

A hasnyálmirigy duktuszok központi szerepe az akut pankreatitisz kialakulásában és progressziójában

Dr. Maléth József

Ph.d: Tézis

Témavezetők: Professzor Dr. Hegyi Péter
 Dr. Rakonczay Zoltán Jr.

I.sz. Belgyógyászati Klinika
Szegedi Tudományegyetem
Szeged
2014

BEVEZETÉS

A pankreasz egyik leggyakrabban előforduló megbetegedése az akut pankreatitisz, melynek leggyakoribb oka az epekövesség mellett a nagy mennyiségű alkohol fogyasztás. Gyakorisága ellenére az akut pankreatitisz terápiája többnyire szupportív jellegű, specifikus terápia a legtöbb típus esetében nem áll rendelkezésre.

A pankreasz duktális epitél sejtek bikarbonátban gazdag alkalikus folyadékot termelnek. A szekretált bikarbonát semlegesíti az acinussejtek enzimszekréciója során felszabaduló protonokat, ezáltal fontos szerepet tölt be a hasnyálmirigy fiziológiai működésében. A bikarbonát szekréció döntően a kisméretű intralobuláris duktuszokban valósul meg, során a sejtek bazolaterális membránja felől a HCO_3^- a Na/HCO_3 ko-transzporterén (NBC) és a Na^+/H^+ cserélőn (NHE) keresztül jut a sejtekbe. Ezt követően a HCO_3^- a duktuszok lumenébe a cisztás fibrozis transmembrán konduktancia regulátor-on (CFTR) és a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ cserélőn keresztül jut ki.

Munkacsoportunk korábbi kutatásai során vizsgálta az epesavak duktális epitél sejtekre gyakorolt hatását. Azt tapasztaltuk, hogy a luminálisan alkalmazott kis koncentrációjú (0,1mM) nem-konjugált kenodezoxikólsav (CDC) szignifikánsan növelte a duktális sejtek HCO_3^- szekrécióját. Kimutattuk továbbá, hogy mind a nem-konjugált CDC, mind pedig a konjugált glikokenodezoxikólsav (GCDC) dóziszfüggő kalcium emelkedést váltanak ki tengerimalac hasnyálmirigy duktális epitél sejtekben (PDEC). A nagy koncentrációjú (1mM) CDC mind a bazolaterális, mind a luminális membrán felől adva gátolta a sav/bázis transzporterek (NHE, NBC és CBE) aktivitását. Arra azonban, hogy a bikarbonát szekréció gátlása milyen módon valósul meg ezidáig nem kaptunk választ.

Az akut pankreatitisz másik igen gyakori oka a nagy mennyiségű alkohol fogyasztás. Az etanol lebontása in vivo kétféle úton történik. Az oxidatív út a májban, a non-oxidatív az extrahepatikus szervekben (a pankreászban) jelentős. Az utóbbi évtizedben végzett kutatások arra utalnak, hogy az akut alkohol indukált pankreatitisz patogenezisében a non-oxidatív etanol metabolitok fontos szerepet játszhatnak. Azonban jelenleg kevés adat áll rendelkezésünkre az alkohol és a non-oxidatív etanol metabolitok pankreasz duktális szekrécióra gyakorolt hatására vonatkozóan.

CÉLKITŰZÉS

Kísérleteink fő célja a pankreász vezetéksejtek HCO_3^- szekréciójának vizsgálata patofiziológiás körülmények között.

