G** ábra), ami arra utal, hogy az epesavak fokozzák a HCO3<sup>-</sup> szekréciót. Az epesavak hatását megvizsgáltuk a CP-D sejtvonalon is, ahol azt kaptuk, hogy az epesavak hatására megnőtt mind Hepes-ben (35B ábra) mind pedig HCO3<sup>-</sup> jelenlétében (35E ábra) az acidózisból történő regeneráció illetve az alkalózisból történő regeneráció mértéke (35G ábra), 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<sup>2+</sup>)<sub>i</sub>. Ennek eldöntésére a sejteket előkezeltük a Ca<sup>2+</sup> 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 emelkedésen keresztül valósul meg.





35. ábra. Az epesavak hatása a nyelőcső epitél sejtek sav/bázis transzportereire. (A) Reprezentatív pH görbék 100, 300 és 500 µM epesav koktél (BAC) hatását mutatják a CP-A sejtekre, Hepes-pufferolt oldatban. Az epesavas kezelést 3 percel a pulzus előtt, a NH<sub>4</sub>Cl pulzus alatt, illetve 3 percel a pulzus után adtuk. (B) Az összefoglaló oszlopdiagramm a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> kicserélő (NHE) aktivitását mutatja CP-A és CP-D sejtekben. Az acidózisból történő regenerációt mértékét ( $J(B^{-})$ ) a regeneráció első 60 másodpercében mért meredékségből ( $\Delta pH/\Delta t$ ) számoltuk a sejt bufferkapacitását is figyelembe véve. (C) Az összefoglaló oszlopdiagramm a 500 µM BAC szelektív hatását mutatja az egyes NHE izoformák aktivitására a CP-A sejtekben. (D) Reprezentatív pH görbék 100, 300 és 500 µM BAC hatását mutatják a CP-A sejtekre, HCO3<sup>-</sup> jelenlétében. Az epesavas kezelést 3 percel a pulzus előtt, a NH<sub>4</sub>Cl pulzus alatt, illetve 3 percel a pulzus után adtuk. (E) Az összefoglaló oszlopdiagramm az NHE és a Na<sup>+</sup>/ HCO<sub>3</sub>kotranszporter (NBC) aktivitását mutatja a CP-A és CP-D sejtekben. Az acidózisból történő regenerációt mértékét (J(B<sup>-</sup>)) a regeneráció első 60 másodpercében mért meredékségből (ΔpH/Δt) számoltuk a sejt bufferkapacitását is figyelembe véve. (F) Az összefoglaló oszlopdiagramm az acidózisból történő regenerációt mutatja a CP-A sejtekben, HCO<sub>3</sub>- jelenlétében. Az epesavak NBC-re kifejtett hatását 50 µM HOE-642 jelenlétében vizsgáltuk. (G) Az összefoglaló oszlopdiagramm az epesavak hatását mutatja a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő aktivitására a CP-A és CP-D sejtekben. Az alkalózisból történő regeneráció mértékét (-J(B-)) a regeneráció első 30 másodpercében mért meredékségből ( $\Delta pH/\Delta t$ ) számoltuk a sejt bufferkapacitását is figyelembe véve. Az eredményeket átlag  $\pm$  standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* =  $p \le 0.05$  vs. kontroll. n = 15-25.

#### 6.2.5. Az epesavak krónikus hatása az iontranszporterek kifejeződésére

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<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő Slc26a6 izoformájának az mRNS kifejeződése a CP-A sejtekben, 7,5-ös pH-n (**36A ábra**). 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 (**36B ábra**). A CP-A sejtekben, savas körülmények között (5,5-ös pH) az iontranszporterek kifejeződése nem változott szignifikánsan az epesavak adása ellenére sem (**36C ábra**). A CP-D sejtek esetén egy jelentős emelkedés volt megfigyelhető az NHE1



**36. ábra. A sav/bázis transzporterek kifejeződése a CP-A és CP-D sejtekben.** A sejteket különböző epesavakkal kezeltük, 7 napon keresztül, 7,5-ös (**A** és **B**) illetve 5,5-ös (**C** és **D**) pH-n és az egyes iontranszporterek mRNS expressziójában beálló változást valós-idejű PCR-al detektáltuk. Az eredményeket átlag  $\pm$  standard hiba (SE) ábrázoltuk. (**E**) A Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> kicserélő-1 fehérje kifejeződését az epesavas kezeléseket követően Western blot analizissel vizsgáltuk. BAC: epesav koktél, NBC: Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kotranszporter.

Az NHE1-nél tapasztalható mRNS emelkedést fehérje szinten is sikerült detektálnunk (**36E ábra**). 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 (2. táblázat) 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 (**37A ábra**) és nemintesztinális (**37B ábra**) 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 (**37C ábra**).



NHE1





**37.** ábra. A sav/bázis transzporterek kifejeződése humán nyelőcső biopszás mintákban. A box plot diagrammok a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> kicserélő-1 (NHE1), NHE2, Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kotranszporter (NBC) és Slc26a6 mRNS kifejeződését mutatja az intesztinális (A) és nem-intesztinális (B) metapláziás mintákban. A közép értékeket vízszintes vonal jelőli az egyes dobozoknál. Az eredményeket átlag  $\pm$  standard hiba (SE) ábrázoltuk. \* = p≤0,05 vs. normál mukóza, n =7. (C) A reprezentatív képek az NHE1 és NHE2 immunhisztokémiai festődését mutatják normál nyelőcső mukózában (SQ) és intesztinális metapláziás (M) szövetben. A nem-specifikus festődések ellenőrzésére izotípus kontroll ellenanyagot (NC) használtunk. A nyílak az NHE1 és NHE2 festődést mutatják. A mérce 50 µm-t jelöl.

## 7. MEGBESZÉLÉS

# 7.1 A pankreász duktális epitél sejtek működése patofiziológiás körülmények között

A pankreász egy kettős elválasztású mirigy, amely egyrészt fontos szerepet játszik az emésztésben, másrészt pedig a szénhidrát anyagcsere szabályozásában. Az exokrin funkciók ellátásában többnyire az acinusok vesznek részt melyek a szerv tömegének döntő többségét is adják (~90%). Bár a duktális sejtek száma elenyésző az acinusokhoz képest, mégis alapvető szerepet játszanak a pankreász fiziológiájában, nem megfelelő működésüknek komoly következményei lehetnek. Az egyik leginkább ismert és karakterizált betegség a CF, mely a mutációtól függően enyhe illetve súlyos tüneteket mutathat. A CFTR csatornában bekövetkező mutációk tanulmányozása rámutatott arra, hogy a CFTR csatorna a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréciót nagy mértékben elősegíti és annak szerves részét képezi.[222] Egy másik betegség, amelyhez szintén megváltozott HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréció társul a pankreatitisz.[160, 223, 224] A pankreatitisz egy gyulladásos megbetegedés, amely lehet akut vagy krónikus és a pankreász szerkezeti átalakulásával jár. Leggyakoribb kiváltó tényezők közt az epekövességet illetve a túlzott alkoholfogyasztást tartják számon, bár folyamatosan nő az autoimmun illetve az idiopátiás esetek száma is. Számos olyan CFTR mutációt sikerült azonosítani, amely bár nem mutatja a CF-es betegekre jellemző tüneteket, viszont krónikus pankreatitisz kialakulásához vezethet.[225, 226, 227, 228, 229] Továbbá egyes tanulmányok azt találták, hogy bizonyos CFTR mutációk nem befolyásolják a csatorna konduktanciáját, viszont jelentősen lecsökkentik a HCO3<sup>-</sup> szekréciót mértékét.[230, 231] Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a CFTR csatorna és a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő kölcsönhat egymással, csökkent vagy elégtelen működésük kihatással van a HCO3<sup>-</sup> szekréció mértékére. A csökkent szekréció eredményeként a pankreász nedv mennyisége és összetétele megváltozik, mely fokozhatja az emésztőenzimek idő előtti aktiválódását és gyulladásos folyamatokat indíthat el. Az utóbbi években számos tanulmány világít rá a duktális HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréció és a luminális pH fontosságára pankreatitiszben. Freedman és mtsai. CFTR génkiütött egerekben kimutatták, hogy a pankreász duktális sejtek elégtelen folyadék és elektrolit szekréciója gátolja a zimogén granulumok membránra történő szállítását az acinusokban, melynek eredményeként az acinusok károsodnak.[232] Azt találták, hogy a CFTR-/- egerekben a luminális pH korrekciója helyreállítja egyrészt a zimogének transzportját az acinus sejtekben, másrészt nagymértékben növeli a membrán dinamikáját, amely nélkülözhetetlen a zimogén granulumok exocitózisához.[232] Az extracelluláris pH csökkenése az elégtelen HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréció következtében, fokozza a szekretagóg-indukálta zimogénaktivációt és ez által az acinusok károsodását.[233] A luminális pH fontosságát mutatja az is, hogy a pankreász fő vezetékbe injektált, 6,9-es pH-jú kontraszt anyag szignifikánsan fokozza az ödéma, neutrofil infiltráció és szöveti károsodás mértékét patkányban, míg a hasonló nyomáson alkalmazott 7,3-as pH-jú kontraszt anyag esetén lényegesen kisebb mértékű szöveti károsodás volt megfigyelhető.[234] A duktális sejtek autoimmun pankreatitiszben betöltött jelentőségét hangsúlyozza az a tanulmány is, melyben a kortikoszteroid-os kezelés hatékonyságát azzal magyarázzák, hogy korrigálja a CFTR csatorna lokalizációját a duktális sejtek apikális membránjára, ezáltal helyreállítja a duktális szekréciót.[223] Összességében elmondható, hogy a csökkent duktális folyadék és HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréció növelheti a pankreatitisz kialakulásának az esélyét.

Bár a pankreatitisz kialakulásában az epekövesség és a túlzott alkoholfogyasztás alapvető szerepet játszik, ezen ágensek hatását a duktális sejtek működésére kevésbé tanulmányozták. Munkacsoportunk izolált pankreász duktális sejteken kimutatta, hogy mind az epesavak mind pedig az EtOH dózisfüggően befolyásolják a duktális HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréciót. A CDCA (1 mM) illetve az EtOH (100 mM) magas koncentrációban erőteljesen gátolja a szekréciót, míg alacsony koncentrációban stimulálják azt. Az epesavak és EtOH ezen kettős hatása feltehetőleg fontos szerepet játszhat a pankreatitisz pathomechanizmusában. A fokozott folyadék és HCO3<sup>-</sup> szekréció egy lehetséges védő mechanizmusként megpróbálja kimosni a toxikus faktorokat illetve az időközben aktiválódott emésztőenzimeket a duktális fából, továbbá megemeli a lumen-ben a pH-t, melynek szerepe lehet az acinus sejtekben fellépő szekréciós defektus helyreállításában.[232] Abban az esetben, ha ez a védő mechanizmus nem elégséges, vagy a toxikus faktorok koncentrációja tovább növekszik a duktális szekréció erőteljesen gátlódik. Klinikai szempontból az egyik legfontosabb kérdés, hogy a duktális szekréció mikor fordul át hiperszekrécióból hiposzekrécióba. A hiperszekréciós fázis elnyújtása illetve a gátlás feloldása akár terápiás jelentőséggel is bírhat a pankreatitisz kezelésében. Ehhez minkenképpen ismernünk kell azokat a mechanizmusokat, amely révén az epesavak vagy az EtOH kifejti gátló/serkentő hatását. Munkám során tehát igyekeztem azonosítani azokat a transzportereket, melyeknek szerepük lehet ezen ágensek hatásának a közvetítésében, amelyek kiindulópontjai lehetnek hathatós terápiák kifejlesztésének.

#### 7.1.1 Az epesavak hatása

### 7.1.1.1 A kenodezoxikólsav hatása

Korábbi vizsgálataink során azt találtuk, hogy az emberben is előforduló, hidrofób epesav, a CDCA hatására (100 µM) fokozódik a pankreász duktális sejtek HCO3<sup>-</sup> szekréciója, melvben az [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> megnövekedett szintje fontos szerepet játszik.[163] A pontos mechanizmus, azonban ismeretlen volt. Ezért munkánk során megvizsgáltuk a CDCA hatását azon iontranszporterek konduktanciájára, melyek aktivitásában a Ca<sup>2+</sup> fontos szerepet játszik. Mivel a HCO3<sup>-</sup> szekrécióhoz a Cl<sup>-</sup> transzport nélkülözhetetlen, első lépésben kézenfekvőnek tűnt a CDCA hatásának vizsgálata a Ca<sup>2+</sup>-aktiválta Cl<sup>-</sup> csatornákra. Meglepő módon azt találtuk, hogy ezen epesav hatására nem változott jelentősen a csatorna konduktanciája. A Cl<sup>-</sup> csatornák mellett egyes K<sup>+</sup> csatornák szintén Ca<sup>2+</sup>-al aktiválhatóak és a membrán hiperpolarizációja révén szerepet játszanak a HCO3<sup>-</sup> szekrécióban. A nagy konduktanciájú BK<sub>Ca</sub> csatorna aktivitása 100 µM CDCA hatására többszörösére emelkedett. A CDCA az extracelluláris Ca<sup>2+</sup> hiányában is képes volt aktiválni a csatornát, bár szignifikánsan kisebb emelkedést indukált mint externális Ca<sup>2+</sup> mellett. A CDCA specifikus hatását továbbá az is igazolja, hogy az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> kelátor, EGTA jelenlétében, valamint a BK<sub>Ca</sub> csatorna gátlószer IBT mellett, a CDCA nem volt képes a csatornát aktiválni. Az aktiválódott K<sup>+</sup> áram a membrán potenciált a negatív irányba tolta el, ami a Nernst-egyenlet alapján várható is volt (a K<sup>+</sup> egyensúlyi potenciálja -90 mV), azonban a CDCA hatására kialakuló reverz vagy más néven fordulási potenciál nem volt annyira negatív, ami arra utal, hogy a CDCA hatására egyéb nem-szelektív kation csatornák is aktiválódhatnak. Hipotézisünk szerint a membrán hiperpolarizációja fokozza az elektrokémiai hajtóerőt az anion szekrécióhoz a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélőn és a CFTR Cl<sup>-</sup> csatornán keresztül. A Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő szerepét a CDCA-indukálta HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekrécióban az is alá támasztja, hogy az anion kicserélő gátlószer, DIDS jelenlétében a CDCA hatására nem tapasztaltunk fokozódást a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréció mértékében. Korábbi tanulmányokban azt találták, hogy azok az anyagok, amelyek a cAMP szint emelésén keresztül fokozzák a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréciót, egyben átmenetileg hiperpolarizálják a plazmamembránt, ami feltehetőleg szerepet játszhat ezen ágensek hatásmechanizmusában.[235]

Jelen ismereteink szerint eddig két kation csatornát azonosítottak patkány duktális sejteken. Az egyik egy Ca<sup>2+</sup>-aktiválta, nem-szelektív kation csatorna, ami mind a bazális mind pedig az apikális membránon megtalálható és permeábilis mind a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> és Cs<sup>+</sup> ionokra.[236] A másik csatorna a duktális sejtek bazolaterális membránjára lokalizálódik és cAMP illetve Ca2+ szint emelkedés hatására aktiválódik.[237] Kutya pankreász duktális sejtek bazolaterális membránján egy karibdotoxin-érzékeny, Ca<sup>2+</sup>-aktiválta K<sup>+</sup> csatornát sikerült azonosítani, amely feltehetőleg a közepes konduktanciájú K<sup>+</sup> csatornák családjában tartozik.[207] Jelen tanulmányban azt találtuk, hogy a CDCA kizárólag a luminális membrán felől adva fokozta a HCO3<sup>-</sup> szekréció mértékét. Továbbá feltételezzük, hogy a CDCA-indukálta Ca<sup>2+</sup> szingál elsősorban a luminális membrán környékére lokalizálódik. Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy a BK<sub>Ca</sub> csatornák, akkor tudnak szerepet játszani a CDCA-indukálta szekrécióban, ha a luminális membránra lokalizálódnak. Ennek eldöntésére megvizsgáltuk a luminális IBT hatását a CDCA-indukálta szekrécióra. A luminális membrán felől adva, a gátlószer teljes mértékben blokkolta a CDCA stimuláló hatását, ami arra utal, hogy a CDCA hatása az apikális membránon lévő BK<sub>Ca</sub> csatornák aktivációja révén valósul meg. A BK<sub>Ca</sub> csatorna jelenlétét immunfestési eljárással is sikerült kimutatni az intra-interlobuláris duktuszok apikális membránján, míg a szigetsejtek illetve az acinusok esetében negatív festődést tapasztaltunk. Bár a BK<sub>Ca</sub> csatorna jelenlétét számos szekretáló epitélium apikális membránján sikerült azonosítani, [238, 239, 240] a pankreász duktális sejtek esetén munkacsoportunk tette meg először ezt a felfedezést. A BK<sub>Ca</sub> csatornák fontos szerepet játszanak a nyálmirigy szekréciós folyamataiban. Ezen csatorna deléciója a fültő- illetve állkapocs alatti mirigy acinus sejtjeiben jelentősen lecsökkenti a és megváltoztatja szekrétum mennyiségét az ionösszetételét.[241, 242] Sertés méhnyálkahártyában az SK<sub>Ca</sub> csatornák aktivációja fokozza a a Ca<sup>2+</sup>-aktiválta anion szekréciót.[243] A gyomormirigyben a Ca<sup>2+</sup>-aktiválta K<sup>+</sup> csatornák szintén fontos szerepet játszanak a savszekrécióban.[244] Ezen adatok alapján feltételezzük, hogy hasonlóan a többi szekretórikus epitéliumhoz, a duktális sejtekben is esszenciális szerepet játszik a BKCa csatorna az anion szekrécióban.

