

A hasnyálmirigy duktális epitél sejtek HCO₃⁻ szekréciójának vizsgálata organoid sejt kultúrában

Ph.D. Tézis



Molnár Réka

Témavezető: **Dr. Maléth József Ph.D**

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

I.sz. Belgyógyászati Klinika

Szegedi Tudományegyetem

Szeged, Magyarország

2020

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés alapját képező közlemények:

- I. **Molnár R**, Madácsy T, Varga Á, Németh M, Katona X, Görög M, Molnár B, Fanczal J, Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Pallagi P, Maléth J., Mouse pancreatic ductal organoid culture as a relevant model to study exocrine pancreatic ion secretion. Lab Invest. 2020 Jan; doi: 10.1038/s41374-019-0300-3 [IF₂₀₁₈: 3.684]
- II. Fanczal J, Pallagi P, Görög M, Diszházi G, Almássy J, Madácsy T, Varga Á, Csernay-Biró P, Katona X, Tóth E, **Molnár R**, Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Maléth J. TRPM2-mediated extracellular Ca²⁺ entry promotes acinar cell necrosis in biliary acute pancreatitis. J Physiol. 2020 Jan 9; doi: 10.1113/JP279047 [IF₂₀₁₈: 4.95]

Az értekezés alapját nem képező egyéb közlemények:

- I. Tuboly E*, **Molnár R***, Tőkés T, Turányi RN, Hartmann P, Mészáros AT, Strifler G, Földesi I, Siska A, Szabó A, Mohácsi Á, Szabó G, Boros M. Excessive alcohol consumption induces methane production in humans and rats. Sci Rep. 2017 Aug 4; doi: 10.1038/s41598-017-07637-3. [IF₂₀₁₈: 4.122]
- II. Varga G, Ugocsai M, Hartmann P, Lajkó N, **Molnár R**, Szűcs S, Jász DK, Érces D, Ghyczy M, Tóth G, Boros M. Acetylsalicylic acid-tris-hydroxymethyl-aminomethane reduces colon mucosal damage without causing gastric side effects in a rat model of colitis. Inflammopharmacology. 2018 Feb; doi: 10.1007/s10787-017-0354-z. [IF₂₀₁₈: 3.838]
- III. Béla Kovács, **Réka Molnár**, Előd Ernő Nagy, Éva Katalin Kelemen, Blanka Székely-Szentmiklósi, István Székely-Szentmiklósi, Boglárka Kovács-Deák and Árpád Gyéresi. Development and Validation of an UV-Spectrophotometric Method for the Assay of Strontium Ranelate and HPLC Stability Testing from Bulk and Pharmaceutical Dosage Form. Acta Medica Marisiensis 2019; doi: 10.2478/amma-2019-0014 [IF₂₀₁₈: 0.21]

Közlemények száma: 5 (2 első szerző)

Összesített impakt faktor: 16.80

1. BEVEZETÉS

A hasnyálmirigy a máj és a patkóbél kezdeti szakaszával van összeköttetésben, elválasztását tekintve felosztható exokrin és endokrin részekre. Az exokrin hasnyálmirigyet két fő sejttípus alkotja: acinus és duktális sejtekre. A két sejttípus egy faágszerű formára emlékeztető szerkezet, melynek végén az acinusok helyezkednek el lobulusokba rendeződve. Az acinus sejtek felelnek a hasnyálmirigy emésztőenzimek elválasztásáért. A hasnyálmirigy duktális rendszere három részre osztható: fő, interlobuláris és intralobuláris duktuszokra. A hasnyálmirigy duktális epitél sejtek szekretin stimulus hatására bikarbonátban gazdag nedvet szekretálnak, a mechanizmus szerepe kettős; az acinusok által termelt enzimekben gazdag emésztőnedvek duktális rendszerből való kimosása és a duodénumba érkező savas gyomornedv semlegesítése. Az alkalikus HCO_3^- szekréciója emberek esetében kiemelkedően magas; a duktális rendszer proximális részeiben 20mM körüli érték, míg a disztális részben akár 140mM-os koncentrációjú is lehet. Egér és patkány esetében ez az érték mindössze ~50-70mM.

1.1. A duktális HCO_3^- szekréció

A bikarbonátionok sejten belüli kétféle módon akumulálódhatnak: $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ kotranszporterrel (NBCe1-B) keresztül, vagy a CO_2 sejtbe történő passzív diffúziójával, ahol a szénsav-anhidráz szénsavvá alakítja, majd hidrolízis révén HCO_3^- és H^+ -ra bomlik a citoszolban. A proton a bazolaterális oldalon elhelyezkedő, Na^+/H^+ kicserélőn (NHE) keresztül távozik a sejtől, a HCO_3^- pedig a lumenbe szekretálódik. NBCe1-B és az NHE is nátrium-dependens működésűek, melyek az intracelluláris pH egyensúlyát tartják fent bikarbonát felvétel és proton leadás révén. Az apikális oldalon elhelyezkedő transzporterek és csatornák közel 140mM HCO_3^- szekretálnak a lumenbe, mely a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kicserélőn (SLC26 transzporter család tagja) és a cisztás fibrózis konduktancia regulátor (CFTR) csatornán keresztül jut ki. Korábban a CFTR csatornát kizárólag Cl^- szekretáló csatornának tekintették, mely a lumen Cl^- koncentrációját biztosította a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kicserélő számára, napjainkban viszont általánosan elfogadott a bikarbonát szekrécióban betöltött szerepe.

