

FONTOS TERÁPIÁS CÉLPONTOK AZ AKUT PANKREÁTITISZBEN

Ph.D. Tézis



Tóth Emese

Témavezetők:

Prof. Hegyi Péter M.D., Ph.D., D.Sc., MAE^{1,2,3}

Maléth József M.D., Ph.D.^{2,4}

¹ Momentum Transzlációs Gasztroenterológia Kutatócsoport, Magyar Tudományos Akadémia- Szegedi Tudományegyetem Szeged, Magyarország

² I. Számú Belgyógyászati Klinika, Szegedi Tudományegyetem, Szeged, Magyarország

³ Transzlációs Medicina Intézet, Pécsi Tudományegyetem, Pécs, Magyarország

⁴ Momentum Epitél Sejt Szignalizációs és Szekréción Kutatócsoport –Magyar Tudományos Akadémia – Szegedi Tudományegyetem, Szeged, Magyarország

Szeged

2019.

Tartalom

I.PUBLIKÁCIÓK.....	3
I.1. Témához kapcsolódó publikációk.....	3
I.2. Nem témához kapcsolódó publikációk	4
I.3. Tudományos teljesítmény	4
II. BEVEZETÉS	4
II.1. A mitokondriális tranzíciós pórus mint lehetséges terápiás célpont az akut pankreatitisz (AP) kezelésében.....	4
II.2. A hasnyálmirigy duktális folyadék szekréció fontos szerepe	5
II.3. A sav-bázis egyensúly és az AP összefüggései	5
III. CÉLKITŰZÉSEK	6
IV.ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	7
IV.1. Etika (Publikáció No.1.-3.)	7
IV.2. Oldatok és vegyszerek (Publikáció No.1.-3.).....	7
IV.3. Statisztikai analízis (Publikáció No.1.-3.).....	7
IV.4. Módszerek és metodikák (Publikáció No.1.)	7
IV.4.1. Állatok.....	7
IV.4.2. Vegyszerek.....	7
IV.4.3. Sejtek izolálása.....	8
IV.4.4. Konfokális mikroszkópia	8
IV.4.5. Fluoreszcens mikroszkópia	8
IV.4.6. Videómikroszkópia	8
IV.4.7. Immunfluoreszcens festés	9
IV.4.8. In vivo vizsgálatok	9
IV.4.9. Szérum amiláz szint vizsgálat	10
IV.4.10. Hisztológiai analízis.....	10
IV.5. Módszerek és metodikák -Publikáció No.2.....	10
IV.5.1. Állatok.....	10
IV.5.2. Immunfluoreszcens festés és AQP1 és CFTR csatornák detektálása hasnyálmirigy szövetben.....	10
IV.6. Módszerek- publikáció No.3.	11
IV.6.1. Állatok.....	11
IV.6.2. MA új modelljének kifejlesztése egér modellben	11
IV.6.3. AP kiváltása	11
IV.6.4. Vizsgálatok és hisztológiai analízis.....	11
V. EREDMÉNYEK	12

V.1. Eredmények- Publikáció No.1.....	12
V.2. Eredmények- Publikáció No.2.....	12
V.3.Eredményeink - Publikáció No.3.	12
VI. DISZKUSSZIÓ	12
VI.1. A mitokondriális homeosztázis védelme mint egy új terápiás célpont az AP kezelésében - Publikáció No.1.....	12
VI.2. A folyadékszécréción jelentős szerepe AP- Publikáció No.2.	13
VI.3. A csökkent vér pH és AP közötti „ördögi kör”-Publikáció No.3.....	14
VII. ÖSSZEFOGLALÁS.....	14
VII.1. Konklúziók, új terápiás lehetőségek az AP kezelésében	14
VIII. TÁMOGATÁS.....	15
IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	15
X.HIVATKOZÁSOK	16

I.PUBLIKÁCIÓK

I.1. Témához kapcsolódó publikációk

Publikáció No.1.; **Emese Tóth**, József Maléth, Noémi Závogyán, Júlia Fanczal, Anna Grassalkovich, Réka Erdős, Petra Pallagi, Gergő Horváth, László Tretter, Emese Réka Bálint, Zoltán Rakonczay Jr., Viktória Venglovecz, Péter Hegyi “Novel mitochondrial transition pore inhibitor N-methyl-4-isoleucine cyclosporin is a new therapeutic option in acute pancreatitis” *The Journal of Physiology* (2019 in press) Original publication , **IF: 4.98, Q1**

Publikáció No.2.; Viktória Venglovecz , Petra Pallagi , Lajos V. Kemény , Anita Balázs , Zsolt Balla , Eszter Becskeházi , Eleonóra Gál , **Emese Tóth** , Ágnes Zvara , László G. Puskás , Katalin Borka , Matthias Sendler , Markus M. Lerch , Julia Mayerle , Jens-Peter Kühn , Zoltán Rakonczay Jr. and Péter Hegyi “The Importance of Aquaporin 1 in Pancreatitis and Its Relation to the CFTR Cl- Channel. “ *Frontiers in physiology* (2018) Original publication, **IF: 3.394, Q2**

Publikáció No.3.; Zoltan Rumbus* , **Emese Toth***, Laszlo Poto, Aron Vincze , Gabor Veres , Laszlo Czako , Emoke Olah , Katalin Marta, Alexandra Miko, Zoltan Rakonczay Jr. , Zsolt Balla , Jozsef Kaszaki , Imre Foldesi , Jozsef Maleth, Peter Hegyi* and Andras Garami*

“Bidirectional Relationship Between Reduced Blood pH and Acute Pancreatitis: A Translational Study of Their Noxious Combination” *Frontiers in physiology* (2018) Original publication, **IF: 3.394, Q2**

*Authors share a co-authorship of this article, * Authors share a co- last authorship of this article

I.2. Nem témához kapcsolódó publikációk

Andrea Szentesi1, **Emese Tóth** , Emese Bálint , Júlia Fanczal , Tamara Madácsy , Dorottya Laczkó , Imre Ignáth , Anita Balázs, Petra Pallagi, József Maléth , Zoltán Rakonczay, Jr, Balázs Kui, Dóra Illés , Katalin Márta , Ágnes Blaskó' 1 , Alexandra Demcsák , Andrea Párniczky , Gabriella Pár, Szilárd Gódi , Dóra Mosztbacher , Ákos Szűcs, Adrienn Halász1, Ferenc Izbéki, Nelli Farkas, Péter Hegyi, Hungarian Pancreatic Study Group Original publication, **IF: 3.057, D1**

I.3. Tudományos teljesítmény :

Publikációk száma:	4 (2 első szerzős)
Összesített impakt faktor:	14.825
Összes idézettség (Google Scholar)	24
Hirsch index	2
Összes idézettség (MTMT2)	19
Hirsch index	2

II. BEVEZETÉS

II.1. A mitokondriális tranzíciós pórus mint lehetséges terápiás célpont az akut pankreatitisz (AP) kezelésében

