

CALCIUM SZIGNALIZÁCIÓ SZEREPE A
GASZTROINTESTINÁLIS TRAKTUSBAN

Dr. Kemény Lajos

Ph.D. Tézis

Témavezetők: Dr. Venglovecz Viktória
Prof. Dr. Hegyi Péter

I. sz. Belgyógyászati Klinika
Általános Orvostudományi Kar
Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2014

A dolgozathoz kapcsolódó közlemények:

I. Kemény LV*, Schnúr A*, Czepán M, Rakonczay Z Jr, Gál E, Lonovics J, Lázár G, Simonka Z, Venglovecz V, Maléth J, Judák L, Németh IB, Szabó K, Almássy J, Virág L, Geisz A, Tizslavicz L, Yule DI, Wittmann T, Varró A, Hegyi P. Na⁺/Ca²⁺ exchangers regulate the migration and proliferation of human gastric myofibroblasts. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 305(8):G552-63. (2013) [IF: 3.737]

*Megosztott első szerzők.

II. József Maléth, Zsolt Balla, Balázs Kui, Anita Balázs, Máté Katona, Linda Judák, István Németh, Petra Pallagi, Lajos V. Kemény, Zoltán Rakonczay Jr., Viktória Venglovecz V., Imre Földesi, Zoltán Pető, Áron Somorácz, Katalin Borka, Doranda Perdomo, Gergely L.Lukacs, Mike A. Gray, Stefania Monterisi, Manuela Zaccolo, Matthias Sandler, Julia Mayerle, Jens-Peter Kühn, Markus M. Lerch, Miklós Sahin-Tóth, Péter Hegyi. Alcohol Disrupts Levels and Function of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator to Promote Development of Pancreatitis, *Gastroenterology*, (2014), Elfogadott közlemény (GASTRO-D-14-00547R1) [IF: 13.926]

III. Kemény LV, Hegyi P, Rakonczay Z Jr, Borka K, Korompay A, Gray MA, Argent BE, Venglovecz V. Substance P inhibits pancreatic ductal bicarbonate secretion via neurokinin receptors 2 and 3 in the guinea pig exocrine pancreas. *Pancreas.* 40(5):793-5. (2011) [IF: 2.386]

Közlemények száma	3
Kumulatív impakt faktor	20.049

Calcium szignalizáció szerepe a gasztrointesztinális traktusban

Bevezetés

A gasztrointesztinális rendszer élettanában kiemelt fontossággal bírnak a különböző ion transzporterek. Calcium csatornák és transzporterek a sejten belüli calcium szintjének szabályozásával számos szignalizációs úton keresztül befolyásolják a sejtek migrációját, proliferációját és túlélését, míg a HCO_3^- transzporterek az egyik legfontosabb szabályozó elemei a pankreász duktális sejteinek folyadék szekréciójának.

Célkitűzések

Munkacsoportunk célul tűzte ki a calcium transzporterek és calcium homeosztázis jelentőségének vizsgálatát humán gyomor miofibroblasztokban, a calcium transzporterek szerepének tanulmányozását a pankreász duktális epitelsejt sejteinek patofiziológiájában, valamint a pankreász duktális HCO_3^- szekréció calciumtól független neuroendokrin szabályozásának további jellemzését. Specifikus céljaink:

1. A humán gyomor miofibroblasztok calcium homeosztázisában szerepet játszó ion transzporter(ek) azonosítása, továbbá ezen ion transzporter(ek) szerepének vizsgálata a miofibroblasztok migrációjában és proliferációjában.
2. Az etanol egy non-oxidatív metabolitjának, a palmitoleinsavnak hosszan tartó calcium szint emelő hatásának vizsgálata pankreász duktális sejteiben, valamint a calcium szintet befolyásoló ion transzporterek azonosítása.
3. Tengerimalac pankreász neurokinin (NK) receptor altípusainak kifejeződésének vizsgálata, valamint a substance P bikarbonát szekréciót gátló hatását közvetítő NK altípusok azonosítása.

Anyagok és Módszerek

A miofibroblasztok izolálása az SZTE ÁOK Sebészeti Klinikáján gyomor rezekciós műtéten átesett betegek mintáiból történt. A miofibroblasztok fenotípusának jellemzése immuncitokémia és immunhisztokémia segítségével történt. A nátrium-calcium kicserélő kimutatása fehérje szinten immunfluoreszcens eljárással, RNS szinten reverz transzkripciót követő PCR segítségével történt. A miofibroblasztok proliferációjának vizsgálata EdU inkorporáció, migrációjának kvantifikálása karc-sebzést követő migráció mérésével történt.

