

**A duktális folyadéktermelés paraszimpatikus szabályozása  
egér könnymirigyben**

Berczeli Orsolya

Ph.D. Tézis

Klinikai Orvostudományi Doktori Iskola

Témavezető: Tóth-Molnár Edit, M.D., Ph.D.

Szemészeti Klinika,  
Szegei Tudományegyetem,  
Szeged

2020

## **AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK:**

### **Az értekezés alapját képező közlemények:**

1. Novel Insight Into the Role of CFTR in Lacrimal Gland Duct Function in Mice.  
INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY AND VISUAL SCIENCE 2018; 59(1):54-62. (2018)

**Berczeli O**, Vizvari E, Katona M, Torok D, Szalay L, Rarosi F, Nemeth I, Rakonczay Z, Hegyi P, Ding C, Tóth-Monár E.

**IF: 3.388**

2. Characterization of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> Cotransporter Activity in Rabbit Lacrimal Gland Duct Cells.  
INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY AND VISUAL SCIENCE 2016; 57(8): 3828-3835.

Vizvari E, Katona M, Orvos P, **Berczeli O**, Facsko A, Rarosi F, Venglovecz V, Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Ding C, Tóth-Molnár E.

**IF: 3.303**

## 1. BEVEZETÉS

A szemfelszín első védelmi vonalát a külső környezet felé a kötőhártya, a szaruhártya és az azt borító könnyfilm biztosítja. Az elégtelen könnytermelés száraz szem betegséget és potenciális szemfelszíni elváltozásokat okozhat. A könnytermelés túlnyomórészt a könnymirigyben történik, ahol a folyamat számos transzmembrán transzporterrel és ioncsatornával keresztül valósul meg. Ezen struktúrák szerepének tisztázása és a könnymirigy fiziológiájának és patofiziológiájának részletesebb megértése a száraz szem betegség hatékonyabb kezelését eredményezheti. A könnymirigy egy tubuloacináris exokrin mirigy, melyet nagyrészt három sejttípus, az acináris, a duktális és a mioepiteliális sejt alkot. Az acináris sejtek adják a mirigy sejteinek 80%-át. A duktális sejtek a sejttömeg kb. 15%-át teszik ki, alkotva a duktális rendszert. A könnymirigy innervációjában mind a paraszimpatikus, mind a szimpatikus idegrendszer szerepet játszik. A könnytermelést befolyásoló legjelentősebb paraszimpatikus neurotranszmitterek az acetilkolin és a vazóaktív intesztinális peptid (VIP).

Az acinus sejtek funkciójáról lényegesen több adat áll rendelkezésre a potenciálisan szekretáló funkcióval is bíró duktusz sejtekkel szemben. 1972-ben Alexander és munkatársai vetették fel a duktális rendszer könnytermelésben betöltött esetleges szerepét. Feltételezésük szerint a könny két lépésben termelődik: az acinusok által termelt elsődleges plazma-szerű folyadék a duktális lumenen való áthaladáskor módosul. Az elsődleges szekréció  $K^+$  és  $Cl^-$  összetételének esetleges duktális módosítását 1981-ben Dartt és munkatársai is leírták, bár ekkor még a könnymirigy duktális epitélium szekréciós funkciója nem volt ismert.

Az első, könnymirigy duktusz funkcionális vizsgálatára alkalmas kísérletes modellt munkacsoportunk dolgozta ki. Módszerünkkel először vált lehetővé a könnymirigy duktusz szegmensek funkcionális vizsgálata. Az alkalmazott videomikroszkópos technikával csoportunk bizonyította a könnymirigy duktális szegmensek folyadékszékrecióját és így a könnytermelésben betöltött aktív szerepét.