A mitokondriális diszfunkció a betegség egyik legkorábbi eseménye ^[1-4]. Kimutatták, hogy acinus sejtekben az epesavak (ES) vagy alkohol (EtOH) és zsírsavak (ZSS) hatására a mitokondriális tranzíciós pórus (mPTP) a ciklofilin D (Cyp D) egységén keresztül kinyílik, melynek következménye mitokondriális depolarizáció, alacsony ATP szintézis és sejt nekrozis. ^[3, 5, 6]. Máig ismeretlen, hogy ez a hasnyálmirigy duktális epithél sejtek funkcióját (HDES) hogyan befolyásolja. Napjainkban, hogy kísérletesen gátoljuk az mPTP-t (a Cyp D-n keresztül) egyedül a ciklosporin A (CyA) az egyetlen hivatalos hatóanyag ^[7]. Habár, a CyA klinikumban történő alkalmazása megkérdőjelezhető. Egy kisebb kísérletsorozatban azt találták, hogy a CyA csökkentette a károsodás mértékét miokardiális infarktus esetén, de nagyobb volumenű vizsgálatokban nem találtak pozitív hatást ^[7-9]. A Debio025-t (ami egy CyA származék, Alispovirir, Debiopharm) hatásosnak találták Hepatitisz C vírus (HCV) ellen, de meglepően, néhány beteg a kezelés alatt hasnyálmirigy gyulladást kapott, mely a Debio025 klinikai alkalmazásának beszüntetését eredményezte világszerte. ^[10, 11]. Egy másik mPTP gátlószer, a TRO40303 (3,5-seco-4-nor-cholestan-5-one oxime-3-o, TROPHOS, Roche) sem bizonyult hasznosnak a klinikai kutatásokban; egy klinikai 2 fázisú kutatásban nem volt hatékony akut miokardiális infarktus esetén, mely megkérdőjelezi hasznosságát ^[7, 12, 13]. A Debio025 és a

TRO40303 is hatékony szernek mutatkozott experimentális modellekben, de a klinikai kísérletekben mutatott negatív eredmények miatt magasabb szintű klinikai vizsgálatokig sajnos nem jutottak el. Nemrég, egy új CyA A derivátum a ; *N*-methyl-4-isoleucine ciklosporinról (NIM811) mutatták ki, hogy pozitív eredményt hozott kísérletes és klinikai vizsgálatokban is [14-19]. Toxikus vagy súlyos mellékhatást ezekben a tanulmányokban nem találtak a NIM811-el kapcsolatban, ami azt sugallhatja, hogy nincs immunszuppresszív hatása sem [20].

II.2. A hasnyálmirigy dukális folyadék szekréció fontos szerepe

Klinikai és kísérletes eredmények azt mutatják, hogy a dukális bikarbonát (HCO_3^-) szekréció károsodása a pankréaszt méginkább fogékonyá teszi a gyulladásos folyamatok kialakulására mely akut és krónikus pankreatitisz (KP) esetén is jellemző.[21-25] Érdekes, hogy a hasnyálmirigy dukális víz transzport folyamatok szerepéről máig sokkal kevesebbet tudunk mint a dukális HCO_3^- szekrécióról, kivéve azt az általános tényt, hogy az elektrolitok mozgása ozmotikusan a víz áramláshoz kötött. Számos kutatás sugallja, hogy a fizikai interakció van a cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR) Cl^- csatorna és bizonyos aquaporin (AQP) izoformák között. [26-28] Továbbá, ezen csatornák ko-lokalizációját már ki is mutatták humán hasnyálmirigy szövetben [29]. Az AQP1 a vezető víz csatorna az emberi vörösvérsejtekben és az emésztőrendszerben, az AQP1 deléciója szérum hypotrigliceridémiát és szérum hypotriglyceridémiát, zsírszékeletet magas triglicerid szinttel valamint emelkedett lipáz aktivitást eredményez [30, 31]. A peritóneumban az AQP1 hiánya erőteljes ozmotikus víz transzportot eredményez [30, 32-34] Kevés adat van az AQP csatornákról a hasnyálmirigyben és arról is, hogy ezek a hasnyálmirigy duktuszon belül miként működnek együtt más csatornákkal. Munkánk során célul tűztük ki, hogy karakterizáljuk az AQP-k patofiziológiai és patológiai szerepét a hasnyálmirigy dukális szekrécióban, a disszertációm egyik része a CFTR és az AQP1 csatornák pankréász duktuszokban történő lehetséges együttműködésére fókuszál.

II.3. A sav-bázis egyensúly és az AP összefüggései

Az AP-val gyakran együtt előfordulhat a sav-bázis egyensúly felborulása, bár az, hogy a vér pH változásai miként befolyásolják az AP-t az máig nem ismert. Az acidózist sűrűn a betegség súlyosságának markereként jelzik. [35]. Köztudott, hogy amikor a hasnyálmirigy bikarbonát termelése sérül, helyi vagy szisztémás savasság hatására (metabolikus acidózis), abban az esetben a bekövetkező csökkent pH pankréász enzim aktivációt és sejtkárosodást indíthat be [36]. Sőt, kimutatták, hogy acidikus kontraszt anyag beinjektálása a hasnyálmirigy vezetékbe súlyosbította az AP-t kísérletes körülmények között patkány modellben [37, 38]. Takács és munkatársai vizsgálatukban arra az eredményre jutottak, hogy az AP-ban szenvedő betegekben

a hasnyálmirigy fő vezetékének lumenális pH értéke jóval alacsonyabb volt mint az a kontroll egyénekénél volt mérhető [23]. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az AP kialakulásának velejárója lehet a lokális pH csökkenés. Sajnos, máig az AP és MA közti lehetséges összefüggések nem ismertek egészében. Munkánk során, kidolgoztunk egy új egér modellt a krónikus metabolikus acidózis vizsgálatára és enyhe vagy súlyos AP-t indukáltunk az állatokban, hogy az elváltozások közti lehetséges összefüggéseket felderíthessük. Azon felfedezések, hogy az MA miként hat az AP kimenetelére új terápiás lehetőségeket vethetnek fel az AP kezelésében. [39]

III. CÉLKITŰZÉSEK

I. (Publikáció No.1.):

a.) Pankreatitisz indukáló ágensek a mitokondriális tranzíciós prous (mPTP) nyitását eredményezik a cyclophilin D-n keresztül acinus sejtekben mely kalcium túltengést és sejthalált okozhat. Érdemes megjegyezni, hogy máig nincs elérhető adat arról, hogy a hasnyálmirigy duktális epithél sejteket hogyan befolyásolja az mPTP gátlása. **Ezért célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk, hogy az az mPTP genetikai és farmakológiai gátlása miként hat a hasnyálmirigy duktális epithél sejtek működésére.**

b.) Az mPTP genetikai és farmakológiai gátlása csökkenti az AP súlyosságát állatmodellekben. Azonban, az mPTP gátlószerek klinikai tesztelése máig nem érte el fázis kettes klinikai vizsgálatokat mert súlyos problémákat tapasztaltak a hatásosság vagy biztonság szempontjából. **Ennek nyomán célul tűztük ki, egy új ciklosporin A derivátum; a NIM811 vizsgálatát in vivo állat kísérletekben is.**

II. (Publikáció No.2.):

A csökkent hasnyálmirigy duktális folyadék szekréció fontos szerepet játszik az AP kialakulásában. Célunk az volt, hogy **megvizsgáljuk az aquaporinok működését és funkcióját** melyek részt vesznek számos szövet transzepithéliális víz transzport folyamataiban.