Jelen tanulmányban arra is kíváncsiak voltunk, hogy vajon a  $BK_{Ca}$  csatornák szerepet játszanak-e egyéb szekretagógok által indukált szekrécióban is. A szekretin-indukálta  $HCO_3^-$  szekréció a cAMP szint emelésén keresztül valósul meg, míg a karbakol illetve a luminális ATP hatásában a megemelkedett  $Ca^{2+}$  szintnek van szerepe.[112, 245] Eredményeink azt mutatták, hogy a  $BK_{Ca}$  csatornák nem vesznek részt ezen szekretagógok stimuláló hatásában, amely meglepő volt főként a karbakol illetve a luminális ATP esetében, amelyek egy  $[Ca^{2+}]_i$  szint emelkedést indukálnak a duktális sejtekben. Egy lehetséges magyarázat erre, hogy a karbakol vagy a luminális 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 luminális 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 pankreászt az epesavak károsító hatásával szemben, amely akár terápiás jelentőséggel is bírhat biliáris pankreatitiszben. Ennek alátámasztására egy specifikus BK<sub>Ca</sub> csatorna aktivátor NS11021 jelenlétében vizsgáltuk a duktális HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréciót. Az NS11021 egy speciális, tiourea származék, amely szelektíven aktiválja a BK<sub>Ca</sub> csatornát.[246] Azt találtuk, hogy a luminális membrán felől adva ezen farmakon szignifikánsan növelte a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréció mértékét, míg az inaktív forma esetében (NS13558) nem detektáltunk változást. Állatkísérletekben kimutatták, hogy az NS11021 csökkenti az iskémia vagy reperfúzió-indukálta infarktus nagyságát és növeli a mitokondriumok energetikai teljesítményét, ezáltal kardioprotektív hatású.[247, 248] Kísérleteink során elsőként mutattuk ki ezen vegyület kedvező hatását a duktális HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekrécióra.

Az utolsó lépésben azt vizsgáltuk, hogy az epesavak milyen mechanizmussal jutnak a duktális sejtekbe. A G-fehérje-kapcsolt bile acid receptor, röviden Gpbar egy viszonylag újonnan azonosított epesav receptor, melynek jelenlétét a pankreász acinusok luminális membránján kimutatták és azt találták, hogy kritikus szerepet játszik az epe-indukálta pankreatitisz pathomechanizmusában.[249] 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.[250] Kísérleteink során nem sikerült ezen transzporter jelenlétét kimutatni a tengerimalac duktális sejtekben, amely feltételezi, hogy a CDCA felvétele nem ezen a transzporteren keresztül valósul meg. Elképzelhető, hogy mivel a CDCA sem glicin-el sem pedig taurin-al nem konjugált ezért kevésbé hidrofil 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,[251] bár ezen epesavtranszporter jelenlétét a duktális sejteken nem vizsgáltuk.

Eredményeinket összefoglalva elmondható, hogy azonosítottunk egy új ioncsatornát a duktális sejtek apikális membránján, amely patofiziológiás körülmények között fontos szerepet játszik a pankreász duktális  $HCO_3^-$  szekrécióban. Eredményeink azt sugallják, hogy a  $BK_{Ca}$  csatornák aktivációja szintetikus farmakonok által egy új terápiás lehetőséget vet fel a biliáris pankreatitisz kezelésében.

#### 7.1.1.2 Az urzodezoxikólsav hatása

A CDCA hatása a duktális sejekre dózisfüggést mutat. Alacsonyabb koncentrációban fokozza a duktális szekréció mértékét, míg magasabb dózisban erőteljesen gátolja azt.[163] A CDCA gátló hatása feltehetőleg a mitkondriumokra kifejtett károsító hatásán keresztül valósul meg.[252] Mivel az epesav reflux könnyen indukálhat pankreász gyulladást és ezáltal fokozhatja a pankreatitisz kialalkulásának az esélyét, fontos részleteiben ismerni az epesavak hatásmechanizmusát illetve feltérképezni azokat a terápiás lehetőségeket, melyeken keresztül a károsító hatásukba be lehet avatkozni. Jelen tanulmányban elsőként mutattuk ki, hogy a hidrofil epesav, UDCA képes csökkenteni a CDCA toxikus hatását, azáltal, hogy csökkenti a CDCA-indukálta mitokondriális károsodást.[177]

Az UDCA hatásának a karakterizálásához a CDCA koncentrációját korábbi vizsgálataink alapján választottuk ki. A CDCA 1 mM-os koncentrációban jelentősen megemeli a (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> szintet, károsítja a mitokondriumokat és gátolja a sav-bázis transzporterek működését.[162, 163] Az UDCA koncentrációját irodalmi adatok alapján választottuk,[175, 253] 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).[254] 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.[175, 253, 255, 256]

Jelen tanulmányban azt találtuk, hogy a pankreász duktuszok 24 órás előkezelése UDCA-al jelentősen lecsökkentette a CDCA sav-bázis transzporterekre kifejtett gátló hatását. A pankreász acinus sejteken elvégzett tanulmányok szerint a hidrofil epesav károsító hatása a megemelkedett (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> szinttel magyarázható.[257, 258] Korábban kimutattuk, hogy 1 mM CDCA hatására nagy fokú (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> felszabadulás figyelhető meg a duktális sejtekben, ezért megvizsgáltuk, hogy az UDCA védő hatása a CDCA-indukálta Ca<sup>2+</sup> szignál kivédésén alapszike. A pankreász duktuszok 24 órás előkezelése nem volt képes kivédeni a CDCA (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub>-ra kifejtett hatását, ami összefüggésben áll korábbi megfigyeléseinkkel mely szerint a Ca<sup>2+</sup> kelátor, BAPTA-AM-el történő előkezelés nem befolyásolta a CDCA sav-bázis transzporterekre kifejtett gátló hatását.[163] Számos tanulmányban igazolták, hogy az epesavak-indukálta sejtkárosodásban a mitkondriumok központi szerepet játszanak és az UDCA előkezelés képes csökkenteni a hidrofób epesavak mitokondriumokra kifejtett károsító hatását.[172, 174, 175, 253] 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 mitkondriumok 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.[259] Egy másik tanulmányban azt találták, hogy a CDCA hatására fokozódik a mitokondriális membrán fluiditása és a citokróm c felszabadulás, ami hozzájárul az mPTP nyitódáshoz.[260] A CDCA-val szemben az UDCA adása nem okozott szignifikáns eltérést a mitkondriális 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 CDCAindukálta 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<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> szint illetve a szabadgyökök képződése. Kísérleteink során az UDCA előkezelés hatását csak a citoplazmában szabad állatpotban lévő Ca<sup>2+</sup> szintjére vizsgáltuk, míg a sejtben belüli, totál (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> szintben bekövetkező változásokat nem vizsgáltuk. Elképzelhető, hogy az UDCA védő hatása a Ca<sup>2+</sup> túlterhelés csökkentéséből vagy a szabad gyök képződés gátlásából származtatható.

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. Mivel a sejtek túlélése nagy mértékben függ a mitokondriumok működésétől a következő lépésben kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon a CDCA-indukálta mitokondriális károsodás sejtelhalást indukál-e és ha igen, akkor az UDCA előkezelés képes-e ezt kivédeni. 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 citokróm c felszabadulás, valamint a kaszpázok aktivitása.[261, 262] Ezenkívül a CDCA glicin-el konjugált formája egy mitokondriumtól független útvonalon, a Fas receptor aktiválásán keresztül indukál apoptózis hepatocitákban.[263] A 24 órás UDCA előkezelés hatására jelentősen lecsökkent a CDCA-indukálta apoptózis a duktális sejtekben, ami alátámassza 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 pankreatitiszt lehetne kiváltani, ezért kísérleteink során patkányokban váltottunk ki pankreatitiszt, CDCA intraduktális injektálásával. [264, 265] A CDCA adása acinus sejt nekrózist illetve emelkedett szérum amiláz szintet eredményezett. Izolált acinus sejteken végzett kísérletekben azt találták, hogy a szintén hidrofób epesav, taurolitokólsav hatására károsodtak a mitokondriumok, toxikus Ca<sup>2+</sup> szignalizáció volt megfigyelhető, illetve fokozódott a ROS termelődés.[258, 266, 267, 268] Feltehetőleg hasonló sejten belüli mechanizmusok mennek végbe a CDCA hatására is. A két hetes UDCA kezelés hatására jelentősen lecsökkent a CDCA-indukálta nekrózis 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 pankreatitiszben demonstrálták, ahol a hosszú távú UDCA kezelés csökkentette a pankreatitisz kiújulásának az esélyét.[269, 270, 271] A szájon át alkalmazott UDCA hatása nagyban függ a

szervezeten belüli metabolizmusától. Patkányban az UDCA nagy része TUDCA-vá alakul,[272] melynek szintén sejtvédő hatása van.[173, 176, 273, 274] Emberben az UDCA metabolizmusa során izoUDCA képződik,[275] ami az UDCA 3β-hidoxi epimerje és sokkal hatékonyabb mint az UDCA.[276] Bár ebben a tanulmányban nem vizsgáltuk az UDCA koncentrációját a vérben, úgy gondoljuk, hogy kellően magas koncentrációban adtuk ahhoz, hogy a védő hatását kifejtse.

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 (**38. ábra**). Eddigi ismereteink szerint az UDCA klinikai alkalmazására a májat és epevezetéket 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.



**38. ábra. Az UDCA hatásmechanizmusának sematikus ábrája.** A kenodezoxikólsav (CDCA) mitokondriális károsodást indukál azálta, hogy csökkenti a mitokondriális membrán potenciált és indukálja a mitokondriális permeabilitás tranzíciós pórus (mPTP) nyitódását. Az urzodezoxikólsavas (UDCA) előkezelés azáltal képes csökkenteni a CDCA sejtkárosító hatását, hogy stabilizálja a mitkondriális membránt.

#### 7.1.1.3 Az epesavak hatásmechanizmusa

Naponta 400-800 ml epe termelődik, mely a duodénumba történő ürülés előtt az epehólyagban tárolódik, ahol a koncentrációja elérheti az akár 300 mM-t is. Az emberi szervezetben az egyik fő, elsődleges epesav a CDCA, míg az UDCA a totál epesav koncentráció kevesebb mint 4%-át adja.[277] Szerkezetüket tekintve az epesavak szteránvázas vegyületek, melyek hidrofil és hidrofób tulajdonsággal is rendelkeznek, melynek jelentősége a zsírok emésztésében van, hiszen az apoláros rész a zsírcseppek felszínéhez, míg a poláros rész a vízmolekulákhoz képes kötődni. Kettős oldódásuknak köszönhetően a zsírcseppeket oldatban tartják illetve emulgeálják, azaz apróbb cseppekre választják szét, megnövelve ez által a zsírcseppek felületét, elősegítve az emésztésüket. Az epesavak toxikus hatása egyenes arányban áll hidrofóbicitásukkal. Minnél inkább hidrofób egy epesav, annál toxikusabb a sejt számára. A hidrofóbicitás mértékét az epesavakon lévő hidroxil csoportok (-OH) száma határozza meg. A litokólsav egy hidroxil csoportot tartalmaz, emiatt az egyik leginkább hidrofób és ebből adódóan leginkább toxikus epesav (4. táblázat). A CDCA és az UDCA két hidroxil csoportot tartalmaz ugyanabban a pozicióban, a két epesav összképlete megegyzik, csak a molekulaszerkezetük eltérő. Az UDCA a CDCA 7β-OH epimerje, azaz a két epesav egyedül a kiralitáscentrum konfigurációjában különbözik egymástól. Ennek köszönhetően a kémiai és biológiai tulajdonságaik, az azonos összképlet ellenére, teljesen eltérő. A CDCA sokkal inkább hidrofób az UDCA-hoz képest és ebből adódóan nagyobb a sejtkárosító hatása is (4. táblázat). Normál körülmények között az epesavak nagy része glicin- vagy taurin-konjugált formában fordul elő az epében, mely növeli az epesavak poláros jellegét. Korábbi vizsgálataink során azt találtuk, hogy a glicin-el konjugált CDCA, nem befolyásolja számottevően a HCO3<sup>-</sup> szekréciót és nem toxikus a sejt számára, még 1 mM-os koncentrációban sem.[163] Továbbá egyes tanulmányok igazolták, hogy önmagában az epe regurgitációja a pankreász vezetékben nem okoz pankreatitiszt, [278] azonban bakteriális fertőzés esetén akut, nekrotizáló pankreatitisz alakulhat ki.[279] Köztudott, hogy egyes baktériumok képesek dekonjugálni az epesavakat, [280] melynek eredményeként az epében megnőhet a toxikus CDCA koncentráció, mely kifejti sejtkárosító hatását. Arra vonatkozóan, hogy a CDCA kis illetve magas koncentrációja miért befolyásolja eltérőképpen a duktális sejtek működését az epesav detergens tulajdonságával magyarázható leginkább. A CDCA 1 mM-os koncentrációban növeli a biológiai membránok polaritását, ezáltal fokozza a foszfolipidek és membránfehérjék felszabadulását és képes megbontani a sejtmembrán szerkezetét, ami kihatással van a transzporterek működésére is. A sejtbe bejutó CDCA a mitokondriumok membránstruktúráját is megbontja, melynek eredményeként a sejt energetikailag is károsodik. Hepatocitákon végzett tanulmányokban kimutatták, hogy a CDCA fokozza a glutamát dehidrogenáz (GLDH) felszabadulását a mitokondriumokból,[281] valamint növeli az mPTP nyitódását.[259] Az UDCA védő hatása feltehetőleg a membrán stabilizáló tulajonságából fakad, ugyanis az UDCA képes csökkenti a membrán polaritását azáltal, hogy beépül a membrán apoláris doménjébe, ezenkívül gátolja a CDCA-indukálta GLDH felszabadulást a mitokondriumokból.[281] A CDCA alacsonyabb koncentrációjánál (100  $\mu$ M) a membrán intakt marad és a CDCA specifikus hatásai kerülnek előtérbe a detergens, membránkárosító hatással szemben. Az egyik ilyen mechanizmus az endoplazmatikus retikulumból történő Ca<sup>2+</sup> felszabadulás, melynek eredményeként fokozódik a Ca<sup>2+</sup>-aktiválta transzporterek működése és ez által a HCO<sub>3</sub>szekréció mértéke.

	Taurin-konjugált		Glicin-konjugált		Nem-konjugált	
	lonizált	Protonált	lonizált	Protonált	lonizált	Protonált
Urzodezoxikólsav	- 0,47	-	- 0,43	- 0,15	- 0,31	0,49
Kólsav	0	-	0,07	0,3	0,13	0,83
Kenodezoxikólsav	0,46	-	0,51	0,77	0,59	1,37
Dezoxikólsav	0,59	-	0,65	0,93	0,72	1,46
Litokólsav	1,0	-	1,05	1,34		• //

**4. táblázat. Az epesavak hidrofóbicitási indexe.** A táblázat az egyes epesavak hidrofóbicitási indexét mutatja ionizált (pH 8,5-9,0) és protonált (pH 2,8-3,5) formában. A taurin-konjugált epesavak savas pH-n is ionizált formában vannak jelen. A táblázat értékei az egyes epesavak kapacitás faktorát mutatják, melyet az epesavak retenciós (visszatartási) idejéből határoztak meg a fordított fázisú folyadékkromatográfiás módszer segítségével.[282] Standardként a taurin-konjugált kólsav szolgált. A hidrofóbicitás mértéke balról jobbra, illetve fentről lefelé nő.