Bár korábbi publikációk leírják a paraszimpatikus idegek által felszabadított VIP szerepét az acinus sejtek fehérjeszekreciójában, hatása a könnymirigy duktuszok folyadéktermelésére ismeretlen volt. A VIP-receptor interakció aktiválja a  $G_s\alpha$  G fehérjét, majd az adenil cikláz stimulációján keresztül megemeli az intracelluláris cAMP szintet. A cAMP aktiválja a protein kináz A (PKA)-t számos célfehérjék foszforilálását eredményezve. Az intracelluláris cAMP szintet emelő hormonok és neurotranszmitterek a fenti mechanizmuson keresztül stimulálhatják a cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia

regulator (CFTR) ioncsatorna működését is. Korábbi igazoltuk, hogy a citoszolikus cAMP szintet növelő ágensek jelentős folyadékszekréciós választ váltottak ki. Ezek az eredmények egyértelműen felvetették a cAMP által aktiválható CFTR szerepét a dukális folyadékszekrécióban. A cisztás fibrózisban szenvedő betegeknél tapasztalható, változó súlyosságú száraz szem betegségre vonatkozó klinikai adatok tovább erősítették a CFTR könnytermelésben betöltött szerepével kapcsolatos feltételezéseket. Nyúlón és patkányon végzett génexpressziós vizsgálatok eredményei szerint a CFTR dominánsan fejeződik ki a könnymirigy dukális sejtjeiben. Mindezek alapján a CFTR legfőbb szerepe a könnymirigyben az anion transzport szabályozása lehet a dukális epitelsejtek apikális membráján. Kísérleteinkben a CFTR könnymirigy működésben betöltött szerepének direkt vizsgálatát a CFTR-t nem expresszáló (CFTR KO) transzgenikus egérmodell tette lehetővé.

## **2. CÉLKITŰZÉSEK**

A könnymirigy a szemfelszínt borító könnyfilm elsődleges termelője. A könnysekreációs folyamatok domináns szabályozói a paraszimpatikus idegek neurotranszmitterei, az acetilkolin és a VIP. Bár korábbi publikációk beszámolnak a kolinerg és VIP receptorok jelenlétéről a könnymirigy sejtjeiben, a paraszimpatikus rendszer dukális folyadéktermelésre kifejtett hatása egyelőre teljesen ismeretlen. Ezért munkánk során célul tűztük ki a paraszimpatomimetikus hatású carbachol és VIP egér könnymirigy duktusokra gyakorolt hatásának vizsgálatát.

A CFTR rendkívül fontos szerepet játszik a folyadékot szekretáló epitelsejtek transzmembrán klorid-ion transzportjában. Más exokrin mirigyekben egyre több bizonyíték áll rendelkezésre a VIP hatásának és a CFTR működésének összefüggéseiről. Munkánk során célul tűztük ki a CFTR és a paraszimpatikus szabályozás összefüggéseinek vizsgálatát egér könnymirigy vezetéksejteken.

Kísérleteink célja a következő volt:

- A kolinerg stimuláció folyadéktermelésére kifejtett hatásának vizsgálata vad típusú (WT) és CFTR KO egerekből izolált könnymirigy duktusokon.
- A VIP stimuláció hatására bekövetkező folyadékszekréció vizsgálata izolált WT és CFTR KO duktus szegmenseken.

- A  $\text{Ca}^{2+}$  szint intracelluláris változásainak vizsgálata carbachol és VIP stimuláció során WT és CFTR KO duktuszokon.

### **3. MÓDSZEREK**

#### **Kísérleti állatok**

A kísérleteket felnőtt WT és CFTR KO egértörzsek könnymirigyéből izolált duktuszokon végeztük. Az összes állatkísérletet az ARVO Állatok Szemészeti Kutatásban történő felhasználásáról szóló irányelveinek betartásával végeztük. Az Európai Parlament 2010/63 / EU irányelvének megfelelő vizsgálati protokollt a Szegedi Tudományegyetem Állattenyésztési Kutatóintézetének etikai bizottsága jóváhagyta.

#### **Hematoxylin & eosin (H&E) festés és immunofluoreszcencia**

A WT és CFTR KO egértörzsek könnymirigyéből izolált duktuszokat fixálást követően metszettük, majd hematoxillin-eozin festést végeztünk. A fagyasztást és rehidrációt ismételt fixálás követte. Az immunfluoreszcencia vizsgálatok céljára az elsődleges antitestekkel egyéjszakás, majd a másodlagos antitestekkel 1 órás inkubálást végeztünk.

#### **Könnymirigy duktuszok izolálása és kultúrában tartása**

A könnymirigy szövetdarabokból sztereo mikroszkóp alatt inter-, és intralobuláris duktuszokat izoláltunk, majd azokat egy éjszakán át Petri csészébe helyezve 37C-on 5% CO<sub>2</sub> atmoszférában inkubáltuk.

