

A könnymirigy és hasnyálmirigy duktális epitél sejtek vizsgálata fiziológias és patofiziológias körülmények között

Katona Máté, M.Sc.

Ph.D. Tézis



Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

I.sz. Belgyógyászati Klinika

Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2015

**A könnymirigy és hasnyálmirigy duktális epitél
sejtek vizsgálata fiziológias és patofiziológias
körülmények között**

Katona Máté, M.Sc.

Ph.D. Tézis

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezetők: Dr. Tóth-Molnár Edit, Ph.D.

Dr. Venglovecz Viktória, Ph.D.

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

I.sz Belgyógyászati Klinika

Szegedi Tudományegyetem

Szeged, Magyarország

2015

A TÉZIS TÁRGYÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

A tézis tárgyához szorosan köthető és a tézisben felhasznált közlemények

- I.** **Katona M**, Vizvári E, Németh L, Facskó A, Venglovecz V, Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Tóth-Molnár E. Experimental evidence of fluid secretion of rabbit lacrimal gland duct epithelium.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014;55(7):4360-7.

[IF₂₀₁₄: 3.661]

- II.** **Katona M**, Hegyi P, Kui B, Balla Zs, Rakonczay Z Jr, Rázga Zs, Tiszlavicz L, Maléth J, Venglovecz V. A novel, protective role of ursodeoxycholate in bile-induced pancreatic ductal injury.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. Accepted for publication [IF₂₀₁₄: 3.737]

A tézis tárgyához köthető közlemények

- III.** Maléth J, Balázs A, Pallagi P, Balla Z, Kui B, **Katona M**, Judák L, Németh I, Kemény LV, Rakonczay Z Jr, Venglovecz V, Földesi I, Pető Z, Somorácz Á, Borka K, Perdomo D, Lukacs 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):427-39.e16.

[IF₂₀₁₄: 16.716]

Publikációk száma: **3 (2 first author)**

Összesített impakt faktor: **24.114**

RÖVIDÍTÉSEK

(ATP)_i	sejten belüli ATP szint
BCECF-AM	2'7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymetil észter
[Ca²⁺]_i	sejten belüli Ca ²⁺ koncentráció
cAMP	ciklikus adenzin monofoszfát
AE	Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ kicserélő (anion kicserélő)
CA	szénsav anhidráz
CaCC	kalcium-aktivált Cl ⁻ csatorna
CFTR	cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor Cl ⁻ csatorna
EIPA	5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amiloride
FURA-2-AM	5-Oxazolecarboxylic acid, 2-(6-(bis(carboxymethyl)amino)-5-(2-(2-(bis(carboxymethyl)amino)-5-methylphenoxy)ethoxy)-2-benzofuranyl)-5-oxazolecarboxylic acetoxymethyl ester
DIDS	diisothiocyanostilbene-2,2'-diszulfon sav
NBC	Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ kotranszporter
NHE	Na ⁺ /H ⁺ kicserélő
NKCC	Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻ kotranszporter
PDEC	hasnyálmirig duktális epitélsejt
pH_i	sejten belüli pH
pH_L	luminális pH

1. BEVEZETÉS

A folyadék és az elektrolitok vektorális transzportja alapvető feladata az epiteliális sejteknek. Az exokrin mirigyek víz és elektrolit szekréciójában a legfőbb szerepet az acináris és a dukális sejtek játsszák. A folyadék összetétele, melyet ezek a sejtípusok szekretálnak eltér az egyes mirigyekben. Az acinusok főleg izotóniás, plazma-szerű folyadékot szekretálnak, melyet a dukális sejtek módosíthatnak. A fő transzporterek, melyek az acináris folyadék és elektrolit szekrécióban vesznek részt: az $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ kotranszporter (NKCC1), a Ca^{2+} -aktivált Cl^- csatornák (CaCC) és a Ca^{2+} -aktivált K^+ csatornák. Míg a dukális folyadék és elektrolit szekrécióban főleg az $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ kotranszporter (NBC), az $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kicserélő (AE), a cisztás fibrosis transzmembrán konduktancia regulator Cl^- csatorna (CFTR) és a CaCC vesznek részt. A dukális szekréciós folyamatok csökkenése, vagy károsodása olyan betegségek kialakulásában játszhatnak meghatározó szerepet, mint a hasnyálmirigy gyulladás, cisztás fibrózis, vagy a száraz szem szindróma.

