

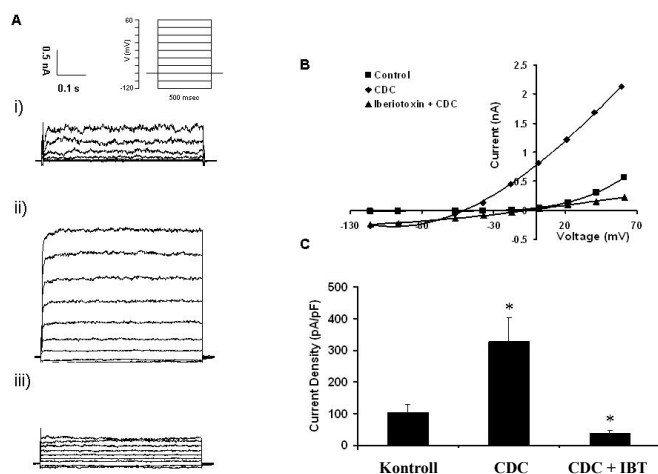
A pankreász duktális sejtek fő funkciója egy HCO_3^- -ban gazdag, izotónikus folyadék szekréciója, amely alapvető szerepet játszik az acinusok által termelt emésztőenzimek kimosásában illetve a gyomor felől érkező savas kémhatás neutralizálásában. Elégtelen vagy csökkent duktális ion- és folyadékszékrció a pankreász működésének zavaraihoz, illetve különböző betegségek (akut pankreatitisz, cisztás fibrózis) kialakulásához vezethet. Annak ellenére, hogy a duktális sejtek alapvető fontosságúak a normál környezet fenntartásában kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre a duktális sejtek működésére vonatkozóan fiziológiás és patofiziológiás körülmények között.

Ezért jelen projektben **célul** tűztük ki a pankreatitisz kiváltásában szerepet játszó etiológia faktor, az epe illetve a tripszin hatásának karakterizálását a duktális sejtekre ezen belül is elsősorban a HCO_3^- szekrécióra kifejtett hatásukat vizsgáltuk.

I. Epesavak hatásának karakterizálása a pankreász duktális sejtek működésére

Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy a duktális sejtek luminális membránja felől adott kenodezoxikólsav (CDC; 0.1 mM) fokozza a duktális sejtek bikarbonát szekrécióját az intracelluláris kalcium emelésén keresztül. Kísérleteink elsődleges célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy mely iontranszporterek, ioncsatornák vesznek részt ezen stimulált szekrécióban.

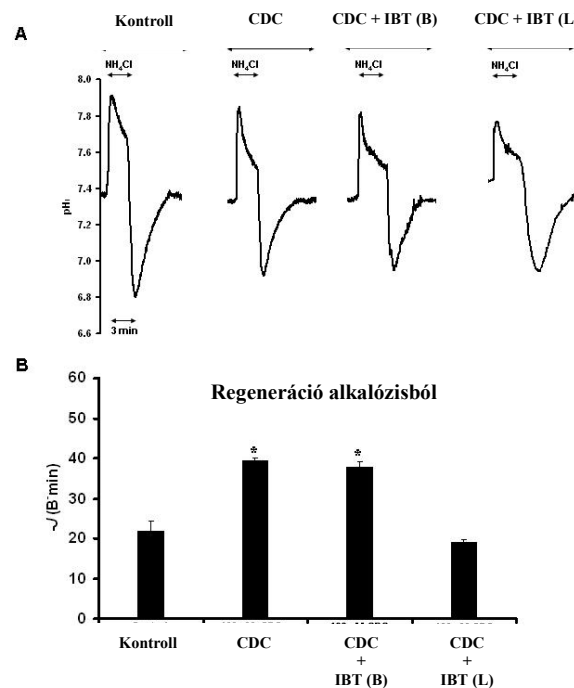
A patch clamp technika egész sejtek konfigurációjának felhasználásával kimutattuk, hogy 0.1 mM CDC hatására fokozódik a duktális sejteken keresztül folyó K^+ ionáramok nagysága. Különböző K^+ csatorna inhibitorok segítségével kimutattuk, hogy a CDC által aktiválta K^+ konduktancia, a nagy-konduktanciájú Ca^{2+} -aktiválta K^+ csatorna vagy más néven BK csatorna gátlószerevel, iberiotoxin-nal (IBT; 100 nM) teljes mértékben gátlható volt (1. ábra).