## 7.1.2. Az etanol hatása

A hosszú időn át fennálló, rendszeres, nagy mennyiségű alkoholfogyasztás komoly gasztrointesztinális és neurológiai betegségeket okozhat, illetve egyes rákos megbetegedések kialakulásában is szerepet játszik,[283, 284, 285, 286] emiatt számos tanulmányban vizsgálták az EtOH hatását különböző szöveteken. Az egyik leginkább tanulmányozott terület az EtOH

hatásának a vizsgálata hepatocitákon. Magas koncentrációban (100 mM) az EtOH csökkenti a sejtek viabilitását és lipid peroxidációt indukál, krónikus fogyasztása pedig mitokondriális károsodást okoz patkányban.[287, 288] A szív- és érrendszer tekintetében az alkohol hatására fokozódik a vérnyomás és nő a szívizom betegségek előfordulása.[289] Továbbá nagyon magas koncentrációban (1,7 M) az EtOH gátolja a sejten belüli proteáz aktivitást az agyban, májban és izomban.[290] Az EtOH hatását a pankreászban is tanulmányozták, hiszen a túlzott alkoholfogyasztás mind a krónikus mind pedig az akut pankreatitisz kialakulásában fontos etiológiai tényező.[151] A pankreász duktális sejtekben a CFTR csatorna alapvető fontosságú. Korábbi tanulmányokban kimutatták, hogy a CFTR gén mutációk gyakorisága az alkoholistákban kétszer akkora, mint a normál populációban,[291] ennek ellenére az EtOH hatását a CFTR csatorna aktivitására kevésbé tanulmányozták.

Jelen tanulmányban kimutattuk, hogy az EtOH és nem oxidatív metabolitjai, magasabb koncentrációban erőteljesen gátolják a CFTR csatorna aktivitását tengerimalac pankreász duktális sejtekben.[166] 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 koncentrációknál (10 és 100 mM), ami közel letális lehet az emberre nézve,[292] az EtOH hatására megnőtt az alap és lecsökkent a forskolin-stimulált CFTR áram nagysága. Ezen eredményeink összhangban állnak korábbi megfigyelésekkel, mely szerint az EtOH dózisfüggően befolyásolja a duktális szekréciót.[293] Annak eldöntésére, hogy az EtOH hatásár a cFTR áramokra. Mivel a mannitol hatására hasonló aktivitást tapasztaltunk a CFTR csatorna konduktanciájában, úgy gondoljuk, hogy az EtOH aktiváló hatása feltehetőleg egy nemspecifikus 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 metobolitok szerepét a pankreatitisz kialakulásában.[294] 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.[295, 296] Kimutatták, hogy az Ac sejten belüli akkumulációja negatívan befolyásolja az NFκB aktivitást és a CCK-indukálta szekréciót izolált patkány acinus sejtekben, magasabb koncentrációban pedig a pankreász morfológiai elváltozását okozza.[295, 297, 298] 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.[294, 299] Ennek eredményeként a nem-oxidatív metabolitok, úgy mint a FA vagy FAEE koncentrációja magasabb a pankreászban mint bármelyik más szervben.[300] Acinusokon végzett vizsgálatok során kimutatták, hogy a FAEE-k toxikus Ca<sup>2+</sup> szignált indukálnak és károsítják a mitokondriális oxidatív láncot, ami ATP deplécióhoz, végül pedig setjhalálhoz vezet.[157, 158, 301] 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.[300] 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.

A CFTR Cl<sup>-</sup> csatorna, ahogy azt a bevezőtben említettem, az ATP-kötő kazetta (ABC) transzporter család egyik tagja, mely a PKA átlal aktiválódik. Mivel a csatorna nyitódása függ az ATP kötődésétől, ezért az ATP jelenléte esszenciális a normális CFTR működéshez.[302, 303, 304] Mivel a FA-k és FAEE-k ATP depléciót okoznak patkány pankreász acinusokban és alveoláris makrofágokban, [157, 305] kíváncsiak voltunk, hogy az EtOH, POA és POAEE hogyan befolyásolja a CFTR aktivitást pankreász 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<sub>i</sub> 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<sub>i</sub> 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 esetében is. Arra vonatkozóan, hogy az ATP adása hogyan fejti 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 depléció fontos szerepet játszik a pankreatitisz kialakulásában.[157, 306, 307] Az acinus sejtekben a FA-k toxikus  $Ca^{2+}$  szignált generálnak, ami rontja a mitokondriális funkciókat és ez által az ATP termelést.[157, 307] ATP hiányában, a  $Ca^{2+}$ -aktiválta ATPázok az ER-ban illetve a plazmamembránon nem képesek a  $Ca^{2+}$ -ot visszapumpálni az ER-ba vagy kipumpálni a sejtből, melynek eredményeként a  $(Ca^{2+})_i$  tartósan magas szinten marad, mely végső során sejthalált indukál. Az ATP helyreállítása azonban képes csökkenti a toxikus  $Ca^{2+}$  szintet.[157]

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<sub>i</sub> szint csökkenése révén. Mivel a CFTR csatorna fontos szerepet játszik a duktális folyadék és HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 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 alkoholindukálta pankreatitiszben.

## 7.1.2.1 Az etanol hatásmechanizmusa

Az epesavakhoz hasonlóan az EtOH is befolyásolja a sejtmembránok szerkezetét, azáltal, hogy kölcsönhat a foszfolipid kettős rétegben lévő molekulákkal, fokozva ez által a membrán fluiditását.[308] Emellett specifikusan is befolyásolja a sejten belüli folyamatokat különös tekintettel a ROS termelődésre.[309] Kísérleteink során azt találtuk, hogy az EtOH, POA és POAEE azáltal gátolja a CFTR csatorna működését, hogy csökkenti a sejten belüli ATP szintet. Az intracelluláris ROS mennyiségének a szabályozásában a mitokondriumok alapvető szerepet játszanak azáltal, hogy az oxidatív metabolizmus során melléktermékként ROS képződik.[310] Az EtOH egyrészt fokozza a ROS képződést,[311] másrészt gyengíti a ROS-al szembeni védekező mechanizmusokat,[309] melynek eredményeként felhalmozódik a ROS a sejtekben. Az EtOH-indukálta ROS fő támadáspontja a mitokondriális DNS, melynek eredményeként gyengülnek a mitokondriális funkciók ami további ROS termelődéshez vezethet. A kontrolálatlan mitokondriális ROS képződés az mPTP aktiválódását okozza, illetve csökken az ATP képződése és végső soron akár apoptotikus vagy nekrotikus sejtelhalás következhet be.

# 7.2 A nyelőcső epitél sejtek működése patofiziológiás körülmények között

A nyelőcső epitél sejtek egy védő falat képeznek a refluxátumban található káros összetevőkkel szemben. Szerkezetüket tekintve többrétegű laphámot vagy egyrétegű hengerhámot képeznek. Az epitél sejteken található sav/bázis transzporterek részét képezik a nyelőcső epitél rezisztenciának, ami az epitél sejtek normál működésének fenntartásában játszik alapvető szerepet.

Ebben a tanulmányban megvizsgáltuk, hogy a metaplasztikus hengerhámban milyen iontranszporterek fordulnak elő, illetve hogyan befolyásolja a refluxátumban található főbb ágensek, úgymint a sósav illetve epesavak, a transzporterek kifejeződését és aktivitását. Sikerült azonosítanunk két alkalizáló (NHE és NBC) és egy acidifikáló (Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő) transzportert. Az NHE-k közül az NHE1 és -2 izoforma fordul elő a CP-A és CP-D sejteken, míg a Cl<sup>-</sup>/HCO3<sup>-</sup> kicserélők közül az Slc26a6 anion transzporter, más néven PAT-1. Az epesavak dózisfüggően lecsökkentették a sejtek pH-ját, mely hatás savas körülmények között még erőteljesebb volt, összhangban korábbi megfigyelésekkel.[196] 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.[312] Az epesavak toxicitását a hidrofóbicitás 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 glicinkonjugált epesavak esetén ez az érték 4,3-5,2 közé esik.[313, 314] 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 határoza 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.[197, 315] Továbbá a savas pH csökkenti a plazmamembrán integritását, ami szintén elősegítheti az epesavak sejtbe történő bejutását.[316]

A pH<sub>i</sub> 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<sup>2+</sup> szignalizációt indukál egér és humán nyelőcső epitél sejtekben.[312, 317, 318] Továbbá sikerült kimutatnunk, hogy az IP<sub>3</sub>R gátlószer, koffein hatására teljesen megszűnt az epesavak (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub>-ra kifejtett hatása, Ca<sup>2+</sup>mentes extracelluláris körülmények között, amely azt sugallja, hogy a folyamat feltehetőleg egy IP<sub>3</sub>R-mediálta útvonalon keresztül valósul meg. Hasonló mechanizmust írtak le a vastagbél kripták, hepatociták, pankreász duktuszok és acinusok esetén is.[163, 206, 257, 258, 319, 320] Amellett, hogy az epesavak fokozzák az IP<sub>3</sub>R-mediálta Ca<sup>2+</sup> felszabadulást, elősegítik az extracelluláris Ca<sup>2+</sup> beáramlását a sejtekbe, bár a mechanizmus nem pontosan ismert. Patkány hepatocitákban az epesavak közvetlenül stimulálják a "store-operated" Ca<sup>2+</sup> csatornákat a sejtmembránon,[321] azonban további vizsgálatok szükségesek, hogy azonosítsuk azokat a Ca<sup>2+</sup> csatornákat, amelyek az epesavak hatását közvetítik a nyelőcső epitél sejteken.

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<sub>i</sub> csökkentő hatásában. A pH<sub>i</sub> csökkenést ellensúlyozandó, megnövekedett NBC aktivitás, a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> felvétele révén képes valamilyen szinten pufferolni az acidifikáció mértékét. Emellett a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kiáramlása a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 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. Patológiás körülmények között a diszpláziás Barrett mukóza nagyobb mértékű savas/epesavas refluxnak van kitéve,[322] ezért sokkal ellenállóbb a GERD-indukálta stimulusokkal szemben, mint a CP-A sejtek.[323]

A pankreász duktális sejtek esetén az epesavak iontranszporterekre kifejtett hatásában a megemelkedett ( $Ca^{2+}$ )<sub>i</sub> szint alapvető szerepet játszik.[163, 167] Kíváncsiak voltunk, hogy vajon a nyelőcső epitél sejtek esetén is a megemelkedett ( $Ca^{2+}$ )<sub>i</sub> szint mediálja-e a folyamatot. A  $Ca^{2+}$  kelátor BAPTA-AM jelenlétében megszünt az epesavak transzporterekre kifejtett gátló és stimuláló hatása, ami feltételezi, hogy a megemelkedett ( $Ca^{2+}$ )<sub>i</sub> 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<sup>+</sup> csatornákkal, de a pontos mechanizmus nem ismert.[167, 324, 325] Az anion kicserélővel szemben az NHE működését a megemelkedett ( $Ca^{2+}$ )<sub>i</sub> szint erőteljesen gátolja. Hasonló eredményeket mutattak ki ileum

kefeszegélyben illetve vese proteoliposzómákban, ahol a megnövekedett (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> szint a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kaszkádon keresztül gátolja a kicserélő működését.[326, 327] Összeségében megállapítható, hogy a megemelkedett (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> 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 kifejeződését humán biopsziás mintákban is megvizsgáltuk és azt találtuk, hogy az NHE-k, NBC és PAT-1 kifejeződése megnövekedett az intesztinális és nem-intesztinális mintákban a normál mukózához képest, mely eredmények összhangban állnak korábbi megfigyelésekkel.[6, 196, 328, 329]

Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a metaplasztikus hengerhám jobban alkalmazkodik a savas környezethez a normál laphámhoz képest. Először is a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kicserélő megnövekedett aktivitásának köszönhetően, fokozott HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 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. Hipotézisünk szerint 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 károsodás mértékét.

# 8. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

- 1/a) Sikerült elsőként azonosítanunk a BK csatornák jelenlétét a pankreász duktális sejtek apikális membránján illetve sikerült 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<sup>2+</sup>. Mivel a CDCA csak a luminális membrán felől képes aktiválni a csatornát, feltételezhető, hogy az apikális membrán mentén lokálisan felszabaduló Ca<sup>2+</sup> játszik alapvető szerepet ebben a folyamatban.
- 1/c) A BK csatornák aktivációja fokozza a duktális HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréciót, azáltal, hogy megváltozik a duktális sejtek membránpotenciálja. A BK csatornák duktális HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekrécióban betöltött szerepét támasztja alá az is, hogy a BK csatorna specifikus aktivátor, NS11021 hatására fokozódott a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 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 előkezlés 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<sup>2+</sup> 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 nemspecifikus, 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)<sub>i</sub> 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 patomechanizmzusában
- 4/a) Az epesavak hatására csökken a nyelőcső epitél sejtek pH-ja és megnő az (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> szint, mely enyhén savas pH-n (5,5) erőteljesebb volt mint neutrális pH-n (7,5). Az epesavak közül a legnagyobb hatást a (pH)<sub>i</sub>-ra a nem-konjugált, DC fejtette ki.
- 4/b) Az epesavak egyrészt IP<sub>3</sub>-mediálta útvonalon keresztül szabadítanak fel Ca<sup>2+</sup>-ot a sejtekben, másrészt potencírozzák a plazmamembránon keresztüli Ca<sup>2+</sup> 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 sejek 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 pankreászt vagy nyelőcsövet érintő gyulladásos megbetegedések kialakulásában szerepet játszhatnak. Mind a pankreász 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 patológiás körülmények között károsodhatnak, melynek eredményeként felborul a sejten belüli homeosztázis, abnormális folyadékszekréció vagy sejthalál következhet be.

Kutatásaink során amellett, hogy karakterizáltuk a pankreász és nyelőcső epitél sejtek ion transzport folyamatait patológiás 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 pankreász károsodás kivédésében, a HCO3<sup>-</sup> szekréció fokozása által
- Az UDCA-t bizonyos máj- és epeúti megbetegedésekben évek óta alkalmazzák. A pankreász 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 sejten 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 sejten 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, amelynek eredményeként a laboratóriumi kutatások eredményei a klinikai gyakorlatban is alkalmazásra kerülhetnek.

# 10. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1 Nakamura N, Tanaka S, Teko Y, Mitsui K, Kanazawa H. Four Na+/H+ exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. The Journal of biological chemistry 2005;**280**:1561-72.

2 Orlowski J, Kandasamy RA, Shull GE. Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na/H exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. The Journal of biological chemistry 1992;**267**:9331-9.

3 Khadilkar A, Iannuzzi P, Orlowski J. Identification of sites in the second exomembrane loop and ninth transmembrane helix of the mammalian Na+/H+ exchanger important for drug recognition and cation translocation. The Journal of biological chemistry 2001;**276**:43792-800.

4 Amemiya M, Loffing J, Lotscher M, Kaissling B, Alpern RJ, Moe OW. Expression of NHE-3 in the apical membrane of rat renal proximal tubule and thick ascending limb. Kidney Int 1995;**48**:1206-15.

5 Goyal S, Vanden Heuvel G, Aronson PS. Renal expression of novel Na+/H+ exchanger isoform NHE8. Am J Physiol Renal Physiol 2003;**284**:F467-73.

6 Sun AM, Liu Y, Dworkin LD, Tse CM, Donowitz M, Yip KP. Na+/H+ exchanger isoform 2 (NHE2) is expressed in the apical membrane of the medullary thick ascending limb. The Journal of membrane biology 1997;**160**:85-90.

7 Chambrey R, St John PL, Eladari D, Quentin F, Warnock DG, Abrahamson DR, *et al.* Localization and functional characterization of Na+/H+ exchanger isoform NHE4 in rat thick ascending limbs. Am J Physiol Renal Physiol 2001;**281**:F707-17.

8 Noel J, Roux D, Pouyssegur J. Differential localization of Na+/H+ exchanger isoforms (NHE1 and NHE3) in polarized epithelial cell lines. Journal of cell science 1996;**109** (**Pt 5**):929-39.

9 Numata M, Orlowski J. Molecular cloning and characterization of a novel (Na+,K+)/H+ exchanger localized to the trans-Golgi network. The Journal of biological chemistry 2001;**276**:17387-94.

10 Hisamitsu T, Ben Ammar Y, Nakamura TY, Wakabayashi S. Dimerization is crucial for the function of the Na+/H+ exchanger NHE1. Biochemistry 2006;**45**:13346-55.