1.2. A hasnyálmirigy duktális HCO_3^- szekréciójának kórélettani szerepe

Korábban munkacsoportunk már vizsgálta a bikarbonát szekrécióban bekövetkezett változásokat különböző patológiás heveny hasnyálmirigy gyulladással modellekben, mint az epesav eredetű vagy az alkohol indukálta hasnyálmirigy gyulladás. Venglovecz és munkatársai

kimutatták, hogy a nem-konjugált epesav, a kenodezoxikólsav, dózisfüggő módon hat az epitél sejtek HCO_3^- szekréciójára, alacsony koncentráció esetében ($100\mu\text{M}$) stimulálta, míg magasabb koncentráció esetében (1mM) gátolt volt az apikális kiválasztás. A mechanizmus tartós intracelluláris Ca^{2+} túlterhelést és mitokondriális károsodást eredményezett, ami az intracelluláris ATP kimerüléséhez vezetett. A túlzott alkoholfogyasztás az esetek közel 30-40%-ban felelős a heveny hasnyálmirigy gyulladás kialakulásáért. Az alkohol nem oxidatív metabolitjai, mint a zsírsavak és zsírsav etil észterek, hasonló intracelluláris változásokat indukálnak a duktális epitél sejtekben, mint az epesav. A folyamat során tartós Ca^{2+} túlterhelés alakul ki sejten belül, ami csakugyan ATP kimerüléshez, nekrozishoz és gátolt apikális HCO_3^- szekrécióhoz vezet. Mindemellett az etanol lecsökkenti a CFTR csatorna mRNS expresszióját, ami szintén a bikarbonát szekréció csökkenésével jár. A hasnyálmirigy gyulladás kialakulásának folyamata és a HCO_3^- szekrécióban bekövetkezett változások megértése kulcsfontosságúak a jövőbeni terápiás lehetőségek szempontjából.

1.3. Az *in vitro* és *in vivo* modellek határai

A hasnyálmirigy modellezéséhez 2D sejt kultúrákat hoztak létre hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekből, mint a CFPAC-1, Capan-1 és Capan-2. A humán cisztás fibrózis sejt vonal lehetővé teszi a CFTR csatorna hibáiból fakadó HCO_3^- szekrécióban bekövetkezett kóros változások tanulmányozását. Habár ezek a sejt vonalak hasznosak a duktális epitél sejtek élettani és kórfolyamatainak tanulmányozására, egészen eltérő morfológiai jelleget mutatnak a primer sejtekkel szemben. A hasnyálmirigy sejt vonalak egyik legnagyobb hátránya, hogy a sejtek elvesztik a polaritásukat és nem alakul ki közöttük szoros sejtkapcsolat, továbbá más jelleget mutat a funkcionális fehérjék expressziója. A hasnyálmirigy duktális sejtek közismert izolálási technikája kiváló lehetőséget nyújt a primer duktális sejtek vizsgálatára, mind élettani, mind kóros körülmények között. Az izolált sejteken *in vitro* lehet tanulmányozni a forskolin indukálta hízást, a fluoreszcens pH változáson keresztül a HCO_3^- szekrécióját és gátlószerek segítségével egyes fehérjék működését. Bár az állatmodellek fiziológiáson közelebb állnak a humán sejtekhez, a fajspecifikus génszabályozások közötti különbségek óriási hátrányt jelentenek az emberi betegségek tanulmányozásához. Mindemellett a megfelelő állatmodellek előállítása rendkívül időigényes, általában 6-12 hónapot vesz igénybe, ezért rendkívül korlátozott az alkalmazhatóságuk. Ebből kifolyólag a jelenlegi hasnyálmirigy kutatások korlátjainak leküzdéséhez szükség van egy megfelelő modellre, mely az élettani, kóréletteni, és hatóanyag tesztelés szempontból is relevánsabb a 2D sejt kultúrákkal és az állat modellekkel szemben. A

gasztrointesztinális kutatások új modelljei, az organoidok, megfelelnek ezeknek a követelményeknek, és ez a modell egy fontos híd az *in vitro* és az *in vivo* állat- vagy emberi modell között.

1.4. Organoid sejt kultúra

Organoid sejt kultúrák létrehozhatók embrionális őssejtekből, indukált pluripotens őssejtekből, vagy szövetspecifikus leucinban gazdag, ismétlődő tartalmú G-protein-kapcsolt receptor 5+ (LGR5+) felnőtt őssejtekből. A szövetspecifikus Lgr5+ felnőtt őssejtekből származó organoid kultúrák a közelmúltban jelentek meg a szöveti struktúra és a betegségek új modelljeként. A Wnt/ β -Catenin szignáltranszdukciós kaszkád aktiválásával az organoid kultúrát *in vitro* hosszú távon lehet növeszteni 3D extracelluláris mátrix alapú hidrogélekben; mivel a tenyészet epitél sejtjei fenntartják az eredeti sejt folyamatokat és önszerveződők. Az organoid sejt kultúrák egyértelműen előnyösek a hagyományos 2D-sejttenyészetekkel szemben, mivel relevánsabb a sejtek közötti kapcsolat, mivel a 2D-s tenyészetekben a sejtek a műanyag felülethez kapcsolódnak, kapcsolatuk pedig az élekre korlátozódik. A hasnyálmirigy kutatásban az organoidokat jelenleg a szöveti fejlődés és a karcinogenezis releváns humán modelljeként alkalmazzák. A korábban említett primer szöveteken történő tanulmányok korlátait a hasnyálmirigy organoid sejt kultúrák alkalmazásával át lehet lépni, mind fiziológiai, mind patológiai vizsgálatok esetében, habár a hasnyálmirigy organoid sejt kultúrák fiziológiai tulajdonságai jelenleg nem ismertek.

2. CÉLKITŰZÉS

A tanulmányunk céljai:

- egér hasnyálmirigy duktális sejtjeiből duktális epitél organoid sejt kultúra létrehozása
- a hasnyálmirigy duktális epitél organoidok morfológiájának és működésének összehasonlítása izolált hasnyálmirigy duktális primer szövetekkel szemben
- az epesav hasnyálmirigy duktális organoidokra gyakorolt hatásának jellemzése és a Ca^{2+} felszabadulás vizsgálata TRPM2 knock-out (KO) duktális fragmentekben a vad típushoz (VT) képest

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok és etikai engedély

10-12 hetes FVB/N egereket használtunk a hasnyálmirigy duktális organoid sejt kultúra létrehozásához és a primer szövetel történő morfológiai és funkcionális összehasonlításához. TRPM2 knock-out (KO) egereket nagylelkűen Yasuo Mori, a Kiotói Egyetemről (Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering) biztosította. Az egereket az NIH irányelv és a 2010/63 / EU irányelv tiszteletben tartása mellett használtuk tudományos célokra. A tanulmányt az Állatkísérletek Országos Tudományos Etikai Testület az FVB/N egerekhez XXI./2522/2018 engedélyszámmal, a TRPM2 KO egerekhez XXI./2523/2018 engedélyszámmal fogadta el.