1. ábra. Az iberiotoxin hatása a nagy-konduktanciájú Ca^{2+} -aktiválta K^+ csatornákra. (A) Reprezentatív K^+ ionáramok a kezelés előtt (i), CDC-vel történő kezelést követően (ii) illetve iberiotoxin (IBT) (iii) jelenlétében. (B) Áram/feszültség (I/V) grafikon. A négyzet az alap áramot, a gyémánt a CDC-stimulált áramot, a háromszög pedig az IBT kezelést reprezentálja. (C) A CDC és IBT hatása + 60 mV-nál mért áram denzitásra. CDC: kenodezoxikólsav, IBT: iberiotoxin. *= $p \leq 0.05$ vs. Kontroll.

A következő lépésben megvizsgáltuk, hogy a CDC HCO_3^- szekréciót stimuláló hatása a BK csatornák aktiválásán keresztül valósul-e meg. Ehhez IBT (100 nM) jelenlétében vizsgáltuk a CDC szekréciót stimuláló hatását intakt pankreász duktuszokon a mikrofluorometriás technika felhasználásával. A bikarbonát szekréció nagyságára az alkalózisból történő regeneráció mértékéből következtettünk.

Eredményeink azt mutatták, hogy a bazális oldal felől adott IBT nem befolyásolta a CDC hatását, ezzel szemben, a lumenális oldal felől adva, teljes mértékben megszüntette a CDC HCO_3^- szekrécióra kifejtett stimuláló hatását (2. ábra). Továbbá kimutattuk, hogy a lumenális membrán felől adott IBT nem befolyásolja a szekretin-, lumenális ATP- vagy carbachol-indukálta HCO_3^- szekréciót. Eredményeink azt mutatják, hogy a BK csatornák aktivációja fontos szerepet játszik a CDC-stimulált szekrécióban illetve, hogy ezek a csatornák feltehetőleg a ductusok lumenális membránjára lokalizálódnak.



2. ábra. A lumenális membrán felől adott IBT gátolja a CDC szekréciót stimuláló hatását. (A) Reprezentatív pH görbék a kontroll, lumenálisan adott CDC, CDC + bazális IBT illetve CDC + lumenálisan adott IBT jelenlétében. (B) A HCO_3^- szekréció mértékét ($-J(\text{B min})$) az alkalózisból történő pH regeneráció mértékéből becsültük meg lineáris regressziós analízis segítségével. B: bazális, L: lumenális. $*=p \leq 0.05$ vs. Kontroll.

Mivel eredményeink azt sugallták, hogy a CDC-stimulálta szekréció a BK csatornák aktivációján keresztül valósul meg, feltételeztük, hogy a BK csatornák aktiválása egy farmakológiai vegyülettel, hasonlóképpen aktiválná a HCO_3^- szekréciót. Ehhez megvizsgáltuk egy specifikus BK csatornaaktiváló, NS11021 hatását a HCO_3^- szekrécióra az alkalózisból történő regeneráció vizsgálatával. A lumenális membrán felől adott $3 \mu\text{M}$ NS11021 fokozta a ductális HCO_3^- szekréciót, míg az NS11021 inaktív formája, az NS13558 nem befolyásolta a szekréció mértékét.