11 Lacroix J, Poet M, Maehrel C, Counillon L. A mechanism for the activation of the Na/H exchanger NHE-1 by cytoplasmic acidification and mitogens. EMBO Rep 2004;**5**:91-6.
12 Sardet C, Counillon L, Franchi A, Pouyssegur J. Growth factors induce phosphorylation of the Na+/H+ antiporter, glycoprotein of 110 kD. Science 1990;**247**:723-6.

13 Putney LK, Denker SP, Barber DL. The changing face of the Na+/H+ exchanger, NHE1: structure, regulation, and cellular actions. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2002;**42**:527-52.

14 Wakabayashi S, Fafournoux P, Sardet C, Pouyssegur J. The Na+/H+ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls "H(+)-sensing". Proc Natl Acad Sci U S A 1992;**89**:2424-8.

15 Kapus A, Grinstein S, Wasan S, Kandasamy R, Orlowski J. Functional characterization of three isoforms of the Na+/H+ exchanger stably expressed in Chinese hamster ovary cells. ATP dependence, osmotic sensitivity, and role in cell proliferation. The Journal of biological chemistry 1994;**269**:23544-52.

16 Goss GG, Woodside M, Wakabayashi S, Pouyssegur J, Waddell T, Downey GP, *et al.* ATP dependence of NHE-1, the ubiquitous isoform of the Na+/H+ antiporter. Analysis of phosphorylation and subcellular localization. The Journal of biological chemistry 1994;**269**:8741-8.

17 Shimada-Shimizu N, Hisamitsu T, Nakamura TY, Wakabayashi S. Evidence that Na+/H+ exchanger 1 is an ATP-binding protein. Febs J;**280**:1430-42.

18 Wu KL, Khan S, Lakhe-Reddy S, Jarad G, Mukherjee A, Obejero-Paz CA, *et al.* The NHE1 Na+/H+ exchanger recruits ezrin/radixin/moesin proteins to regulate Akt-dependent cell survival. The Journal of biological chemistry 2004;**279**:26280-6.

19 Wang H, Singh D, Fliegel L. The Na+/H+ antiporter potentiates growth and retinoic acid-induced differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. The Journal of biological chemistry 1997;**272**:26545-9.

20 Masereel B, Pochet L, Laeckmann D. An overview of inhibitors of Na(+)/H(+) exchanger. Eur J Med Chem 2003;**38**:547-54.

21 Benos DJ. Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells. Am J Physiol 1982;**242**:C131-45.

22 Scholz W, Albus U. Potential of selective sodium-hydrogen exchange inhibitors in cardiovascular therapy. Cardiovasc Res 1995;**29**:184-8.

23 Scholz W, Albus U, Lang HJ, Linz W, Martorana PA, Englert HC, *et al.* Hoe 694, a new Na+/H+ exchange inhibitor and its effects in cardiac ischaemia. Br J Pharmacol 1993;**109**:562-8.

24 Kulanthaivel P, Leibach FH, Mahesh VB, Cragoe EJ, Jr., Ganapathy V. The Na(+)-H+ exchanger of the placental brush-border membrane is pharmacologically distinct from that of the renal brush-border membrane. The Journal of biological chemistry 1990;**265**:1249-52.

25 Soleimani M, Grassi SM, Aronson PS. Stoichiometry of Na+-HCO-3 cotransport in basolateral membrane vesicles isolated from rabbit renal cortex. J Clin Invest 1987;**79**:1276-80.

26 Satoh H, Moriyama N, Hara C, Yamada H, Horita S, Kunimi M, *et al.* Localization of Na+-HCO-3 cotransporter (NBC-1) variants in rat and human pancreas. Am J Physiol Cell Physiol 2003;**284**:C729-37.

27 Yoshitomi K, Burckhardt BC, Fromter E. Rheogenic sodium-bicarbonate cotransport in the peritubular cell membrane of rat renal proximal tubule. Pflugers Arch 1985;**405**:360-6.

28 Romero MF, Hediger MA, Boulpaep EL, Boron WF. Expression cloning and characterization of a renal electrogenic Na+/HCO3- cotransporter. Nature 1997;**387**:409-13.

29 Jentsch TJ, Stahlknecht TR, Hollwede H, Fischer DG, Keller SK, Wiederholt M. A bicarbonate-dependent process inhibitable by disulfonic stilbenes and a Na+/H+ exchange mediate 22Na+ uptake into cultured bovine corneal endothelium. The Journal of biological chemistry 1985;**260**:795-801.

30 Burnham CE, Amlal H, Wang Z, Shull GE, Soleimani M. Cloning and functional expression of a human kidney Na+:HCO3- cotransporter. The Journal of biological chemistry 1997;**272**:19111-4.

31 McAlear SD, Liu X, Williams JB, McNicholas-Bevensee CM, Bevensee MO. Electrogenic Na/HCO3 cotransporter (NBCe1) variants expressed in Xenopus oocytes: functional comparison and roles of the amino and carboxy termini. The Journal of general physiology 2006;**127**:639-58.

32 Shirakabe K, Priori G, Yamada H, Ando H, Horita S, Fujita T, *et al.* IRBIT, an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding protein, specifically binds to and activates pancreas-type Na+/HCO3- cotransporter 1 (pNBC1). Proc Natl Acad Sci U S A 2006;**103**:9542-7.

33 Ruiz OS, Wang LJ, Qiu YY, Kear F, Bernardo A, Arruda JA. Regulation of the renal Na-HCO3 cotransporter: VI. Mechanism of the stimulatory effect of protein kinase C. Kidney Int 1996;**49**:696-704.

34 Alper SL, Darman RB, Chernova MN, Dahl NK. The AE gene family of Cl/HCO3exchangers. J Nephrol 2002;**15 Suppl 5**:S41-53.

Alper SL. Molecular physiology of SLC4 anion exchangers. Exp Physiol 2006;91:153-61.

36 Alper SL. Molecular physiology and genetics of Na+-independent SLC4 anion exchangers. The Journal of experimental biology 2009;**212**:1672-83.

37 Reithmeier RA. A membrane metabolon linking carbonic anhydrase with chloride/bicarbonate anion exchangers. Blood Cells Mol Dis 2001;**27**:85-9.

38 Low PS. Structure and function of the cytoplasmic domain of band 3: center of erythrocyte membrane-peripheral protein interactions. Biochimica et biophysica acta 1986;**864**:145-67.

Wang Z, Schultheis PJ, Shull GE. Three N-terminal variants of the AE2 Cl-/HCO3exchanger are encoded by mRNAs transcribed from alternative promoters. The Journal of biological chemistry 1996;**271**:7835-43.

40 Yannoukakos D, Stuart-Tilley A, Fernandez HA, Fey P, Duyk G, Alper SL. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of two isoforms of the AE3 anion exchanger from human heart. Circ Res 1994;**75**:603-14.

41 Brown PD, Davies SL, Speake T, Millar ID. Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. Neuroscience 2004;**129**:957-70.

42 Grichtchenko, II, Choi I, Zhong X, Bray-Ward P, Russell JM, Boron WF. Cloning, characterization, and chromosomal mapping of a human electroneutral Na(+)-driven Cl-HCO3 exchanger. The Journal of biological chemistry 2001;**276**:8358-63.

43 Parker MD, Musa-Aziz R, Rojas JD, Choi I, Daly CM, Boron WF. Characterization of human SLC4A10 as an electroneutral Na/HCO3 cotransporter (NBCn2) with Cl- self-exchange activity. The Journal of biological chemistry 2008;**283**:12777-88.

44 Markovich D. Physiological roles and regulation of mammalian sulfate transporters. Physiological reviews 2001;**81**:1499-533.

Lohi H, Lamprecht G, Markovich D, Heil A, Kujala M, Seidler U, *et al.* Isoforms of SLC26A6 mediate anion transport and have functional PDZ interaction domains. Am J Physiol Cell Physiol 2003;**284**:C769-79.

46 Alvarez BV, Vilas GL, Casey JR. Metabolon disruption: a mechanism that regulates bicarbonate transport. The EMBO journal 2005;**24**:2499-511.

47 Aravind L, Koonin EV. The STAS domain - a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists. Curr Biol 2000;**10**:R53-5.

48 Ko SB, Zeng W, Dorwart MR, Luo X, Kim KH, Millen L, *et al.* Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters. Nat Cell Biol 2004;**6**:343-50.

49 Kujala M, Tienari J, Lohi H, Elomaa O, Sariola H, Lehtonen E, *et al.* SLC26A6 and SLC26A7 anion exchangers have a distinct distribution in human kidney. Nephron Exp Nephrol 2005;**101**:e50-8.

50 Simpson JE, Schweinfest CW, Shull GE, Gawenis LR, Walker NM, Boyle KT, *et al.* PAT-1 (Slc26a6) is the predominant apical membrane Cl-/HCO3- exchanger in the upper villous epithelium of the murine duodenum. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2007;**292**:G1079-88.

51 Alvarez BV, Kieller DM, Quon AL, Markovich D, Casey JR. Slc26a6: a cardiac chloride-hydroxyl exchanger and predominant chloride-bicarbonate exchanger of the mouse heart. J Physiol 2004;**561**:721-34.

52 Park M, Ko SB, Choi JY, Muallem G, Thomas PJ, Pushkin A, *et al.* The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator interacts with and regulates the activity of the HCO3-salvage transporter human Na+-HCO3- cotransport isoform 3. The Journal of biological chemistry 2002;**277**:50503-9.

53 Wang Y, Soyombo AA, Shcheynikov N, Zeng W, Dorwart M, Marino CR, *et al.* Slc26a6 regulates CFTR activity in vivo to determine pancreatic duct HCO3- secretion: relevance to cystic fibrosis. The EMBO journal 2006;**25**:5049-57.

54 Shcheynikov N, Wang Y, Park M, Ko SB, Dorwart M, Naruse S, *et al.* Coupling modes and stoichiometry of Cl-/HCO3- exchange by slc26a3 and slc26a6. The Journal of general physiology 2006;**127**:511-24.

55 Ishiguro H, Namkung W, Yamamoto A, Wang Z, Worrell RT, Xu J, *et al.* Effect of Slc26a6 deletion on apical Cl-/HCO3- exchanger activity and cAMP-stimulated bicarbonate secretion in pancreatic duct. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2007;**292**:G447-55.

56 Ishiguro H, Yamamoto A, Nakakuki M, Yi L, Ishiguro M, Yamaguchi M, *et al.* Physiology and pathophysiology of bicarbonate secretion by pancreatic duct epithelium. Nagoya J Med Sci 2012;**74**:1-18.

<sup>57</sup> Jiang Z, Asplin JR, Evan AP, Rajendran VM, Velazquez H, Nottoli TP, *et al.* Calcium oxalate urolithiasis in mice lacking anion transporter Slc26a6. Nat Genet 2006;**38**:474-8.

58 Elgavish A, Meezan E. Altered sulfate transport via anion exchange in CFPAC is corrected by retrovirus-mediated CFTR gene transfer. Am J Physiol 1992;**263**:C176-86.

59 Mahajan RJ, Baldwin ML, Harig JM, Ramaswamy K, Dudeja PK. Chloride transport in human proximal colonic apical membrane vesicles. Biochimica et biophysica acta 1996;**1280**:12-8. 60 Silberg DG, Wang W, Moseley RH, Traber PG. The Down regulated in Adenoma (dra) gene encodes an intestine-specific membrane sulfate transport protein. The Journal of biological chemistry 1995;**270**:11897-902.

61 Chernova MN, Stewart AK, Jiang L, Friedman DJ, Kunes YZ, Alper SL. Structurefunction relationships of AE2 regulation by Ca(i)(2+)-sensitive stimulators NH(4+) and hypertonicity. Am J Physiol Cell Physiol 2003;**284**:C1235-46.

Lau KR, Howorth AJ, Case RM. The effects of bumetanide, amiloride and Ba2+ on fluid and electrolyte secretion in rabbit salivary gland. J Physiol 1990;**425**:407-27.

63 Martinez JR, Cassity N. Effects of 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbene disulphonic acid and amiloride on salivary secretion by isolated, perfused rat submandibular glands. Arch Oral Biol 1985;**30**:797-803.

64 Regeer RR, Lee A, Markovich D. Characterization of the human sulfate anion transporter (hsat-1) protein and gene (SAT1; SLC26A1). DNA Cell Biol 2003;**22**:107-17.

65 Hoglund P, Haila S, Socha J, Tomaszewski L, Saarialho-Kere U, Karjalainen-Lindsberg ML, *et al.* Mutations of the Down-regulated in adenoma (DRA) gene cause congenital chloride diarrhoea. Nat Genet 1996;**14**:316-9.

Everett LA, Glaser B, Beck JC, Idol JR, Buchs A, Heyman M, *et al.* Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). Nat Genet 1997;17:411-22.

67 Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 1989;**245**:1066-73.

68 Dawson DC, Smith SS, Mansoura MK. CFTR: mechanism of anion conduction. Physiological reviews 1999;**79**:S47-75.

69 Tabcharani JA, Linsdell P, Hanrahan JW. Halide permeation in wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels. The Journal of general physiology 1997;**110**:341-54.

70 Cheung M, Akabas MH. Locating the anion-selectivity filter of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) chloride channel. The Journal of general physiology 1997;**109**:289-99.

71 Guinamard R, Akabas MH. Arg352 is a major determinant of charge selectivity in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. Biochemistry 1999;**38**:5528-37.

72 Gadsby DC, Nairn AC. Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. Physiological reviews 1999;**79**:S77-S107.

73 Riordan JR. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Annual review of physiology 1993;**55**:609-30.

74 Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channel. Physiological reviews 1999;**79**:S23-45.

75 Hwang TC, Horie M, Gadsby DC. Functionally distinct phospho-forms underlie incremental activation of protein kinase-regulated Cl- conductance in mammalian heart. The Journal of general physiology 1993;**101**:629-50.

Rich DP, Gregory RJ, Anderson MP, Manavalan P, Smith AE, Welsh MJ. Effect of deleting the R domain on CFTR-generated chloride channels. Science 1991;**253**:205-7.

77 Rich DP, Gregory RJ, Cheng SH, Smith AE, Welsh MJ. Effect of deletion mutations on the function of CFTR chloride channels. Receptors Channels 1993;1:221-32.

Ma J, Zhao J, Drumm ML, Xie J, Davis PB. Function of the R domain in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. The Journal of biological chemistry 1997;**272**:28133-41.

79 Carson MR, Travis SM, Welsh MJ. The two nucleotide-binding domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) have distinct functions in controlling channel activity. The Journal of biological chemistry 1995;**270**:1711-7.

80 Gunderson KL, Kopito RR. Conformational states of CFTR associated with channel gating: the role ATP binding and hydrolysis. Cell 1995;**82**:231-9.

81 Wilkinson DJ, Mansoura MK, Watson PY, Smit LS, Collins FS, Dawson DC. CFTR: the nucleotide binding folds regulate the accessibility and stability of the activated state. The Journal of general physiology 1996;**107**:103-19.

82 Berger HA, Travis SM, Welsh MJ. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl- channel by specific protein kinases and protein phosphatases. The Journal of biological chemistry 1993;**268**:2037-47.

Luo J, Pato MD, Riordan JR, Hanrahan JW. Differential regulation of single CFTR channels by PP2C, PP2A, and other phosphatases. Am J Physiol 1998;**274**:C1397-410.

84 Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. Cell 1993;**73**:1251-4.

85 Wine JJ. The genesis of cystic fibrosis lung disease. J Clin Invest 1999;**103**:309-12.

86 De Boeck K, Zolin A, Cuppens H, Olesen HV, Viviani L. The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis. J Cyst Fibros;**13**:403-9.

87 Salvatore D, Buzzetti R, Baldo E, Forneris MP, Lucidi V, Manunza D, *et al.* An overview of international literature from cystic fibrosis registries. Part 3. Disease incidence, genotype/phenotype correlation, microbiology, pregnancy, clinical complications, lung transplantation, and miscellanea. J Cyst Fibros;**10**:71-85.

88 Southern KW, Munck A, Pollitt R, Travert G, Zanolla L, Dankert-Roelse J, *et al.* A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe. J Cyst Fibros 2007;**6**:57-65.

89 Ratjen F, Doring G. Cystic fibrosis. Lancet 2003;361:681-9.

Davies JC, Wainwright CE, Canny GJ, Chilvers MA, Howenstine MS, Munck A, *et al.* Efficacy and safety of ivacaftor in patients aged 6 to 11 years with cystic fibrosis with a G551D mutation. Am J Respir Crit Care Med;**187**:1219-25.

