

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet
Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Elméleti orvostudományok Doktori Iskola

**Tanulmány az 1-es típusú cukorbetegség
hasnyálmirigyvezetékham-sejtjeinek iontranszport folyamataira
kifejtett serkentő hatásáról és vizsgálatuknak egy új módszere**

Doktori értekezés

Ébert Attila

Témavezető:

Venglovecz Viktória Ph.D., D.Sc.



Szeged, Magyarország

2024

1. BEVEZETÉS

1.1. A hasnyálmirigy

A hasnyálmirigy (pankreasz) egy kettős mirigy. Az exokrin rész emésztőenzimeket választ ki, amelyek feladata a béllumenben lévő tápanyagok lebontása, míg az endokrin rész hormonokat juttat a véráramba, amik az anyagcserét szabályozzák. Az endokrin hasnyálmirigy egyedülálló módon szétszórtan, exokrin szövetbe ágyazva helyezkedik el és nem képez anatómiailag különálló mirigyet.

Az endokrin hasnyálmirigy funkcionális egysége a Langerhans-sziget. A szigetek öt fő sejttypusból állnak: α - (~35%), β - (~55%), δ - (~5%), PP- (<1%) és ϵ -sejtek (~0,15%). Általában a β -sejtek száma a legnagyobb. Fő szerepük, hogy inzulint termeljenek, melynek szekrécióját a vércukorszint étkezés utáni megemelkedése indukálja. Az inzulin elősegíti a tápanyagok más szervek általi felvételét és tárolását, emellett csökkenti azok *de novo* szintézisét, így csökkentve a vércukorszintet. Az α -sejtek főként glukagont választanak ki, hipoglikémiára válaszol. Glukagon hatására növekszik a glikogenolízis és glükoneogenezis megnő a májban így a vércukorszint fiziológias tartományon marad. A δ -sejtek szomatostatint termelnek, amely a szigeten belüli erősen gátolja az inzulin és a glukagon felszabadulását. A PP-sejtek pancreaspolipeptidet (PP) termelnek, amely étkezés után kerül a keringésbe, főként a vagális stimuláció hatására. A PP a gyomor-bélrendszer motilitására, a gyomorsavtermelésre, a glükózanyagcserére és a jóllakottságra szabályozásában játszik szerepet. Az ϵ -sejtek ghrelint választanak ki, amely serkenti a növekedési hormon felszabadulását, az étvágyat, az energiaraktározást és a gyomor-bélrendszer motilitását.

Az exokrin hasnyálmirigy funkcionális egységét az acinus képezi, amely piramis alakú acinussejtekből áll. Ezek egy központi üreget alkotnak, ahová egy Cl^- -ban, fehérjékben, zimogénekben és enzimekben gazdag folyadékot választanak ki. Az enzimek a központi üregből egy interkalált duktuszba távoznak. Az acinusok a maguk interkalált csatornáival lebennye állnak össze, melyben egy fő intralobuláris csatorna fut. Az intralobuláris csatornák fúziójával nagyobb, interlobuláris csatornák jönnek létre. Ezek egyesülésével jön létre a fő hasnyálmirigy-vezeték, amely a duodénumba torkollik. Az így felépülő duktális fát hasnyálmirigy duktális epitél sejtek alkotják (PDEC-ek), melyek azáltal, hogy vízzel hígítják, a Cl^- ionokat HCO_3^- -ra cserélik, így lúgosítva az acinussejtek váladékát, kulcsszerepet játszanak a hasnyáltermelésben. A HCO_3^- -szekréció kulcsfontosságú transzporterei legerősebben az interkalált csatornáknak expresszálódnak, amelyek a humán hasnyál- és HCO_3^- -elválasztás fő helyei. Ahogy a hasnyál áthalad duktális fán, szakaszosan módosul és HCO_3^- -

tartalma megnő. A lúgos hasnyál megakadályozza az emésztőenzimek idő előtti aktiválódását, és semlegesíti a duodénumba jutó gyomortartalmat.

1.1.1. A pankreasz duktális epitél sejtek iontranszportfolyamatai

A hasnyál- és HCO_3^- -szekrécióban részt vevő transzporterek expressziója az apikális és bazális membránban eltér. Továbbá az iontranszport-folyamatok eltérnek a duktális fa proximális és disztális szakaszaiban is. A HCO_3^- a bazolaterális membránon keresztül többféle módon juthat a sejtbe. Egyfelől a sejtbe passzív diffúzióval bejutó CO_2 -ot a karbonanhidráz (CA) enzim hidratálja és az így keletkező H^+ -okat a bazolaterális membránon keresztül a Na^+/H^+ cserélő (NHE-1) exportálja. A Na^+ elektrokémiai hajtóerejét a Na^+/K^+ ATPáz pumpa működése és K^+ csatornák biztosítják. A HCO_3^- túlnyomó többségét azonban az $1\text{Na}^+/2\text{HCO}_3^-$ kotranszporter, más néven NBCe1-B, aktív módon szállítja a sejtbe. A HCO_3^- szekréciója az apikális membránon keresztül a lumenbe az SLC26A6 nevű $2\text{HCO}_3^-/1\text{Cl}^-$ kicserélőn keresztül történik, míg a cisztás fibrózis (CF) transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR) Cl^- csatorna biztosítja a Cl^- ionok visszaforgatását. A HCO_3^- transzcelluláris mozgása negatív elektromos potenciált generál a lumenben, amely paracellulárisan Na^+ ionokat von maga után. A víz paracellulárisan és akvaporin 1 és 5 (AQP1, -5) vízcsatornákon keresztül transzcellulárisan követi a Na^+ -ot és a HCO_3^- -ot, az ozmotikus grádiensnek megfelelően. Mivel a duktális sejtek Cl^- általi átjárhatósága a bazolaterális membránon rossz, de az apikális membránon jó, a luminális Cl^- nagy része a proximális duktális szegmensekben a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kicserélő által reabszorbeálódik. A disztális csatornákban a csökkent luminális Cl^- koncentráció az $[\text{Cl}^-]$ gyors csökkenését eredményezi. Amikor az $[\text{Cl}^-]$ 10 mM alá csökken, a WNK1 kináz (with-no-lysine-kinase 1) aktiválódik, és megváltoztatja a CFTR pórusméretét, aminek ezáltal HCO_3^- -átjárhatósága megnő. A WNK1 párhuzamosan gátolja az apikális SLC26 anioncserélőket a SPAK/OSR1 szignalizációs útvonalakon keresztül, megakadályozva azok fordított üzemmódban történő aktivitását, és ezáltal a HCO_3^- luminális reabszorpcióját. A kész hasnyálban ez a mechanizmus 140 mM-os HCO_3^- -koncentrációt tesz lehetővé.