1.1. Könnyimirigy

A könnyfilm réteg a szemben elengedhetetlen az ép szemfelszín fenntartásához. A könnyet az exokrin, tubuloacináris felépítésű könnyimirigy termeli. A megfelelő mennyiségű kiegyensúlyozott elektrolit, fehérje és mucin tartalmú folyadék szekréciója kulcsfontosságú a szemfelszín integritásának megtartásához. Csakúgy, mint más exokrin mirigyeket, a könnyimirigy is három fő sejtípus építi fel: acináris, dukális és mioepiteliális sejtek. Az acinusok funkcióját széleskörben tanulmányozták, de kevés információval rendelkezünk a könnyimirigy dukális sejtjeinek működéséről. Korábban feltételezték, hogy az acináris folyadék módosul útja során a dukális rendszerben, mire a szemfelszínre ér. Ezek a dukális szekréciós folyamatok emelkedett K^+ és Cl^- koncentrációt eredményeznek a könnyben.

Mindazonáltal a könnyimirigy dukális epitelsejtek szerepe az elektrolit és protein szekrécióban még nem tisztázott. Az első kísérletes vizsgálatokat munkacsoportunk végezte izlált könnyimirigy duktusz szegmenteken. Ezen izolátumok használata lehetővé tette különböző iontranszporterek szerepének vizsgálatát.

Ezen eredmények kimutatták a Na^+ függő H^+ kicserélő és a Cl^- függő HCO_3^- kicserélő funkcionális jelenlétét.

Az egyes Ca^{2+} és cAMP kapcsolt szignalizációs útvonalakat széleskörben vizsgálták már különböző mirigyekben úgy mint, a hasnyálmirigyben vagy a nyálmirigyben. Mindazonáltal kevés információnk van a könnyimirigy szekrécióban betöltött szerepükről.

A száraz szem szindróma az egyik leggyakoribb szemfelszínt érintő betegség. Jelenleg a könny utólagos pótlása, különböző szemcseppekkel a fő, többnyire nem elégséges kezelési mód, mely csak a tünetek kezelésére szolgál, de a probléma gyökerét nem szünteti meg.

Jelenlegi tudásunk a könnyimirigy működéséről, még messze nem komplett. Ezért a részletesebb

hepatobiliáris szekréciót, (ii) kiszorítja a hidrofób, toxikus epesavakat a májból, (iii) direct sejtvédő hatás a toxikus epesavak ellen.

Az UDCA és taurin konjugált formája a tauroursodezoxikólsav sejtvédő hatását már széleskörben vizsgálták májsejteken. Tanulmányok kimutatták, hogy az UDCA előkezelés jelentősen csökkentette az epesavak okozta mitokondrium pórusok nyitását és az apoptózist. Ezek alapján feltételezhető, hogy a mitokondrium membrán stabilizálása, legalábbis részben, fontos szerepet játszik az UDCA hatásmechanizmusában.

Ezen figyelemreméltó tulajdonsága az UDCA-nak felveti a kérdést, hogy vajon más szövetekben is hasonló hatása van e az epesavak okozta sejtkárosodásra.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. A könnyimirigy vezetéksejtek szekréciós folyamatainak vizsgálata

A könnyimirigy működéséről szerzett ismereteink még korántsem nevezhetők komplettnek. Egészen mostanáig limitált lehetőségekkel rendelkezünk a könnyimirigy vezetéksejtek működésének vizsgálatára. Ezért célul tűztük ki, hogy meghatározzuk a vezetéksejtek folyadékáteresztő képességét (P_f) és megvizsgáljuk a szekrécióban betöltött szerepüket különböző szekretagógok hatására, úgy mint (forskolin és carbachol).

2.2. Epesavak hatásának tanulmányozása hasnyálmirigy duktális epitelsejteken

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy egyes epesavak, mint a CDCA, erősen gátolják a sav-bázis transzporterek működését, károsítják a mitokondriumokat és elégtelen folyadék és HCO_3^- szekréciót eredményeznek. Az epesavak ezen hatása közrejátszhat a heveny hasnyálmirigy gyulladás kialakulásában. Egy másik epesav, az UDCA, ismert mitokondrium károsodás és sejthalál ellen védő hatásáról. Ezért kutatásunk célja az UDCA előkezelés hatásának vizsgálata vol a CDCA okozta vezetéksejt károsodással szembe *in vitro* és *in vivo* körülmények között.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Állatok

Felnőtt, hím 2-2,5 kg súlyú "New Zealand" fehér nyulakat használtunk kísérleteinkhez (Dévai Farm, Kondoros, Hungary). Az állatokat ketamin (40 mg/ml) és xylazin (10 mg/ml) elegyével altattuk, majd pentobarbitállal túllaltattuk (80 mg/kg). A könnyimirigyét óvatosan eltávolítottuk a koponyából.

Az epesavak hasnyálmirigy vezetéksejtekre gyakorolt hatásának vizsgálatához 150-250 g súlyú tengerimalacokat használtunk. Az állatok humánus nyaki diszokációja után, a hasnyálmirigyüket eltávolítottuk.

Hím 200-250g súlyú SPRD patkányokat használtunk az epesavak *in vivo* vizsgálatához.