A következő lépésben immunhisztokémiai eljárással sikerült kimutatnunk a BK csatornák jelenlétét a ductális sejtek lumenális membránján, míg az acinusokban negatív festődést kaptunk. A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a CDC hatása az újonnan felfedezett epesav receptor, a Gpbar-1 közvetítésével valósul-e meg. A Gpbar-1 receptor ellen kifejlesztett ellenanyag pozitív festődést mutatott az acinusokban. A ductális sejtekben azonban nem sikerült ezen receptor jelenlétét kimutatnunk. Ezzel szemben reverz transzkripció PCR technikával sikerült kimutatnunk a az organikus anion transzporter-2 (Oatp-2) epesav transzporter jelenlétét tengerimalac pankréaszban illetve a fő pankréász vezetékben.

Végül pedig elektronmikroszkóp felhasználásával megvizsgáltuk, hogy az epesavas kezelés okoz-e morfológiai eltéréseket a pankréasz ductális sejtek sejtorganellumaiban vagy a

plazmamembrán integritásában. A pankreász duktuszok CDC-vel (0.1 mM) történő 10 perces inkubálása nem befolyásolta a sejten belüli organellumokat, morfológiai elváltozást nem tapasztaltunk

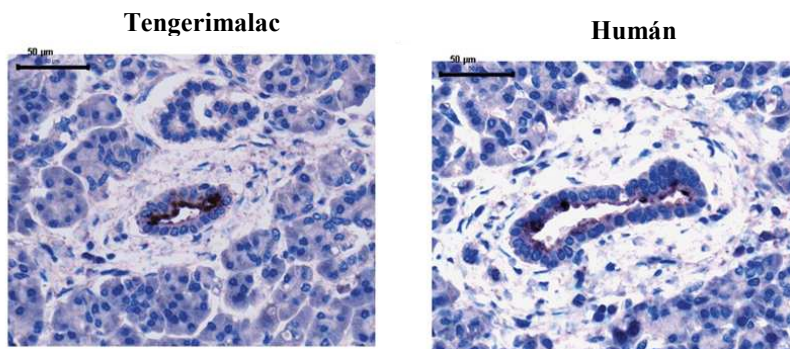
Eredményeink **összefoglalás**aként elmondhatjuk, hogy:

- 1.) Kimutattuk egy Ca^{2+} -aktiválta K^+ csatorna (BK) jelenlétét tengerimalac pankreász duktális sejtek lumenális membránján
- 2.) Megállapítottuk, hogy a BK csatornák alapvető szerepet játszanak a kis koncentrációban adott CDC duktális HCO_3^- szekréciót stimuláló hatásában
- 3.) A BK csatorna aktivátor, NS11021 stimulálta a duktális HCO_3^- szekréciót.

Hipotézisünk szerint a duktális HCO_3^- szekréció stimulációja védekező funkciót jelenthet a biliáris akut pankreatitisz kezdeti szakaszában azáltal, hogy kimossa a különböző toxikus faktorokat, így az epesavakat a duktális fából, megakadályozva ez által a pankreász károsodását. Eredményeink azt mutatják, hogy a BK csatornák aktivációja terápiás lehetőséget jelenthet az akut pankreatitisz kezelésében.