91 Milla CE, Ratjen F, Marigowda G, Liu F, Waltz D, Rosenfeld M. Lumacaftor/Ivacaftor in Patients Aged 6-11 Years with Cystic Fibrosis and Homozygous for F508del-CFTR. Am J Respir Crit Care Med;**195**:912-20.

92 Haws CM, Nepomuceno IB, Krouse ME, Wakelee H, Law T, Xia Y, *et al.* Delta F508-CFTR channels: kinetics, activation by forskolin, and potentiation by xanthines. Am J Physiol 1996;**270**:C1544-55.

93 French PJ, Bijman J, Bot AG, Boomaars WE, Scholte BJ, de Jonge HR. Genistein activates CFTR Cl- channels via a tyrosine kinase- and protein phosphatase-independent mechanism. Am J Physiol 1997;**273**:C747-53.

94 Schultz BD, Frizzell RA, Bridges RJ. Rescue of dysfunctional deltaF508-CFTR chloride channel activity by IBMX. The Journal of membrane biology 1999;**170**:51-66.

95 Ma T, Thiagarajah JR, Yang H, Sonawane ND, Folli C, Galietta LJ, *et al.* Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxininduced intestinal fluid secretion. J Clin Invest 2002;**110**:1651-8.

96 Muanprasat C, Sonawane ND, Salinas D, Taddei A, Galietta LJ, Verkman AS. Discovery of glycine hydrazide pore-occluding CFTR inhibitors: mechanism, structure-activity analysis, and in vivo efficacy. The Journal of general physiology 2004;**124**:125-37.

97 Leung PS, Ip SP. Pancreatic acinar cell: its role in acute pancreatitis. Int J Biochem CellBiol 2006;**38**:1024-30.

98 Evans RL, Park K, Turner RJ, Watson GE, Nguyen HV, Dennett MR, *et al.* Severe impairment of salivation in Na+/K+/2Cl- cotransporter (NKCC1)-deficient mice. The Journal of biological chemistry 2000;**275**:26720-6.

Zhao H, Muallem S. Agonist-specific regulation of [Na+]i in pancreatic acinar cells.The Journal of general physiology 1995;106:1243-63.

100 Zhao H, Muallem S. Na+, K+, and Cl- transport in resting pancreatic acinar cells. The Journal of general physiology 1995;**106**:1225-42.

101 Kunzelmann K, Kongsuphol P, Aldehni F, Tian Y, Ousingsawat J, Warth R, *et al.* Bestrophin and TMEM16-Ca(2+) activated Cl(-) channels with different functions. Cell calcium 2009;**46**:233-41.

102 Romanenko VG, Catalan MA, Brown DA, Putzier I, Hartzell HC, Marmorstein AD, *et al.* Tmem16A encodes the Ca2+-activated Cl- channel in mouse submandibular salivary gland acinar cells. The Journal of biological chemistry;**285**:12990-3001.

103 Lee MG, Muallem S. Physiology of duct cell secretion. In: Beger H, ed. The Pancreas:An Integrated Textbook of Basic Sciences, Medicine, and Surgery. Malden: BlackwellPublishing Limited, 2008:78-90.

104 Melvin JE, Yule D, Shuttleworth T, Begenisich T. Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. Annual review of physiology 2005;**67**:445-69.

105 Steward MC, Ishiguro H, Case RM. Mechanisms of bicarbonate secretion in the pancreatic duct. Annual review of physiology 2005;**67**:377-409.

106 Petersen OH. Calcium-activated potassium channels and fluid secretion by exocrine glands. Am J Physiol 1986;**251**:G1-13.

107 Kasai H, Augustine GJ. Cytosolic Ca2+ gradients triggering unidirectional fluid secretion from exocrine pancreas. Nature 1990;**348**:735-8.

108 Kiselyov K, Wang X, Shin DM, Zang W, Muallem S. Calcium signaling complexes in microdomains of polarized secretory cells. Cell calcium 2006;**40**:451-9.

109 Thorn P, Lawrie AM, Smith PM, Gallacher DV, Petersen OH. Ca2+ oscillations in pancreatic acinar cells: spatiotemporal relationships and functional implications. Cell calcium 1993;14:746-57.

110 Iwatsuki N, Petersen OH. Pancreatic acinar cells: the acetylcholine equilibrium potential and its ionic dependency. J Physiol 1977;**269**:735-51.

111 Lee MG, Ohana E, Park HW, Yang D, Muallem S. Molecular mechanism of pancreatic and salivary gland fluid and HCO3 secretion. Physiological reviews 2012;**92**:39-74.

112 Argent BE, Case RM. Pancreatic duct cell secretion: control and mechanisms of transport. In: Go VLW DE, Gardner JD, Labenthal E, Reher HA, and Scheele GA, ed. The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease. New York: Raven, 1993:301-50.

113 Argent BE, Gray MA, Steward MC, Case RM. Cell Physiology of Pancreatic Ducts. In: Johnson LR, ed. Physiology of the Gastrointestinal Tract. San Diego: Elsevier, 2006:1376-96.

114 Argent BE, Arkle S, Cullen MJ, Green R. Morphological, biochemical and secretory studies on rat pancreatic ducts maintained in tissue culture. Q J Exp Physiol 1986;71:633-48.

115 Lee MG, Ahn W, Choi JY, Luo X, Seo JT, Schultheis PJ, *et al.* Na(+)-dependent transporters mediate HCO(3)(-) salvage across the luminal membrane of the main pancreatic duct. J Clin Invest 2000;**105**:1651-8.

116 Zhao H, Star RA, Muallem S. Membrane localization of H+ and HCO3- transporters in the rat pancreatic duct. The Journal of general physiology 1994;**104**:57-85.

117 Stewart AK, Yamamoto A, Nakakuki M, Kondo T, Alper SL, Ishiguro H. Functional coupling of apical Cl-/HCO3- exchange with CFTR in stimulated HCO3- secretion by guinea pig interlobular pancreatic duct. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2009;**296**:G1307-17.

118 Zeng W, Lee MG, Yan M, Diaz J, Benjamin I, Marino CR, *et al.* Immuno and functional characterization of CFTR in submandibular and pancreatic acinar and duct cells. Am J Physiol 1997;**273**:C442-55.

119 Park HW, Nam JH, Kim JY, Namkung W, Yoon JS, Lee JS, *et al.* Dynamic regulation of CFTR bicarbonate permeability by [Cl-]i and its role in pancreatic bicarbonate secretion. Gastroenterology 2010;**139**:620-31.

120 Donowitz M, Cha B, Zachos NC, Brett CL, Sharma A, Tse CM, *et al.* NHERF family and NHE3 regulation. J Physiol 2005;**567**:3-11.

121 Weinman EJ, Hall RA, Friedman PA, Liu-Chen LY, Shenolikar S. The association of NHERF adaptor proteins with g protein-coupled receptors and receptor tyrosine kinases. Annual review of physiology 2006;**68**:491-505.

122 He G, Wang HR, Huang SK, Huang CL. Intersectin links WNK kinases to endocytosis of ROMK1. J Clin Invest 2007;**117**:1078-87.

123 Huang CL, Yang SS, Lin SH. Mechanism of regulation of renal ion transport by WNK kinases. Curr Opin Nephrol Hypertens 2008;**17**:519-25.

124 Richardson C, Alessi DR. The regulation of salt transport and blood pressure by the WNK-SPAK/OSR1 signalling pathway. Journal of cell science 2008;**121**:3293-304.

125 Ando H, Mizutani A, Matsu-ura T, Mikoshiba K. IRBIT, a novel inositol 1,4,5trisphosphate (IP3) receptor-binding protein, is released from the IP3 receptor upon IP3 binding to the receptor. The Journal of biological chemistry 2003;**278**:10602-12.

126 Devogelaere B, Nadif Kasri N, Derua R, Waelkens E, Callewaert G, Missiaen L, *et al.* Binding of IRBIT to the IP3 receptor: determinants and functional effects. Biochemical and biophysical research communications 2006;**343**:49-56. 127 Yang D, Shcheynikov N, Zeng W, Ohana E, So I, Ando H, *et al.* IRBIT coordinates epithelial fluid and HCO3- secretion by stimulating the transporters pNBC1 and CFTR in the murine pancreatic duct. J Clin Invest 2009;**119**:193-202.

128 Gray MA, Winpenny JP, Verdon B, O'Reilly CM, Argent BE. Properties and role of calcium-activated chloride channels in pancreatic duct cells. In: Fuller CM, ed. Current Topics in Membranes: Elsevier Science (USA), 2002:231-56.

129 Ashton N, Argent BE, Green R. Characteristics of fluid secretion from isolated rat pancreatic ducts stimulated with secretin and bombesin. J Physiol 1991;**435**:533-46.

130 Ashton N, Evans RL, Elliott AC, Green R, Argent BE. Regulation of fluid secretion and intracellular messengers in isolated rat pancreatic ducts by acetylcholine. J Physiol 1993;471:549-62.

131 Leung PS. The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas. J Physiol 2007;**580**:31-7.

132 Nguyen TD, Moody MW, Savard CE, Lee SP. Secretory effects of ATP on nontransformed dog pancreatic duct epithelial cells. Am J Physiol 1998;**275**:G104-13.

133 Nguyen TD, Okolo CN, Moody MW. Histamine stimulates ion transport by dog pancreatic duct epithelial cells through H1 receptors. Am J Physiol 1998;**275**:G76-84.

134 Szalmay G, Varga G, Kajiyama F, Yang XS, Lang TF, Case RM, *et al.* Bicarbonate and fluid secretion evoked by cholecystokinin, bombesin and acetylcholine in isolated guinea-pig pancreatic ducts. J Physiol 2001;**535**:795-807.

135 Hegyi P, Gray MA, Argent BE. Substance P inhibits bicarbonate secretion from guinea pig pancreatic ducts by modulating an anion exchanger. Am J Physiol Cell Physiol 2003;**285**:C268-76.

Beijer HJ, Maas AH, Charbon GA. A vasopressin-induced decrease in pancreatic blood
flow and in pancreatic exocrine secretion in the anesthetized dog. Pflugers Arch 1984;400:3248.

137 Kitagawa M, Hayakawa T, Kondo T, Shibata T, Oiso Y. Plasma osmolality and exocrine pancreatic secretion. Int J Pancreatol 1990;**6**:25-32.

138 Suzuki A, Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Yoshikawa T, Ko SB, *et al.* 5hydroxytryptamine strongly inhibits fluid secretion in guinea pig pancreatic duct cells. J Clin Invest 2001;**108**:749-56.

139 Hopwood D. Oesophageal defence mechanisms. Digestion 1995;56 Suppl 1:5-8.

140 Orlando RC. Esophageal epithelial defense against acid injury. Journal of clinical gastroenterology 1991;**13 Suppl 2**:S1-5.

141 Orlando RC. Review article: oesophageal mucosal resistance. Alimentary pharmacology & therapeutics 1998;**12**:191-7.

142 Awayda MS, Bengrine A, Tobey NA, Stockand JD, Orlando RC. Nonselective cation transport in native esophageal epithelia. Am J Physiol Cell Physiol 2004;**287**:C395-402.

143 Tobey NA, Argote CM, Awayda MS, Vanegas XC, Orlando RC. Effect of luminal acidity on the apical cation channel in rabbit esophageal epithelium. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2007;**292**:G796-805.

144 Tobey NA, Reddy SP, Khalbuss WE, Silvers SM, Cragoe EJ, Jr., Orlando RC. Na(+)dependent and -independent Cl-/HCO3- exchangers in cultured rabbit esophageal epithelial cells. Gastroenterology 1993;**104**:185-95.

145 Layden TJ, Schmidt L, Agnone L, Lisitza P, Brewer J, Goldstein JL. Rabbit esophageal cell cytoplasmic pH regulation: role of Na(+)-H+ antiport and Na(+)-dependent HCO3-transport systems. Am J Physiol 1992;**263**:G407-13.

146 Shallat S, Schmidt L, Reaka A, Rao D, Chang EB, Rao MC, *et al.* NHE-1 isoform of the Na+/H+ antiport is expressed in the rat and rabbit esophagus. Gastroenterology 1995;**109**:1421-8.

147 Tobey NA, Koves G, Orlando RC. Human esophageal epithelial cells possess an Na+/H+ exchanger for H+ extrusion. The American journal of gastroenterology 1998;**93**:2075-81.

148 Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, Gooszen HG, Johnson CD, Sarr MG, *et al.* Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. Gut 2013;**62**:102-11.

149 Lund H, Tonnesen H, Tonnesen MH, Olsen O. Long-term recurrence and death rates after acute pancreatitis. Scandinavian journal of gastroenterology 2006;**41**:234-8.

150 Williams M, Simms HH. Prognostic usefulness of scoring systems in critically ill patients with severe acute pancreatitis. Critical care medicine 1999;**27**:901-7.

151 Frossard JL, Steer ML, Pastor CM. Acute pancreatitis. Lancet 2008;**371**:143-52.

152 American Gastroenterological Association Institute on "Management of Acute Pancreatits" Clinical P, Economics C, Board AGAIG. AGA Institute medical position statement on acute pancreatitis. Gastroenterology 2007;**132**:2019-21.

153 Working Group IAPAPAAPG. IAP/APA evidence-based guidelines for the management of acute pancreatitis. Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology 2013;**13**:e1-15.

154 Opie E. The etiology of acute hemorrhagic pancreatitis. Johns Hopkins Hospital Bulletin 1901;**12**:182-8.

155 Saluja AK, Bhagat L. Pathophysiology of alcohol-induced pancreatic injury. Pancreas 2003;**27**:327-31.

156 Sarles H. Alcoholism and pancreatitis. Scandinavian journal of gastroenterology 1971;6:193-8.

157 Criddle DN, Murphy J, Fistetto G, Barrow S, Tepikin AV, Neoptolemos JP, *et al.* Fatty acid ethyl esters cause pancreatic calcium toxicity via inositol trisphosphate receptors and loss of ATP synthesis. Gastroenterology 2006;**130**:781-93.

158 Criddle DN, Raraty MG, Neoptolemos JP, Tepikin AV, Petersen OH, Sutton R. Ethanol toxicity in pancreatic acinar cells: mediation by nonoxidative fatty acid metabolites. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;**101**:10738-43.

159 Huang W, Booth DM, Cane MC, Chvanov M, Javed MA, Elliott VL, *et al.* Fatty acid ethyl ester synthase inhibition ameliorates ethanol-induced Ca2+-dependent mitochondrial dysfunction and acute pancreatitis. Gut 2014;**63**:1313-24.

160 Czako L, Yamamoto M, Otsuki M. Exocrine pancreatic function in rats after acute pancreatitis. Pancreas 1997;**15**:83-90.

161 Czako L, Yamamoto M, Otsuki M. Pancreatic fluid hypersecretion in rats after acute pancreatitis. Digestive diseases and sciences 1997;**42**:265-72.

162 Maléth J, Venglovecz V, Rázga Zs, Tiszlavic L, Rakonczay Z Jr., Hegyi P. The nonconjugated chenodeoxycholate induces severe mitochondrial damage and inhibits bicarbonate transport mechanisms in pancreatic duct cells. Gut 2010;**In press**.

163 Venglovecz V, Rakonczay Z, Jr., Ozsvari B, Takacs T, Lonovics J, Varro A, *et al.* Effects of bile acids on pancreatic ductal bicarbonate secretion in guinea pig. Gut 2008;**57**:1102-12.

164 Yamamoto A, Ishiguro H, Ko SB, Suzuki A, Wang Y, Hamada H, *et al.* Ethanol induces fluid hypersecretion from guinea-pig pancreatic duct cells. J Physiol 2003;**551**:917-26.

165 Raju SV, Wang G. Suppression of adenosine-activated chloride transport by ethanol in airway epithelia. PLoS One 2012;7:e32112.

166 Judak L, Hegyi P, Rakonczay Z, Jr., Maleth 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. Pflugers Arch;**466**:549-62. 167 Venglovecz V, Hegyi P, Rakonczay Z, Jr., Tiszlavicz L, Nardi A, Grunnet M, *et al.* Pathophysiological relevance of apical large-conductance Ca(2)+-activated potassium channels in pancreatic duct epithelial cells. Gut 2011;**60**:361-9.

168 de Caestecker JS, Jazrawi RP, Petroni ML, Northfield TC. Ursodeoxycholic acid in chronic liver disease. Gut 1991;**32**:1061-5.

169 Festi D, Montagnani M, Azzaroli F, Lodato F, Mazzella G, Roda A, *et al.* Clinical efficacy and effectiveness of ursodeoxycholic acid in cholestatic liver diseases. Current clinical pharmacology 2007;**2**:155-77.