4-8 hetes tengerimalacokból cervikális diszkolációt követően történt a pankreász elvátolítása, majd intra/interlobuláris duktuszok izolálása enzimatikus emésztést követően mikrodisszekcióval történt. A tengerimalac pankreászok neurokinin receptor expresszióját immunhisztokémiával vizsgáltuk.

A Capan-1 pankreász duktális sejtek intracelluláris calcium, a miofibroblasztok calcium és nátrium koncentrációjának, valamint a tengerimalac pankreász duktuszok intracelluláris pH-jának változását mikrofluorometriával detektáltuk. A duktuszok bikarbonát szekréciójának mérésére az ammonium-pulzus technikát használtuk.

Eredmények

I. Nátrium-calcium kicserélő szerepének vizsgálata a gyomor miofibroblasztok migrációjában és proliferációjában

1. Gasztrointesztinális rendszer különböző részeiből izolált fibroblasztok egy része spontán, nem szinkronizált calcium oszcillációkat végez.
2. Immuncitokémia segítségével megállapítottuk, hogy az izolált miofibroblasztok nem azonosak a gasztrointesztinális rendszerben megtalálható Cajal sejtekkel, mivel a Cajal sejt marker DOG1-et nem fejezik ki.
3. Az intracelluláris calcium oszcillációk az extracelluláris calciumtól és nátriumtól függenek.
4. A nátrium-calcium kicserélő mindhárom izoformája (NCX1, NCX2, NCX3) kifejeződik a gyomor miofibroblasztokban mind RNS, mind fehérje szinten.

5. NCX gátlószerek alkalmazása megszünteti a miofibroblasztok spontán oszcillációját.
6. NCX gátlószerek alkalmazása csökkenti a gyomor miofibroblasztok migrációját.
7. NCX gátlása csökkenti a gyomor miofibroblasztok proliferációját.

II. A palmitoleinsav tartós calcium szintet emelő hatásának vizsgálata

1. A palmitoleinsav az extracelluláris calcium beáramlásának elősegítésével és az endoplazmatikus reticulum kiürítésével emeli a pankreász duktális sejtek intracelluláris calcium szintjét.
2. A palmitoleinsav a plazma membrán calcium ATP-áz aktivitásának gátlásával is hozzájárul a calcium szint magas tartásához, mivel csökkenti a calcium kiáramlását a duktális sejtekből.

III. A substance P bikarbonát szekréciót gátló hatását közvetítő neurokinin receptorok vizsgálata

1. A NK2 és NK3 receptorok a pankreász duktuszok bazolaterális oldalán, míg az NK1 receptor a duktuszok lumenális oldalán fejeződik ki.
2. A substance P a NK2 és NK3 receptorokon keresztül gátolja a pankreász duktuszok bikarbonát szekrécióját.

Következtetések

A gasztrointesztinális rendszer számos különböző sejt típusában vizsgáltuk a calcium homeosztázis és ion transzporterek szerepét. Azonosítottuk a nátrium-calcium kicserélőt (NCX), mint a gyomor miofibroblasztok calcium homeosztázisának egyik kulcs transzporterét. Megállapítottuk, hogy az NCX gátlásával csökken a miofibroblasztok migrációja és proliferációja, így az NCX potenciális terápiás célpontként szolgálhat különböző hiperproliferatív gasztroenterológiai kórképekben. Továbbá kimutattuk, hogy az etanol egy non-oxidatív metabolitja, a palmitoleinsav az endoplazmatikus retikulum kiürítésével, az extracelluláris calcium beáramlásának fokozásával és a plazma membrán

calcium ATP-áz gátlásával tartja magasan a pankreász duktális epithel sejteinek calcium szintjét, potenciálisan hozzájárulva az epithelium alkohol indukált sejtkárosodáshoz és az alkoholos pankreátitiszhez. Valamint eredményeink hozzájárultak a fiziológias pankreász nedv elválasztás szabályozásának pontosabb megértéséhez, mivel azonosítottuk, hogy a substance P az NK2 és NK3 receptorokon keresztül gátolja a pankreász folyadék szekrécióját.