1.1.2. HCO_3^- szekréció szabályozása hasnyálmirigy ductalis epithelialis sejtekben

A duktális sejtekben a HCO_3^- szekréciója a cAMP/PKA útvonalon keresztül indítható be és Ca^{2+} jelátviteli útvonalon keresztül stimulálható. A proximális duodénumban jutó savas gyomortartalom hatására a neuroendokrin S-sejtek szekretint (SCT) szabadítanak fel, amely a duktális sejtek elsődleges aktivátora. A bazolaterális membránon a SCT saját G-proteinkapcsolt receptorához kötődik, ami aktiválja az adenilát-cikláz (AC). A megnövekedett cAMP

szint aktiválja a PKA-t (protein kináz A), amely foszforilálja és aktiválja a HCO_3^- -szekrécióban szerepet játszó kulcsfontosságú fehérjét, például a CFTR-t. A cAMP/PKA útvonal aktiválása VPAC1 VIP-receptoron és béta-adrenerg receptorokon keresztül is történhet. A ductális sejtek további fontos agonistái a kolecisztokinin (CCK) és az acetilkolin, amelyek a SCT által kiváltott HCO_3^- -szekréciót erősítik. A ductális sejtek bazolaterális membránjában található CCK-B és muszkarinos M2, M3 receptorok, aktiválják a foszfolipáz C-t (PLC), amely inozitol-1,4,5-trifoszfátot (IP_3) hoz létre. Az intracelluláris raktárakból felszabaduló Ca^{2+} jelet a plazmamembrán található Ca^{2+} -aktivált Ca^{2+} csatornák tovább erősítik. A Ca^{2+} jelátviteli út a Ca^{2+} -függő AC és Ca^{2+} -aktivált Cl^- csatornák aktiválásával fokozó hatással lehet a ductális HCO_3^- -szekrécióra.

A ductális sejtekben a két molekuláris útvonal szinergizmusát az IRBIT szabályozófehérje (IP_3 receptor binding protein released with IP_3) közvetíti. Inaktív állapotban az IRBIT fehérje az IP_3 receptorokhoz (IP_3R) köt és megakadályozza, hogy a receptor IP_3 -ot kössön. Az IP_3R szerin oldalláncok PKA általi foszforilációja növeli a receptor IP_3 -hoz való affinitását és csökkenti az IRBIT-hez való affinitását. Amikor a Ca^{2+} jelátvitel stimulációja következtében IP_3 keletkezik, az IRBIT ledisszociál az IP_3R -ról, és a protein foszfatáz 1 (PP1) és kalcineurin toborzásával defoszforilálja a vezikuláris NBCe1-B, CFTR és SLC26A6 transzportereket, ezzel elősegítve azok transzlokációját a plazmamembránba. Emellett a plazmamembránban elhelyezkedő CFTR és NBCe1-B transzporterekről az IRBIT specifikus gátló hatású foszfátcsoportok eltávolítását közvetíti, fokozva ezzel aktivitásukat, egyúttal csökkenti az $[\text{Cl}^-]_i$ NBCe1-B-re kifejtett gátló hatását.

1.1.3. A cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR) Cl^- csatorna

A CFTR az ATP-kötő kazetta (ABC) transzporter szupercsaládba tartozik, és Cl^- és HCO_3^- elvezetését közvetíti az elektrokémiai gradiens mentén. A hasnyálmirigyben, a tüdőben, a könny- és nyálmirigyekben, valamint más szervekben a hám HCO_3^- -szekréciójának elengedhetetlen mozgatója. A CFTR génben bekövetkezett mutációk elronthatják a csatorna funkcióit, ami az epiteliális szekréció zavaraihoz és CF-hoz vezethet. Alacsony $[\text{Cl}^-]_i$ mellett a WNK1 megváltoztatja a CFTR aktivitását, megnövelve annak HCO_3^- -permeabilitását. Teszi ezt úgy, hogy kötődik a CFTR 1-es transzmembrán doménjének (TDM1) első könnyökhélixéhez, és a csatorna pórusméretét 4,8 Å-ről 5,7 Å-re változtatja. A megnövekedett pórusméret így a kisebb méretű Cl^- -ionnal szemben jobban kedvez a HCO_3^- átjutásának. Ezenkívül a TMD1 lasszó motívuma az R doménnel való kapcsolata révén befolyásolja a csatorna kapuzását. A könnyökhélixhez való kötődéssel így a WNK1 képes lehet a CFTR kapuzását is befolyásolni. A

CFTR közvetlen interakción keresztül hatással van több másik transzporterre. A CFTR TMD2 C-terminális végén egy PDZ (PSD95/Discs-large/ZO-1) ligandum található, amely képes kapcsolódni más fehérjék PDZ doménjeivel, ilyen például a NHERF (Na^+/H^+ exchanger regulatory factor) scaffold-fehérjék családja, valamint a Shank2 (SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2) fehérjék. Ezeken az scaffold-okon keresztül a CFTR funkcionális komplexeket képez más transzporterekkel, és közvetlen kölcsön hatva velük szabályozza azokat. A CFTR R-doménje képes kölcsönhatásba lépni az SLC26 anioncserélők STAS (sulphate transporter and anti-sigma factor antagonist) doménjével, így a két transzportert a PKA kölcsönösen aktiválja. Ugyanakkor a PKA gátolja az epitél sejtek apikális membránjában a HCO_3^- reabszorpciójában részt vevő transzportereket, azaz az NHE-3-at és az NBCn1-et. Ez gátlás NHERF-eken keresztül kapcsolódó CFTR fehérjékkel való közvetlen interakció révén jön létre. Valószínűsíthető tehát, hogy a HCO_3^- szekrécióját és reabszorpcióját a PDZ doméneken keresztül egymáshoz kapcsolódó CFTR, SLC26 anionkicserélők, NHE-3 és az NBCn1 közötti komplex kölcsönhatások szabályozzák. Érdekes módon a CFTR-ral való közvetlen kölcsönhatás szükséges lehet a CA IV membránba történő eljutásához is. A CFTR funkcióját mutációi sokféleképpen befolyásolhatják. A Cl^- -csatorna aktivitással nem rendelkező, de az SLC26 anioncserélőket aktiválni képes CFTR mutánsok, nagyrészt képesek rendes epitéliális $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ cserét lebonyolítani. Ezzel szemben az SLC26A6 aktivitása jelentősen csökken a ΔF508 CFTR mutánst expresszáló egerekben. Ez a mutáns CFTR ubiquitinálódik és lebomlik az endoplazmatikus retikulumban, így a membránig nem jut el. Egyes más mutánsok annak ellenére, hogy eléri a plazmamembránt, képesek is Cl^- -csatornaként működni, továbbra is okozhatnak hasnyálmirigy-elégtelenséggel.