170 Poupon RE, Poupon R, Balkau B. Ursodiol for the long-term treatment of primary biliary cirrhosis. The UDCA-PBC Study Group. N Engl J Med 1994;**330**:1342-7.

171 Rust C, Beuers U. Medical treatment of primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. Clinical reviews in allergy & immunology 2005;**28**:135-45.

172 Botla R, Spivey JR, Aguilar H, Bronk SF, Gores GJ. Ursodeoxycholate (UDCA) inhibits the mitochondrial membrane permeability transition induced by glycochenodeoxycholate: a mechanism of UDCA cytoprotection. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 1995;**272**:930-8.

173 Pusl T, Vennegeerts T, Wimmer R, Denk GU, Beuers U, Rust C. Tauroursodeoxycholic acid reduces bile acid-induced apoptosis by modulation of AP-1. Biochemical and biophysical research communications 2008;**367**:208-12.

174 Rodrigues CM, Fan G, Ma X, Kren BT, Steer CJ. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. J Clin Invest 1998;**101**:2790-9.

175 Rodrigues CM, Fan G, Wong PY, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. Molecular medicine 1998;4:165-78.

176 Schoemaker MH, Conde de la Rosa L, Buist-Homan M, Vrenken TE, Havinga R, Poelstra K, *et al.* Tauroursodeoxycholic acid protects rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis via activation of survival pathways. Hepatology 2004;**39**:1563-73.

177 Katona M, Hegyi P, Kui B, Balla Z, Rakonczay Z, Jr., Razga Z, *et al.* A novel, protective role of ursodeoxycholate in bile-induced pancreatic ductal injury. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2016;**310**:G193-204.

178 DeVault KR, Castell DO. Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. The Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. The American journal of gastroenterology 1999;**94**:1434-42.

179 Katz PO, Gerson LB, Vela MF. Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease. The American journal of gastroenterology 2013;**108**:308-28; quiz 29.

180 Dent J, El-Serag HB, Wallander MA, Johansson S. Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. Gut 2005;**54**:710-7.

181 Locke GR, 3rd, Talley NJ, Fett SL, Zinsmeister AR, Melton LJ, 3rd. Prevalence and clinical spectrum of gastroesophageal reflux: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. Gastroenterology 1997;**112**:1448-56.

182 Goldberg HI, Dodds WJ, Gee S, Montgomery C, Zboralske FF. Role of acid and pepsin in acute experimental esophagitis. Gastroenterology 1969;**56**:223-30.

183 Salo JA, Kivilaakso E. Role of bile salts and trypsin in the pathogenesis of experimental alkaline esophagitis. Surgery 1983;**93**:525-32.

184 McQuaid KR, Laine L, Fennerty MB, Souza R, Spechler SJ. Systematic review: the role of bile acids in the pathogenesis of gastro-oesophageal reflux disease and related neoplasia. Alimentary pharmacology & therapeutics 2011;**34**:146-65.

185 Spechler SJ, Souza RF. Barrett's esophagus. N Engl J Med 2014;**371**:836-45.

186 Ronkainen J, Aro P, Storskrubb T, Johansson SE, Lind T, Bolling-Sternevald E, *et al.* Prevalence of Barrett's esophagus in the general population: an endoscopic study. Gastroenterology 2005;**129**:1825-31.

187 Fan X, Snyder N. Prevalence of Barrett's esophagus in patients with or without GERD symptoms: role of race, age, and gender. Digestive diseases and sciences 2009;**54**:572-7.

188 Barbera M, Fitzgerald RC. Cellular origin of Barrett's metaplasia and oesophageal stem cells. Biochemical Society transactions 2010;**38**:370-3.

189 Nemeth IB, Rosztoczy A, Izbeki F, Roka R, Gecse K, Sukosd F, *et al.* A renewed insight into Barrett's esophagus: comparative histopathological analysis of esophageal columnar metaplasia. Dis Esophagus 2012;**25**:395-402.

190 Seery JP. Stem cells of the oesophageal epithelium. Journal of cell science 2002;**115**:1783-9.

191 Stolte M, Vieth M. [Barrett metaplasia: how dangerous is it really?]. Zeitschrift fur Gastroenterologie 2002;40 Suppl 2:5-8.

192 Corley DA, Levin TR, Habel LA, Weiss NS, Buffler PA. Surveillance and survival in Barrett's adenocarcinomas: a population-based study. Gastroenterology 2002;**122**:633-40.

193 Cameron AJ, Ott BJ, Payne WS. The incidence of adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett's) esophagus. N Engl J Med 1985;**313**:857-9.

194 Flejou JF. Barrett's oesophagus: from metaplasia to dysplasia and cancer. Gut 2005;54Suppl 1:i6-12.

195 Fitzgerald RC, Omary MB, Triadafilopoulos G. Altered sodium-hydrogen exchange activity is a mechanism for acid-induced hyperproliferation in Barrett's esophagus. Am J Physiol 1998;**275**:G47-55.

196 Goldman A, Shahidullah M, Goldman D, Khailova L, Watts G, Delamere N, *et al.* A novel mechanism of acid and bile acid-induced DNA damage involving Na+/H+ exchanger: implication for Barrett's oesophagus. Gut 2010;**59**:1606-16.

197 Hopwood D, Bateson MC, Milne G, Bouchier IA. Effects of bile acids and hydrogen ion on the fine structure of oesophageal epithelium. Gut 1981;**22**:306-11.

198 Jolly AJ, Wild CP, Hardie LJ. Acid and bile salts induce DNA damage in human oesophageal cell lines. Mutagenesis 2004;**19**:319-24.

199 Safaie-Shirazi S, DenBesten L, Zike WL. Effect of bile salts on the ionic permeability of the esophageal mucosa and their role in the production of esophagitis. Gastroenterology 1975;**68**:728-33.

200 Laczko D, Rosztoczy A, Birkas K, Katona M, Rakonczay Z, Jr., Tiszlavicz L, *et al.* Role of ion transporters in the bile acid-induced esophageal injury. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2016;**311**:G16-31.

201 Hegyi P, Rakonczay Z, Jr., Gray MA, Argent BE. Measurement of intracellular pH in pancreatic duct cells: a new method for calibrating the fluorescence data. Pancreas 2004;**28**:427-34.

202 Thomas JA, Buchsbaum RN, Zimniak A, Racker E. Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. Biochemistry 1979;**18**:2210-8.

203 Lee HI, Choi CI, Sa JH, Lee YJ, Bae JW, Jang CG, *et al.* Ursodeoxycholic acid, an inhibitor of hepatocyte nuclear factor 1alpha, did not increase the systemic exposure of pitavastatin. International journal of clinical pharmacology and therapeutics 2014;**52**:981-5.

204 Thomson AB, Keelan M. Feeding rats diets containing cheno- or ursodeoxycholic acid or cholestyramine modifies intestinal uptake of glucose and lipids. Digestion 1987;**38**:160-70.

205 Maleth J, Balazs A, Pallagi P, Balla Z, Kui B, Katona M, *et al.* Alcohol disrupts levels and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to promote development of pancreatitis. Gastroenterology 2015;**148**:427-39 e16. 206 Devor DC, Sekar MC, Frizzell RA, Duffey ME. Taurodeoxycholate activates potassium and chloride conductances via an IP3-mediated release of calcium from intracellular stores in a colonic cell line (T84). J Clin Invest 1993;**92**:2173-81.

207 Nguyen TD, Moody MW. Calcium-activated potassium conductances on cultured nontransformed dog pancreatic duct epithelial cells. Pancreas 1998;17:348-58.

208 Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, *et al.* Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion Buthus tamulus. The Journal of biological chemistry 1990;**265**:11083-90.

209 Dunn PM. UCL 1684: a potent blocker of Ca2+ -activated K+ channels in rat adrenal chromaffin cells in culture. Eur J Pharmacol 1999;**368**:119-23.

210 Wulff H, Miller MJ, Hansel W, Grissmer S, Cahalan MD, Chandy KG. Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca2+-activated K+ channel, IKCa1: a potential immunosuppressant. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;**97**:8151-6.

211 Ikegami T, Matsuzaki Y, Fukushima S, Shoda J, Olivier JL, Bouscarel B, *et al.* Suppressive effect of ursodeoxycholic acid on type IIA phospholipase A2 expression in HepG2 cells. Hepatology 2005;**41**:896-905.

Im E, Akare S, Powell A, Martinez JD. Ursodeoxycholic acid can suppress deoxycholic acid-induced apoptosis by stimulating Akt/PKB-dependent survival signaling. Nutrition and cancer 2005;**51**:110-6.

213 Saeki T, Yui S, Hirai T, Fujii T, Okada S, Kanamoto R. Ursodeoxycholic acid protects colon cancer HCT116 cells from deoxycholic acid-induced apoptosis by inhibiting apoptosome formation. Nutrition and cancer 2012;**64**:617-26.

214 Kruger B, Albrecht E, Lerch MM. The role of intracellular calcium signaling in premature protease activation and the onset of pancreatitis. Am J Pathol 2000;**157**:43-50.

215 Mithofer K, Fernandez-del Castillo C, Frick TW, Lewandrowski KB, Rattner DW, Warshaw AL. Acute hypercalcemia causes acute pancreatitis and ectopic trypsinogen activation in the rat. Gastroenterology 1995;**109**:239-46.

216 Raraty M, Ward J, Erdemli G, Vaillant C, Neoptolemos JP, Sutton R, *et al.* Calciumdependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;**97**:13126-31.

217 Czepan M, Rakonczay Z, Jr., Varro A, Steele I, Dimaline R, Lertkowit N, *et al.* NHE1 activity contributes to migration and is necessary for proliferation of human gastric myofibroblasts. Pflugers Arch 2012;**463**:459-75.

218 Toth-Molnar E, Venglovecz V, Ozsvari B, Rakonczay Z, Jr., Varro A, Papp JG, *et al.* New experimental method to study acid/base transporters and their regulation in lacrimal gland ductal epithelia. Investigative ophthalmology & visual science 2007;**48**:3746-55.

219 Ghatak S, Reveiller M, Toia L, Ivanov A, Godfrey TE, Peters JH. Bile acid at low pH reduces squamous differentiation and activates EGFR signaling in esophageal squamous cells in 3-D culture. Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract 2013;17:1723-31.

220 Maenz DD, Forsyth GW. Calcium ionophore activity of intestinal secretory compounds. An in vitro porcine model for the effects of bile acids, hydroxy-fatty acids and dioctyl sulfosuccinate. Digestion 1984;**30**:138-50.

221 Oelberg DG, Wang LB, Sackman JW, Adcock EW, Lester R, Dubinsky WP. Bile saltinduced calcium fluxes in artificial phospholipid vesicles. Biochimica et biophysica acta 1988;**937**:289-99.

Choi JY, Muallem D, Kiselyov K, Lee MG, Thomas PJ, Muallem S. Aberrant CFTR-dependent HCO3- transport in mutations associated with cystic fibrosis. Nature 2001;410:94-7.

223 Ko SB, Mizuno N, Yatabe Y, Yoshikawa T, Ishiguro H, Yamamoto A, *et al.* Corticosteroids correct aberrant CFTR localization in the duct and regenerate acinar cells in autoimmune pancreatitis. Gastroenterology 2010;**138**:1988-96.

224 Sugiyama M, Kobori O, Atomi Y, Wada N, Kuroda A, Muto T. Pancreatic exocrine function during acute exacerbation in WBN/Kob rats with spontaneous chronic pancreatitis. Int J Pancreatol 1996;**20**:191-6.

225 Cohn JA. Reduced CFTR function and the pathobiology of idiopathic pancreatitis. Journal of clinical gastroenterology 2005;**39**:S70-7.

Cohn JA, Bornstein JD, Jowell PS. Cystic fibrosis mutations and genetic predisposition to idiopathic chronic pancreatitis. The Medical clinics of North America 2000;**84**:621-31, ix.

227 Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. N Engl J Med 1998;**339**:653-8.

228 Cohn JA, Jowell PS. Are mutations in the cystic fibrosis gene important in chronic pancreatitis? The Surgical clinics of North America 1999;**79**:723-31, viii.

229 Cohn JA, Neoptolemos JP, Feng J, Yan J, Jiang Z, Greenhalf W, *et al.* Increased risk of idiopathic chronic pancreatitis in cystic fibrosis carriers. Human mutation 2005;**26**:303-7.

230 Schneider A, Larusch J, Sun X, Aloe A, Lamb J, Hawes R, *et al.* Combined bicarbonate conductance-impairing variants in CFTR and SPINK1 variants are associated with chronic pancreatitis in patients without cystic fibrosis. Gastroenterology 2011;**140**:162-71.

Weiss FU, Simon P, Bogdanova N, Shcheynikov N, Muallem S, Lerch MM. Functional characterisation of the CFTR mutations M348V and A1087P from patients with pancreatitis suggests functional interaction between CFTR monomers. Gut 2009;**58**:733-4.

Freedman SD, Kern HF, Scheele GA. Pancreatic acinar cell dysfunction in CFTR(-/-) mice is associated with impairments in luminal pH and endocytosis. Gastroenterology 2001;**121**:950-7.

Bhoomagoud M, Jung T, Atladottir J, Kolodecik TR, Shugrue C, Chaudhuri A, *et al.* Reducing extracellular pH sensitizes the acinar cell to secretagogue-induced pancreatitis responses in rats. Gastroenterology 2009;**137**:1083-92.

234 Noble MD, Romac J, Vigna SR, Liddle RA. A pH-sensitive, neurogenic pathway mediates disease severity in a model of post-ERCP pancreatitis. Gut 2008;**57**:1566-71.

235 Ishiguro H, Steward MC, Sohma Y, Kubota T, Kitagawa M, Kondo T, *et al.* Membrane potential and bicarbonate secretion in isolated interlobular ducts from guinea-pig pancreas. The Journal of general physiology 2002;**120**:617-28.

236 Gray MA, Argent BE. Non-selective cation channel on pancreatic duct cells. Biochimica et biophysica acta 1990;**1029**:33-42.

237 Gray MA, Greenwell JR, Garton AJ, Argent BE. Regulation of maxi-K+ channels on pancreatic duct cells by cyclic AMP-dependent phosphorylation. The Journal of membrane biology 1990;115:203-15.

238 Grunnet M, Hay-Schmidt A, Klaerke DA. Quantification and distribution of big conductance Ca2+-activated K+ channels in kidney epithelia. Biochimica et biophysica acta 2005;**1714**:114-24.

239 Grunnet M, Knaus HG, Solander C, Klaerke DA. Quantification and distribution of Ca(2+)-activated maxi K(+) channels in rabbit distal colon. Am J Physiol 1999;**277**:G22-30.

Hay-Schmidt A, Grunnet M, Abrahamse SL, Knaus HG, Klaerke DA. Localization of Ca2+ -activated big-conductance K+ channels in rabbit distal colon. Pflugers Arch 2003;**446**:61-8.

241 Romanenko V, Nakamoto T, Srivastava A, Melvin JE, Begenisich T. Molecular identification and physiological roles of parotid acinar cell maxi-K channels. The Journal of biological chemistry 2006;**281**:27964-72.

242 Romanenko VG, Nakamoto T, Srivastava A, Begenisich T, Melvin JE. Regulation of membrane potential and fluid secretion by Ca2+-activated K+ channels in mouse submandibular glands. J Physiol 2007;**581**:801-17.

243 Palmer ML, Schiller KR, O'Grady SM. Apical SK potassium channels and Ca2+dependent anion secretion in endometrial epithelial cells. J Physiol 2008;**586**:717-26.

Song P, Groos S, Riederer B, Feng Z, Krabbenhoft A, Smolka A, *et al.* KCNQ1 is the luminal K+ recycling channel during stimulation of gastric acid secretion. J Physiol 2009;**587**:3955-65.

Ishiguro H, Naruse S, Kitagawa M, Hayakawa T, Case RM, Steward MC. Luminal ATP stimulates fluid and HCO3- secretion in guinea-pig pancreatic duct. J Physiol 1999;519 Pt 2:551-8.

246 Bentzen BH, Nardi A, Calloe K, Madsen LS, Olesen SP, Grunnet M. The small molecule NS11021 is a potent and specific activator of Ca2+-activated big-conductance K+ channels. Mol Pharmacol 2007;**72**:1033-44.

Aon MA, Cortassa S, Wei AC, Grunnet M, O'Rourke B. Energetic performance is improved by specific activation of K(+) fluxes through K(Ca) channels in heart mitochondria. Biochimica et biophysica acta 2009;**1797**:71-80.

248 Bentzen BH, Osadchii O, Jespersen T, Hansen RS, Olesen SP, Grunnet M. Activation of big conductance Ca(2+)-activated K (+) channels (BK) protects the heart against ischemia-reperfusion injury. Pflugers Arch 2009;**457**:979-88.