#### **Könnymirigy duktuszok folyadékszekréciójának mérése**

A duktuszok folyadékszekréciójának vizsgálatát videómikroszkópos módszerrel végeztük. Az interlobuláris duktuszok zárt intraluminális terébe történő folyadékszekréciója a lumen tere videómikroszkóppal detektálható növekedését eredményezte. A szekréció mértékének meghatározása a volumenváltozásból történt.

#### **Intracelluláris Ca<sup>2+</sup> szint ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) mérése**

A duktuszokat Ca<sup>2+</sup> érzékeny, fluoreszkáló FURA 2AM festékkel töltöttük fel és az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> értéket egy képalkotó rendszerrel mértük. Egy adott mérési területen belül 5-10 sejtet 340 és 380 nm-en gerjesztettünk, majd a fluoreszcencia emissziós rátát 510 nm-en mértük. Másodpercenként egy [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> szint mérés történt.

## **Statisztikai analízis**

A dukális folyadékszekréció mennyiségének meghatározásához vegyes ANOVA modellt használtunk. A könny szekréció elemzésére Dunn-módszerrel végzett Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk. Az adatok elemzéséhez SPSS 22 statisztikai szoftvert használtunk. A 0.05-nél kisebb p értéket tekintettük szignifikánsnak.

## **4. EREDMÉNYEK**

### **WT és CFTR KO állatok könnymirigyének H&E festése**

A WT és CFTR KO állatok könnymirigyének morfológiai eltéréseit H&E festéssel vizsgáltuk 8-10 és 20-24 hetes állatok könnymirigyéből készült metszeteken. A könnymirigyekben egyik életkorban sem tapasztaltunk struktúrális eltéréseket egyik állatcsoport (WT és CFTR KO) esetében sem.

### **Immunfluoreszcens festés**

A VPAC1, VPAC2 receptorok és a CFTR lokalizációjának vizsgálatára immunfluoreszcens festést alkalmaztunk. Eredményeink a CFTR fehérje kifejeződését jellemzően a könnymirigy dukális sejtek apikális membránjában igazolták, bár az acinus sejtek citoplazmájában is észleltünk némi festődést. A várákosoknak megfelelően a CFTR fehérjét nem lehetett kimutatni a CFTR KO állatok könnymirigyében. A VPAC1 receptor dominánsan a dukális sejtekben lokalizálódik, de erőteljes mozaik-mintázatban (nem minden duktus szakaszban). A WT és CFTR KO egerekből származó metszetek festődése között nem tapasztaltunk különbséget. A VPAC2 receptor lokalizációját erős festődés igazolta nem csak a dukális, de az acináris sejtek bazolaterális felszínén is mind WT, mind CFTR KO minták esetén.

### **Kolinerg stimuláció hatása izolált könnymirigy duktusok folyadékszekréciójára**

A CFTR kolinerg-indukált folyadékszekrécióban betöltött szerepének felderítésére a muszkarin-agonista carbachol hatását vizsgáltuk WT és CFTR KO duktusokon, HEPES és  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  pufferelt-oldatban. A duktusok izolálása 14-24 hetes állatokból történt. A carbachol stimuláció első 4-5 percében gyors szekréció volt megfigyelhető, amelyet egy lassabb fázis követ a HEPES pufferban végzett kísérletek során. A szekréciós ráták között nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget WT és CFTR KO állatból izolált minták esetén.  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -pufferelt körülmények között elvégeztük ugyanezen kísérleteket. Hasonlóan a HEPES-pufferelt mérésekhez, az első 4-5 percben gyors, majd lassabb szekréciót tapasztaltunk mind a WT mind a CFTR KO duktusok esetében.  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -pufferelt

oldatban sem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a WT és a CFTR KO duktuszok között a carbachol-indukálta folyadékszekréció mérésekor. Összefoglalva, a carbachol hasonló mértékben stimulálta a WT és CFTR KO egerekből izolált duktuszok folyadékszekrécióját mind HEPES, mind  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -pufferelt oldatban. A szekréciós ráta értékek között nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget sem a különböző eredetű duktuszok (WT és CFTR KO), sem a különböző pufferek között.