1.2. 1-es típusú diabetes mellitus és a hasnyálmirigy exokrin elégtelenség

Az 1-es típusúdiabétesz a hasnyálmirigy β -sejtek autoimmun-indukált elvesztése révén kialakuló krónikus betegség, amelyet inzulinhiány, hiperglikémia és az ezek következtében kialakuló szövődmények jellemeznek. Kialakulásának első stádiumát az inzulin, a glutaminsav dekarboxiláz, a protein tirozin foszfatáz IA-2/IA-2 β , vagy a cinktranszporter 8 fehérjék ellen kialakult egynél több autoantitest definiálja míg a második stádiumot dysglikémia vagy glükóz intolerancia jellemzi. Mivel mindkét stádium tünetmentes, a betegek általában csak a 3. stádiumban jelentkeznek orvosuknál, már a hiperglikémia tüneteivel (poliuria, polidipsia, enurézis, súlycsökkenés, homályos látással). A hiperglikémia miatt kialakult hosszú távú szövődmények közé tartoznak a mikrovaszkuláris (azaz retinopátia, nefropátia és neuropátia) és makrovaszkuláris (azaz szív- és érrendszeri betegségek, érelmeszesedés, agyvérzés)

defektusok, valamint a hasnyálmirigy exokrin elégtelensége (EPI). A EPI az 1-es típusú cukorbetegség körülbelül 40%-át érintő szövődmény. Számos tényező játszik szerepet a PEI 1-es típusú diabétesz talaján történő kialakulásában. (1) A pancreasreflexek károsodhatnak autonóm diabéteszes neuropátia következtében. (2) A hasnyálmirigy mikroereinek károsodása elégtelen vérrellátáshoz és ischaemiához vezethet, ami hozzájárul a hasnyálmirigy szövetének elhalásához és fibrózis kialakulásához. (3) A SCT-indukált exokrin hasnyáleválasztást a hiperglikémia gátolja. (4) Az oxidatív stressz, a hiperglikémia és a infiltráló immunsejtekből felszabaduló citokinek aktiválják a hasnyálmirigy-csillagsejteket, amelyek központi szerepet játszanak a hasnyálmirigy fibrózisában. (5) a szigetecskék károsodása következtében kialakuló inzulinhiány a magas inzulinszintekhez adaptálódott hasnyálmirigyszövet atrófiájához vezet. Ennek megfelelően kimutatták, hogy az 1-es típusú cukorbetegség hasnyálmirigyét csökkent méret és az acinusok atrófiája jellemzi. Ezzel párhuzamosan kimutatták, hogy az inzulin hiánya negatívan befolyásolja az acinusok enzimeleválasztását. Ellentétben az acinussejtekkel, a diabétesz duktális sejtekre gyakorolt hatásáról lényegesen kevesebb információ áll rendelkezésünkre. Ezért disszertációmban az 1-es típusú diabétesz duktális sejtek iontranszportfolyamataira gyakorolt hatásának vizsgálatát tűztük ki célul.

1.3. A duktális sejtek funkcionális vizsgálatához használt kísérleti modellek

1.3.1. Széles körben használt kísérleti modellek a hasnyálmirigy-kutatásban

A 2D sejtkultúrák, a 3D organoid sejtkultúrák és az izolált duktális szegmensek a duktális sejtek kutatásában használt legelterjedtebb kísérleti modellrendszerek. Ezek a modellek azonban az izolálásukhoz szükséges enzimátikus emésztés, a kultúrák hosszú tenyésztési ideje, vagy az eredeti intercelluláris kölcsönhatásainak hiánya miatt fenitípusos változásokra hajlamosak.

1.3.2. Hasnyálmirigyszövet-szeletek

A szövetszelet egy széles körben alkalmazott *in situ* kísérleti modell az agy, valamint a máj, a mellékvese és a retina szerkezetének és működésének vizsgálatára. A technikát Speier és Rupnik optimalizálták pankreasz β -sejtek tanulmányozására, majd később mások sikeresen alkalmazták mind az acinus, mind a β -sejtek szerkezeti és funkcionális vizsgálatához. A korábban említett kísérleti rendszerekkel ellentétben a szövetszeletek elkészítése nem igényel enzimátikus emésztést. A közvetlen intercelluláris kapcsolatok és kölcsönhatások fontos szerepet töltenek be a hasnyálmirigy fejlődésében, a sejt differenciációban és a funkcionális

szabályozásban. Mivel a szövetszeletek jól megőrzik a szövetek fiziológias szerkezetét, ez a technika morfológiai és funkcionális képalkotásra egyaránt alkalmas, anélkül, hogy fennállna bennük a fenotípusos változások veszélye. Patch-clamp-el és mikrofluorimetriás mérésekkel egyaránt végezhető rajtuk elektrofiziológiai vizsgálatok. Továbbá ez technika a hasnyálmirigy exokrin és endokrin komponensének sejtszintű kölcsönhatások vizsgálatát is lehetővé teszi, amely munkacsoportunk egyik fokozottan kutatott területe.