249 Perides G, Laukkarinen JM, Vassileva G, Steer ML. Biliary acute pancreatitis in mice is mediated by the G-protein-coupled cell surface bile acid receptor Gpbar1. Gastroenterology 2010;**138**:715-25.

Duboc H, Tache Y, Hofmann AF. The bile acid TGR5 membrane receptor: from basic research to clinical application. Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver 2014;46:302-12.

251 Yamaguchi H, Okada M, Akitaya S, Ohara H, Mikkaichi T, Ishikawa H, *et al.* Transport of fluorescent chenodeoxycholic acid via the human organic anion transporters OATP1B1 and OATP1B3. Journal of lipid research 2006;47:1196-202.

252 Maleth J, Venglovecz V, Razga Z, Tiszlavicz L, Rakonczay Z, Jr., Hegyi P. Nonconjugated chenodeoxycholate induces severe mitochondrial damage and inhibits bicarbonate transport in pancreatic duct cells. Gut 2011;**60**:136-8. 253 Rodrigues CM, Ma X, Linehan-Stieers C, Fan G, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome c release in apoptosis by inhibiting mitochondrial membrane depolarization and channel formation. Cell death and differentiation 1999;**6**:842-54.

Boyer JL. New concepts of mechanisms of hepatocyte bile formation. Physiological reviews 1980;**60**:303-26.

255 Sola S, Castro RE, Kren BT, Steer CJ, Rodrigues CM. Modulation of nuclear steroid receptors by ursodeoxycholic acid inhibits TGF-beta1-induced E2F-1/p53-mediated apoptosis of rat hepatocytes. Biochemistry 2004;**43**:8429-38.

256 Sola S, Ma X, Castro RE, Kren BT, Steer CJ, Rodrigues CM. Ursodeoxycholic acid modulates E2F-1 and p53 expression through a caspase-independent mechanism in transforming growth factor beta1-induced apoptosis of rat hepatocytes. The Journal of biological chemistry 2003;**278**:48831-8.

257 Gerasimenko JV, Flowerdew SE, Voronina SG, Sukhomlin TK, Tepikin AV, Petersen OH, *et al.* Bile acids induce Ca2+ release from both the endoplasmic reticulum and acidic intracellular calcium stores through activation of inositol trisphosphate receptors and ryanodine receptors. The Journal of biological chemistry 2006;**281**:40154-63.

258 Voronina S, Longbottom R, Sutton R, Petersen OH, Tepikin A. Bile acids induce calcium signals in mouse pancreatic acinar cells: implications for bile-induced pancreatic pathology. J Physiol 2002;**540**:49-55.

Rolo AP, Oliveira PJ, Moreno AJ, Palmeira CM. Chenodeoxycholate is a potent inducer of the permeability transition pore in rat liver mitochondria. Bioscience reports 2001;**21**:73-80.

260 Rolo AP, Oliveira PJ, Moreno AJ, Palmeira CM. Chenodeoxycholate induction of mitochondrial permeability transition pore is associated with increased membrane fluidity and cytochrome c release: protective role of carvedilol. Mitochondrion 2003;**2**:305-11.

261 Woolbright BL, Jaeschke H. Novel insight into mechanisms of cholestatic liver injury. World journal of gastroenterology : WJG 2012;**18**:4985-93.

262 Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW, Gumpricht E, Sokol RJ. Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. Hepatology 2001;**33**:616-26.

Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Roberts PJ, Svingen PA, *et al.* Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. J Clin Invest 1999;**103**:137-45.

Sun W, Watanabe Y, Toki A, Wang ZQ. Beneficial effects of hydrocortisone in induced acute pancreatitis of rats. Chinese medical journal 2007;**120**:1757-61.

Sun W, Watanabe Y, Wang ZQ. Expression and significance of ICAM-1 and its counter receptors LFA-1 and Mac-1 in experimental acute pancreatitis of rats. World journal of gastroenterology : WJG 2006;12:5005-9.

Booth DM, Murphy JA, Mukherjee R, Awais M, Neoptolemos JP, Gerasimenko OV, *et al.* Reactive oxygen species induced by bile acid induce apoptosis and protect against necrosis in pancreatic acinar cells. Gastroenterology 2011;**140**:2116-25.

267 Voronina SG, Barrow SL, Gerasimenko OV, Petersen OH, Tepikin AV. Effects of secretagogues and bile acids on mitochondrial membrane potential of pancreatic acinar cells: comparison of different modes of evaluating DeltaPsim. The Journal of biological chemistry 2004;**279**:27327-38.

Voronina SG, Barrow SL, Simpson AW, Gerasimenko OV, da Silva Xavier G, Rutter GA, *et al.* Dynamic changes in cytosolic and mitochondrial ATP levels in pancreatic acinar cells. Gastroenterology 2010;**138**:1976-87.

269 Ros E, Navarro S, Bru C, Garcia-Puges A, Valderrama R. Occult microlithiasis in 'idiopathic' acute pancreatitis: prevention of relapses by cholecystectomy or ursodeoxycholic acid therapy. Gastroenterology 1991;**101**:1701-9.

270 Testoni PA, Caporuscio S, Bagnolo F, Lella F. Idiopathic recurrent pancreatitis: longterm results after ERCP, endoscopic sphincterotomy, or ursodeoxycholic acid treatment. The American journal of gastroenterology 2000;**95**:1702-7.

271 Venneman NG, vanBerge-Henegouwen GP, van Erpecum KJ. Pharmacological manipulation of biliary water and lipids: potential consequences for prevention of acute biliary pancreatitis. Current drug targets Immune, endocrine and metabolic disorders 2005;**5**:193-8.

272 Roda A, Hrelia P, Paolini M, Calzolari M, Grigolo B, Simoni P, *et al.* Pharmacokinetics of ursodeoxycholic acid in rat. Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society 1991;**23**:327-35.

273 Benz C, Angermuller S, Otto G, Sauer P, Stremmel W, Stiehl A. Effect of tauroursodeoxycholic acid on bile acid-induced apoptosis in primary human hepatocytes. European journal of clinical investigation 2000;**30**:203-9.

274 Benz C, Angermuller S, Tox U, Kloters-Plachky P, Riedel HD, Sauer P, *et al.* Effect of tauroursodeoxycholic acid on bile-acid-induced apoptosis and cytolysis in rat hepatocytes. Journal of hepatology 1998;**28**:99-106.

Beuers U, Fischer S, Spengler U, Paumgartner G. Formation of iso-ursodeoxycholic acid during administration of ursodeoxycholic acid in man. Journal of hepatology 1991;13:97-103.

276 Marschall HU, Roeb E, Yildiz Y, Busch N, Nguyen H, Purucker E, *et al.* Study of human isoursodeoxycholic acid metabolism. Journal of hepatology 1997;**26**:863-70.

277 Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. Annu Rev Biochem 2003;**72**:137-74.

278 Lerch MM, Saluja AK, Runzi M, Dawra R, Saluja M, Steer ML. Pancreatic duct obstruction triggers acute necrotizing pancreatitis in the opossum. Gastroenterology 1993;104:853-61.

279 Senninger N, Moody FG, Coelho JC, Van Buren DH. The role of biliary obstruction in the pathogenesis of acute pancreatitis in the opossum. Surgery 1986;**99**:688-93.

280 Begley M, Gahan CG, Hill C. The interaction between bacteria and bile. FEMS Microbiol Rev 2005;**29**:625-51.

281 Leuschner U, Guldutuna S, Bhatti S, Elze A, Imhof M, You T, *et al.* TUDCA and UDCA are incorporated into hepatocyte membranes: different sites, but similar effects. Ital J Gastroenterol 1995;**27**:376-7.

Heuman DM. Quantitative estimation of the hydrophilic-hydrophobic balance of mixed bile salt solutions. Journal of lipid research 1989;**30**:719-30.

283 Neiman J. Alcohol as a risk factor for brain damage: neurologic aspects. Alcohol Clin Exp Res 1998;**22**:346S-51S.

284 Ronksley PE, Brien SE, Turner BJ, Mukamal KJ, Ghali WA. Association of alcohol consumption with selected cardiovascular disease outcomes: a systematic review and metaanalysis. Bmj 2011;**342**:d671.

285 Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. Nature reviews Cancer 2007;7:599-612.

286 Testino G. Alcoholic diseases in hepato-gastroenterology: a point of view. Hepato-gastroenterology 2008;**55**:371-7.

287 Cahill A, Hershman S, Davies A, Sykora P. Ethanol feeding enhances age-related deterioration of the rat hepatic mitochondrion. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2005;**289**:G1115-23.

288 Yang SS, Huang CC, Chen JR, Chiu CL, Shieh MJ, Lin SJ, *et al.* Effects of ethanol on antioxidant capacity in isolated rat hepatocytes. World journal of gastroenterology : WJG 2005;**11**:7272-6.

289 Lee WK, Regan TJ. Alcoholic cardiomyopathy: is it dose-dependent? Congestive heart failure 2002;**8**:303-6.

290 Mantle D, Falkous G, Peters TJ, Preedy VR. Effect of ethanol and acetaldehyde on intracellular protease activities in human liver, brain and muscle tissues in vitro. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry 1999;**281**:101-8.

291 Sharer N, Schwarz M, Malone G, Howarth A, Painter J, Super M, *et al.* Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. N Engl J Med 1998;**339**:645-52.

Soderberg BL, Salem RO, Best CA, Cluette-Brown JE, Laposata M. Fatty acid ethyl esters. Ethanol metabolites that reflect ethanol intake. Am J Clin Pathol 2003;119 Suppl:S94-9.

293 Durbec JP, Sarles H. Multicenter survey of the etiology of pancreatic diseases. Relationship between the relative risk of developing chronic pancreaitis and alcohol, protein and lipid consumption. Digestion 1978;**18**:337-50.

Wilson JS, Apte MV. Role of alcohol metabolism in alcoholic pancreatitis. Pancreas 2003;**27**:311-5.

295 Gukovskaya AS, Mouria M, Gukovsky I, Reyes CN, Kasho VN, Faller LD, *et al.* Ethanol metabolism and transcription factor activation in pancreatic acinar cells in rats. Gastroenterology 2002;**122**:106-18.

Haber PS, Apte MV, Applegate TL, Norton ID, Korsten MA, Pirola RC, *et al.* Metabolism of ethanol by rat pancreatic acinar cells. J Lab Clin Med 1998;**132**:294-302.

297 Majumdar AP, Vesenka GD, Dubick MA, Yu GS, DeMorrow JM, Geokas MC. Morphological and biochemical changes of the pancreas in rats treated with acetaldehyde. Am J Physiol 1986;**250**:G598-606.

298 Sankaran H, Lewin MB, Wong A, Deveney CW, Wendland MF, Leimgruber RM, *et al.* Irreversible inhibition by acetaldehyde of cholecystokinin-induced amylase secretion from isolated rat pancreatic acini. Biochem Pharmacol 1985;**34**:2859-63.

Hamamoto T, Yamada S, Hirayama C. Nonoxidative metabolism of ethanol in the pancreas; implication in alcoholic pancreatic damage. Biochem Pharmacol 1990;**39**:241-5.

300 Laposata EA, Lange LG. Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse. Science 1986;**231**:497-9.

301 Haber PS, Wilson JS, Apte MV, Pirola RC. Fatty acid ethyl esters increase rat pancreatic lysosomal fragility. J Lab Clin Med 1993;**121**:759-64.

302 Berger AL, Ikuma M, Welsh MJ. Normal gating of CFTR requires ATP binding to both nucleotide-binding domains and hydrolysis at the second nucleotide-binding domain. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;**102**:455-60.

303 Hwang TC, Sheppard DN. Gating of the CFTR Cl- channel by ATP-driven nucleotidebinding domain dimerisation. J Physiol 2009;**587**:2151-61.

304 Vergani P, Lockless SW, Nairn AC, Gadsby DC. CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. Nature 2005;**433**:876-80.

Peters-Golden M, Shelly C. Inhibitory effect of exogenous arachidonic acid on alveolar
macrophage 5-lipoxygenase metabolism. Role of ATP depletion. J Immunol 1988;140:195866.

306 Maleth J, Rakonczay Z, Jr., Venglovecz V, Dolman NJ, Hegyi P. Central role of mitochondrial injury in the pathogenesis of acute pancreatitis. Acta physiologica 2013;**207**:226-35.

307 Petersen OH, Tepikin AV, Gerasimenko JV, Gerasimenko OV, Sutton R, Criddle DN. Fatty acids, alcohol and fatty acid ethyl esters: toxic Ca2+ signal generation and pancreatitis. Cell calcium 2009;**45**:634-42.

308 Goldstein DB. Effect of alcohol on cellular membranes. Ann Emerg Med 1986;15:1013-8.

309 Hoek JB, Cahill A, Pastorino JG. Alcohol and mitochondria: a dysfunctional relationship. Gastroenterology 2002;**122**:2049-63.

310 Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem J 1973;**134**:707-16.

311 Bailey SM, Cunningham CC. Acute and chronic ethanol increases reactive oxygen species generation and decreases viability in fresh, isolated rat hepatocytes. Hepatology 1998;**28**:1318-26.

312 Yamada T, Ishida Y, Nakamura Y, Shimada S. Bile-acid-induced calcium signaling in mouse esophageal epithelial cells. Biochemical and biophysical research communications 2011;**414**:789-94.

313 Mukaisho K, Hagiwara T, Nakayama T, Hattori T, Sugihara H. Potential mechanism of corpus-predominant gastritis after PPI therapy in Helicobacter pylori-positive patients with GERD. World journal of gastroenterology : WJG 2014;**20**:11962-5.

314 Stamp DH. Three hypotheses linking bile to carcinogenesis in the gastrointestinal tract: certain bile salts have properties that may be used to complement chemotherapy. Med Hypotheses 2002;**59**:398-405.

315 Schweitzer EJ, Bass BL, Batzri S, Harmon JW. Bile acid accumulation by rabbit esophageal mucosa. Digestive diseases and sciences 1986;**31**:1105-13.

316 Hofmann AF, Mysels KJ. Bile acid solubility and precipitation in vitro and in vivo: the role of conjugation, pH, and Ca2+ ions. Journal of lipid research 1992;**33**:617-26.

317 Goldman A, Chen H, Khan MR, Roesly H, Hill KA, Shahidullah M, *et al.* The Na+/H+ exchanger controls deoxycholic acid-induced apoptosis by a H+-activated, Na+-dependent ionic shift in esophageal cells. PLoS One 2011;**6**:e23835.

318 Li D, Cao W. Role of intracellular calcium and NADPH oxidase NOX5-S in acidinduced DNA damage in Barrett's cells and Barrett's esophageal adenocarcinoma cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2014;**306**:G863-72.

319 Capied T, Combettes L, Noel J, Claret M. Evidence for bile acid-evoked oscillations of Ca2(+)-dependent K+ permeability unrelated to a D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate effect in isolated guinea pig liver cells. The Journal of biological chemistry 1991;**266**:268-73.

320 Pallagi-Kunstar E, Farkas K, Maleth J, Rakonczay Z, Jr., Nagy F, Molnar T, *et al.* Bile acids inhibit Na/H exchanger and Cl /HCO exchanger activities via cellular energy breakdown and Ca overload in human colonic crypts. Pflugers Arch 2014.

321 Aromataris EC, Castro J, Rychkov GY, Barritt GJ. Store-operated Ca(2+) channels and Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1) are targets for the actions of bile acids on liver cells. Biochimica et biophysica acta 2008;**1783**:874-85.

322 Orlando RC, Powell DW, Carney CN. Pathophysiology of acute acid injury in rabbit esophageal epithelium. J Clin Invest 1981;**68**:286-93.

323 Kong J, Whelan KA, Laczko D, Dang B, Caro Monroig A, Soroush A, *et al.* Autophagy levels are elevated in barrett's esophagus and promote cell survival from acid and oxidative stress. Molecular carcinogenesis 2015.

324 Namkung W, Lee JA, Ahn W, Han W, Kwon SW, Ahn DS, *et al.* Ca2+ activates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator- and Cl- -dependent HCO3 transport in pancreatic duct cells. The Journal of biological chemistry 2003;**278**:200-7.

325 Zsembery A, Strazzabosco M, Graf J. Ca2+-activated Cl- channels can substitute for CFTR in stimulation of pancreatic duct bicarbonate secretion. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 2000;14:2345-56.

326 Emmer E, Rood RP, Wesolek JH, Cohen ME, Braithwaite RS, Sharp GW, *et al.* Role of calcium and calmodulin in the regulation of the rabbit ileal brush-border membrane Na+/H+ antiporter. The Journal of membrane biology 1989;**108**:207-15.