A tripszin hatásának karakterizálása a pankreász duktális sejtek működésére

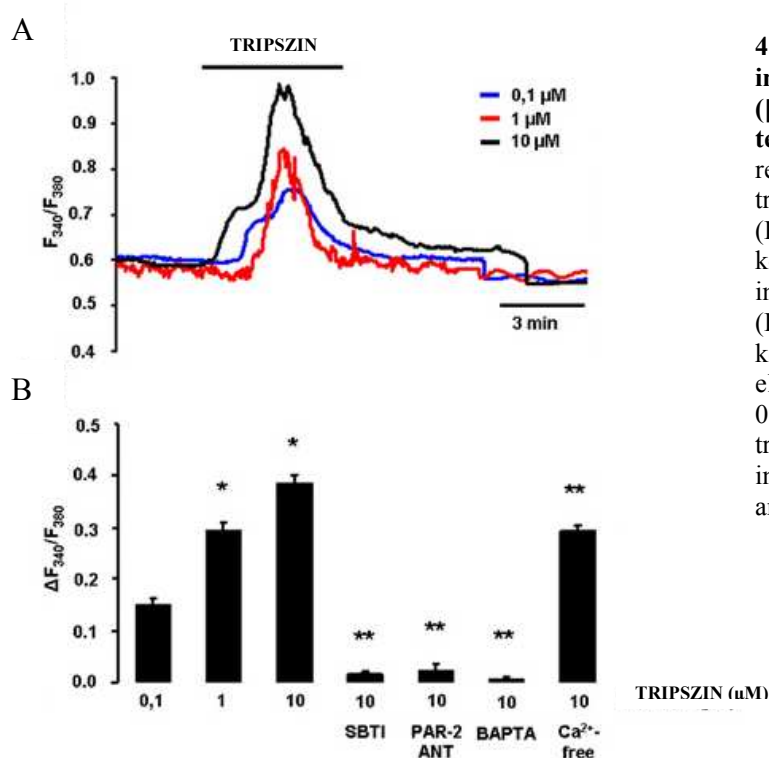
Első lépésben megvizsgáltuk, a PAR-2 receptor kifejeződését tengerimalac pankreász duktális sejtekben illetve humán pankreászban. Immunhisztokémiai módszer erőteljes PAR-2 festődést mutatott mind a tengerimalac pankreász duktuszokban. Az intra/interlobuláris duktuszok festődésének denzitometriás összehasonlítása nagy mennyiségű PAR-2 expressziót mutatott az intralobuláris duktuszokban, míg a nagyobb, interlobuláris duktuszokban alig volt detektálható ezen receptor kifejeződése. A humán pankreász immunhisztokémiai vizsgálata hasonló festődési mintázatot mutatott a tengerimalac pankreászához.



3. ábra. PAR-2 lokalizációja tengerimalac és humán pankreász duktuszokban. A PAR-2 receptor a kis méretű intra/interlobuláris duktuszok lumenális membránjára lokalizálódik. 400X-os nagyítás, vonalas mérték: 50 μm .

A következő kísérletsorozatban megvizsgáltuk a tripszin, a tripszin aktiváló peptid, PAR-2 AP, a tripszin agonista és antagonist (PAR-2-ANT) hatását a duktális sejtek intracelluláris kalcium szintjére és pH-jára. Kimutattuk, hogy a PAR-2-AP és a tripszin dózisfüggő intracelluláris kalcium szignalizációt indukál a tengerimalac pankreász duktuszokban. A lumenális membrán felől adott PAR-2-AP hatását (1, 10 és 100 μM) mind a PAR-2 antagonist (10 μM) mind pedig a kalcium kelátor BAPTA-AM (40 μM) teljes mértékben kivédte, míg az extracelluláris oldatból történő kalcium elvonása nem befolyásolta. A lumenális membrán felől adott tripszin (0.1, 1 and 10 μM) hatása megegyezett a PAR-2-AP hatásával. A tripszin generálta kalcium szignált mind a szójabab tripszin inhibitor (SBTI, 5 μM), mind a PAR-2-ANT (10 μM) mind pedig a BAPTA-AM (40 μM) előkezelés gátolta.

Ezen eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a tripszin intracelluláris kalcium koncentrációra ($[Ca^{2+}]_i$) kifejtett hatása a PAR-2 receptorok aktiválásán keresztül valósul meg (4. ábra).