3.2. A hasnyálmirigy duktális fragmentek és acinus sejtek izolálása

Duktális fragmentek. Az FVB/N, a VT és a TRPM2 KO egerek feláldozásához terminális érzéstelenítést használtunk és a hasnyálmirigy szövetet 100 U/ml kollagenázzal, 0,1 mg/ml tripszin inhibitorral és 1 mg/ml borjú szérum albuminnal emésztettük DMEM-ben, 37°C-on 30 percig. A kis intra-/interlobuláris duktuszokat sztereomikroszkóp alatt mikrodisszekcióval izoláltuk, és ugyanazon a napon használtuk a mérésekhez.

Acinus sejtek. Az egerek feláldozásához terminális érzéstelenítést alkalmaztunk, majd a hasnyálmirigy szövetet apró darabokra vágtuk jég hideg HBSS oldatban. Az acinus izolálásához a hasnyálmirigy darabokat 10 ml jég hideg HBSS és 10mM Hapest tartalmazó oldatban emésztettük 200 U/ml kollagenázzal 25-30 percig 37°C-on.

3.3. A hasnyálmirigy duktális organoid sejt kultúra létrehozása

A hasnyálmirigy organoid sejt kultúrák létrehozásához 8-12 hetes FVB/N egereket (20-25 g testtömeg) használtunk. A duktális fragmenteket a fent leírtak szerint izoláltuk, és Matrigelben növesztettük 2 ml komplex organoid tápoldattal, 35 mm-es petri csészében. Az organoidokat 7 naponta passzáltuk.

3.4. Kondicionált organoid médium előállítása 2D sejt kultúrákkal

A WNT kondicionált médiumot L-Wnt-3A expresszáló sejtekkel állítottuk elő, melyet az ATCC-től vásároltunk meg (CRL-2647), az R-Spondin kondicionált médium előállításához a

Cultrex HA-R-Spondin1-Fc 293T sejtvonalat alkalmaztuk a Trevigentől és a Noggin termelő sejtvonaltól Hans Clevers-től (Hubrecht Institute, Utrecht, The Netherlands) kaptuk ajándékba.

3.5. *Génexpresszió*

Az organoid és a primer szöveti mRNS expresszió vizsgálata reverz-transzkripció polimeráz-láncreakció (RT-PCR) és általános polimeráz-láncreakció (PCR) technika alkalmazásával kivitelezte. Teljes mRNS izolálás 3 független biológiai szövetből történt: egér agy, egér duktális fragment és egér duktális organoid.

3.6. *Fluoreszcens mérések*

A hasnyálmirigy duktális fragmentek vagy organoidok poly-l-lizinnel bevont fedőlemezre lettek kitapasztva és standard HEPES oldatban voltak inkubálva BCECF-AM (1.5 μ mol/L), Fura-2-AM (5 μ mol/L), vagy MQAE (2 μ mol/L) fluoreszcens festékekkel 30 percig. A poly-l-lizines fedőlemezeket perfúziós kamrákba tettük és a változásokat Olympus IX71 invert mikroszkóppal detektáltuk. Az organoidok konfokális pH méréseihez SNARF-, vagy SNARF-1 dextrán fluoreszcens festékeket használtuk, az organoidokat poly-l-lizines fedőlemezre helyeztük, majd standard HEPES oldatban SNARF-1 (10 μ mol/L) festékekkel inkubáltuk 30 percig. SNARF-1 dextránt üvegpipettával injektáltuk az organoidok lumenjébe. A mérések Zeiss LSM880 konfokális mikroszkóppal történtek.

3.7. *Immunfluoreszcens festés*

Az izolált hasnyálmirigy fragmenteket és organoidokat Shandon Cryomatrixba ágyazva fagyasztottuk, majd cryostat (Leica CM 1860 UV) segítségével metszettük. A szeleteket 4% PFA-PBS fixáltuk, majd 1x TBS (Tris puffer sóoldat) oldattal mostuk. Az antigén feltárásához Tween20 puffert tartalmazó nátrium-citrát oldatot használtunk. Az elsődleges antitesttel a szeleteket overnight 4°C-on inkubáltuk. A másodlagos antitesttel szobahőmérsékleten történt az inkubálás. A sejtmagfestéshez 1 μ g/ml Hoechst33342 festéket alkalmaztunk. A képeket Zeiss LSM880 konfokális mikroszkóppal készítettük.

3.8. *Elektronmikroszkóp*

Minta előkészítése. Az izolált hasnyálmirigy duktális fragmenteket és organoidokat az első passzálás után 3%-os glutáraldehidben fixáltuk szobahőmérsékleten, és 0,3M-os kakodilát-pufferben mostuk. A mintákat a kontraszt eléréséhez 3% kálium-ferrocianidban és 2% ozmium-tetroxidban inkubáltuk. A minta dehidratálását 20%, 50%, 70%, 96% és abszolút etanollal végeztük. Az infiltrációhoz Epon 812 gyantát használtunk a gyártó utasításainak megfelelően.

Metszés és képképzés. A metszés előtt indium-ón-oxiddal bevont üvegeket helyeztünk a Quorum szén bevonóba (Quorum Q150R ES Plus, Quorum Tech) a negatív töltés kialakulásához. A blokkokból 100 nm-es szeleteket vágunk 0.8 mm/mp sebességgel. Az utólagos kontrasztot 5% uranyl-acetáttal és Reynolds-oldattal végeztük. A metszeteket szénrel bevontuk, és Zeiss Sigma 300 pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM) készítettük a képeket.