Minden állatot konstans szobahőn (22 ± 2 °C) tartottunk 12 órás fény és sötét ciklusokkal. Az állatok szabad hozzáférést kaptak vízhez és sztenderd laboratóriumi takarmányhoz (Biofarm, Zagyvaszántó, Hungary).

3.2. Etika

Az összes állatkísérletet a Laboratóriumi Állatok Tartásáról és Felhasználásáról szóló irányelvnek, a 2010/63/EU irányelvnek és a Magyar 40/2013 (II.14.) kormányrendeletnek megfelelően és a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának (I-74-3/2012 MÁB), továbbá a magyar hatóságok (XII./3773/2012.) jóváhagyásával végeztük. A könnyimirigyhez köthető kísérleteknél továbbá tartottuk magunkat az ARVO Állatok Szemészeti Kutatásban történő felhasználásáról szóló állásfoglalásához is.

3.3. Könnyimirigy és hasnyálmirigy duktuszok izolálása és kultúrában tartása

A nyúl könnyimirigy és tengerimalac hasnyálmirigy intra/interlobuláris duktuszokat izoláltunk és kultúrában hagytunk egy éjszakán át

3.4. Ozmotikus permeabilitás és folyadékszekréció vizsgálata könnyimirigy vezetéksegmenteken

Izolálás után a könnyimirigy vezetékek vége leforr egy éjszaka alatt. Ezáltal zárt luminális tér keletkezik. Szekréció hatására a luminális térfogat növekedés videomikroszkópos technikával nyomonkövethető. A lumen hossza (L_0) és a luminális terület (A_0) direkt módon mérhető a képek pixelintenzitása alapján. A duktuszok folyadék átteresztőképességét különböző ozmolaritású (290 mosM és hipotóniás 145 mosM) oldatokkal vizsgáltuk.

Folyadékszekréciós vizsgálatoknál a használt izotóniás pufferoldatokat forskolinral, vagy carbachollal egészítettük ki. A kísérletek végén a szegmentek integritását hipotóniás oldattal vizsgáltuk.

3.5. Epesav kezelések

Az izolált hasnyálmirigy vezetékeket az alábbiak szerint kezeltük epesavakkal: kontroll (nincs kezelés, 5 perc CDCA (1 mM), 24 óra UDCA előkezeléskezelés (0.5 mM), paralell inkubáció UDCA előkezelés után 1 mM CDCA-val.

3.6. Intracelluláris Ca^{2+} koncentráció, pH és ATP szint mérése

Az izolált tengerimalac hasnyálmirigy vezetékek HEPES-pufferelt oldatban töltöttük BCECF-AM (1.5 μ M), Fura-2-AM (2.5 μ M), MgGreen-AM (5 μ M) vagy TMRM (1 μ M) 30-45 percig 37°C-on. A sav-bázis transzporterek aktivitását NH_4Cl pulzus technikával vizsgáltuk extracelluláris HCO_3^- jelenlétében és hiányában.

3.7. Mitokondrium membrán permeabilizáció vizsgálata

A mitokondrium belső membrán permeabilizáció vizsgálatára a calcein-cobalt kioltási technikát alkalmaztuk. Az izolált hasnyálmirigy vezetékeket calcein-AM (1 μ M) festékkel 30 percig, majd 1 mM CoCl_2 jelenlétében további 10 percig inkubáltuk. A mérések során 495 nm excitációs és 515 nm-emissziós hullámhosszt használtunk.

3.8. Programozott sejthalál vizsgálata

A sejthalál vizsgálatához terminális deoxiribonukleotidil transzferáz (TDT)-mediált dUTP-digoxigenin tört vég jelölést (TUNEL) próbát használtunk (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Az izolált hasnyálmirigy vezetékeket a fentebb leírt módon kezeltük epesavakkal. A kontroll és epesav kezelt vezeték szegmenteket 4%-os paraformaldehidben egy éjszakán át fixáltuk, majd fagyasztva metszettük a gyártó protokollja szerint.

3.9. Transzmissziós elektron mikroszkópia

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a kezelt és kontroll hasnyálmirigy vezeték szegmenteket 2.5%-os glutáraldehidben fixáltuk, a kezeléseket után, majd 1%-os ozmium tetroxidban utófixáltuk, dehidratáltuk felszálló alkoholsorban és epoxigyantába ágyasztuk. A mintákat transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. (CM10; Philips, Eindhoven, The Netherlands).

3.10. Akut hasnyálmirigy gyulladás indukálása állatmodellben

Hím SPRD patkányokat használtunk. A sebészi beavatkozás előtt 12 órával az állatokat éhezettük. A kísérletet megelőző két hétben a kezelt állatok szájon át 250 mg/kg UDCA-t (Ursofalk) csapvízben oldva kaptak, naponta egy alkalommal. A kontroll állatok csapvizet kaptak ugyanennyi ideig. Az utolsó UDCA kezelés egy nappal a hasnyálmirigy gyulladás indukciója előtt történt. A hasnyálmirigy gyulladás indukciójához az intraduktális térbe fecskendeztünk fiziológiás sóoldatban oldott 1ml/kg 1%-os CDCA-t. A kontroll állatok fiziológiás sóoldatot kaptak ugyanilyen beavatkozás keretében. Az állatok feláldozása 24 óráva az indukció után történt.