2. A TANULMÁNY CÉLJA

Az 1-es típusú diabétesz csökkent életminőséggel és súlyos hosszú távú szövődeményekkel járhat, emellett jelentős költséget ró mind a betegre, mind az egészségügyi ellátó rendszerre. Prevalenciája világszerte folyamatosan növekszik, azonban a betegség mechanizmusáról és szövődeményeinek – többek között az EPI – kialakulásáról alkotott ismereteink és terápiás lehetőségeink továbbra is hiányosak. Az 1-es típusú diabétesz pankreasz duktális iontranszport-folyamataira gyakorolt hatásáról kevés tanulmány áll rendelkezésre, és azok némelyike elavult, vagy ellentmondó eredményeket hozott. Mivel a duktális sejtek alapvető szerepet játszanak a hasnyálmirigy integritásának megőrzésében, a diabétesz hatására megváltozott duktális folyadéksekréció mechanizmusnak megértése közelebb vihet bennünket az exokrin pankreasz elégtelenség patogenezisének megértéséhez. Továbbá a duktális szekréció tanulmányozására széles körben használt kísérleti rendszerek nem teszik lehetővé a duktális sejtek vizsgálatát saját fiziológias környezetükben.

Ezért a dolgozat **első** részében a következőket tűztük ki célul:

- I. Az 1-es típusú diabétesz hatásának vizsgálata a fő duktális iontranszporterek aktivitására és expressziójára
- II. A CFTR 1-es típusú diabéteszben történő duktális iontranszport-változásokban betöltött szerepének meghatározása
- III. Az 1-es típusú diabéteszben történő duktális iontranszport-változások mögött álló mechanizmusok felderítése

A dolgozat **második** részében a következőket tűztük ki célul:

- IV. A pankreasz szövetszeletek duktális sejtek funkcionális vizsgálatára való alkalmasságának meghatározása

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Cukorbetegség indukálása

Az 1-es típusú cukorbetegséget a Diabetes Complications Consortium alacsony dózisu streptozotocin (STZ) protokolljával indukálták. Az első injekció után 4 héttel az egereket feláldoztuk és a szívből vért vettünk. A hasnyálmirigyet eltávolítottuk, és egy részét hematoxilín/eozin festésre használtuk fel. Transzmissziós elektronmikroszkópiához apró hasnyálmirigy-darabokat fixáltunk 3% -os glutáraldehidben. A hasnyálmirigy másik részét duktusok izolálására használtuk fel.

3.2. Hasnyálmirigy-csatornák izolálása és intracelluláris pH mérése

Vad típusú (WT) és CFTR kiütött (KO) egerek hasnyálmirigyéből intra/interlobularis duktuszokat izoláltunk enzimatis emésztéssel és mikrodisszekcióval. Az intracelluláris pH (pH_i) változását a 2,7-bisz-(2-karboxietil)-5(6)-karboxifluoreszcein-acetoximetil-észter (BCECF) nevű pH-érzékeny fluoreszcens festékkel és az ammónia pulzus technikával mértük.

3.3. HCO_3^- -szekréció mérése

A Cl^-/HCO_3^- kicserelő aktivitását az NH_4Cl -pulzus technikával és Cl^- -elvonásos technikával mértük. Az NH_4Cl pulzus technikához a duktuszokat HCO_3^-/CO_2 -pufferelt oldatban 20 mM NH_4Cl -dal perfundáltuk. Az alkalózis során a sejtbe beáramló NH_3 protonálódik és ugrásszerű pH_i növekedést eredményez. Az így létrejövő csúcsról a pH_i elkezd helyreállni, amelynek meredeksége a Cl^-/HCO_3^- -kicserelő aktivitását tükrözi. Az NH_4Cl eltávolítása után NH_4^+ disszociál H^+ -ná és NH_3 -vá melyutóbbi a sejtből kidiffundálva a pH_i zuhanását okozza. Az acidózisból történő regeneráció kezdeti sebessége az NHE és az NBC aktivitását tükrözi.

A Cl^- -kivonásos technika során a Cl^- -mentes extracelluláris oldat hatására a Cl^-/HCO_3^- kicserelő reverz módon kezd el működni, ami a pH_i emelkedését okozza. Az alkalózis kezdeti sebessége a Cl^-/HCO_3^- -kicserelő reverz, az alkalózisból való felépülés sebessége pedig a kicserelő normál irányú működését tükrözi.

3.4. A CFTR aktivitásának mérése

A CFTR aktivitását az $[Cl^-]_i$ méréssel elemeztük, melyhez N-(etoxikarbonil-metil-6-metoxikinolinium) bromid (MQAE) fluoreszcens festéket és forskolinstimulációt használtunk. A Cl^- -ionok kioltó hatást gyakorolnak a festékre, így az MQAE fluoreszcenciájának intenzitása

fordítottan arányos a Cl^- -koncentrációval. A hasnyálmirigy-csatornákat $20 \mu\text{M}$ forskolint tartalmazó $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -pufferolt oldattal perfundáltuk. A detektál jelet fluoreszcencia-aránnyá konvertáljuk (F/F_0) és a görbén, a forskolinstimuláció kezdeti, két perces szakaszára egy lineáris trendvonalat illesztettünk (120 másodperc). A görbe alatti területet a függvény integrálásával számítottuk ki.

3.5. Hasnyálszekréció mérése

A ductalis folyadékszekréció sebességének *in vitro* becsléséhez videomikroszkópiával detektáltuk az izolált intra- és interlobuláris csatornák forskolin stimulációra történő hízását. Emellett a hasnyáleválasztást *in vivo*, altatott egerekben is megmértük, a fő hasnyálmirigy-vezeték kanülálásával és a hasnyál összegyűjtésével.

3.6. Fagyasztott szövetmetszetek immunfestése

A kriomátrixba ágyazott, fagyasztott duktális szegmensekből $10 \mu\text{m}$ vastagságú metszeteket készítettünk, majd ezeket a www.novusbio.com oldalon közzétett protokollt követve immunfluoreszcensen jelöltük. A képeket az ImageJ nevezetű szoftverrel elemeztük. Az fókusz az eptél sejtek rétegéhez igazítva mindkét csatornán beállítottunk egy intenzitásküszöb-értéket, a kijelölést pedig erre korlátoztuk. A kijelölésen belül a vizsgált antigéneket jelölő vörös intenzitásértékeket a β -aktint jelölő zöld intenzitásértékekre normalizáltuk.

3.7. Kvantitatív reverz transzkripció polimeráz láncreakció (RT-qPCR)

6 normál és 6 diabéteszes egérből intra- és interlobularis duktális szegmenseket izoláltunk, és a pool-ozott mintákból teljes RNS-t izoláltunk. Reverz transzkripciót követően TaqMan próbákkal qPCR-t végeztük. Az eredményeket a $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ módszerrel kvantifikáltuk.