Specifikus cél: **Megvizsgálni, az AQP1 víz és a CFTR ion csatorna jelenlétét egér hasnyálmirigy szövetmintákban.**

III. (Publikáció No.3.):

A sav-bázis elváltozások gyakoriak AP esetén. Az extracelluláris pH csökkenése súlyosbítja az AP-t patkány modellben, valamint az alacsony lumenális pH kialakulása hozzájárul AP-ban

a hasnyálmirigy károsodás mértékéhez egérben. **Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk az MA hatását az AP-ra egérben.**

Specifikus cél I.: **Metabolikus acidózis egér modelljének kifejlesztése**

Specifikus cél II: **Metabolikus acidózis AP-ra gyakorolt hatásának vizsgálata kísérletes körülmények között.**

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

IV.1. Etika (Publikáció No.1.-3.)

Az állatkísérletek a hatályos szabályozás és jogszabályban határozott kereteknek megfelelően történtek (Európai Unió 2010/63/EU és Magyar Kormány 40/2013 (II.14.)). Az állatok eliminálása i.p. 200mg/kg pentobarbital-al történt. (Bimeda MTC, Cambridge, Canada).

IV.2. Oldatok és vegyszerek (Publikáció No.1.-3.)

A vegyszerek beszerzése a Sigma Aldrich cégtől történt (Budapest, Magyarország), más cégtől történő beszerzés esetén a cég neve külön feltüntetésre került. 2.7-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6-) carboxyfluorescein-acetoxymethylester (BCECF-AM) és Tetramethylrhodamine-methylester (TMRM) –t a Termofischer Scientific-től szereztük be. A NIM811-et a MedChem Express Europe (Sweden)-től. Cyclosporin A (CYA), caerulein (CER), NIM811, CCCP és a fluoreszcens festékek dimethyl sulfoxide-ban lettek feloldva (DMSO).

IV.3. Statisztikai analízis (Publikáció No.1.-3.)

Az eredmények átlagolva vannak ábrázolva \pm SEM. A statisztikai analízist Sigma Plot programmal végeztük.

IV.4. Módszerek és metodikák (Publikáció No.1.)

IV.4.1. Állatok

A projekthez összesen 70 vad típusú (WT) vagy cyclophilin D knockout (Cyp D KO, (B6; 129-Ppif^{tm1Maf}/J) egeret áldoztunk fel. Cyp D KO állatokat a Semmelweis Egyetem, Orvosi Biokémia Intézet biztosította számunkra (Semmelweis University, Budapest, Magyarország).

IV.4.2. Vegyszerek

Ebben a tanulmányban 500 μ M Kenodeoxikólsavat (epesav-bile acid, BA) vagy 100mM ethanolt (EtOH) + 200 μ M palmitolsavat (zsírsav-fatty acid, FA) használtunk a fluoreszcens, konfokális vagy immunfluoreszcens festések alkalmával hogy megvizsgáljuk az epesavak vagy

az alkohol és zsírsavak okozta mitokondriális vagy sejtkárosodás mértékét az mPTP genetikai vagy farmakológiai gátlása alatt pankreász acinus vagy duktális sejtekben. 100 μM of Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) használtunk a mitokondriális mérésekhez, pozitív kontrollnak a mitokondriális károsodás kiváltásához. 2 μM CYA és 2 μM NIM811 használtunk, az mPTP farmakológiai gátlására. 25-30 percig előkezeltük a mintákat CYA-val vagy NIM811-el a fluoreszcens, konfokális vagy immunfestés vizsgálatokhoz (a NIM811 vagy CYA csoportok alatt).

IV.4.3. Sejtek izolálása

A hasnyálmirigy duktuszok vagy acinus sejtek izolálása enzimátikus emésztés és mikrodiszsekcio segítségével történt, korábbról ismert módon. ^[40, 41]

IV.4.4. Konfokális mikroszkópia

A mitokondriális membrán potenciált (Ψ) Zeiss LSM 880 konfokális lézer mikroszkóppal történt. (Carl Zeiss Technika Kft., Budaörs, Hungary). BA vagy EtOH + FA-t arra használtuk, hogy mitokondriális károsodást indukáljunk. Izolált hasnyálmirigy duktuszokat vagy acinus sejteket standard HEPES oldatban inkubáltuk TMRM festéket tartalmazó oldatban (Tetramethylrhodamine Methyl Ester Perchlorate, 100 nmol/L). Apoptózis, nekrosis monitorozására egy apoptózis/nekrosis detektálására alkalmas készletet használtunk. (ab176750, Abcam). Az elő, nekrotizált vagy apoptotizált sejteket CytoCalcein Violet 450 fluorescent, Apopxin Deep Red Indicator and Nuclear Green DCS1 fluoreszcens festékekkel jelöltük (ab176750, Abcam).

IV.4.5. Fluoreszcens mikroszkópia

A hasnyálmirigy duktális HCO_3^- szekréciót mikrofluorometriával vizsgáltuk ahogy az korábbról ismert, ^[42, 43] BCECF-AM (2', 7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein, Acetoxymethyl Ester, 1.5 mmol/L) fluoreszcens festék alkalmazásával.

IV.4.6. Videómikroszkópia

In vitro pankreász duktális folyadékszékreció (luminális hízás) mérését videómikroszkópia segítségével mértük, Fernández-Salazar és munkatársai korábban bemutatott metodikája alapján ^{[44] [45]}.

IV.4.7. Immunfluoreszcens festés

A mitokondriumok jelenlétét immunfluoreszcens festékekkel is detektáltuk. (TOM20 mitokondriális marker, (EPR15581-39, Abcam)). TOM20 a centrális egysége a mitokondriális TOM20 komplex receptornak a mitokondriális külső membránon, funkciója, az, hogy felismeri és transzlokálja a citoszolikus szintetizált mitokondriális preproteineket [46-48]. A pankréász duktuszokat cryomold-ban -20°C fokon tároltuk. A 7 µm vastag duktusz metszeteket Leica Cryostat-tal metsztük. 4% paraformaldehidet használtunk a minták fixálására. A mintáink mosására 1xTBS oldatot használtunk. Antigén feltáráshoz 10 mM Sodium –Citrate oldatot használtunk 6-os pH-n 95 °C 15 percig. Blokkoláshoz 1% kecske szérumot használtunk mely 5% BSA-TBS –ben volt feloldva (1 óra). TOM20 nyúl monoklonális antitesttel (hígítás 1:400, Abcam) inkubáltuk a mintáinkat 4°C-on egy éjszakán át. Ezt követő napon a metszeteket a másodlagos antitesttel 2 órán keresztül sötétben szobahőmérsékleten tartottuk. (Alexa fluor 488, Thermo Fisher, Rockford, IL, United States). A sejtmagokat Hoechst 33342-vel festettük meg (Termofischer, Rockford, IL, United States). Az acinus sejtek immunfluoreszcens festése friss izolátumon történt a fent említett módszer alapján (két parameter eltéréssel; a sejteket 2% paraformaldehidben fixáltuk, az antitest hígítása pedig 1:200-hoz volt). Fluoromount-tal kezeltük a mintákat majd a detektálás Zeiss LSM 880 konfokális lézer mikroszkóppal történt. (Carl Zeiss Technika Kft., Budaörs, Hungary).