4. ábra. A tripszin hatása az intracelluláris kalcium koncentrációra ($[Ca^{2+}]_i$) mikroperfundált tengerimalac duktuszokban. (A) A reprezentatív görbék 0,1, 1 illetve 10 μM tripszin hatását mutatják a $[Ca^{2+}]_i$ -re. A (B) ábrán látható a különböző koncentrációban adott tripszin, tripszin inhibitor (SBTI), tripszin antagonist (PAR-2 ANT), illetve a BAPTA-AM kezelés és az extracelluláris kalcium elvonás hatása a $[Ca^{2+}]_i$ -re. *= $p \leq 0.05$ vs. 0,1 μM tripszin, **= $p \leq 0.05$ vs. 10 μM tripszin. SBTI: szójabab tripszin inhibitor, PAR-2 ANT: PAR-2 antagonist.

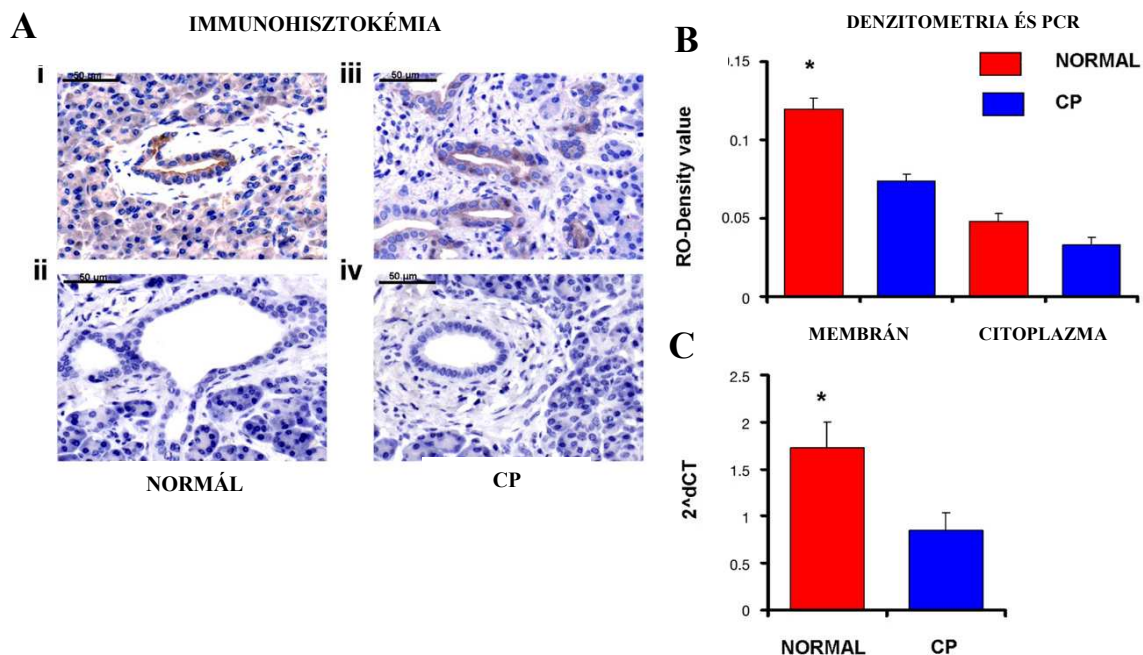
Az intracelluláris pH-ban (pH_i) bekövetkező változások detektálása a pH-függő fluoreszcens festék, BCECF-AM felhasználásával történt. A PAR-2-AP (10 μM) és a tripszin (10 μM) dózisfüggő alkalizációt indukál a duktális sejtekben. Ezen alkalizáció feltehetőleg az apikális membránon keresztüli bikarbonát kiáramlás gátlásán keresztül jön létre. A PDEC SBTI-vel (5 μM), PAR-2-ANT-val (10 μM) vagy BAPTA-AM-el (40 μM) történő előkezelése kivédte a tripszin ezen gátló hatását. Fontos megjegyezni, hogy a Cl^-/HCO_3^- kicserélőt gátló H_2DIDS adása illetve a Cl^- elvonása a külső oldatból csökkentette, de nem szüntette meg a tripszin hatását az intracelluláris pH_i -ra, amely arra utal, hogy a tripszin mind a Cl^- -függő mind pedig a Cl^- -független bikarbonát szekretáló mechanizmusokat gátolja.