3.9. Adatelemzés

A statisztikai elemzést a GraphPad Prism szoftverrel végeztük. Az adatok eloszlását Shapiro-Wilk normalitás teszttel vizsgáltuk. Mind a parametrikus varianciaanalízis egyirányú elemzése (ANOVA), mind a nem parametrikus (Mann Whitney teszt, Kruskal Wallis teszt) tesztek használtunk az adat eloszlás normalitása alapján. A 0,05-nél kisebb p értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Egér eredetű duktális epitel organoid sejt kultúra létrehozása

Egér eredetű hasnyálmirigy-duktális fragmentekből 3D epitel organoid sejt kultúrákat (OC) hoztunk létre Matrigel cseppekben, majd optimalizáltuk protokollunk. Miután az OC-k az első hét végére elérték maximális méretüket, mechanikai úton szétzúztuk és passzáltuk őket. A passzázs eredményeként egyedi sejteket és kisméretű klasztereket kaptunk, melyeket újból Matrigelbe ágyaztunk. Az első passzázzsal eltávolítottuk az izolált duktális fragmentek bazolaterális oldalát borító kötőszövetet és fibroblasztokat, amivel tisztán epitel sejtekből álló OC-kat kaptunk.

4.2. Ioncsatornák és iontranszporterek mRNS expressziós mintázata OC-ban és duktális fragmentekben

Hogy bebizonyítsuk, az OC-k alkalmas modellek a pankreasz dukális szekréció tanulmányozására, megvizsgáltuk az OC-ban és dukális fragmentekben az ioncsatornák és iontranszporterek mRNA expressziós mintázatát. Az izolált duktusok és az organoidok mRNA expresszióját 30 és 35 PCR ciklus futtatása után vizsgáltuk. Mivel 35 ciklus után magasabb intenzitásértékeket kaptunk, a kiértékeléshez ezeket használtuk. Az Slc26a6, a CFTR, NHE1 és NBCe1 mind izolált dukális fragmentekben, mind organoid sejt kultúrákban kifejeződött. Sikerült továbbá bizonyítani a non-gasztrális H^+/K^+ ATPase, a Ca^{2+} -aktiválta K^+ csatorna (BK csatorna), az Slc26a3 Cl^- /anion kicserélő és a bazolaterális $Na^+/K^+/Cl^-$ szimporter (NKCC) kifejeződését is. Mivel a K^+ -csatornák kifejeződése a pankreasz dukális epitéliumban fajspecifikus és igen vitatott, kiválasztottunk négy, pankreasz dukális epitéliumban még leíratlan feszültségaktivált K^+ -csatornát (Kcna1, Kcna2, Kcnd3 és Kcnh1), hogy további szempontok alapján hasonlíthassuk össze az izolált elsődleges szövetet és a pankreasz dukális organoidokat. A kettő közötti hasonlóságot tovább erősíti, hogy a K^+ -csatorna család négy választott tagja mind kifejeződött izolált dukális fragmentben és OC-ban is. Ezek mellett sikerült mindkét mintában kimutatni az EnaC epiteliális nátrium csatornát, az Anoctamin1 Ca^{2+} -aktivált Cl^- -csatornát (ANO1, vagy TMEM16A) és két feszültségfüggő Cl^- -csatornát (Clcn1, Clcn3).

4.3. Az apikális HCO_3^- szekréció hasnyálmirigy dukális sejtekben és organoidokban

Mivel a dukális epitél sejtek elsődleges szerepe az ion (különösen a HCO_3^-) és fluid szekréció, így funkcionális vizsgálatainkat a hagyományos beállított fluoreszcens technikán alapuló intracelluláris pH (pH_i) mérésekkel kezdtük. A fluoreszcens mérésekhez BCECF-AM fluoreszcens indikátort használtunk az ion transzporterek aktivitásának méréshez primer szövetekben és organoid sejt kultúrákon. Elsőként az organoidokat és a dukális fragmenteket 20mM NH_4Cl standard HEPES oldattal perfundáltuk. Ennek eredményeként az pH_i jelentősen megemelkedett, mely az ammónia sejtmembránon történő gyors diffúzójának eredménye. A sejten belül megemelkedett ammónia koncentráció eltolja a sav-bázis egyensúlyt alkalikus irányba a protonok hiánya és a túltermelt HCO_3^- által. Miután az extracelluláris és intracelluláris ammónia koncentrációja kiegyenlítődik, a sejtek a keletkezett HCO_3^- szekréciójával kezdik visszaállítani az intracelluláris pH-t. Ezt a fázist alkalózisból történő regenerációnak nevezik. Az alkalózisból történő regeneráció során a HCO_3^- az intracelluláris térből az extracellulárisba transzportálódik a CFTR csatorna és SLC26A (3 és 6) anion kicserélő által. Az ammónia eltávolítása gyors sejten belüli acidózist okoz a sejtekből kilépő ammónia által hátrahagyott

protonok hirtelen növekedése miatt. Az acidózisból történő regenerációhoz a bazolaterális Na^+/H^+ antiporterek (NHE) eltávolítják a protonokat az intracelluláris térből, ami megnöveli a pH-t. A HCO_3^- szekréció további vizsgálataihoz bazolaterálisan 20mM NH_4Cl in $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -pufferelt oldatot alkalmaztunk. Hasonlóan az előző kísérletekhez, a pH_i azonnal megemelkedett a sejtmembránon át az intracelluláris térbe belépő ammónia ionoknak köszönhetően, melyet szintén egy lassú alkalózisból történő regenerációs fázis követett. Az NH_4Cl eltávolítását követően a pH_i gyors csökkenését figyeltük meg, majd a beállt a nyugalmi pH. Az acidózisból történő regenerációs fázis a bazolaterális NHE1 aktivitásától függ, de HCO_3^- tartalmú oldat jelenlétében a pH növelésében a bazolaterális $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ kotranszporter (NBCe1) is részt vesz, az extracelluláris HCO_3^- intracelluláris térbe történő felvétele révén. Az alkalózisból és az acidózisból történő regeneráció számszerűsítéséhez a regenerációs szakasz első 30 másodperc alatt bekövetkezett pH változását vettük ($\Delta\text{pH}/\Delta t$), és az alap fluxust [$\text{J}(\text{B}^-)$] Maléth és munkatársai 2015. leírása szerint számítottuk ki. Ezzel a megközelítéssel nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget az organoidok és az izolált duktális fragmentek között. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az apikális $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kicserélő aktivitása és a bazolaterális HCO_3^- felvétel közel megegyezik a két modellben. A CFTR csatorna aktivitását és a HCO_3^- szekréciójának mértékét a CFTR csatorna gátláson alapuló módszerrel határoztuk meg. Organoidokban és izolált primer duktális sejteken az alkalózisból történő regeneráció során a CFTR csatorna működését specifikus $10\mu\text{M}$ CFTR_(inh)-172 inhibitorral blokkoltuk NH_4Cl pulzus alatt $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ puffer oldatban történő perfundálása során. Az apikális Cl^- függő HCO_3^- szekréció mindkét modellben lecsökkent a kontrol csoporthoz képest.