Specifikus céljaink:

- az etanol és etanol metabolitok hatásának vizsgálata a hasnyálmirigy bikarbonát szekréciójára
- a nem-konjugált kenodezoxykólsav a hasnyálmirigy bikarbonát szekrécióra gyakorolt gátló hatásának vizsgálata

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Az etanol, a zsírsavak és a zsírsav etil-észterek hatását a hasnyálmirigy folyadék és HCO_3^- szekrécióra, valamint a CFTR klorid csatorna aktivitására és expressziójára hasnyálmirigy duktális epitél sejtvonalon (Capan-1) és rágcsáló modelleken (tengeri malac, CFTR knockout egér) vizsgáltuk. Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), ATP szint ($(\text{ATP})_i$), és mitokondrium membrán potenciál ($(\Delta\Psi)_m$) változásait etanol, non-oxidatív etanol metabolitok és epesavak hatására fluoreszcens módszerekkel határoztuk meg. A mitokondriális morfológiát elektron mikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

EREDMÉNYEK

- I. A kis dózisú etanol (10mM) IP₃-mediálta úton Ca²⁺-t szabadított fel az endoplazmás retikulumból, amely szignifikáns mértékben serkentette a hasnyálmirigy duktális bikarbonát szekréciót Capan-1 sejtekben. A serkentő hatás létrejöttében az apikális membránon elhelyezkedő CBE és CFTR aktivitásának fokozódása is szerepet játszott.
- II. Nagy dózisú etanol (100mM) és palmitoleát (POA; 200μM) gátolta a duktális bikarbonát szekréciót és a CFTR klorid csatorna aktivitását Capan-1 sejtekben, illetve izolált tengerimalac duktuszokban.
- III. Nagy dózisú etanol és zsírsav gátolta a pankreász duktális folyadékszekeréciót *in vivo* vad típusú és CFTR knock out egerekben, illetve *in vitro* izolált tengerimalac duktuszokban.
- IV. Az etanol és a palmitoleát gátolta az apikális membránon elhelyezkedő CBE-t és CFTR klorid csatornát.
- V. Nagy dózisú etanol és palmitoleát IP₃ és rianodin receptor mediálta úton Ca²⁺-t szabadított fel az endoplazmás retikulumból és elhúzódo kalcium szignált váltott ki Capan-1 sejtekben.
- VI. Nagy dózisú etanol és palmitoleát csökkentette az intracelluláris ATP szintet és a mitokondriális transzmembrán potenciált. A celluláris ATP deplécio, amit a mitokondriális és glikolitikus ATP termelés gátlásával idéztünk elő, az etanolhoz és a palmitoleáthoz hasonló mértékben gátolta a HCO₃⁻ szekréciót.
- VII. Az intracelluláris Ca²⁺ szint emelkedésének megakadályozása BAPTA-AM preinkubációval kivédte az etanol és a palmitoleát gátló hatását, ami azt sugallja, hogy az elhúzódo Ca²⁺ emelkedés kulcsfontosságú a gátló hatás létrejöttében.
- VIII. Az alkohol és a non-oxidatív alkohol metabolitok gátolták a CFTR klorid csatorna expresszióját *in vitro* hasnyálmirigy duktális epitél sejtekben és *in vivo* tengerimalac modellben.
- IX. A nagy dózisú (1mM) nem-konjugált kenodezoxikólsav jelentős mértékű mitokondrium károsodást idézett elő tengerimalac pankreász duktális epitél sejtekben, illetve humán kolón epitél sejtekben. A mitokondriumok morfológiai károsodása következményes intracelluláris ATP deplécioval is járt, ami szignifikáns mértékben gátolta a duktális epitél sejtek HCO₃⁻ szekrécióját.

KÖVETKEZTETÉSEK

Jelen tanulmány során sikeresen demonstráltuk, hogy az akut pankreatitisz két fontos etiológiai tényezőjének (a nem-konjugált epesavak, illetve az alkohol és a non-oxidatív metabolitok) hatására (ATP)_i depélcio jön létre a hasnyálmirigy duktális epitél sejtekben, a bikarbonát szekréció pedig gátlás alá kerül. Mind az (ATP)_i csökkenés megakadályozása, mind a bikarbonát szekréció helyreállítása (különös tekintettel a CFTR aktivitásának helyreállítására) potenciális terápiais kozekvenciával bírhatnak.