3.8. ELISA esszék

A szívből vért vettünk, fluorid+heparin bevonatú kapillárisokba töltöttük és centrifugáltuk. A pancreas-homogenizátumokhoz 100 mg szövetet folyékony nitrogénben elmorzsoltunk 1 ml jéghideg proteáz inhibitor koktélaban feloldottunk. A SCT és CCK esszéket a gyártó utasításai szerint végeztük el.

3.9. Metszetsorozat készítése Giemával injektált egér-hasnyálmirigyből

$1,5\%$ -os alacsony olvadáspontú agarózban 10% Giemsa-t oldottunk és az egerek Wirsung-vezetékébe injektáltuk. A hasnyálmirigyet eltávolítottuk, megtisztítottuk, és a fej, test

és a fark felosztás szerint három arabra vágtuk. A darabokat kriomátrixba ágyasztuk, és 15 vastag metszeteket készítettünk belőlük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az exokrin hasnyálmirigy morfológiája 1-es típusú diabéteszben

A STZ-kezelés hatására az inzulintermelő béta-sejtek elpusztultak, emiatt a szigetek száma és mérete lecsökken. Ezen felül a szövetekben enyhe fibrózis, acináris atrófia és leukocita infiltráció volt megfigyelhető. Ezzel szemben a csatornák szerkezete ép maradt. A hasnyálmirigy elektronmikroszkópos vizsgálatával az acinusokban megnagyobbodott mitokondriumokat, azokban pedig fragmentált belső membránszerkezetet figyeltünk meg

4.2. A dukális hasnyálszekréció növekedése diabéteszben

Az *in vitro* mérésekben a folyadékszekréció sebességét az izolált ductalis szegmensek luminális térfogatváltozásából becsültük meg. A forskolinstimuláció hatására bekövetkező folyadéktermelés az egészséges állatok duktusaihoz képest szignifikánsan nagyobb diabéteszben. Hasonló eredményeket mutattak az *in vivo* folyadékszekréciós vizsgálatok. Az egészséges egerekhez képest mind a bazális, mind a SCT-stimulált (1 CU/kg) hasnyálszekréció szignifikánsan nagyobb volt a diabéteszes állatokban.

4.3. Diabéteszben fokozódott a dukális sav-bázis-transzporterek aktivitása és expressziója

Normál és diabéteszes egerek izolált duktuszaiban a sav-bázis transzporterek aktivitásának mérésére az ammóniapulzus technikát használtuk. Az alkalózisból és az acidózisból történő regeneráció egyaránt fokozottabb volt diabéteszes egerekben, mint a kontrollokban, a cukorbetegség tehát megnövelte a sav-bázis transzporterek aktivitását. Ennek a megerősítésére Cl^- -elvonásos módszert használtuk. Az ammóniapulzus technikához hasonlóan az anionkicserélők fokozott aktivitást mutattak diabéteszben.

Ezután megvizsgáltuk a fő sav-bázis transzporterek mRNS- és fehérjeexpresszióját normál és diabéteszes egerek izolált intra- és interlobuláris duktuszaiban. Az RT-qPCR és az immunfluoreszcens jelölés a CFTR, az ANO-1, az NHE-1 és az AQP-1 fokozott expresszióját mutatta ki diabéteszes egerekben.

4.4. A CFTR központi szerepe a diabéteszben megfigyelhető fokozott HCO₃⁻-szekréciónban

A CFTR Cl⁻-csatorna alapvető szerepet játszik a duktális HCO₃⁻-szekréciónban. expressziója megnövekedett diabéteszben. Emellett a 20 μM-os forskolinstimuláció hatására bekövetkező Cl⁻-kiáramlás az MQAE-s fluoreszcens mérések során szignifikánsan magasabb volt a diabéteszes állatok izolált duktuszaiban.

Hogy megerősítsük a CFTR szerepét a diabéteszben megfigyelt fokozott HCO₃⁻-szekréciónban, a Cl⁻/HCO₃⁻-kicszerelő aktivitását CFTR KO egerekben (CFTR hiányában) is megvizsgáltuk az ammóniapulzus technika használatával. CFTR hiányában a HCO₃⁻-szekréción sebessége jelentősen csökken. A diabéteszes KO egerek megnövekedett HCO₃⁻ szekréción mutattak nem diabéteszes társaikhoz képest. Ez a növekmény azonban sokkal kisebb volt, mint amit a diabéteszes és kontroll WT egereknél megfigyeltünk, és statisztikailag sem volt szignifikáns. CFTR hiányában a NHE és/vagy NBC diabéteszben fokozott aktivitása is szignifikánsan kisebb volt. *In vivo* a CFTR KO egerek a hasnyálszekréciónja a WT-nál sokkal lassabb volt. Diabétesz hatására a hasnyálszekréción enyhén megnövekedett a CFTR KO egerekben is, de ez statisztikailag nem volt szignifikáns. Ezen eredmények együttesen azt mutatják, hogy a CFTR fontos szerepet játszik a diabéteszben megfigyelhető fokozott folyadék- és HCO₃⁻ szekréciónban.

4.5. A magas extracelluláris glükózkoncentráció hatása a sav/bázis transzporterek aktivitására

Az 1-es típusú diabétesz jellemzően hiperglikémiával jár, ezért az ammóniapulzus technikával meghatároztuk, hogy az akut és krónikus glükózkezelés milyen hatással van a transzporterek aktivitására. Sem az akut, sem krónikus adása nem okozott különbséget az alkalózisból történő regenerációnban a kontrollhoz képest. A krónikus kezelés azonban megnövelte az acidózisból történő regeneráción sebességét, ami azt jelzi, hogy az NHE-1 és/vagy az NBCe1-B aktivitása megnő krónikusan magas extracelluláris glükózsint esetén. A Cl⁻/HCO₃⁻-kicszerelő aktivitását a Cl⁻-elvonásos technikával is megvizsgáltuk; azonban sem az akut, sem a krónikus glükózkezelés nem okozott szignifikáns változást az aktivitásában.

4.6. A szekretin és a kolecisztokinin plazmaszintje diabéteszes egerekben

A kontroll és a diabéteszes egerek plazmájában se a SCT, se a CCK szintje nem mutatott különbséget. A SCT szintjét pancreashomogenizátumokban is megvizsgáltuk, amikben enyhe, de nem szignifikáns növekedést láttunk diabéteszes állatokban. Végül RT-qPCR-rel

kimutattuk, hogy a diabéteszes állatok duktuszaiban a SCTR expressziója szignifikánsan megnőtt, azonban immunfluoreszcens jelöléssel ezt fehérjeszinten nem tudtuk megerősíteni.