3.11. Statisztikai analízis

Az adatokat standard hibával ábrázoltuk. Az egyes csoportok közötti különbségeket varianciaanalízissel vizsgáltuk. $p < 0.05$ -t fogadtunk el, mint szignifikáns különbség.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A könnymirigy vezetéksejtek szekréción folyamatának vizsgálata

4.1.1. Könnymirigy epitélium vízáteresztő képességének vizsgálata

Könnymirigy vezeték hipotóniás oldatokkal történő perfúziója gyors növekedést eredményezett a lumen területben, bizonyítva azt, hogy a NaCl gradiens gyors folyadék beáramlást

okozott a zárt lumenális térbe. P_f értéke $60,53 \mu\text{m/s}$ ($\pm 19,76$).

4.1.2. Forskolin stimulálta szekréció

A könnymirigy vezetékének szekrécióját forskolin hatására HCO_3^- jelenlétében és hiányában vizsgáltuk. HCO_3^- mentes HEPES-pufferelt oldatot adtunk 10 percig, majd $10 \mu\text{mol/l}$ forskolinnal perfundáltuk a vezetékét. Forskolin hatására jelentős folyadékszékreciót figyeltünk meg, mely a lumenális tér és az ebből származtatott térfogat növekedésében mutatkozott meg.

Hogy vizsgáljuk a HCO_3^- lehetséges szerepét a folyadékszékrecióban, kísérleteinket megismételtük HCO_3^- tartalmú oldatokban is, mely során hasonló szekreciós aktivitást tapasztaltuk.

4.1.3. Különböző inhibitorok hatása a folyadékszékrecióra

A fent leírt eredmények alapján feltételezhető, hogy a könnymirigy vezetékének szekréciójában a HCO_3^- nem, vagy elhanyagolható mértékben vesz részt, ezért a szekrecióban egy másik anion a Cl^- játszhat jelentős szerepet. A sejt Cl^- felvételének vizsgálatához teszteltük a bazolaterális NKCC1 aktivitását, annak specifikus inhibitorával bumetaniddal. Kísérleteink során a bumetanidot ($100 \mu\text{mol/l}$) előkezelésben és szekreció közben is adtuk. Előkezelés hatására a forskolin indukált folyadék szekreció elmaradt, míg a szekreció közben adott inhibitor gátlást fejtett ki a további szekreciós folyamatokra. A kísérleteket elvégeztük HCO_3^- tartalmú oldatokban is, melyek során hasonló eredményt kaptunk, mint HCO_3^- mentes környezetben.

4.1.4. Bazolaterális HCO_3^- transzporterek szerepe a folyadékszékrecióban

A bazolaterális HCO_3^- és Cl^- transzporterek vizsgálatához, megnéztük azok gátlásának hatását a folyadék szekrecióra. Az NHK-t $3 \mu\text{mol/l}$ EIPA-val, a $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$ kicserélőt $500 \mu\text{mol/l}$ DIDS-el gátoltuk HCO_3^- tartalmú oldatokban, szekreció közben. Az EIPA és DIDS együttes alkalmazása teljesen gátolta a forskolin stimulált szekreciót.

4.1.5. Carbachol stimulált szekréció

A carbachol hatását a szekrecióra $100 \mu\text{mol/l}$ -os koncentrációban vizsgáltuk HCO_3^- tartalmú és mentes oldatokban. A folyadék szekreció két fázisúnak mutatkozott és hasonló kinetikával ment végbe mindkét esetben. Az első 5 percben folyamatos szekreciót, majd egy plató fázist tapasztaltunk. Paraszimpatolitikum (atropin) hatására a szekreció komplett gátlását figyeltük meg. A kalkulált szekreciós ráták nem mutattak szignifikáns különbséget a HCO_3^- tartalmú és a HCO_3^- mentes oldatokban tapasztalt szekreciós aktivitás között.

4.2. Epesavak hatásának tanulmányozása hasnyálmirigy duktális epitelsejteken

4.2.1. Epesavak hatása a sejten belüli pH-ra

Több korábbi tanulmány foglalkozott már az epesavak által okozott pH_i csökkenéssel különböző sejt típusokban. Ezért első lépésként megvizsgáltuk a CDCA és UDCA hatását a

hasnyálmirigy vezetéksejtek bazális pH_i -jára. Mindkét alkalmazott epesav dózisfüggő reverzibilis csökkenést okozott a pH_i -ban. A kísérleteket elvégeztük mind $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ pufferelt, mind HCO_3^- mentes HEPES-pufferelt oldatban is. A azonos koncentrációban adva a CDCA minden esetben nagyobb pH_i csökkenést okozott az UDCA által okozotthoz képest.