4.4. CFTR aktivitásának közvetett mérése hasnyálmirigy OC-ban fluoreszcens Cl^- indikátor alkalmazásával

Ebben a kísérletsorozatban Cl^- érzékeny fluoreszcens intracelluláris indikátort alkalmaztunk az intracelluláris Cl^- koncentráció méréséhez [Cl^-]_i. Az MQAE fluoreszcens szignált a Cl^- ionok jelenléte csökkenti, míg növekedése a Cl^- ionok távozását jelenti az intracelluláris térből. Az extracelluláris Cl^- eltávolítása a $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ pufferelt oldatból a [Cl^-]_i csökkenését eredményezte, mely valószínűleg a CFTR csatornán keresztül a citoszolból kiáramló Cl^- következtében jött létre. Ezt a [Cl^-]_i csökkenést forskolin adásával szignifikánsan sikerült növelni. Mindemelllett, $10\mu\text{M}$ CFTR_(inh)-172 inhibitor adása során a Cl^- szekréciót sikerült majdnem teljesen sikerült meggátolni, míg protein kináz A (PKA) inhibitor H-89 adása kontrol

szintre javította a Cl^- effluxot. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a mért Cl^- -áramlás a CFTR csatornán keresztül valósult meg. Ezek az eredmények összhangban vannak a CFTR aktivitásról és szabályozásról szóló jelenlegi ismereteinkkel, így ez a technika hatékony eszköze lehet a CFTR aktivitást 3D kultúrákban tanulmányozó kutatók számára. Ezt a technikát alkalmaztuk az NKCC aktivitásának vizsgálatára is, szintén organoidokban és izolált duktális fragmenteken is. Az NKCC1 inhibitoraként alkalmazott $100\mu\text{M}$ Bumetanide adását követően lecsökkent a $[\text{Cl}^-]_i$ az organoidokban és a duktális fragmentekben is, mely az NKCC1 függő bazolaterális Cl^- felvételére utal.

4.5. A bazolaterális HCO_3^- -felvétel összehasonlítása izolált duktális fragmentekben és hasnyálmirigy organoidokban

A bazolaterális Na^+ -függő HCO_3^- felvétel aktivitásának organoidokban és duktális fragmentekben történő összehasonlításához a már korábban leírt NH_4Cl pulzus technikát alkalmaztuk, Na^+ mentes $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -pufferelt oldat perfundálásával. A kísérlet során az acidózisból történő regeneráció majdnem teljesen megszűnt, mely megerősíti az extracelluláris Na^+ jelenlététől függő folyamatot és az NHE1 és NBCe1 Na^+ függő szerepét ebben a fázisban. Az egyes transzporterek hozzájárulásának részletesebb jellemzésére egy másik protokollt és az NHE1 és NBCe1 specifikus inhibitorait alkalmaztuk. Ezen kísérletsorozat során a standard HEPES oldatot $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -pufferelt oldatra váltottuk, ami gyors pH_i csökkenést váltott ki a CO_2 sejtbe történő beáramlása és a sejtben intracelluláris szénsavvá történő átalakulása, valamint a szénsav HCO_3^- és H^+ -disszociációja miatt. Az extracelluláris Na^+ koncentráció visszaadásával az NHE1 és az NBCe1 a pH_i -t nyugalmi pH szintre állítja be. Mint ahogy az egyes kísérletek átlagos görbéi, a $\Delta(\text{pH}_i)_{\text{max}}$ és a számolt alap fluxus is mutatja, mindkét modellben hasonló sejtválasz alakult ki az NHE1 ($10\mu\text{M}$ EIPA) és NBCe1 ($10\mu\text{M}$ S0859) inhibitoros kezelése hatására. Organoidok és duktális fragmentek esetében is az NHE1 gátlása nagyobb csökkenést eredményezett a számolt alap fluxusban (79.01% OC-ban and 70.62% duktuszban) az NBCe1 gátláshoz képest (60.82% OC-ban and 53.32% duktuszban). Az NHE1 és az NBCe1 együttes gátlása nem csökkentette tovább a bazolaterális Na^+ -függő HCO_3^- felvételt.

4.6. Intraluminális pH mérés hasnyálmirigy organoidokban

A hasnyálmirigy duktális epitél sejtek HCO_3^- szekréciója meghatározza a hasnyálmirigy intraluminális pH-ját, ezért az intraluminális pH valós idejű változásának követése érdekében új fluoreszcens technikát dolgoztunk ki. Első lépésben a SNARF-1 fluoreszcens festék használatával optimalizáltuk a pH mérést, amelynek kereskedelmi forgalomban kapható dextrán-konjugált változata alkalmas extracelluláris pH mérésre. Az organoidokat első körben SNARF-1 festékkel töltöttük és 20mM NH_4Cl standard HEPES vagy $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ pufferelt oldattal perfundáltuk, mely a korábban alkalmazott BCECF-hez hasonló pH_i változást eredményezett. Az alkalózisból történő regeneráció a $\text{CFTR}_{(\text{inh})}$ -172 inhibitor gátolta. Ezután az SNARF1-dextránt mikropipetta segítségével injektáltuk az organoidokba, és az NH_4Cl beadása során rögzítettük az intraluminális pH változását. Az NH_4Cl HEPES adását követően az intraluminális pH mérsékelt növekedését figyeltük meg, mely az NH_3 organoid lumenbe történő diffúziójának tulajdonítható. Ezzel szemben az NH_4Cl $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -pufferelt oldat perfundálása gyors és markáns növekedést eredményezett az intraluminális pH változásban a HCO_3^- lumenbe történő kiáramlásának köszönhetően. Ezt az emelkedést teljesen gátolta a $10\mu\text{M}$ $\text{CFTR}_{(\text{inh})}$ -172, ami arra utal, hogy a CFTR ebben a folyamatban fontos szerepet játszik.