4.7. A pancreasszövet-szeletekben található duktuszok szerkezeti integritása

A pankreasz feji és testi régiójának intra- és interlobuláris duktuszai erős sejtmagi Giemsa festődést mutattak, míg a farki régióban gyenge, vagy semmilyen festődést nem találtunk, továbbá a környező szövetek sem mutattak festődést. A lumenális membrán erős CFTR-jelölést mutatott, és szerkezetileg sértetlennek tűnt, ez pedig a duktális sejtek normális működésére utal.

5. ÉRTÉKELÉS

A cukorbetegségnek az exokrin hasnyálmirigyre számos negatív, hosszú távú hatása van. A mögöttes folyamatokról, különösen a duktális sejtek oldaláról rendelkezésre álló ismereteink ennek ellenére mindmáig hiányosak. Jelen vizsgálatunkban kimutattuk, hogy a duktális sejtek folyadék- és HCO_3^- szekréciós aktivitása diabétesz következtében fokozódik. Ebben a folyamatban valószínűleg szerepet játszik a CFTR, az NHE-1 és valószínűleg az ANO-1 aktiválása és overexpressziója.

Először elektronmikroszkóppal megvizsgáltuk, hogy az 1-es típusú diabétesz hogyan befolyásolja az exokrin és endokrin pankreasz morfológiáját. A legjellemzőbb különbség a normál és a diabéteszes hasnyálmirigy között az acinussejtek mitokondriumainak morfológiája volt, amely diabéteszben kevésbé megnyúlt, kerekesebb alakot mutatott. Ezen kívül a mitokondriumok megnagyobbodása és a belső membrán szerkezetének megrongálódása volt megfigyelhető. Mások hasonló eredményeket figyeltek meg 1-es típusú cukorbetegség intermedier sejtjeiben (zimogén- és hormongranulumokat egyaránt tartalmazó sejtek), és 2-es típusú cukorbetegség béta-sejtjeiben. Az acinusokkal ellentétben a duktális mitokondriumok többnyire épek voltak, ami arra utal, hogy a duktális funkciók nem sérülnek 1-es típusú diabéteszben. A mitokondriumok fontos szerepet játszanak a sejtek normál energiatermelésének és energiaegyensúlyának fenntartásában, ezért az acináris mitokondriumok károsodása valószínűleg hozzájárul a PEI kialakulásához.

Mind *in vivo*, mind *in vitro* módszerekkel kimutattuk, hogy a hasnyálválasztás szignifikánsan megnő STZ-indukált diabéteszes egerekben. Ez mind a bazális, mind a forskolinral vagy SCT-nel történő, cAMP/PKA útvonalon keresztül stimulált szekréció esetén

megfigyelhető volt. Mindez a CFTR fokozott aktiválódására utal, és arra, hogy a stimulált duktális folyadék szekréció SCT-érzékenysége megnő.

A hasnyálevélválasztás sebessége elsősorban a HCO_3^- -szekréció sebességétől, és így a duktális iontranszporterek aktivitásától függ. A duktális sejtekben a HCO_3^- -szekréció elsősorban az SLC26A6 nevű elektrogén $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -kicserélőn keresztül valósul meg. Az ammóniapulzus technikával megfigyeltük, hogy diabéteszben a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -kicserélő aktivitása fokozódott. A Cl^- -elvonásos módszer az anionkicserélő aktivitásának közvetlen mérését teszi lehetővé. Az ammóniapulzushoz hasonlóan az anionkicserélő diabéteszben fokozott aktivitást mutatott luminális irányba, reverz üzemmódban azonban nem, és az alkalózis mértékében sem volt különbség. Utóbbiak arra utalnak, hogy az anionkicserélő reverz aktivitását a diabétesz nem befolyásolja. Továbbá az is lehetséges, hogy a megnövekedett HCO_3^- -kiáramlást a CFTR közvetíti, amelyet az $[\text{Cl}^-]_i$ 10 mM alá történő lecsökkenésekor a WNK1 aktivál.

Mivel a CFTR Cl^- -csatorna és a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -kicserélők NHER-eken keresztül kölcsönhatásba lépnek egymással és szabályozásuk együttesen valósul meg, a CFTR aktivitását az MQAE nevű Cl^- -érzékeny fluoreszcens festék és az AC-t aktiváló forskolin segítségével is megmértük. A diabéteszes állatok duktuszaiban fokozott CFTR-aktivitást detektáltunk, ami nagy valószínűséggel hozzájárul a megnövekedett HCO_3^- szekréció létrejöttéhez.

Az ammóniapulzus technika az acidózisból történő regeneráció sebességének mérésével a bazális alkalizáló transzporterek vizsgálatát is lehetővé teszi. Az alkalózishoz hasonlóan az acidózisból való regenerációban is szignifikáns növekedést tapasztaltunk, ami arra utal, hogy az alkalizáló transzporterek aktivitása is megnő diabétesz hatására. A duktális sejtekben a fő alkalizáló transzporterek a bazolaterális NHE-1 és NBCe1-B. Az NBCe1-B HCO_3^- -ot szállít a sejtbe, míg az NHE-1 eltávolítja a CA aktivitásának következtében létrejövő H^+ -at. Amennyiben az anionkicserélő aktivitása megnő, azt az NHE-1 és az NBCe1-B fokozott aktivitása kell kísérje, amit kísérleteink is alátámasztanak.

Hogy azonosítsuk a diabétesz hatására megnövekedett transzportaktivitás mögött álló mechanizmusokat először megvizsgáltuk a főbb sav-bázis transzporterek expresszióját. Kimutattuk, hogy a CFTR mRNS és fehérje expressziója szignifikánsan megnövekszik a diabéteszes egerek duktuszaiban, ami részben megmagyarázza a CFTR megnövekedett aktivitását. Kimutattuk továbbá, hogy a duktális HCO_3^- -szekrécióban részt vevő más sav-bázis transzporterek is overexpresszálódnak. A diabéteszes duktuszokban fokozott NHE-1-expressziót figyeltünk meg, azonban az NBCe1-B expressziójában nem találtunk változást. Ez arra utal, hogy a diabéteszben megfigyelt fokozott szekréció során az intracelluláris HCO_3^-

jelentős része a CA és az NHE-1 aktivitásán keresztül akkumulálódik, nem pedig az NBCe1-B aktivitásán keresztül.