4.2.2. Az UDCA előkezelés hatása a CDCA által okozott sav-bázis transzporter gátlásra

Az ammonium pre-pulzus technika alkalmazásával lehetőségünk nyílt az egyes sav-bázis transzporterek vizsgálatára izolált hasnyálmirigy vezetékeken. Az UDCA akut alkalmazása nem volt különösebb hatással az alkalózisból és az acidózisból való regenerációra sem HEPES-pufferelt, sem $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ pufferelt oldatokban. Ezzel szemben 1 mM CDCA komoly gátló hatást fejtett ki a pH_i homeosztázis fenntartásáért leginkább felelős transzportereken. A következő lépésben teszteltük, hogy az UDCA és CDCA együttes alkalmazása milyen hatással van a transzporterek működésére. Együtt adva a CDCA-val az UDCA nem volt képes kivédeni a CDCA által okozott gátlást a sav-bázis transzportereken. Mivel több kutatás is hosszabb UDCA előkezelésről írt más sejtek esetében a pozitív hatás eléréséhez, ezért mi is hosszabb előkezelési időtartamokkal és koncentrációkkal kísérleteztünk. A ductuszok 5 órás preinkubációja semmilyen alkalmazott koncentrációban (0,1; 0,25; 0,5 és 1 mM) nem volt hatással a CDCA okozta gátló hatásra. Míg a 24 órás 0,5 és 1 mM-os UDCA előkezelés jelentősen csökkentette a CDCA toxikus hatását a sav-bázis (NHK, AE, NBC) transzportereken mind HEPES-pufferelt, mind $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ pufferelt oldatokban.

4.2.3. Az UDCA előkezelés hatása a CDCA által kiváltott Ca^{2+} szignálra

Több korábbi tanulmány is leírta, hogy az epesavak okozta toxikus Ca^{2+} szignál az egyik első lépés a heveny hasnyálmirigy gyulladás kialakulásában. Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján tudjuk, hogy a CDCA jelentős emelkedést okoz az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ban. Az UDCA magában nem váltott ki jelentős Ca^{2+} szignalizációt. Ezért megvizsgáltuk az UDCA előkezelés potenciális hatását a CDCA által kiváltott Ca^{2+} szignálra. Semmilyen UDCA előkezelési időtartamban és koncentrációban nem tapasztaltunk változást a CDCA indukált Ca^{2+} szignálban. Ebből arra következtetve, hogy az UDCA protektív hatását nem a CDCA által kiváltott Ca^{2+} szignálon keresztül fejt ki.

4.2.4. Az UDCA előkezelés hatása a CDCA által okozott mitokondriális károsodásra

Hogy tovább vizsgáljuk az UDCA védő hatását a vezetéksejtek mitokondriumain, vizsgáltuk a mitokondriális membrán potenciált ($\Delta\Psi_m$), a mitokondrium permeabilizációt, sejten belüli ATP koncentráció változásait és a mitokondriumok morfológiáját transzmissziós elektronmikroszkópiával. A CDCA magában komoly $\Delta\Psi_m$ depolarizációt, nagymértékű mitokondrium permeabilizációt és jelentős ATP_i csökkenést okozott, melyet a 24 órás 0,5 mM UDCA előkezelés nagymértékben csökkenteni tudott izolált hasnyálmirigy vezetéksejteken. A CDCA kezelés a mitokondriumok szerkezetében is nagymértékű roncsolást okozott, belső membránjai eltűntek, méretük megnőtt. A

CDCA által okozott hatás nem volt megfigyelhető az UDCA által előkezelt vezetékszegmenteken.

4.2.5. Az UDCA előkezelés hatása a CDCA által kiváltott sejthalálra

A sejthalál vizsgálatához az izolált vezeték-szegmenteket 5 percig 1 mM CDCA-val kezeltük, majd legalább 3 óra elteltével fixáltuk és fagyasztvametszés után TUNEL sejthalál próbát végeztünk, a gyártó leírása szerint. A CDCA által okozott sejthalált nagymértékben csökkentette a 24 órás UDCA előkezelés.