4.7. A hasnyálmirigy duktális sejtjeinek morfológiai és funkcionális polaritása

Összehasonlítani kívántuk a sejtek morfológiáját pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM), mindkét modell, az izolált duktális fragmentek és az organoidok duktális sejtjei is polaritás struktúrát eredményezett. Továbbá az organoidokban található epitél sejtek polarizált egysoros sejtréteget képeztek, míg az izolált duktális fragmentekben több kötőszövetréteg figyelhető meg, melyek kollagén rostokat és fibroblasztokat tartalmaznak. Nagyobb nagyítású SEM képeken megfigyelhető a sejtek polaritása mindkét modellben, az apikális membránban kirajzolódik a kefeszegély, a mitokondriumok intracelluláris eloszlása hasonló apikális övszerű mintázatot mutatott. A funkcionális polaritás meghatározásához immunfluoreszcens festést alkalmaztunk a primer duktális fragmenteken és organoidokon. A konfokális felvételek alapján az NHE1 és az NBCe1 bazolaterális membránban, míg a CFTR kizárólag az apikális membránban fejeződött ki. Ezek az eredmények megerősítették az OC-k morfológiai és funkcionális polaritását.

4.8. Hasnyálmirigy organoidok alkalmazása kórélettani vizsgálatokban

Mivel az organoid sejt kultúrák patológiás folyamatainak vizsgálatára is alkalmasak, ezért összehasonlítani kívántuk a nem-konjugált epesav - kenodezoxi kólsav (CDC) - által kiváltott patofiziológiás Ca^{2+} szignalizációt, mely tartós Ca^{2+} szintemelkedést eredményez a duktális sejtekben. A Ca^{2+} felszabadulás magasabb volt az organoidokban a duktális fragmentekhez képest, mely a kötőszövet hiányának valószínűsíthető, ezáltal az epesav könnyebben és magasabb koncentrációban hozzáfér az organoidok egysoros epitél rétegéhez. Ezek az eredmények az organoidok patofiziológiás vizsgálatok alkalmazhatóságára világítanak rá. Korábbi vizsgálataink hasnyálmirigy acinus sejteken kimutatták, hogy a TRPM2, mely egy nem-szelektív kation csatorna fontos szerepet játszik az epesav indukálta patogenezisben. Ennek duktális epitél sejteken történő tanulmányozásához elsőként az epesav által kiváltott intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedését vizsgáltuk vad típusú (VT) és knock-out (KO) duktális fragmenteken. Az acinus sejtekkel szemben nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a $250\mu\text{M}$ CDC kiváltott Ca^{2+} szignalizációban a VT és a KO duktális epitél sejtek között. Az eredmények alapján a TRPM2 nem játszik szerepet az epesav által kiváltott duktális sejt károsodásban. Ahhoz, hogy megállapítsuk a TRPM2 szerepét az epesav okozta Ca^{2+} emelkedést acinus és duktális sejtekben, az intracelluláris reaktív oxigéngyökök (ROS) felszabadulását mértük H2DCFDA használatával. Az eredmények emelkedett ROS termelést mutattak $250\mu\text{M}$ CDC kezelés hatására a hasnyálmirigy acinus sejtekben, míg duktális epitél sejtekben szignifikánsan alacsonyabb volt (13.6 ± 2 vs 33.4 ± 4 tetszőleges egység). Ez a megfigyelés adhat magyarázatot arra, hogy duktális sejtek esetében a TRPM2 csatorna hiánya nem rendelkezik protektív hatással az epesav által kiváltott tartósan emelkedett Ca^{2+} esetében. Ezek alapján nem vizsgáltunk tovább részleteiben organoid sejt kultúrákon.

5. MEGBESZÉLÉS

A közelmúltban kifejlesztett organoid sejt kultúrák (OC-ék) ígéretes *ex vivo* modellek a szövetek kialakulásának, fiziológiájának és patofiziológiájának tanulmányozására. Noha egyre több kutatásban használnak fel organoidokat, korlátozott kísérleti adat áll rendelkezésre fiziológiás alkalmasságukról, különösen a pankreasz eredetű organoidok esetében. Ebből kifolyólag célunk az volt, hogy génexpresszió, morfológia és sejtfunkció alapján párhuzamosan összehasonlítsuk egymással az izolált pankreasz duktális fragmentumokból származó primer epitél sejteket és a 3D organoid kultúra sejtjeit. Ehhez első lépésként megvizsgáltuk az ioncsatornákat transzporter fehérjéket kódoló gének expresszióját izolált duktuszban és OC-ben. A vizsgált gének kifejeződését mind egér eredetű primer duktális fragmentumokban, mind OC-ben sikeresen