Az SLC26 anioncserélők közül a dukális sejtekben apikális membránjában az SLC26A3 és az SLC26A6 izoformák vannak jelen, és jelentős szerepet játszanak a dukális HCO_3^- -szekrécióban. Noha funkcionális kísérleteink során diabéteszben fokozott $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ csereaktivitást tapasztaltunk, az SLC26A3 és SLC26A6 expressziójában találtunk különbséget. Ez azt jelenti, hogy a megnövekedett anioncserélő aktivitás valószínűleg az SLC26A3 és SLC26A6 CFTR általi fokozott aktiválódása révén jön létre, nem pedig az anionkicserélők cserélők overexpressziója következtében.

Diabétesz hatására az AQP-1 expressziója is megemelkedett. Az AQP-1 elősegíti a víz transzcelluláris mozgását, és a dukális sejtek fő vízcsatornájaként az AQP-1 felelős a kiválasztott hasnyál térfogatának nagy részéért. Az AQP-1 overexpressziója diabéteszben valószínűleg a fokozott anionszekréciót kompenzálni hivatott mechanizmusa, mivel a transzcelluláris ionmozgásokat a víz ozmotikusan leköveti.

Az egyik legérdekesebb felfedezésünk, az ANO-1 nevű Ca^{2+} -aktivált Cl^- csatorna, pancreas dukális sejtekben történő kifejeződése. Noha korábban a pankreasz dukális sejtekben leírták Ca^{2+} -aktivált Cl^- -áram meglétét, a csatorna a molekuláris kiléte ismeretlen maradt. Vizsgálatunk kimutatta az ANO-1 jelen van az egerek dukális sejtjeinek luminális membránján. Az ANO-1-et kétértékű kationok – főleg Ca^{2+} – aktiválják, melyeket Mg^{2+} -mal antagonizálni lehet. Számos egyéb stimulus, például extracelluláris ATP, a pH_i csökkenése és a hőstressz is képes aktiválni a csatornát. Tekintve, hogy az acinus sejtekben és a nyálcsatornáknak az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedése kiváltja az ANO-1 aktiválódását, valószínűsíthető, hogy a csatorna a pankreasz dukális sejtekben is aktiválódik a Ca^{2+} -jelátviteli útvonalon keresztül. Mind az egér, mind a humán dukális sejtek viszonylag nagy sűrűségű Ca^{2+} -aktivált Cl^- -áramot produkálnak, emellett a dukális sejtek néhány fő szekretagógja (pl. acetilkolin és CCK) a Ca^{2+} -szignalizációs útvonalon keresztül hat. Továbbá a CFTR-hoz hasonlóan az ANO-1 ionszelektivitása a Cl^- -ről a HCO_3^- felé eltolható a csatornapórus méretének módosításával. Mindez alapján feltételezzük, hogy a CFTR mellett az ANO-1 is szorosan együttműködik az apikális transzporterekkel, és a HCO_3^- -szekréció egy alternatív útvonalaként működik, amint azt acinus sejtekben kimutatták. Emellett megállapítottuk, hogy a diabétesz megnöveli az ANO-1 expresszióját, így ez hozzájárulhat a fokozott HCO_3^- -szekrécióhoz is. Végző soron azonban az ANO-1 hasnyáleválsztásban betöltött szerepének tisztázására további funkcionális vizsgálatokra van szükség. Eredményeink azt mutatják, hogy a CFTR, az ANO-1 és az NHE-1 fokozott expressziója serkenti a dukális $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -cserét. Felmerül tehát annak lehetősége,

hogy ezen transzporterek mesterséges aktivációja új terápiák kifejlesztését tegye lehetővé olyan betegségek kezelésében, mint a CF vagy az akut és krónikus hasnyálmirigy-gyulladás.

CFTR KO egereken végzett eredményeink ugyancsak alátámasztják, hogy a CFTR-nak központi szerepe van a diabéteszben megnövekedett dukális szekrécióban. A vártak megfelelően mind a folyadék, mind a HCO_3^- -szekréció szignifikánsan csökkent volt a CFTR KO egerek duktuszaiban. A KO egerekben indukált diabétesz kis mértékben fokozta mind az *in vivo* hasnyáleválasztást, mind az *in vitro* HCO_3^- -szekréció, statisztikailag azonban egyik sem volt szignifikáns. Ez azt jelzi, a diabétesz dukális szekrécióra gyakorolt serkentő hatásához elengedhetetlen a funkcionálisan aktív CFTR jelenléte. A diabéteszes CFTR KO állatokban megfigyelt kismértékű növekedés azonban arra utal, hogy a diabétesz más apikális transzporterek, mint például az ANO-1 és a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -cserélők aktivitását is befolyásolja.

További kísérleteinkben arra törekedtünk, hogy azonosítsuk azokat az ingereket, amelyek a szóban forgó transzporterek diabéteszben megfigyelhető fokozott aktivitásáért/expressziójáért felelősek lehetnek. Az 1-es típusú diabéteszhez járó hiperglikémia az iontranszport mechanizmusokat jelentősen befolyásoló tényező – mind a vese proximális tubulusaiban, mind a pankreasz duktuszaiban. Az ammóniapulzus és a Cl^- -megvonás alkalmazásával sem az akut-, sem a krónikus glükózkezelés anioncsere-aktivitást befolyásoló hatását nem tudtuk kimutatni. A krónikus glükózkezelés azonban növelte az acidózisból való regeneráció sebességét, ami arra utal, hogy a hiperglikémia közvetlenül növeli az NHE-1 és/vagy az NBCe1-B aktivitását. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy diabéteszes vesebetegek disztális nephron sejteiben, vaszkuláris myocytáiban és limfoblasztjaiban, a magas extracelluláris glükóz növeli az NHE-1 aktivitását, a valószínűleg a protein kináz C vagy a Mek/Erk1/2/p90(RSK) és p38MAPK útvonalakon keresztül.