IV.4.8. In vivo vizsgálatok

IV.4.8.1. AP kiváltása

Az AP-t caerulein (CER, 10x50µg/kg) és 4% nátrium-taurokolát segítségével indukáltuk (TAU, 2ml/kg, 4%)^[24, 49-51]. Alkohol és zsírsav által kiváltott AP-t is alkalmaztunk projektünk során (i.p. 1.75 g/kg ethanol és 750 mg/kg FA, EtOH+FA), ez jelen disszertációnak nem része^[25, 52]. A kontroll csoportok fiziológiás sóoldatot kaptak az oltóanyagoknak megfelelő mennyiségek szerint.

IV.4.8.2. Orális szondáztatás alkalmazása egerekben

Az orális szondáztatás műanyag etető csövek segítségével történt (20ga x 38mm, Instech Laboratories, USA). A NIM811-et vivőanyagban szolubilizáltuk (8.3% polyoxyl 40 hydrogenated castor oil és 8.3% ethanol).^[17] Az állatok előkezelése NIM811-el egy órával az AP kiváltása előtt történt, 10 mg/kg or 5mg/kg koncentrációban. A NIM811 dózisa korábbi kísérletek alapján lett beállítva^[17].

Az előkezelés mellett a NIM811-et utókezelésben is alkalmaztuk AP esetén. 12 órával a TAU vagy EtOH+FA indukálta AP után kezeltük az állatokat NIM811-el, a CER kiváltotta AP esetén pedig a 3. i.p. oltás után.

IV.4.9. Szérum amiláz szint vizsgálat

A vizsgálathoz a vérvétel szívből történt, a vért azonnal jégre helyezve, majd 2500 RCF-en 15 percig centrifugáltuk a mintákat 4°C-on. A vér szérumot összegyűjtöttük majd -20°C-on tároltuk használatig. A hasnyálmirigy mintákat 8%-os formaldehid oldatba helyeztük és 4°C tároltuk a hematoxylin –eosin festésig. A szérum amiláz aktivitást egy kolometráis reagenskészlet segítségével mértük meg (Diagnosticum, Budapest, Hungary). 405 nm detektáltuk a minták abszorbanciáját FLUOstar OPTIMA mikroplét olvasó segítségével. (BMG Labtech, Budapest, Hungary) .

IV.4.10. Hisztológiai analízis

A formaldehid fixált pankréász minták paraffin-ba történő ágyazását követően a 3 µm vastag szeleteken hematoxin-eozin festést alkalmaztunk. Hisztológiai eltérések detektálására egy szemikvantitatív mérési módszert alkalmaztunk ahogy azt korábban Kui és munkatársai már bemutatták. ^[53]

IV.5. Módszerek és metodikák -Publikáció No.2.

IV.5.1. Állatok

A CFTR knock out (KO) (háttér FVB/N) egereket Dr. Ursula Seidler (Hannover Medical School, Hannover, Germany) biztosította számunkra. AQP1 KO (háttér CD4) egereket számunkra bocsájtotta : Dr. Alan Verkman (University of Carolina, CA, Unites States) és Dr. Alastair Poole (University of Bristol, United Kingdom).

IV.5.2. Immunfluoreszcens festés és AQP1 és CFTR csatornák detektálása hasnyálmirigy szövetben

A 7 µm vastag egér hasnyálmirigy szeleteket (WT, AQP1, és CFTR KO) 2% paraformaldehidben fixáltuk. A minták permeabilizálása 10% Tween 20-nátrium citrátban történt, blokkolása pedig 5% kecske szérummal. A kettős immunfestés AQP1 antitesttel (hígítás: 1:500; Thermo Fisher, Rockford, IL, United States) és CFTR antitesttel történt (hígítás: 1:100; Alomone Labs, Jerusalem, Israel) egy éjszakán át tartó inkubálással. A mosási periódusokat követően a metszeteket másodlagos antitestekkel kezeltük (Alexa fluor 488, Thermo Fisher, Rockford, IL, United States) (Alexa fluor 568, Thermo Fisher, Rockford, IL,

United States) 120 percig szobahőmérsékleten sötétben. A sejtmagokat DAPI fluoreszcens festékekkel festettük meg. Az adatokat Zeiss LSM880 konfokális mikroszkóppal detektáltuk (Carl Zeiss Technika Kft., 10–12 reprezentatív képet készítettünk a WT, AQP1 KO és CFTR KO hasnyálmirigy mintákról, korábban bemutatott metodikák szerint.^[54]

IV.6. Módszerek- publikáció No.3.

IV.6.1. Állatok

Kísérleteinkhez nőstény FVB/N egereket használtunk (Charles Rivers Laboratories, Wilmington, MA, USA).

IV.6.2. MA új modelljének kifejlesztése egér modellben

A krónikus MA modell beállításához, az egereket 4 csoportba osztottuk véletlenszerűen a 12 napos kísérlethez:

- ammónium klorid tartalmú ivóvíz (NH_4Cl) (8.2 ± 0.5 ml/nap/egér) fogyasztása, szakirodalmi adatok alapján ^[55, 56]
- NH_4Cl oldat intraperitoneális injekciója (i.p.) (0.5 ml, 0.28 M) a kezelés 1. és 6. napján;
- ammónium klorid tartalmú ivóvíz (mint az 1. csoportban) és oltás alkalmazása (mint a 2. csoportban)
- kontroll csoport, NH_4Cl mentes csapvíz víz és 2 i.p. oltás fiziológiás só oldattal a kezelés 1. és 6. napján

IV.6.3. AP kiváltása

A súlyos AP-t (SAP) caerulein által váltottuk ki (CER, $10 \times 50 \mu\text{g}/\text{kg}$), a CER-t i.p. oltással adtuk be az állatoknak.^[49] Az enyhe AP kiváltása alkohol és zsírsav adásával történt (i.p. of 1.75 g/kg ethanol and 750 mg/kg palmitic acid, EtOH+FA) ^[25, 52]. Az MA kezelés 12. napján történt az AP indukálása.