### **Izolált könnymirigy duktuszok VIP-indukált folyadékszekréciója**

A VIP folyadékszekrécióra gyakorolt hatását WT és CFTR KO egerekből származó duktuszokon is vizsgáltuk. Ezek a mérések kizárólag  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -pufferelt oldatban történtek. Ennek okai részben a korábbi kísérletek (HEPES és  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -pufferelt mérések) során tapasztalt egyező eredmények, részben pedig a VIP-stimulálta folyadékszekréciós mérések során tapasztalt nehézségek voltak. Ezekben a mérésekben az izolált duktuszok jelentős része nem reagált a stimuláló szerre. Ez a megfigyelés összhangban áll a duktusok immunfluoreszcens vizsgálata során tapasztaltakkal, ahol a VPAC1 receptorok mozaik-szerű expresszióját tapasztaltuk. A VIP stimuláció hatására erős és folyamatos szekréciós választ tapasztaltunk WT állatból izolált könnymirigy duktuszokon. Ezzel ellentétben a CFTR KO egerekből származó duktuszoknál gyenge, pulzus-szerű szekréciót tapasztaltunk, amit a mérés során plató-jellegű fázis követett.

### **Carbachol és VIP-indukálta $\text{Ca}^{2+}$ szignalizáció vizsgálata izolált könnymirigy duktuszokon**

Az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szint carbachol hatására bekövetkező változásait és esetleges eltéréseit szintén WT és CFTR KO egerekből izolált duktuszokon vizsgáltuk. Az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szint dóziszfüggő emelkedését tapasztaltuk mind WT, mind CFTR KO duktális sejtek esetében. Ezekben a kísérletekben nem tapasztaltunk különbséget a WT és CFTR KO duktuszok között. A VIP stimuláció hatására bekövetkező  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szint változásokat szintén WT és CFTR KO duktusz szakaszokon vizsgáltuk. A VIP stimuláció kisebb mértékű, de szignifikáns  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szint emelkedést váltott ki mind a WT, mind a CFTR KO egerekből izolált duktális sejtekben. Ezekben a kísérletekben a kolinerg agonista carbacholt pozitív kontrollként használtuk.



## 5. MEGBESZÉLÉS

A száraz szem betegség a leggyakoribb szemészeti kórkép, mely világszerte emberek millióit érinti. A betegség kezelése többnyire a tünetek enyhítésére irányul a jelenleg még elérhetetlen oki terápia helyett. A könnymirigy által termelt folyadék megfelelő mennyiségű és kiegyensúlyozott elektrolit, fehérje és mucin összetétele elengedhetetlen a megfelelő preokuláris könnyfilm réteg fenntartásához. A könnymirigy működésének megértése és részletes feltárása elengedhetetlen a száraz szem betegség kezelésére alkalmas új farmakológiai megoldások kidolgozásához. Jelenleg a széleskörűen tanulmányozott acinus sejtekről rendelkezésre álló információ mennyiséghez képest meglehetősen szegényes a duktális sejtekről rendelkezésre álló ismeretanyag. Laboratóriumunkban világelsőként dolgoztunk ki egy olyan modellrendszert, amelynek segítségével lehetővé vált a könnymirigy duktuszok funkcionális tanulmányozása, új lehetőségeket nyitva ezzel a könnymirigy kutatásban. Munkánk a könnymirigy duktuszok könnysekreációs folyamatban betöltött szerepének vizsgálatára irányult az izolált duktusz modell felhasználásával. Bár a duktális epitelsejtek szekréciója egyértelmű szerepet játszik a könnytermelésben, a könnymirigy duktuszok működésének szabályozásáról nagyon keveset tudunk. A könnymirigy duktális szekrécióra a szimpatikus és paraszimpatikus rendszer is hatást gyakorol. Az anatómiailag és funkcionálisan is domináns paraszimpatikus idegek a szekretált neurotranszmitter alapján két csoportra oszthatók. A kolinerg idegvégződések kolinerg agonista acetilkolint, a VIP-erg idegvégződések VIP-et választanak ki. Mindkét neurotranszmitternek jelentős hatása van a könnymirigy folyadékszekréciójára. A paraszimpatikus idegrendszer könnysekreációs szerepének vizsgálatára irányuló kísérletek korábban kizárólag intakt könnymirigyen vagy acinuson zajlottak. Munkánk során a kolinerg és VIP-erg stimuláció direkt hatását vizsgáltuk izolált könnymirigy duktusz szegmenseken és felderítettük a CFTR klorid-ion csatorna és a paraszimpatikus szabályozó rendszer közti kapcsolatot. A a CFTR-t kódoló génszakaszban hibát hordozó transzgenikus egérmodell, lehetővé tette az ioncsatorna folyadékszekrécióban betöltött szerepének vizsgálatát és a hiányzó CFTR fehérje által okozott potenciális morfológiai eltérések felderítését. A WT és CFTR KO egerek könnymirigyében jelentkező esetleges morfológiai eltérések elemzéséhez hisztológiai vizsgálatokat végeztünk. A H&E festés eredményeként nem tapasztaltunk strukturális különbséget sem a duktuszok, sem acinusok esetén WT és CFTR KO állatokból származó, azonos korcsoportú minták között. Ezek az eredmények jól demonstrálják, hogy a betegség kialakulásában a funkcionális eltérések már a morfológiai elváltozások előtt jelentkezhetnek. A CFTR KO állatok rövid várható élettartama miatt a betegség késői stádiumában kialakuló morfológiai eltérések vizsgálata nem volt kivitelezhető, ennek felderítésére további kísérletek szükségesek.