4.2.6. Az UDCA előkezelés hatásának vizsgálata CDCA indukált hasnyálmirigygyulladás modellben

Az UDCA előkezelés *in vivo* hatásainak vizsgálatához állatmodellt használtunk. Az *in vitro* kísérletekhez alkalmazott tengerimalacok anatómiai sajátosságai miatt nem voltak alkalmasak egy jól használható *in vivo* modell kialakítására, ezért patkány epesavas hasnyálmirigygyulladás modellben használtunk. Az állatokat UDCA-val előkezeltük a fentebb leírt módszerrel 2 hétig, majd hasnyálmirigygyulladást indukáltunk CDCA-val. A kontroll állatokéhoz képest az előkezelt állatokban kisebb mértékű gyulladást tapasztaltunk a laboratóriumi paraméterek és a szövettani képek alapján.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. A könnymirigy vezetéksejtek szekréciónak vizsgálatának vizsgálata

A legtöbb szekretáló epitéliummal ellentétben kevés információval rendelkezünk a könnymirigy vezetéksejtek permeabilitásával kapcsolatban. Ez a paraméter létfontosságú a szekréciónak megállapításában. Korábban feltételezték, hogy a dukális sejtek lehetnek felelősek a könnytermelés nagyjából 30%-áért. Bazolaterálisan és apikálisan elhelyezkedő ion transzporterek, kotranszporterek és kicserélők együttes működésének eredményeként képesek lehetnek ozmotikus gradiens kialakítására, melyet a folyadékmozgása követ. Hasonlóan a hasnyálmirigy vezetékéhez a könnymirigy vezeték szegmentek végei leformnak egy éjszaka alatt, így egy zsák-szerű struktúrát létrehozva. A szekréciónak a folyamat az intraluminális tér tényleges növekedését eredményezve.

Megmértük a folyadékszekeréciónak rátát a könnymirigy vezetékben Na^+ gradiens hatására, ezáltal karakterizálva a vezeték folyadék permeabilitási képességét.

Megfigyeléseink alapján az izolált vezeték leforrása az epitélium integritásának komplett helyreállítását eredményezi. A kalkulált P_f értéke a könnymirigy vezetéksejteknek $60,53 \mu\text{m/s}$ ($\pm 19,76$), mely elmarad a hasnyálmirigyben ($160\text{-}170 \mu\text{m/s}$), vagy a vese proximális tubulusaiban ($100\text{-}500 \mu\text{m/s}$) mért értékektől, de nagyon hasonló a légutak epitéliumain ($60 \mu\text{m/s}$), kolangiocitákon ($50 \mu\text{m/s}$) és cornea endotéliumon mért ($74 \mu\text{m/s}$) mért értékekhez.

Forskolin stimuláció jelentékeny és folyamatos szekréciónak választ indukált nyúl könnymirigy vezetékben, melyre nem volt hatással a HCO_3^- jelenléte, de gátlódott a bazolaterális Cl^- transzport

folyamatok gátlásával. Ezen észrevétel HCO_3^- független, Cl^- függő szekréción folyamatokat feltételez.

A könnymirigy vezeték kolinerg stimulációja carbachollal gyors, de kisfokú szekréción mutatott. A szekréción kinetikája összefüggésben állhat a carbachol által kiváltott Ca^{2+} szignalizációval a könnymirigy vezetéksejtekben, melyet korábban írt le munkacsoportunk. A carbachol által okozott szekréción teljesen gátlódott, a paraszimpatolitikum atropin hatására, mely a muszkarinos acetilkolin receptorok közreműködését feltételezi.

Eredményeinkből következik, hogy a könnymirigy vezetéksejtek képesek Cl^- függő szekréciónra, mely intracelluláris cAMP és Ca^{2+} kapcsolt útvonalakon mehet végbe. Ezen eredmények alátámasztják a hipotézist, mely szerint a vezetéksejtek aktív szerepet játszanak a könnytermelés során a könny végleges összetételének kialakulásában. A jövőben az ehhez hasonló vizsgálatok jó alapot szolgáltathatnak olyan farmakológiai vizsgálatokhoz, melyek a könnymirigy funkciójának helyreállításához keresnek hatóanyag támadáspontot a száraz szem szindróma terápiájában.

5.2. Epesavak hatásának tanulmányozása hasnyálmirigy duktális epitelsejteken

A hasnyálmirigy gyulladás kórélettana még nem teljesen ismert. Az epesavak bekerülése a hasnyálmirigy vezetékrendszerébe egy lehetséges oka lehet a heveny biliáris hasnyálmirigy gyulladásnak. Ezért az epesavak által okozott hasnyálmirigy károsodás és annak kivédése egy lehetséges terápia lehetőség lehet a jövőben.

Korábbi kísérleteinkből tudjuk, hogy a CDCA nagy koncentrációban súlyosan károsítja a hasnyálmirigy vezetéksejteket. Gátolja azok sav-bázis transzportereinek működését és károsítja a mitokondriális funkciókat mely végső soron elégtelen folyadék és HCO_3^- szekréciónhoz vezethet, hozzájárulva a hasnyálmirigy gyulladás kialakulásához. Az UDCA már jól ismert a kolesztázis terápiájában. Több tanulmány is foglalkozott az epesavak okozta sejtkárosodással szembeni protektív szerepével májsejtekben.