IV.6.4. Vizsgálatok és hisztológiai analízis

A laboratóriumi vizsgálatokat a vér szérum és vizelet mintákból általános laboratóriumi metodikák segítségével mértük meg (Laboratóriumi Medicina Intézetben, Szegedi Tudományegyetem). A szérum amiláz vizsgálatokat a már korábban említett módszer segítségével határoztuk meg. A vérgáz pH vizsgálatokhoz, az artériás vérmintákat (170 μl) egy heparinnal és lítiummal kezelt zárt kapilláriókba gyűjtöttük. Az artériás vér analízise egy vérgáz

mérő berendezéssel történt a mintavételt követő egy percen belül 22 C szobahőmérsékleten (Cobas 221, Roche Ltd., Basel, Switzerland)

V. EREDMÉNYEK

V.1. Eredmények- Publikáció No.1.

A Cyp D genetikai és farmakológiai gátlásával az epesav valamint az alkohol és zsírsav okozta károsodás kivédhető azáltal, hogy a mitokondriális membrán potenciál és a mitokondriumok mennyisége is védett. In vivo eredményeink rámutatnak arra, hogy a NIM811 per os adminisztrációja csökkenti az AP súlyosságát, csökkenti ödéma, leukocita infiltráció, nekrozis és szérum amiláz szinteket AP esetén. A NIM811-nak nem találtunk toxikus hatást

V.2. Eredmények- Publikáció No.2.

Elsőként mutattuk ki, hogy az AQP1 és CFTR ko-lokalizált a hasnyálmirigy duktális epithél sejtek lumenális oldalán. A CFTR hiánya az AQP1 expressziójának csökkenését eredményezi, ez arra ad következtetést, hogy a CFTR hatással lehet a duktális epithél sejtek víz permeabilitására is. Eredményeink sugallják, hogy az AQP1 együttműködhet a CFTR Cl⁻ csatornával valamint részt vesz a hasnyálmirigy folyadék szekréciójában. Továbbá, projektünk rávilágított arra, hogy az AQP1-nek szerepe van a hasnyálmirigy gyulladásban is.

V.3. Eredményeink - Publikáció No.3.

Kísérleteink során experimentális bizonyítékot találtunk arra, hogy létezik egy bilaterális kapcsolat a pH változás és AP között. Bizonyítottuk, hogy a már meglévő MA súlyosbítja az AP kimenetelét, míg az AP a vér pH csökkenéséhez vezet, ez az ártalmas ciklus pedig az egyik fő oka lehet az AP súlyos eseteiben előforduló magas halálozásnak.

VI. DISZKUSSZIÓ

VI.1. A mitokondriális homeosztázis védelme mint egy új terápiás célpont az AP kezelésében - Publikáció No.1.

A mitokondriumok alulműködése acinus és duktális sejtekben is az egyik legfőbb pathofiziológiai esemény AP korai fázisában [2, 57, 58]. ATP termelés csökkenéshez vezet, intracelluláris Ca²⁺ szint megemelkedésével jár, valamint és duktális sejtekben előforduló ATP függő Cl⁻/HCO₃⁻ kicserélők és a CFTR Cl⁻ csatorna működését is negatívan befolyásolja [2, 4,

6, 25, 58-60]. Továbbá, a mitokondriális károsodás meghatározó tényezője a nekrozis és apoptózisnak. A mitokondriális citokrom c citoszólba szabadulása apoptózist eredményez, míg a mitokondriális depolarizáció nekrozishoz vezet [61]. Az mPTP gátlása a duktális epithél sejteket megóvta mindkét sejthalál típustól, ami eltér az acinus sejtekben tapasztaltaktól, ahol is csak a nekrozistól biztosított védelmet ez a mechanizmus. Összefoglalva, az mPTP mindkét sejtípusban hatékonynak tűnik. Az elmúlt évtizedben, bemutatták, hogy az mPTP genetikai és farmakológiai gátlása csökkenti acinus sejtekben a BA vagy EtOH+BA okozta károsodást és csökkenti az AP súlyosságát [1, 4, 6, 62]. Munkacsoportunk az elmúlt években kimutatta, hogy BA vagy EtOH+FA a súlyos mitokondriális károsodás kiváltásán keresztül a HCO_3^- szekréció csökkenéséhez vezet duktális epithél sejtekben [25, 59, 61, 50, 85, 36, 70]. Munkánk során folytattuk kísérleteinket az mPTP és annak gátlásának vizsgálatával, hogy a duktális epithél sejtekben betöltött szerepét feltérképezzük. Első lépésben, karakterizáltuk az mPTP szerepét, annak (genetikai és farmakológiai-CyA) gátlásán keresztül duktális epithél sejtekben és azt találtuk, hogy a BA és EtOH+FA ellen erős védelmet biztosított, ez arra utalhat, hogy az mPTP megcélzása hatásos lehet általánosságban is a betegség ellen. Habár, több mPTP gátlószert is teszteltek már az elmúlt években, egyik sem tekinthető sikeresnek. A CyA hatással van a kalcineurinra, ez vezet immunszuppresszáns aktivitásához, mely a páciens fogékonyabbá teheti fertőzésekkel szemben. A nem immunszuppresszáns CyA derivátumok klinikai tesztelése pedig az ún. "proof of concept" kettes típusú klinikai AP vizsgálatok előtt le lettek állítva a nem egyértelmű hatások miatt melyeket már a bevezetésben is tárgyaltunk. Bemutattuk, hogy a NIM811 csökkenti a BA vagy EtOH+FA okozta mitokondriális károsodást. Sőt, a NIM811 csökkentette az apoptózis értékeket is BA vagy EtOH+FA kezelések alatt is duktális epithél sejtekben. Érdekes módon, az mPTP gátlása megvédte a hasnyálmirigy duktális HCO_3^- szekréciós értékeket BA vagy EtOH+FA kezelés alatt is, de a folyadékszekrécióra nem volt hatással. Ezeket az eredményeket szem előtt tartva, valószínűsíthető, hogy az intracelluláris ATP szint és a Na^+/K^+ -ATPáz működésének védelme nem elég egy teljes körű védelem biztosítására és talán más folyadéktranszportban résztvevő csatornák, mint például az aquaporinok működése nem érintett.[54] Az 5 vagy 10 mg/kg NIM811 kezelésnek nem volt önmagában toxikus hatása, de szignifikánsan csökkentette az AP súlyosságát.

VI.2. A folyadékszekréció jelentős szerepe AP- Publikáció No.2.