A VPAC1 és VPAC2 receptorok, továbbá a CFTR fehérje jelenlétének és lokalizációjának bizonyítására immunfluoreszcens festést végeztünk. A WT állatokból származó metszetek esetében intenzív CFTR festődést tapasztaltunk, jellemzően a könnymirigy duktális sejtek apikális membránján. Emellett sokkal gyengébb, diffúz festődést tapasztaltunk az acinus sejtek citoplazmájában. Az általunk kapott eredmények bizonyítják a CFTR domináns jelenlétét a könnymirigy duktuszok sejtjeiben és jelzik a CFTR fontos, a pankreaszhoz hasonló duktusz-specifikus szerepét. A vártnak megfelelően, a CFTR KO egerekből származó metszeteken nem kaptunk CFTR festődést.

A VPAC1 és VPAC2 receptorok jelenlétét és lokalizációját szintén WT és CFTR KO állatok könnymirigyéből származó metszeteken vizsgáltuk. Vizsgálataink során jelentős különbséget tapasztalunk a két receptor szöveten belüli eloszlásában. A VPAC1 receptor jellemzően a duktális sejtekben lokalizálódik, a festődési mintázatot meghatározó mozaikos eloszlásban. A VPAC2 receptor homogén eloszlást mutatott a könnymirigy szövet különböző sejtjeiben. Mindkét receptor jellemzően a könnymirigy szövet sejtjeinek bazolaterális felszínén lokalizálódott. A CFTR fehérje hiánya nem befolyásolta a VPAC1 és VPAC2 receptorok expresszióját, nem tapasztaltunk különbséget a WT és CFTR KO minták között.

A paraszimpatikus neurotranszmitterek folyadékszécrécióra gyakorolt hatását videomikroszkópos módszerrel vizsgáltuk. A kolinerg agonista carbachol (100  $\mu$ M) kétfázisú folyadékszécréciós választ idézett elő: az első 5 percben gyors szekréciót, majd egy platószerű fázist hozva létre. Hasonló eredményeket kaptunk CFTR KO egerekből származó izolált duktuszokon végzett kísérletekben is. Ez utóbbi eredmény a kolinerg szekréciós mechanizmus aktív CFTR fehérjétől való függetlenségét bizonyítja. VIP (100nM) stimuláció hatására erős és folyamatos folyadékszécréciót tapasztaltunk WT állatokból származó izolált duktuszok esetében. Ezzel ellentétben, a CFTR KO egerekből származó duktuszok gyenge, pulzus-szerű szekréciót mutattak, amit egy plató fázis követett. A CFTR KO duktuszoknál tapasztalható csökkent VIP-indukálta válasz a CFTR fehérje hiányára vezethető vissza a következő módon: a VIP receptorok stimulációja az adenil-cikláz révén megnöveli az intracelluláris cAMP szintet, és közvetve fokozza a CFTR aktivitását. A VIP-stimulálta folyadékszécréció mögött ilyen módon jelentős részben a CFTR működése állhat. A CFTR KO duktuszon tapasztalt gyenge VIP-indukálta szekréciós válasz jelentős mértékben alátámasztja ezt a magyarázatot.