327 Weinman EJ, Dubinsky WP, Shenolikar S. Reconstitution of cAMP-dependent protein kinase regulated renal Na+-H+ exchanger. The Journal of membrane biology 1988;**101**:11-8.

328 Chow CW. Regulation and intracellular localization of the epithelial isoforms of the Na+/H+ exchangers NHE2 and NHE3. Clinical and investigative medicine Medecine clinique et experimentale 1999;**22**:195-206.

329 Guan Y, Dong J, Tackett L, Meyer JW, Shull GE, Montrose MH. NHE2 is the main apical NHE in mouse colonic crypts but an alternative Na+-dependent acid extrusion mechanism is upregulated in NHE2-null mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2006;**291**:G689-99.

## 11. KÖZLEMÉNYEK

#### 11.1. A doktori dolgozat alapját képező *in extenso* közlemények

- Laczkó D., Rosztóczy A., Birkás K., Katona M., Rakonczay Z. Jr., Tiszlavicz L., Róka R., Wittmann T., Hegyi P., <u>Venglovecz V</u>. 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
- Katona M., Hegyi P., Kui B., Balla Zs., Rakonczay Z Jr., Rázga Zs., Tiszlavicz L., Maléth J., <u>Venglovecz V</u>. 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
- Judák L, Hegyi P, Rakonczay Z Jr, Maléth J, Gray MA, <u>Venglovecz V</u>. Ethanol and its non-oxidative metabolites profoundly inhibit CFTR function in pancreatic epithelial cells which is prevented by ATP supplementation. *Plfügers Arc-Eur J Physiol* 2014;466(3):549-62. IF: 4.101
- <u>Venglovecz V</u>, Hegyi P, Rakonczay Z Jr, Tiszlavicz L, Nardi A, Grunnet M, Gray MA. Pathophysiological relevance of apical large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels in pancreatic duct epithelial cells. *Gut* 2011;60:361-369. IF: 10.111
- Maléth J., Hegyi P., Rakonczay Z Jr, <u>Venglovecz V.</u> Breakdown of bioenergetics evoked by mitochondrial damage in acute pancreatitis: Mechanism and consequences. *Pancreatology* 2015;15:18-22 *Konferencia kiadvány*
- <u>Venglovecz V</u>, Rakonczay Z Jr, Gray MA, Hegyi P. Potassium channels in pancreatic duct epithelial cells: their role, function and pathophysiological relevance. *Plfügers Arc-Eur J Physiol* 2015;467(4):625-640 IF: 4.101
- Maléth J., Balla Z, Kui B, Balázs A, Katona M, Judák L, Németh I, Pallagi P, Kemény L, Rakonczay Z Jr, <u>Venglovecz V</u>, Földesi I, Pető Z, Somorácz A, Borka K, Pedomo D, Lukács Gl, Gray MA, Monterisi S, Zaccolo M, Sendler 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
- Maléth J, Rakonczay Z Jr., <u>Venglovecz V</u>, Dolman NJ, Hegyi P. Central role of mitochondrial injury in the pathomechanism of acute pancreatitis. *Acta Physiologica* 2013;2:226-235. IF: 4.251

- <u>Venglovecz V</u>, 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
- Maléth J, <u>Venglovecz V</u>, Rázga Zs, Tiszlavicz L, Rakonczay Z. Jr, Hegyi P. The nonconjugated 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, <u>Venglovecz V</u>, Gray MA, Kim KH, and Lee MG. Dynamic regulation of CFTR bicarbonate permeability by [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> and its role in pancreatic bicarbonate secretion. *Gastroenterology* 2010;139(2):620-631. IF.: 12.032
- <u>Venglovecz V</u>, 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

# 11.2. A doktori dolgozat témájához nem kapcsolódó egyéb *in extenso* közlemények

- Venglovecz V., Pallagi P., Kemény VL., Balázs A., Balla Zs., Becskeházi E., Gál E., Tóth E., Zvara Á., Puskás L., Borka K., Sendler M., Lerch MM:, Mayerle J., Kühn JP., Rakonczay Jr. Z., Hegyi P. The importance of Aquaporin 1 in pancreatitis and its relation to the CFTR Cl<sup>-</sup> channel. *Front. Physiol. - Gastrointestinal Sciences 2018; accepted*
- Vizvári E., Katona M., Orvos P., Berczeli O., Facskó A., Rárosi F., <u>Venglovecz V.</u>, Rakonczay Z. Jr., Hegyi P., Ding C., Tóth-Molnár E. Characterization of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter activity in rabbit lacrimal gland duct cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2016;57:3828-3835. IF: 3.404
- Kumar, JD., Kumar JD, Steele I, Moore AR, Murugesan SV, Rakonczay Z, <u>Venglovecz V</u>, Pritchard DM, Dimaline R, Tiszlavicz L, Varro A, Dockray GJ. Gastrin stimulates MMP-1 expression in gastric epithelial cells: putative role in gastric epithelial cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2015;309(2):G78-86. IF: 3.798
- Maléth J, Madácsy T, Pallagi P, Balázs A, <u>Venglovecz V</u>, Rakonczay Z Jr, Hegyi P. Pancreatic epithelial fluid and bicarbonate secretion is significantly elevated in the absence of peripheral serotonin. *Gut* 2015;64:9 1497-1498 *Letter* IF: 14.66

- Kui B., Balla Z., Vasas B., Végh ET., Pallagi P., Kormányos ES., <u>Venglovecz V</u>., Iványi B., Takács T., Hegyi P., Rakonczay Z Jr. New insights into the methodology of L-arginine-induced acute pancreatitis. *PloS One* 2015; 10(2) p. e0117588. IF: 3.234
- 6. Pallagi-Kunstár E, Farkas K, Maléth J, Rakonczay Z Jr, Nagy F, Molnár T, Szepes Z, <u>Venglovecz V</u>, Lonovics J, Rázga Z, Wittmann T, Hegyi P. Bile acids inhibit Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger and Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger activities via cellular energy breakdown and Ca<sup>2+</sup> overload in human colonic crypts. *Plfügers Arc-Eur J Physiol* 2014 IF: 4.101
- Katona M, Vízvári E, Németh L, Facskó A, <u>Venglovecz V</u>, Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Tóth-Molnár E. Experimental evidence of fluid secretion of rabbit lacrimal gland duct epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;12;55(7):4360-7 IF: 3.404
- Pallagi P, Balla Z, Singh AK, Dósa S, Iványi B, Kukor Z, Tóth A, Riederer B, Liu Yj, Engelhardt R, Jármay K, Szabó A, Janovszky Á, Perides G, <u>Venglovecz V</u>, Maléth J, Wittmann T, Takács T, Gray MA, Gácser A, Hegyi P, Seidler U, Rakonczay Z Jr. The role of pancreatic ductal secretion in protection against acute pancreatitis in mice. *Crit Care Medicine* 2014;42(3):e177-88. IF: 6.312
- Kemény LV, Schnúr A, Czepán M, Gál E, Lonovics J, Lázár Gy, Simonka Zs, <u>Venglovecz</u> <u>V</u>, Maléth J, Judák L, Németh IB, Szabó K, Almássy J, Virág L, Geisz A, Tiszlavicz L, Yule DI, Wittmann T, Varró A, Hegyi P. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers regulate the migration and proliferation of human gastric myofibroblast. *Am J Physiol-Gastro L* 2013;305(8):G552-63. IF: 3.73
- Czepan M, Rakonczay Z. Jr., Varró A, Steele I, Dimaline R, Lertkowit N. Lonovics J, Schnúr A, Biczó Gy, Geisz A, Lázár Gy, Simonka Zs, <u>Venglovecz V</u>, Wittmann T, Hegyi P. NHE1 activity contributes to migration and is necessary for proliferation of human gastric myofibroblasts. *Plfügers Arc-Eur J Physiol* 2012;463(3):459-75. IF: 4.866
- Hegyi P, Maléth J, <u>Venglovecz V</u>, Rakonczay Z Jr. Pancreatic ductal bicarbonate secretion: challenge of the acinar acid load. *Front Physiol* 2011;2:36.
- 12. Pallagi P, <u>Venglovecz V</u>, Rakonczay Z Jr, Borka K, Korompay A, Ozsvari B, Judak L, Sahin-Tóth M, Geisz A, Schnúr A, Maléth J, Takács T, Gray MA, Argent BE, Mayerle J, Lerch MM, Wittmann T, Hegyi P. Trypsin Reduces Pancreatic Ductal Bicarbonate Secretion by Inhibiting CFTR Cl- channel and Luminal Anion Exchangers. *Gastroenterology* 2011;141(6):2228-39. IF: 11.675
- Kemény LV, Hegyi P, Rakonczay Z Jr, Borka K, Korompay A, Gray MA, Argent BE, <u>Venglovecz V.</u> Substance P inhibits pancreatic ductal bicarbonate secretion via neurokinin

receptors 2 and 3 in the guinea pig exocrine pancreas. *Pancreas* 2011;40(5):793-795. IF: 2.386

- 14. Biczó Gy, Hegyi P, Dósa S, Balla Zs, <u>Venglovecz V</u>, Iványi B, Wittmann T, Takács T, Rakonczay Z Jr. Aliphatic, but not imidazol basic amino acids cause severe acute necrotizing pancreatitis in rats. *Pancreas* 2011;40(3):486-487. IF: 2.386
- 15. Hegyi P, Pandol S, <u>Venglovecz V</u>, Rakonczay Z. The acinar-ductal tango in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gut* 2011;60:544-552. IF: 10.11
- 16. Biczó G, Hegyi P, Dósa S, Shalbuyeva N, Berczi S, Sinervirta R, Hracskó Zs, Siska A, Kukor Z, Jármay K, <u>Venglovecz V</u>, Varga IS. Iványi B, Alhonen L, Wittmann T, Gukovskaya A, Takács T, Rakonczay Z Jr. The crucial role of early mitochondrial injury in L-lysine-induced acute pancreatitis. *Antioxidants and Redox Signaling* 2011;15(10):2669-81. IF: 8.456
- 17. Farkas K, Yeruva S, Ifj Rakonczay Z, Ludolph L, Molnár T, Nagy F, Szepes Z, Schnúr A, Wittmann T, Hubricht J, Riederer B, <u>Venglovecz V</u>, Lázár Gy, Király M, Zsembery Á, Varga G, Seidler U, Hegyi P. New therapeutical targets in ulcerative colitis: The importance of ion transporters in the human colon. *Inflammatory bowel diseases* 2011;4:884-98. IF: 4.855
- Hegyi P, <u>Venglovecz V</u>, Pallagi P, Maléth J, Takács T, Rakonczay Z. Galanin a potent inhibitor of pancreatic bicarbonate secretion is involved in the induction and progression of cerulein-induced experimental acute pancreatitis. *Pancreas* 2011;40(1):155-156. IF: 2.38
- Biczó G, Hegyi P, Berczi S, Dósa S, Hracskó Z, Varga IS, Iványi B, <u>Venglovecz V</u>, Wittmann T, Takács T, Rakonczay Z. Inhibition of arginase activity ameliorates L-arginineinduced acute pancreatitis in rats. *Pancreas* 2010;39(6):868-874. IF.: 2.607
- 20. Biczó Gy, Hegyi P, Sinervirta R, Berczi S, Dósa S, Siska A, Iványi B, <u>Venglovecz V</u>, Takács T, Alhonen L, Rakonczay Jr. Z. Characterisation of polyamine homeostasis in L-ornithine-induced acute pancreatitis in rats. *Pancreas* 2010.39(7):1047-1056. IF.: 2.607
- Maléth J, <u>Venglovecz V</u>. A pankreász vezetéksejtek bikarbonát szekréciójának fontossága akut pankreatitiszben. *LAM* 2010;20(6-7):413-416.
- 22. Ignáth I, Hegyi P, <u>Venglovecz V</u>, Székely Cs, Carr G, Hasegawa M, Inoue M, Takács T, Argent BE, Gray MA, Rakonczay Z Jr. CFTR Expression But Not Cl- Transport Is Involved in the Stimulatory Effect of Bile Acids on Apical Cl-/HCO3- Exchange Activity in Human Pancreatic Duct Cells. *Pancreas* 2009;38(8):921-9. IF.: 2.73

- Pagliocca A, Hegyi P, <u>Venglovecz V</u>, Rackstraw SA, Khan Z, Wang TC, Dimaline R, Varro A, Dockray GJ. Identification of ezrin as target of gastrin in immature gastric parietal cells. *Experimental Physiology* 2008;93:1174-89. IF.: 2.91
- Hegyi P, Rakonczay Z Jr, Farkas K, <u>Venglovecz V</u>, Ozsvari B, Seidler U, Gray MA, Argent BE. Controversies in the role of SLC26 anion exchangers in pancreatic ductal bicarbonate secretion. *Pancreas* 2008;37(2):232-4. IF.: 2.708
- 25. Czakó L, Szabolcs A, Vajda Á, Csáti S, <u>Venglovecz V</u>, Rakonczay Z, Hegyi P, Tiszlavic L, Csont T, Pósa A, Berkó A, Varga Cs, Szőllősiné I, Boros I, Lonovics J. Hyperlipidemia induced by a cholesterol-rich diet aggravates necrotizing pancreatitis in rats. *European Journal of Pharmacology* 2007;572(1):74-81. IF: 2.376
- 26. Tóth-Molnár E, <u>Venglovecz V</u>, Ózsvári B, Rakonczay Z Jr., Varró A, Tóth A, Lonovics J, Takács T, Ignáth I, Iványi B and Hegyi P. A New Experimental Method to Study the Acid/Base Transporters and their Regulation in Lacrimal Gland Ductal Epithelia. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2007;48(8):3746-55 IF: 3.528

#### 11.3. A PhD értekezésben szereplő közlemények

- <u>Venglovecz V</u>, 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
- Pagliocca A, Hegyi P, <u>Venglovecz V</u>, Rackstraw SA, Khan Z, Wang TC, Dimaline R, Varro A, Dockray GJ. Identification of ezrin as target of gastrin in immature gastric parietal cells. Experimental Physiology 2008;93:1174-89. IF.: 2.91
- Czakó L, Szabolcs A, Vajda Á, Csáti S, <u>Venglovecz V</u>, Rakonczay Z, Hegyi P, Tiszlavic L, Csont T, Pósa A, Berkó A, Varga Cs, Szőllősiné I, Boros I, Lonovics J. Hyperlipidemia induced by a cholesterol-rich diet aggravates necrotizing pancreatitis in rats. European Journal of Pharmacology 2007;572(1):74-81. IF: 2.376
- 4. Tóth-Molnár E, <u>Venglovecz V</u>, Ózsvári B, Rakonczay Z Jr., Varró A, Tóth A, Lonovics J, Takács T, Ignáth I, Iványi B and Hegyi P. A New Experimental Method to Study the Acid/Base Transporters and their Regulation in Lacrimal Gland Ductal Epithelia. Investigative Ophthalmology & Visual Science 2007;48(8):3746-55 IF: 3.528

### **12. SCIENTOMETRIAI ADATOK**

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

Tudományos és oktatási közlemények	Száma		Hivatkozások <sup>1</sup>	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Folyóiratcikk <sup>2</sup>	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 <sup>3</sup>		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. Konferenciaközlemény <sup>4</sup>	1		2	6
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)		0	0	0
Tudományos közlemények összesen (IIV.)		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 száma <sup>1</sup>		 444	705
Hirsch index <sup>6</sup>	16	 	

g index <sup>6</sup>	27		 
		•	
Speciális tudománymetriai adatok	Száma	Összes hivatkozás	
Első szerzős folyóiratcikkek száma <sup>2*</sup>	4	97	
Utolsó szerzős folyóiratcikkek száma <sup>2*</sup>	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 <sup>7</sup>	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:

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> lektorált, tudományos folyóiratban

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

<sup>4</sup> konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben

<sup>5</sup> nem idézett absztrakt itt nem kerül az összesítésbe

<sup>6</sup> a disszertáció és egyéb típusú idéző nélküli összes idézővel számolva

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

# 13. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

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 pankreász laborjában kísérleteket végezhessek.

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 Eleonórát, Becskeházi Esztert, Ébert Attilát, Stefán Glóriát és Korsós Margarétát), akik rengeteget dolgoznak azért, hogy a pankreász 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 partnereim**nek, **tudományos diákkörös hallgatóim**nak akik színvonalas közreműködése nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre.

A kutatómunkához nélkülözhetetlen anyagi forrásokat hazai (Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFI), Társdalmi 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 Istvánnénak 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.