Az AQP csatornák a hasnyálmirigy duktális folyadék szekrécióban betöltött szerepét figyelembe véve, elsőként mutattuk be, hogy az AQP1 és a CFTR ko-lokalizált a duktális epithél sejtek apikális oldalán. A CFTR hiánya szignifikánsan csökkentette az AQP1 expresszióját, ez arra utalhat, hogy a CFTR-nak szabályozó szerepe lehet a duktális sejtek víz permeabilitásában is. Eredményeink továbbá arra engednek következtetni, hogy az AQP1 együttműködhet a CFTR-ral a hasnyálmirigy folyadékszekréciójában is. Ezen felül, azt

találtuk, hogy az AQP1-nek szerepe lehet a pankreatitiszben is. Korábban, légzőszervi epithél sejtekben találtak hasonló eredményeket, ahol a gátolt vagy hiányzó CFTR működés az epithél sejtek víz permeabilitásának csökkenéséhez vezetett. [26, 63]. Ez rámutathat arra, hogy ennek a víz csatornának akár fontos szerepe lehet nem csak a pankreatitiszben hanem például a cisztás fibrózisban is.

VI.3. A csökkent vér pH és AP közötti „ördögi kör”-Publikáció No.3.

Miután, a szakirodalomban nem volt MA-ra kidolgozott állatmodell, elsőként számos előkísérletet végeztünk, hogy kidolgozzuk a legalkalmasabb MA modellt a kísérletsorozatunkhoz. A savas folyadék kettős alkalmazása (szájon át és i.p.) erőteljes pH csökkenést eredményezett a vérben anélkül, hasnyálmirigy károsodás alakult volna ki. MA modellünkben, az MA lassan alakult ki és számos napig fennállt ami hasonló a humán esetekhez. Továbbá, emberekben az AP is kialakulhat már meglévő MA mellett, például hyperlipidemia vagy diabéteszes ketoacidózis esetén [64, 65] Habár, klinikumban az MA leginkább az AP következményeként alakul ki és nem pedig már azt megelőzően van jelen. A jövőben érdemes lehetne klinikai kísérleteket tervezni annak vizsgálatára, hogy vizsgálati körülmények között lehessen tanulmányozni a pH megfelelően kontrollált értékének hatását, valamint megtalálni az optimális folyadékpótlás beállítását és vizsgálatát AP és már fennálló MA esetén is. Kísérleteink során experimentális bizonyítékot találtunk arra, hogy egy bilaterális kapcsolat van a pH csökkenés és az AP között. Megmutattuk, hogy a már fennálló MA súlyosbítja az AP kimenetelét, míg AP-ban a vér pH csökkenését figyelhettük meg, mely az egyik fő oka lehet annak, hogy súlyos AP esetekben magas a mortalitás. Jövőbeli kísérletek szükségesek ahhoz, hogy az MA hatásait az AP-ra teljes mértékben feltárjuk, de valószínűsíthetően egy komplex mechanizmusról van szó.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

VII.1. Konklúziók, új terápiás lehetőségek az AP kezelésében

- 1. NIM811 egy alkalmas komponens lehet AP klinikai tesztelésre.** Bizonyítottuk, hogy az egyik mPTP inhibitor a NIM811 nagy mértékben hatásos számos kísérletes AP állatmodellben is. Mivel a NIM811 nincs mellékhatása és fontos 1-es fázisú klinikai teszteken is átment, a cégeknek érdemes lehetne klinikai fázis kettes

vizsgálatokat indítania ennek az új és ígéretes hatóanyagnak a tesztelésére. (Publikáció No.1.)

- 2. A folyadékszekréció védelme fontos terápiás lehetőség lehet AP esetén.** Hipotézisünk az, hogy az AQP1 hiánya érzékenyebbé teszi a hasnyálmirigyet a gyulladás kialakulására, valószínűleg a csökkent folyadék és bikarbonát szekréció végett. Ezáltal a megfelelő folyadékpótlás beállítása illetve a folyadék szekréció védelme fontos terápiás célpont lehet AP esetén. (Publikáció No.2.)
- 3. Az AP-s betegek normál pH háztartásának visszaállítása fontos része lehetne a betegek terápiájának** (Publikáció No.3.)

VIII. TÁMOGATÁS

PhD munkám alatt laborunk a következőktől kapott támogatást: Magyar Tudományos Akadémia Lendület program (LP2014-10/2014 Hegyi Péter) , Emberi Erőforrások Minisztériuma és Nemzeti Kutatási és Fejlesztési Hivatal (GINOP-2.3.2-15-2016-00015, EFOP-3.6.2-16-2017-00006, K116634 Hegyi Péter, K109756-Venglovecz Viktória, PD115974-Maléth József,K119938-ifj. Rakonczay Zoltán).

IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként, szeretném köszönetemet és hálámat kifejezni mentoromnak és témavezetőmnek **Prof. Dr. Hegyi Péternek** (Transzlációs Gasztroenterológia Kutatócsoport , Magyar Tudományos Akadémia-Szegedi Tudományegyetem, Transzlációs Medicina Intézet-Pécsi Tudományegyetem) aki a tudományos és finansziális háttérrel biztosította PhD tanulmányaimhoz. Az Ő kiemelkedő tudományos és vezetői szakértelme nélkül ez a disszertáció nem készülhetett volna el. Hálásan köszönöm társ-témavezetőmnek, **Dr. Maléth Józsefnek** (1. Számú Belgyógyászati Klinika, Szegedi Tudományegyetem és Epitelejt Szignalizációs és Szekréciós Kutatócsoport, Magyar Tudományos Akadémia-Szegedi Tudományegyetem) az évek során nyújtott szakértői tanácsait, értékes kommentjeit és módszertani javaslatait. Köszönöm, **Prof. Dr. Lengyel Csabának és Prof. Dr. Ábrahám Györgynek**, az 1. Számú Belgyógyászati Klinika jelen és korábbi vezetőinek, hogy lehetővé tették, hogy az intézetükben dolgozhassak. Köszönöm, **Prof. Dr. Varró Andrásnak** (Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet korábbi vezetőjének, Szegedi Tudományegyetem) a támogatását. Külön köszönöm **Dr. Venglovecz Viktóriának** (Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet, Szegedi Tudományegyetem) az évek során nyújtott tudományos javaslatait és a támogatását. Köszönöm, **Dr. Szentesi Andreának** (1. Számú Belgyógyászati Klinika, Szegedi Tudományegyetem és Transzlációs Medicina Intézet-Pécsi Tudományegyetem), **Dr. Pallagi Petrának** (1. Számú Belgyógyászati Klinika, Szegedi Tudományegyetem) és **Prof. Dr. ifj. Rakonczay Zoltánnak** (Kórélettani Intézet, Szegedi Tudományegyetem) hasznos tanácsait. Köszönöm a 1. Számú Belgyógyászati Klinika Sejtélettani

laboratóriumában dolgozó kollégáknak és a Magyar Hasnyálmirigy Munkacsoport tagjainak a támogatást. Ezt a munkát véghez vinni nem lehetett volna a következő nagyszerű asszisztens csapat segítségével; **Fritz Rea, Magyarné Pálfi Edit, Miklósné Árva Zsuzsanna, Horesnyi Béláné Pritz Tünde, Kazi Brigitta** és † **Fuksz Zoltánné Erzsébet**. Nagyon hálás vagyok a következő laboros kollégáimnak és barátaimnak a tanácsokért, segítségért és a vidám pillanatokért amiket együtt töltöttünk (ABC sorrendben): **Bálint Réka Emese, Balla Zsolt, Ébert Attila, Fanczal Júlia, Fűr Gabriella, Lőrincz Anett, Madácsy Tamara, Molnár Réka** és **Závogyán Noémi**. Köszönöm a férjemnek, Jánosnak kivételes türelmét és azt, hogy a legnagyobb szurkolóm volt ezalatt az évek alatt. Testvéremnek Máté Gergelynek köszönöm, hogy mindig arra ösztönzött, hogy ne adjam fel, s a családom és barátaimnak is hálával tartozom az érzelmi támogatásért. Hihetetlenek vagytok! A disszertációm a szüleimnek és nagyszüleimnek ajánlom. Szüleimnek, Évának és Tibornak, akik megtanítottak a szorgalom, a becsület és a kitartás fontosságára. Továbbá, nagypapámnak; † **Tóth Imrének**, aki már akkor hit a kutatói karrieremben mikor még azt sem tudtam az mit jelent.