A paraszimpatikus stimuláció  $Ca^{2+}$  homeosztázisra gyakorolt hatását a CFTR fehérje esetleges szerepét a folyamatban szintén vizsgáltuk. A  $[Ca^{2+}]_i$  változásait mikrofluorometriás módszerrel mértük. A carbachol WT és CFTR KO sejtek esetén is az  $[Ca^{2+}]_i$  dóziszfüggő emelkedését indukálta. A carbachol hatására bekövetkező  $[Ca^{2+}]_i$  szint változásban nem

tapasztaltunk szignifikáns különbséget WT és CFTR KO duktuszok esetén. A CFTR KO duktuszokon tapasztalt változatlan carbachol-indukálta  $[Ca^{2+}]_i$  szint emelkedés a változatlan carbachol-indukálta szekréciós válasszal együtt a  $Ca^{2+}$  szignalizáció meghatározó vagy kizárólagos szerepét valószínűsíti a kolinerg stimulációban és kizárja a CFTR lehetséges befolyását. A VIP sem kizárólag az adenil cikláz-cAMP rendszeren keresztül hat: bizonyítja ezt a kis mértékű  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedés is, mely összhangban van a CFTR KO duktuszokban kimutatható kismértékű, de egyértelmű szekréciós válasszal. A VIP indukálta  $[Ca^{2+}]_i$  szint emelkedés szintén független a CFTR receptor jelenlététől. Mindemellett a VIP stimulálta  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedés jelentősen gyengébb a carbachol hatásához képest.

Az immunfestés, folyadékszékreciós és  $[Ca^{2+}]_i$  kísérleteink eredményeképp két, részben független paraszimpatikus szabályozó útvonalat feltételezhetünk. Összegezve, a carbachol stimuláció kizárólag a  $[Ca^{2+}]_i$  szint emelésén keresztül fejt ki hatását és nem érinti az adenil cikláz-cAMP-CFTR mechanizmust, azaz a cAMP által aktivált CFTR nem vesz részt a carbachol stimulálta folyadékszékrecióban. VIP stimuláció hatására az  $[Ca^{2+}]_i$  szintnek csak kisfokú és azonos mértékű emelkedését tapasztaltuk mind WT, mind CFTR KO duktuszokban. Ugyanakkor a folyadékszékreciós válasz nagyban különbözött a WT és CFTR KO duktuszokban: a CFTR KO duktuszokban mért szekréciós ráta jelentősen elmaradt a WT duktuszok értékeitől. Ezek az adatok az adenil cikláz-cAMP útvonal meghatározó szerepét valószínűsítik a könnymirigy duktuszok VIP stimulálta folyadékszékreciójában. Eredményeink összhangban vannak a korábbi megfigyelésekkel, melyek szerint a VIP nagyobb részt a cAMP-n keresztül fejt ki hatását, és csak kisebb részben befolyásolja az intracelluláris  $Ca^{2+}$  szignalizációt. A funkcionálisan aktív CFTR hiánya befolyásolja a VIP-indukálta folyadékszékreciós választ könnymirigy duktuszokban, ami befolyással lehet akár a könnymirigy teljes folyadékszékreciójára. A CFTR receptor defektusai szignifikánsan veszélyeztethetik a könnymirigy duktuszok  $Cl^-$  és víz szekrecióját, egyúttal a CFTR fontos célpont lehet a száraz szem betegség oki farmakoterápiájának kidolgozásában.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