igazoltuk. Az *Atp12a* (non-gasztrális H^+/K^+ ATPáz kódoló gén), a *Kcnma1* (BK csatornát kódoló gén), az *Slc26a3* és az *Nkcc1* expressziójában szintén átfedést találtunk. Azt találtuk továbbá, hogy a feszültségaktivált káliumcsatorna-alsó család vizsgált négy tagja (*Kcna1*, *Kcna2*, *Kcnd3* és *Kcnh1*) is expresszálódik pankreasz epitel sejtekben, amiről pedig korábbi információ nem állt rendelkezésre. Emellett elsőként mutattuk ki két feszültségaktivált Cl^- -csatorna (*Clcn1* és *Clcn3*) kifejeződését is. Eredményeink alapján az *Enac* és az *Ano1* csatorna is kifejeződik mind izolált primer duktális fragmentekben, mind pankreasz OC-ben. Az apikális HCO_3^- -szekréció és a bazolaterális HCO_3^- -felvétel méréseinek eredményei rendkívül hasonlóak voltak izolált duktuszban és OC-ben. Igen hasonlóak voltak továbbá az NHE1 és az NKCC1 mediálta iontranszport folyamatok is. A Ca^{2+} -szignalizációnak, a pankreasz duktális epitel sejtek egyik fő szignáltranszdukciós útvonalának a karakterisztikája is hasonló volt az izolált primer szövetben és OC-ben, ami tovább erősíti a kettő egymásnak való megfeleltethetőségét. Korábbi kísérletekben kimutatták, hogy emésztőenzimek exocitózisa során párhuzamosan protonok is felszabadulnak, ezzel intraluminális acidózist idézve elő. A lumenáris pH mérésére kifejlesztettünk egy technikát, melyben egy dextránnal konjugált pH-érzékeny fluoreszcens festék, a SNARF1 használatával követtük nyomon az organoidok lumenében bekövetkező pH-változásokat. A technika használatával képesek voltunk mérni az NH_4Cl okozta pH-emelkedést, amit a CFTR gátlása teljes egészében blokkolt. A CFTR-függő ion- és fluidszekréció mérésének egyik korszerű módszere a forskolin-indukálta hízás (FIS) mérése. A FIS egy viszonylag egyszerű és biztos technika, amely jól használható a különböző cisztás fibrózis kezelésekre adott válaszok vizsgálatára, ugyanakkor lehetnek potenciális korlátai. Vad típusú pankreasz organoidok FIS hatására viszonylag gyorsan szétrepednek, ezért a Cl^- -áramok nyomon követésére a relatív lumenáris térfogat mérése helyett egy $[Cl^-]_i$ -szenzitív fluoreszcens indikátorfestéket használtunk. E technikával nyert eredményeink az irodalmi adatokkal megegyeznek: a fluoreszcens jel emelkedését a forskolin szignifikánsan növelte, a CFTR vagy a PKA gátlása pedig csökkentette. A módszer hasznos eszköze lehet a pankreaszfiziológia kutatásának és az exokrin pankreaszfunkciók javítására irányuló gyógyszervizsgálatoknak. Tanulmányunkban az izolált duktális fragmentek és az organoidok morfológiáját is összehasonlítottuk, különös hangsúlyt fektetve az apikális-bazális polaritásra. A két mintában található epitel sejtek mikroszerkezete semmilyen jelentős különbséget nem mutatott. Az OC sejtek felépítése – mitokondriumok apikális sűrűsödése, kefeszegély az apikális membránon – hasonló a primer duktális epitel sejtekéhez. Az ioncsatornák és transzporter fehérjék eloszlása is hasonló mintázatot mutatott organoidok és izolált duktuszok keresztirányú metszeteiben. Az

aktuális irodalomnak megfelelően a CFTR kizárólag az apikális membránban, míg az NHE1 és NBCe1 a bazolaterális membránban expresszálódott.

Eredményeink összességében teljes génexpressziós és morfológiai átfedést mutattak ki az izolált duktális fragmentumok és pankreasz OC-k között. OC-k alkalmazása esetén biztosak lehetünk bene, hogy eredményeink egy primer epitél monolayer-ből származnak, nem pedig heterogén szöveti fragmensekből. Fentebb leírt eredményeink alapján tehát a 3D pankreasz duktális organoid sejt kultúra alkalmas modell a duktális epitél sejtek morfológiai és fiziológiai vizsgálatára.

A hasnyálmirigy-kutatás egy másik fontos területe az akut pankreatitisz (AP) patofiziológiájának vizsgálata. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy pankreasz duktális- és acinussejtekben az epesavak képesek tartós intracelluláris Ca^{2+} -szint növekedést kiváltani, intracelluláris- és intramitokondriális ROS termelést indukálni és károsítani a mitokondriális hálózatot. Acinus sejtekben az epesavak IP_3 aktiváción és a rianodin-receptorokon keresztül dóziszfüggő intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedést váltanak ki. Duktális sejtekben a CDC dóziszfüggő módon emeli az intracelluláris Ca^{2+} -szintet és gátolja a HCO_3^- -szekréción. Annak megállapítására, hogy a pankreasz OC használható-e patofiziológiás folyamatok tanulmányozására, összehasonlítottuk a CDC-re adott Ca^{2+} -szignalizációs választ OC-ben és izolált duktális fragmentumokban, a válasz pedig mindkét esetben tartós Ca^{2+} -szint emelkedés volt. Az OC-ben tapasztalt emelkedés nagyobb volt a duktális fragmentumokban tapasztaltnál. Ez valószínűleg a külső kötőszövetburok hiányának tudható be, ami lehetővé teszi, hogy az OC-ben a CDC nagyobb koncentrációban jusson el az epitél sejtekhez. Patofiziológiás vizsgálataink eredményei alapján az organoidok alkalmasak kórfolyamatok tanulmányozásában történő felhasználásra is. Pankreasz acinus sejteken végzett kísérleteink alapján a TRPM2 redox-szenzitív, nem-szelektív kation csatorna fontos szerepet játszik az epesav-indukált sejt károsodás patogenezisében (nem része e tézisnek). A kísérletek során a CDC növelte az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt mind acinus-, mind duktális sejtekben. A TRPM2 genetikai deléciónja képes volt mérsékelni a CDC-re adott Ca^{2+} -választ, de csakis acinus sejtekben. E tanulmány kimutatta, hogy a TRPM2 csatorna ~22%-ban járul hozzá az epesav-indukált Ca^{2+} -szignalizációhoz acinus sejtekben. A folyamat duktális epitél sejtekben történő tanulmányozásához összehasonlítottuk az epesav indukálta Ca^{2+} -szint emelkedést vad típusú (WT) és TRPM2 knock-out (KO) duktusokban. Ellentétben az acinus sejtekkel, a WT és TRPM2 KO duktális fragmentumok 250 μM CDC-re adott Ca^{2+} -válaszában nem volt kimutatható szignifikáns különbség, amiből arra következtetünk, hogy duktális sejtekben a

TRPM2 nem játszik szerepet az epesav-indukált sejtkárosodásban. Eredményeink arra is rávilágítottak, hogy az epesavak hatására bekövetkező intracelluláris ROS képződés jelentősen különbözik acinus- és duktális sejtekben, ami magyarázatot adhat a TRPM2 Ca^{2+} -válaszban betöltött szerepének különbségeire is.