A következőkben a patch clamp technika whole cell konfigurációjának a felhasználásával megvizsgáltuk, hogy a tripszin és a többi farmakológiai ágens hatását a CFTR Cl^- áramokra. A PAR-2-AP (10 μM) és a tripszin (10 μM) az alap CFTR áramokat nem, viszont a forskolin-aktiválta CFTR áramokat több mint 50%-al csökkentette. Mindkét esetben a gátlás irreverzibilis volt. SBTI-vel (5 μM) vagy PAR-2-ANT-val (10 μM) történő előkezelés teljesen megszüntette a tripszin ezen gátló hatását, amely arra utal, hogy a tripszin a CFTR Cl^- áramokat a PAR-2 receptor aktiválásán keresztül gátolja.

A következő lépésben megvizsgáltuk, hogy befolyásolja a duktális pH-ban bekövetkező változás a tripszinogén autoaktivációját. A tripszinogén autoaktivációját a pH csökkenés (8.5-ről 7-re) szignifikánsan megemelte. Ezt követően az autoaktiváció egy lassú csökkenést mutatott pH 7.0 és 6.0 között. Annak érdekében, hogy kizárjuk, hogy az autoaktivációban bekövetkező változás a pufferek különböző ionösszetételével magyarázható, megismételtük a

kísérletet 100mM NaCl-ot tartalmazó pufferben is. Bár a reakció összességében lassabban ment végbe NaCl jelenlétében, az autoaktiváció ugyanolyan pH függést mutatott.

Végül pedig megvizsgáltuk a PAR-2 jelenlétét krónikus pankreatitisz-ben. Az 5. ábrán látható, hogy krónikus pankreatitiszben csökkent mind fehérje mind pedig mRNA szinten a PAR-2 kifejeződése. A PAR-2 citoplazmába történő transzlokációban nem tapasztaltunk eltérést a normál és krónikus pankreatitiszben szenvedő betegekből vett szöveti mintákban.



5. ábra. PAR-2 kifejeződése normál és krónikus pankreatitiszben szenvedő betegek pankréaszában. Az (A) ábrán a normál (i és ii) illetve a krónikus pankreatitiszes (iii és iv) szövetminták immunohisztokémiai festése látható PAR-2 elsődleges ellenanyag jelenlétében (i és iii) illetve hiányában (ii és iv). (B) Relatív optikai denzitás. $*=p \leq 0.05$ vs. CP membrán. (C) ábrán a PAR-2 mRNA expressziójának analízise. $*=p \leq 0.05$ vs. CP. CP: krónikus pankreatitisz. Vonalas mérték: 50 μ m.

Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy a pankréasz duktális sejtek HCO_3^- szekréció alapvető szerepet játszik a tripszinogén autoaktivációjának a kivédésében. Azonban, ha a tripszin jelen van a duktális fában a duktális sejtek lumenális membránjára lokalizálódó PAR-2 receptorok aktiválódnak, amely intracelluláris kalcium felszabaduláshoz és megemelkedett intracelluláris kalcium szinthez vezet. Ezen folyamat gátlólag hat mind a lumenális anion kicserélőre mind pedig a CFTR Cl^- csatornára, amely a HCO_3^- szekréció csökkenését fogja eredményezni. A csökkent szekréció miatt egyrészt lassabban jutnak el a zimogének a duodénumba, másrészt az elégtelen HCO_3^- szekréció miatt lecsökken a duktális pH, amely elidítja a tripszinogén idő előtti autoaktivációját. A tripszinogén autoaktivációja pedig tovább gátolja az anion kicserélő működését beindítva ezáltal egy ördögi kör, amely végső soron a pankreatitisz kialakulásához vezet.