“A siker annyi mint bukástól bukásig menni anélkül, hogy feladnád a lelkesedéset.” —Winston Churchill

X. HIVATKOZÁSOK

1. Sah, R.P. and A. Saluja, *Molecular mechanisms of pancreatic injury*. Curr Opin Gastroenterol, 2011. **27**(5): p. 444-51.
2. Maleth, J., et al., *Central role of mitochondrial injury in the pathogenesis of acute pancreatitis*. Acta Physiol (Oxf), 2013. **207**(2): p. 226-35.
3. Abu-El-Haija, M., et al., *Accelerating the Drug Delivery Pipeline for Acute and Chronic Pancreatitis: Summary of the Working Group on Drug Development and Trials in Acute Pancreatitis at the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Workshop*. Pancreas, 2018. **47**(10): p. 1185-1192.
4. Biczó, G., et al., *Mitochondrial Dysfunction, Through Impaired Autophagy, Leads to Endoplasmic Reticulum Stress, Dereglated Lipid Metabolism, and Pancreatitis in Animal Models*. Gastroenterology, 2018. **154**(3): p. 689-703.
5. Shalbueva, N., et al., *Effects of oxidative alcohol metabolism on the mitochondrial permeability transition pore and necrosis in a mouse model of alcoholic pancreatitis*. Gastroenterology, 2013. **144**(2): p. 437-446 e6.
6. Mukherjee, R., et al., *Mechanism of mitochondrial permeability transition pore induction and damage in the pancreas: inhibition prevents acute pancreatitis by protecting production of ATP*. Gut, 2016. **65**(8): p. 1333-46.
7. Javed, M.A., et al., *TRO40303 Ameliorates Alcohol-Induced Pancreatitis Through Reduction of Fatty Acid Ethyl Ester-Induced Mitochondrial Injury and Necrotic Cell Death*. Pancreas, 2018. **47**(1): p. 18-24.
8. Piot, C., et al., *Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction*. N Engl J Med, 2008. **359**(5): p. 473-81.
9. Cung, T.T., et al., *Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction*. N Engl J Med, 2015. **373**(11): p. 1021-31.

10. Zeuzem, S., et al., *Randomised clinical trial: alisporivir combined with peginterferon and ribavirin in treatment-naive patients with chronic HCV genotype 1 infection (ESSENTIAL II)*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2015. **42**(7): p. 829-44.
11. Stanciu, C., et al., *Efficacy and safety of alisporivir for the treatment of hepatitis C infection*. *Expert Opin Pharmacother*, 2019. **20**(4): p. 379-384.
12. Atar, D., et al., *Effect of intravenous TRO40303 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-elevation myocardial infarction: MITOCARE study results*. *Eur Heart J*, 2015. **36**(2): p. 112-9.
13. Sileikyte, J. and M. Forte, *Shutting down the pore: The search for small molecule inhibitors of the mitochondrial permeability transition*. *Biochim Biophys Acta*, 2016. **1857**(8): p. 1197-1202.
14. Arai, M., et al., *Resistance to cyclosporin A derives from mutations in hepatitis C virus nonstructural proteins*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. **448**(1): p. 56-62.
15. Readnower, R.D., et al., *Post-injury administration of the mitochondrial permeability transition pore inhibitor, NIM811, is neuroprotective and improves cognition after traumatic brain injury in rats*. *J Neurotrauma*, 2011. **28**(9): p. 1845-53.
16. Garbaisz, D., et al., *Attenuation of skeletal muscle and renal injury to the lower limb following ischemia-reperfusion using mPTP inhibitor NIM-811*. *PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e101067.
17. Rehman, H., et al., *NIM811 prevents mitochondrial dysfunction, attenuates liver injury, and stimulates liver regeneration after massive hepatectomy*. *Transplantation*, 2011. **91**(4): p. 406-12.
18. Huang, Z.L., et al., *Cyclophilin inhibitor NIM811 ameliorates experimental allergic encephalomyelitis*. *J Neuroimmunol*, 2017. **311**: p. 40-48.
19. Liu, Q., et al., *Small-for-Size Liver Transplantation Increases Pulmonary Injury in Rats: Prevention by NIM811*. *HPB Surg*, 2012. **2012**: p. 270372.
20. Lawitz, E., et al., *Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of the cyclophilin inhibitor NIM811 alone or in combination with pegylated interferon in HCV-infected patients receiving 14 days of therapy*. *Antiviral Res*, 2011. **89**(3): p. 238-45.
21. Hegyi, P. and Z. Rakonczay, *Insufficiency of electrolyte and fluid secretion by pancreatic ductal cells leads to increased patient risk for pancreatitis*. *Am J Gastroenterol*, 2010. **105**(9): p. 2119-20.
22. Hegyi, P., et al., *The acinar-ductal tango in the pathogenesis of acute pancreatitis*. *Gut*, 2011. **60**(4): p. 544-52.
23. Takacs, T., et al., *Intraductal acidosis in acute biliary pancreatitis*. *Pancreatology*, 2013. **13**(4): p. 333-5.
24. Pallagi, P., et al., *The role of pancreatic ductal secretion in protection against acute pancreatitis in mice**. *Crit Care Med*, 2014. **42**(3): p. e177-88.
25. Maleth, J., et al., *Alcohol disrupts levels and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to promote development of pancreatitis*. *Gastroenterology*, 2015. **148**(2): p. 427-39 e16.
26. Schreiber, R., et al., *The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates aquaporin 3 in airway epithelial cells*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(17): p. 11811-6.
27. Cheung, K.H., et al., *Synergistic effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and aquaporin-9 in the rat epididymis*. *Biol Reprod*, 2003. **68**(5): p. 1505-10.
28. Jesus, T.T., et al., *Aquaporin-4 as a molecular partner of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in rat Sertoli cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. **446**(4): p. 1017-21.
29. Burghardt, B., et al., *Distribution of aquaporin water channels AQP1 and AQP5 in the ductal system of the human pancreas*. *Gut*, 2003. **52**(7): p. 1008-16.
30. Hua, Y., et al., *Physiological and pathological impact of AQP1 knockout in mice*. *Biosci Rep*, 2019. **39**(5).