Összefoglalásul elmondható, hogy alapos elemzést követően bebizonyítottuk, a pankreasz duktális eredetű organoid sejt kultúrák epitél sejtjei jelentős mértékben megegyeznek a primer duktális epitél sejtekkel. Eredményeink igazolták, hogy az organoid sejt kultúra egy korszerű, jól reprodukálható és nagy áteresztőképességű *ex vivo* modellrendszere lehet a hasnyálmirigy-kutatásnak, és hasznos eszköze a fiziológiás és patológiás szekréciós folyamatok tanulmányozásának.

6. AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- Az organoidokat alkotó epitél sejtek polárisak és egyrétegűek
- Az organoid sejt kultúra és az izolált duktális primer szövet ultrastruktúrájukban hasonlóságot mutat
- Az ioncsatornák és a fehérjék génexpressziója és eloszlása átfedésben van az organoid kultúrákban és az izolált duktális fragmentekben
- Az iontranszport folyamatok aktivitása az organoid kultúrákban a duktális primer szövethez hasonló
- Az intraluminális pH változás nyomon követésére a SNARF-1-dextrán kiválóan alkalmazható organoid sejt kultúrákban
- Az epesavak tartós Ca^{2+} -emelkedést váltanak ki az organoid sejt kultúrákban és az izolált duktális fragmentekben

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt, szeretnék mindenkinek köszönetet mondani, aki segített és támogatott a PhD tanulmányaim alatt. Elsőként szeretném kifejezni hálámat és nagyra értékelésemet témavezetőmnek, **Dr. Maléth Józsefnek**, segítségével és támogatásával jelen értekezés nem valósulhatott volna meg. Őszinte hálámat szeretném kifejezni **Prof. Dr. Hegyi Péternek** a Pécsi Tudományegyetem Transzlációs Orvostudományi Intézetének elnökének a támogatásáért és a lehetőségért, hogy a színvonalas kutatócsoportjának tagja lehettem.

Szeretnék köszönetet mondani **Prof. Dr. Lengyel Csabának** és **Dr. Ábrahám Györgynek**, a Szegedi Tudományegyetem Orvostudományi Tanszékének jelenlegi és volt vezetőjének, valamint **Dr. Varró Andrásnak** és **Dr. Baczkó Istvánnak** (az Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Tanszékének korábbi és jelenlegi vezetője), akik lehetőséget adtak számomra, hogy az intézményeikben dolgozhassak.

Szeretném kifejezni hálámat **Dr. Pallagi Petrának** és **Prof. Rakonczay Zoltánnak** a közös együttműködésért és a tudományos tanácsaikért, külön köszönet illeti **Dr. Venglovecz Viktóriát** a tanulmányaim alatt nyújtott segítségéért.

Szeretném kifejezni őszinte köszönetemet minden munkatársamnak és barátomnak: **Ancsányi Kitti, Dr. Balla Zsolt, Bálint Emese Réka, Dr. Becskeházi Eszter, Dr. Csernay-Bíró Péter, Dr. Demeter-Haludka Vivien, Déri Szilvia, Dobai Klaudia, Ébert Attila, Fűr Gabriella, Gál Eleonóra, Gyömbér Zsuzsanna, Görög Marietta, Dr. Grassalkovich Anna, Katona Xénia, Kelemen Evelyn, Koncz Balázs, Dr. Kormányos Eszter, Lőrincz Anett, Madácsy Tamara, Molnár Brigitta, Miskolczi Gottfried, Németh Margit, Dr. Pigniczki Daniella, Dr. Szentesi Andrea, Tóth Dávid, Dr. Tóth Emese, Varga Árpád.**

Ez a köszönetnyilvánítás nem lenne teljes a labor asszisztencia említése nélkül, szeretném megköszönni minden labor asszisztens munkatárs lelkiismeretes munkáját és segítségét: **Pritz Tünde, Árva Miklósné, Fritz Rea, Tóth Zsolt, Szabó Nikoletta, Magyaré Pálfi Edit és †Fuksz Zoltánné Erzsébet.**

Köszönetemet fejezem ki az **Elméleti Orvostudományi Doktori Iskolának**, amiért engedélyezte a kutatásom. Köszönet illeti azon irodai dolgozókat, akik türelemmel segítettek a PhD munkám és tézisének elkészítése során.

Meg kell említenem őszinte elismerésemet és tiszteletemet **Dr. Boros Mihály Professzor Úrnak**, aki meggyőzően közvetítette a kaland szellemét a kutatás kapcsán, és arra ösztönzött, hogy belépjek a tudományos terület vérkeringésébe. Ezért köszönet illeti még: **Dr. Kaszaki Józsefet, Dr. Tókécs Tündét, Dr. Hartman Petrát, Dr. Tuboly Esztert, Dr. Varga Gabriellát, Dr. Mészáros Tamás Andrást és Dr. Szűcs Szilárdot** a sok közös tudományos munkáért és hasznos tanácsokért. Külön köszönet a Szegedi Sebészeti és Műtéttani Intézet minden tagjának.

Az elsők között szeretnék köszönetet mondani páromnak, **Ébert Attilának** szakmai és általános támogatásáért, amiért széles körű tudásával és kreativitásával megmutatta, hogy minden megoldható.

Végül a legnagyobb elismerés a családomé. Szívemből köszönettel tartozom szüleimnek, **Molnár Józsefnek** és **Lak Évának**, húgaimnak, **Molnár Brigittának** és **Molnár Dórának** és férjének **Dr. Szalai Bencének** minden türelmükért, segítségükért és szeretetükért, valamint azért, hogy hittek bennem és minden körülmények között mellettem álltak. Soha nem szűntek meg támogatni, ezért ezt a tézist nekik szentelem.

Köszönet minden barátnak!