A dukális folyadék- és HCO_3^- -szekréció diabéteszben történő megváltozásának egy másik módja, ha módosul a fő aktivációs hormonokra, például az SCT-re és a CCK-ra adott válasz. A SCT a dukális sejtek szekréciós tevékenységét elsődlegesen befolyásoló hormon. A bazolaterális SCTR-ok aktiválása megnöveli a cAMP intracelluláris szintjét, ami aktiválja a PKA-t. A PKA ezt követően aktiválja a CFTR-t és az SLC26 anionkicserélőket, egyúttal NHER-kapcsolt funkcionális komplexeken belül gátolja az NHE-3-at és az NBCn1-et az, így indukálva a HCO_3^- apikális kiáramlását. A CCK-t főként enteroendokrin I-sejtek termelik és a dukális sejtekben a CCKBR-onkeresztül, az intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedését idézi elő. A Ca^{2+} -jelátviteli útvonalon keresztül a CCK főként az IRBIT aktiválásával potenciózza a SCT-indukált HCO_3^- -szekréciót, de előfordulhat, hogy aktiválja a Ca^{2+} -függő AC-t és Ca^{2+} -aktivált Cl^- csatornákat is, amilyen például az ANO-1. A plazma SCT- és CCK-szintjében nem

találtunk változást, ami arra utal, hogy az 1-es típusú diabétesz valószínűleg nem befolyásolja a duodenális S-sejtek és az enteroendokrin I-sejtek szekréciós aktivitását. Azonban megfigyeltük, hogy a SCTR mRNS expressziója szignifikánsan megnő a diabéteszes egerek duktuszaiban. Ez a fokozott expresszió fehérjeszinten is megfigyelhető volt, de statisztikailag nem volt szignifikáns. Feltételezzük tehát, hogy a SCT diabéteszben nagyobb stimuláló hatást fejt ki a duktális sejtekre, azonban ennek megerősítéséhez további vizsgálatokra van szükség.

E disszertáció második részében azt vizsgáltuk, hogy a pankreaszövet-szelet technika alkalmas-e a duktális sejtek funkcionális vizsgálatára. A szövetszeletekben csak a duktális sejtmagok festődtek Giemssával, egyéb struktúrák azonban nem, ami azt mutatja, hogy a beinjektált agarózgél nem jut ki a duktuszokból. A pankreasz metszeteinek vizsgálata alapján továbbá az derül ki, hogy a gél a mirigy testi régiójában található interlobuláris duktuszokig hatol. A csatornák megrepedése és a gél szivárgása agarózcsomókat eredményezne a szövetben és megakadályozná a gél egyenletes eloszlását a duktális fában, ami így a lágyszövetnek nem volna képes biztosítani a mikrotómos szeleteléshez szükséges rigiditást.

Fiziológiás körülmények között a CFTR fehérje érése során végül az apikális membránba transzportálódik, amit a duktális sejtekben jól körülhatárolható apikális CFTR-festődés jelez. A CFTR foldingja más fehérjékhez képest viszonylag bonyolult, és még a WT CFTR fehérje érési hatékonysága is csupán ~30%. Toxikus anyagok vagy kóros állapotok, például krónikus hasnyálmirigy-gyulladás következtében a CFTR felhalmozódik az endoplazmatikus retikulumban, és jelölése citoplazmatikus lokalizációt mutat. Ezért a szövetszeletekben a CFTR duktális apikális lokalizációja valószínűleg normál sejttéltani funkciókat tükröz, amit funkcionális kísérleteink is megerősítettek. Ennek megfelelően arra a következtetésre jutottunk, hogy a pankreaszövet-szeletek megőrzik a duktális sejtek fiziológiás szerkezetét és funkcióját, továbbá hogy ez a modell alkalmas a duktális sejtek és kölcsönhatásaik tanulmányozására.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Eredményeinkből arra következtetünk, hogy az 1-es típusú diabétesz duktális HCO_3^- -szekrécióna kifejtett stimuláló hatása egy összetett és többtényezős folyamat. Az SLC26 anionkicsérőlék aktivitását fokozza a duktális sav-bázis transzporterek, különösen a CFTR és az NHE-1 megnövekedett expressziója. Emellett a magas extracelluláris glükózkoncentráció stimulálja az alkalizáló transzporterek, például az NHE-1 aktivitását, amely szintén hozzájárulhat a fokozott szekréciónhoz. Továbbá a megnövekedett szekrécións aktivitásban az ANO-1 is valószínűleg szerepet játszik, mivel az ANO-1 jelen van a pankreasz duktális sejtekben és expressziója diabéteszben megnő. A fokozott duktális szekréción szerepe az 1-es típusú diabéteszben, és hogy e jelenség átmeneti-e, vagy tartós, nem egyértelmű. A legelfogadottabb, klinikai vizsgálatokra alapuló nézet az, hogy a hosszú ideje fennálló diabétesz károsítja az exokrin funkciókat. Ennek alapja, hogy az inzulin és stimuláló hatása 1-es típusú diabéteszben hiányzik. Ezzel szemben vizsgálataink azt mutatták, hogy a cukorbetegség következtében a duktális szekréción megnövekszik, legalábbis annak kezdeti szakaszában. Ez nem volna példa nélküli, mivel a diabéteszes vesebeteggekben a glomeruláris filtrációs ráta kezdetben fokozódik, hogy kompenzálja a hiperglikémia miatt lecsökkent Na^+ -kiválasztást. A betegség előrehaladtával azonban a glomeruláris filtrációs ráta lassan hanyatlani kezd. Ezért azt feltételezzük, hogy 1-es típusú diabéteszben a fokozott duktális HCO_3^- -szekréción egy védelmi mechanizmus, ezen felül pedig egy potenciális terápiás célpont. Feltételezésünk igazolásához azonban további vizsgálatokra van szükség.

A szakterület számára újdonsággal bíró eredményeink:

- I. A STZ-indukált 1-es típusú diabétesz hatására pankreaszban fokozódik a duktális folyadék- és HCO_3^- -szekréción.
- II. Az SLC26 anionkicsérőlék aktivitása a duktális sav-bázis iontranszporterek – elsősorban a CFTR – megnövekedett expressziója révén megnő 1-es típusú diabéteszben
- III. A magas extracelluláris glükózkoncentráció fokozza az alkalizáló transzporterek, például az NHE-1 működését
- IV. Az ANO-1 jelen van a duktális sejtekben és kifejeződése megnövekszik 1-es típusú diabéteszben
- V. A pankreaszszövet-szelet a duktális sejtek morfológiai és funkcionális vizsgálatára alkalmas kísérleti modell