A bemutatott eredmények összefoglalásaként elmondható, hogy kísérleteink újabb bizonyítékot nyújtanak a vezetéksejtek szekréciós szerepéről. Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a VIP receptorok és a CFTR funkcionálisan jelen vannak az egér könnymirigy duktális sejtjeiben. A CFTR protein a duktális sejtek apikális, a VPAC1 és VPAC2 pedig a bazolaterális membránján lokalizáltak. A folyadékszékreciós kísérletek funkcionális

bizonyítékot szolgáltatottak a könnymirigy duktuszok paraszimpatikus szabályozásának jelentőségéről. Igazoltuk a carbachol és VIP hatására bekövetkező  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedést és a  $Ca^{2+}$  jelátviteli útvonal változatlanosságát a CFTR fehérje hiányában is. Ezek az eredmények szélesebb körű betekintést engednek a VIP könnymirigy működésben betöltött szerepébe és bizonyítják a VIP stimuláció és a CFTR közötti kapcsolatot. További vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy a CFTR működésének befolyásolása lehet-e célpontja a könnymirigy szekréció fokozásának, és ezáltal szerepet játszhat-e a száraz szem kezelésében.

**Az értekezésben a könnymirigy duktuszok funkciójával kapcsolatban bemutatott új eredmények a következők:**

- 1. A CFTR könnymirigyben való jelenlétét vizsgálva megállapítottuk, hogy a CFTR protein elsősorban a duktuszok apikális membránjában található meg, jelenléte az acinusokban nem jelentős.**
- 2. A VPAC1 receptorok elsősorban a duktális, míg a VPAC2 receptorok mind a duktális, mind az acinális sejtek bazolaterális membránján kifejeződnek.**
- 3. A könnymirigy kutatásban először és egyedülálló módon CFTR KO egértörzsön vizsgáltuk a paraszimpatikus szabályozás hatását a duktális folyamatokra, illetve a CFTR szerepét a paraszimpatikus szekréciós működésben.**
- 4. Az általunk korábban kifejlesztett eljárással izolált könnymirigy duktusz modellen, videómikroszkópos technikákkal vizsgáltuk a WT és CFTR KO egerek könnymirigyének folyadékszékrecióját. Jelentős folyadékszékreciós választ tapasztaltunk mind carbachol, mind VIP stimuláció hatására.**
- 5. A CFTR KO egerek duktuszain megfigyelt, carbachol stimuláció hatására történő jelentős és változatlan szekréciós válaszból a kolinerg szabályozás alatt álló szekréciós folyamatok aktív CFTR jelenlététől való függetlenségére következtettünk.**
- 6. A CFTR VIP-indukálta szekrécióban betöltött döntő szerepét bizonyította, hogy aktív CFTR hiányában csak minimális VIP-indukálta folyadékszékreciót tapasztaltunk.**
- 7. A WT és KO duktuszoknál egyaránt tapasztalt  $[Ca^{2+}]_i$  szint emelkedés az  $[Ca^{2+}]_i$  homeosztázis funkcionálisan aktív CFTR-tól való függetlenségét jelzi.**

## 7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, aki segített és inspirált Ph.D. tanulmányaim során.

Mindenekelőtt, szeretném kifejezni legmélyebb hálámat témavezetőmnek, **Dr. Tóth-Molnár Editnek**, a Szemészeti Klinika tanszékvezetőjének a támogatásáért és iránymutatásáért. Az ő tudása, hozzáállása és tanácsai inspiráltak és segítettek munkám során.

Hálás vagyok **Prof. dr. Varró Andrásnak**, a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet korábbi tanszékvezetőjének, **Prof. dr. Hegyi Péternek** és **Prof. dr. ifj. Rakonczay Zoltánnak**, akik lehetőséget biztosítottak kutatómunkám elvégzéséhez a laboratóriumukban.

Továbbá szeretném megköszönni kollégáimnak és barátaimnak, **Fanczal Júliának**, **Dr. Katona Máténak**, **Dr. Vízvári Eszternek**, **Szarka Dórának** és a **Gasztroenterológiai Multidiszciplináris Kutatócsoport minden tagjának** a sok segítséget, jókedvet és törődést, amit tőlük kaptam.

Különösen hálás vagyok kisfiamnak, **Borics-Berczeli Farkasnak** és férjemnek **Dr. Borics Attilának** a sok szeretetért, türelemért és támogatásért a tanulmányaim alatt.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni édesanyámnak, **Kovács Ágnesnek**, testvéremnek, **Berczeli Ákosnak** és az egész családomnak szeretetüket, támogatásukat, soha el nem fogyó türelmüket, és hogy mindig ott voltak nekem.

Nekik ajánlom ezt a tézist!