A CDCA és UDCA hatásainak *in vitro* vizsgálatához tengerimalac intra-interlobuláris hasnyálmirigy vezeték szegmenteket használtunk. *In vivo* kísérleteinket patkány modellen végeztük.

Eredményeinkből kitűnik, hogy 24 órás UDCA előkezelés 0,5 mM koncentrációban pozitív hatással volt a CDCA által okozott gátlásra a sav-bázis transzportereken. Eredményeink igazolták, hogy az UDCA nem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ függő útvonalon fejti ki protektív hatását.

Számos tanulmány foglalkozik az epesavak mitokondriális károsodásban játszott szerepével és az UDCA ezzel szemben kifejtett esetleges preventív hatásával. Ezért kísérleteink egy részében a mitokondriális funkciókat vizsgáltuk. A CDCA nagy koncentrációban nyitja a mitokondrium permeabilizációban szerepet játszó pórusokat, depolarizálja a mitokondrium membránját, károsítja annak szerkezetét és ezen keresztül jelentős ATP csökkenést eredményez a sejten belül. Az UDCA előkezelés hatására ezen hatásai a CDCA-nak mérséklődnek. Kisebb mértékű depolarizációt, ATP depléciót és mitokondriális károsodást figyeltünk meg.

Eredményeink megerősítésére *in vivo* modellt használtunk. A tengerimalac anatómiai

sajátosságainak köszönhetően nem volt alkalmas hasnyálmirigy gyulladás modell beállítására, ezért patkány modellt használtunk, ahol már jól ismert és leírt epesav-indukált modellek álltak rendelkezésre. Az állatok egy részét UDCA-val etettük két hétig, majd hasnyálmirigy gyulladást indukáltunk CDCA oldatának pankréász vezetékbe juttatásával. Az előkezelt állatok esetében a gyulladás súlyossága és az elhalt szövet aránya jelentősen csökkent.

A hasnyálmirigy gyulladás lehetséges terápiás célpontjainak kutatásában elengedhetetlen az epesavak okozta sejtkárosodás folyamatainak megértése. Eredményeink megerősítik a korábban tapasztalt és feltételezett központi szerepét a mitokondriális károsodásnak az epesavak által okozott hasnyálmirigy gyulladásban. Az UDCA előkezelés gátolja a CDCA okozta sejtkárosodást és ezáltal a programozott sejthalált a mitokondriális funkciók fenntartásával.

Ezen eredmények alapján elmondható, hogy az UDCA egy lehetséges terápiás eszköz lehet a vezetéksejtek epesavak által okozott károsodásával szemben kifejtett hatásán keresztül a heveny hasnyálmirigy gyulladás gyógyításában, bár ehhez több további vizsgálat szükséges.

6. ÖSSZEGZÉS

6.1. A könnymirigy vezetéksejtek szekréciónak vizsgálata

A tézis első felének **CÉLKITŰZÉSE** a könnymirigy vezetékek ozmotikus permeabilitásának és könnytermelésben betöltött szerepének vizsgálata, az alábbi **MÓDSZEREKKEL**: izolált nyúl könnymirigy vezeték szegmenteken videomikroszkópos technikával, a lumenális tér változásait detektáltuk.

EREDMÉNYEK:

- A könnymirigy vezetékek végei egy éjszakán át tartó inkubációt követően leforrtak
- Meghatároztuk szegmentek filtrációs rátáját a hipotóniás oldatok hatására bekövetkezett lumenális térfogatváltozás alapján
- Forskolin hatására jelentős HCO_3^- független, feltehetően Cl^- függő szekréciónak tapasztaltunk
- Carbachol hatására, alacsony, de gyors folyadékszékreciónak tapasztaltunk mind HCO_3^- jelenlétében, mind annak hiányában.

KONKLÚZIÓKÉNT megállapíthatjuk, hogy

- (i) Sikerült beállítani egy új, a könnymirigy vezetékek szekréciónak vizsgálatát lehetővé tevő módszert
- (ii) A könnymirigy epitelsejtek képesek jelentékeny szekréciónak
- (iii) Forskolin és carbachol hatására a könnymirigy vezetéksejtek HCO_3^- független feltételezhetően Cl^- függő szekréciónak aktivitást mutattak

6.2. Epesavak hatásának tanulmányozása hasnyálmirigy duktális epitélisejteken

Korábbi tanulmányok bizonyították, hogy az epesavak által okozott sejtkárosodás az egyik fő oka lehet a hasnyálmirigy gyulladós megbetegedésének. Májsejtekben az UDCA hatásosnak bizonyult az epesavak által okozott sejtkárosodás kivédésében. Ezért **CÉLKITŰZÉSÜNK** volt az UDCA előkezelés hatásainak vizsgálata a CDCA okozta sejtkárosodással szemben, hasnyálmirigy vezetéksejteken az alábbi **METODIKÁKKAL**:

In vitro kísérleteinkhez tengerimalacból izolált intra-interlobuláris hasnyálmirigy vezeték szegmenteket használtunk. A szegmenteket UDCA-val előkezeltek 5 illetve 24 óráig. Az UDCA előkezelés hatását vizsgáltuk CDCA által kifejtett hatásra az $[Ca^{2+}]_i$, pH_i , ATP_i , $\Delta\Psi_m$, MPTP, mitokondriális morfológia és sejthalál tekintetében. *In vivo* modellel vizsgáltuk az UDCA előkezelés hatását a CDCA indukálta hasnyálmirigy gyulladás súlyosságára.