31. Ma, T., et al., *Defective dietary fat processing in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **280**(1): p. C126-34.
32. Yang, B., et al., *Reduced osmotic water permeability of the peritoneal barrier in aquaporin-1 knockout mice*. Am J Physiol, 1999. **276**(1): p. C76-81.
33. Ni, J., et al., *Aquaporin-1 plays an essential role in water permeability and ultrafiltration during peritoneal dialysis*. Kidney Int, 2006. **69**(9): p. 1518-25.
34. Zhang, W., et al., *Novel Endothelial Cell-Specific AQP1 Knockout Mice Confirm the Crucial Role of Endothelial AQP1 in Ultrafiltration during Peritoneal Dialysis*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0145513.
35. Vincent, J.L. and R. Moreno, *Clinical review: scoring systems in the critically ill*. Crit Care, 2010. **14**(2): p. 207.
36. Reed, A.M., et al., *Low extracellular pH induces damage in the pancreatic acinar cell by enhancing calcium signaling*. J Biol Chem, 2011. **286**(3): p. 1919-26.
37. Noble, M.D., et al., *A pH-sensitive, neurogenic pathway mediates disease severity in a model of post-ERCP pancreatitis*. Gut, 2008. **57**(11): p. 1566-71.
38. Bhoomagoud, M., et al., *Reducing extracellular pH sensitizes the acinar cell to secretagogue-induced pancreatitis responses in rats*. Gastroenterology, 2009. **137**(3): p. 1083-92.
39. Rumbus, Z., et al., *Bidirectional Relationship Between Reduced Blood pH and Acute Pancreatitis: A Translational Study of Their Noxious Combination*. Front Physiol, 2018. **9**: p. 1360.
40. Argent, B.E., et al., *Morphological, biochemical and secretory studies on rat pancreatic ducts maintained in tissue culture*. Q J Exp Physiol, 1986. **71**(4): p. 633-48.
41. Gout, J., et al., *Isolation and culture of mouse primary pancreatic acinar cells*. J Vis Exp, 2013(78).
42. Hegyi, P., et al., *Measurement of intracellular pH in pancreatic duct cells: a new method for calibrating the fluorescence data*. Pancreas, 2004. **28**(4): p. 427-34.
43. Hegyi, P., M.A. Gray, and B.E. Argent, *Substance P inhibits bicarbonate secretion from guinea pig pancreatic ducts by modulating an anion exchanger*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **285**(2): p. C268-76.
44. Fernandez-Salazar, M.P., et al., *Basolateral anion transport mechanisms underlying fluid secretion by mouse, rat and guinea-pig pancreatic ducts*. J Physiol, 2004. **556**(Pt 2): p. 415-28.
45. Balazs, A., et al., *Ductal Mucus Obstruction and Reduced Fluid Secretion Are Early Defects in Chronic Pancreatitis*. Front Physiol, 2018. **9**: p. 632.
46. Schatz, G., *The protein import system of mitochondria*. J Biol Chem, 1996. **271**(50): p. 31763-6.
47. Pfanner, N., *Mitochondrial import: crossing the aqueous intermembrane space*. Curr Biol, 1998. **8**(8): p. R262-5.
48. Rapaport, D., *Biogenesis of the mitochondrial TOM complex*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(4): p. 191-7.
49. Niederau, C., L.D. Ferrell, and J.H. Grendell, *Caerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin*. Gastroenterology, 1985. **88**(5 Pt 1): p. 1192-204.
50. Ding, S.P., J.C. Li, and C. Jin, *A mouse model of severe acute pancreatitis induced with caerulein and lipopolysaccharide*. World J Gastroenterol, 2003. **9**(3): p. 584-9.
51. Perides, G., et al., *Experimental acute biliary pancreatitis induced by retrograde infusion of bile acids into the mouse pancreatic duct*. Nat Protoc, 2010. **5**(2): p. 335-41.
52. Huang, W., et al., *Fatty acid ethyl ester synthase inhibition ameliorates ethanol-induced Ca²⁺-dependent mitochondrial dysfunction and acute pancreatitis*. Gut, 2014. **63**(8): p. 1313-24.
53. Kui, B., et al., *New insights into the methodology of L-arginine-induced acute pancreatitis*. PLoS One, 2015. **10**(2): p. e0117588.
54. Venglovecz, V., et al., *The Importance of Aquaporin 1 in Pancreatitis and Its Relation to the CFTR Cl(-) Channel*. Front Physiol, 2018. **9**: p. 854.

55. Galicek, J., F. Seow, and J.M. Lingard, *The effect of chronic acid/base disturbances on renal amino acid clearances in the rat*. Aust J Exp Biol Med Sci, 1981. **59**(4): p. 383-91.
56. Nowik, M., et al., *Induction of metabolic acidosis with ammonium chloride (NH₄Cl) in mice and rats--species differences and technical considerations*. Cell Physiol Biochem, 2010. **26**(6): p. 1059-72.
57. Hegyi, P. and O.H. Petersen, *The exocrine pancreas: the acinar-ductal tango in physiology and pathophysiology*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2013. **165**: p. 1-30.
58. Maleth, J. and P. Hegyi, *Ca²⁺ toxicity and mitochondrial damage in acute pancreatitis: translational overview*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2016. **371**(1700).
59. Maleth, J., et al., *Non-conjugated chenodeoxycholate induces severe mitochondrial damage and inhibits bicarbonate transport in pancreatic duct cells*. Gut, 2011. **60**(1): p. 136-8.
60. Judak, L., et al., *Ethanol and its non-oxidative metabolites profoundly inhibit CFTR function in pancreatic epithelial cells which is prevented by ATP supplementation*. Pflugers Arch, 2014. **466**(3): p. 549-62.
61. Odinkova, I.V., et al., *Mitochondrial mechanisms of death responses in pancreatitis*. J Gastroenterol Hepatol, 2008. **23 Suppl 1**: p. S25-30.
62. Gukovskaya, A.S., S.J. Pandol, and I. Gukovsky, *New insights into the pathways initiating and driving pancreatitis*. Curr Opin Gastroenterol, 2016.
63. Jourdain, P., et al., *The human CFTR protein expressed in CHO cells activates aquaporin-3 in a cAMP-dependent pathway: study by digital holographic microscopy*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 3): p. 546-56.
64. Nair, S. and C.S. Pitchumoni, *Diabetic ketoacidosis, hyperlipidemia, and acute pancreatitis: the enigmatic triangle*. Am J Gastroenterol, 1997. **92**(9): p. 1560-1.
65. Nair, S., D. Yadav, and C.S. Pitchumoni, *Association of diabetic ketoacidosis and acute pancreatitis: observations in 100 consecutive episodes of DKA*. Am J Gastroenterol, 2000. **95**(10): p. 2795-800.