EREDMÉNYEINK alapján az UDCA előkezelés:

- teljesen kivédte a CDCA által okozott gátlást a sav-bázis transzportereken.
- csökkentette a CDCA okozta $\Delta\Psi_m$ depolarizációt, a mitokondriális károsodás, MPTP nyitást, ATP_i csökkenést és sejthalál mértékét
- kedvező hatással volt a CDCA indukált hasnyálmirigy gyulladás súlyosságára *in vivo* modellben

Melyekből a következő **KÖVETKEZTETÉSEKET** vontuk le:

- (i) Az UDCA előkezelés csökkenti a CDCA által okozott sejtkárosodás mértékét a mitokondriális károsodás csökkentésével és ezen keresztül a programozott sejthalál mértékének csökkentésével
- (ii) Csökkenti a CDCA által indukált hasnyálmirigy gyulladás súlyosságát

Az UDCA protektív hatása a hidrofil epesavak sejtkárosító hatásával szemben egy lehetséges terápiás célpont lehet a biliáris hasnyálmirigy gyulladás kezelésében.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, aki segített és inspirált Ph.D tanulmányaim során. Hálás vagyok **Prof. Dr. Varró Andrásnak**, a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet tanszékvezetőjének, és **Prof. Dr. Ábrahám Györgynek** és **Prof. Dr. Wittmann Tibornak** az I.sz. Belgyógyászati Klinika jelenlegi és volt vezetőjének, akik lehetőséget biztosítottak számomra, hogy a tanszékeiken dolgozhassak.

Szeretném továbbá kifejezni a legmélyebb hűtőmet témavezetőimnek **Dr. Tóth-Molnár Editnek** és **Dr. Venglovecz Viktóriának** a támogatásukért, irányításukért és barátságukért. Az ő széleskörű tudásuk és logikus gondolkodásuk nagy érték volt számomra. Az ő nagyszerű témavezetésük nélkül ez a Ph.D munka nem készülhetett volna el.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Hegyi Péternek** és **Dr. ifj. Rakonczay Zoltánnak** a bizalmukért, hogy lehetőséget biztosítottak kutatómunkám elvégzéséhez a laboratóriumukban és konstruktív tanácsaikkal segítettek azt.

Továbbá szeretném megköszönni kollégáimnak és barátaimnak, **Balla Zsoltnak**, **Dr. Kui Baláznak**, **Dr. Kormányos Eszternek**, **Dr. Laczkó Dorottyanak**, **Dr. Pallagi Petrának**, **Dr. Maléth Józsefnek**, **Dr. Farkas Klaudiának**, **Dr. Balázs Anitának**, **Dr. Geisz Andreának**, **Dr. Schnúr Andreának**, **Dr. Kunstár Évának**, **Dr. Végh Eszter Teréznek**, **Madácsy Tamarának**, **Berczeli Orsolyának**, **Szólik Viviennek** és **Dr. Vizvári Eszternek** a sok segítséget, jókedvet és törődést amit tőlük kaptam. Ez a munka nem jöhetett volna létre kiváló asszisztensek mindenre kiterjedő önzetlen segítsége és nem elhanyagolható módon barátsága nélkül, ezért köszönettel tartozom **Fritz Reának**, **Magyarné Pálfi Editnek**, **Pritz Tündének**, **Árva Miklósnének**, **Fuks Zoltánnének** és **Enyinginé Etusnak**.

Kutatásunkat a Nemzeti Fejlesztési Ügynökség (TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0052; TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0073; TÁMOP-4.2.4.A/2-11-1-2012-0001; TÁMOP- 4.2.4.A2-SZJÖ-TOK-13-0017), MTA-SZTE Lendület Program (LP2014-10/2014) és az OTKA (K109756, NF105785, NF100677) pályázatai támogatták.

Szeretnék külön köszönetet mondani **Rácz Lillának** a sok szeretetért, türelméért és támogatásért a tanulmányaim alatt.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni **szüleimnek**, **Pinke Andreának** és **Katona Lászlónak**, **nővéremnek Katona Nórának** és **az egész családomnak** szeretetüket, támogatásukat, soha el nem fogyó türelmüket, és hogy mindig ott voltak nekem.

Nekik ajánlom ezt a tézist!