

Bevezetés

A hasnyálmirigy vezetéksejtek kb. 1,5 l HCO_3^- -ban gazdag folyadékot szekretálnak, melynek fő feladata, hogy kimossa az acinusok által termelt emésztőenzimeket a pankréasz duktális rendszeréből, illetve a duodenumba jutva semlegesítse a gyomornedv savas pH-ját (Steward és mtsai., 2005). A szekretált HCO_3^- legnagyobb része a vérből származik. A HCO_3^- a bazolaterálisan elhelyezkedő $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ kotranszporterén (NBC) keresztül jut a sejtbe. A HCO_3^- sejten belüli akkumulációjának másik lehetséges módja (mely lényegesen gyorsabb, de kisebb jelentőségű) a vérben oldott CO_2 passzív, sejtmembránon keresztüli diffúziója. A sejtbe bejutott CO_2 a szénsav-anhidráz enzim segítségével szénsavvá alakul, majd a keletkezett szénsav HCO_3^- -ra és protonra bomlik. Ezt követően a HCO_3^- az apikális oldalon elhelyezkedő $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ cserélőkön keresztül szekretálódik a lumenbe. A HCO_3^- szekréciónban kulcsfontosságú szerepet játszó apikális $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ cserélők az SLC26 transzporter család tagjai (**SLC26A3, DRA: down regulated in adenoma** és **SLC26A6, PAT-1: putative anion transporter 1**). A HCO_3^- szekréción másik fontos transzportere a cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor Cl^- csatorna (CFTR), amely az SLC26 transzporterekhez hasonlóan a luminális membránon helyezkedik el. A HCO_3^- szekréción pontos mechanizmusa ugyan nem ismert, az azonban biztos, hogy a CFTR fontos szerepet játszik a folyamatban és az apikális membránon történő elhelyezkedése nagyon fontos. A **Na^+/H^+ cserélő regulátor faktor 1 (NHERF-1)** felelős egy több fehérjéből álló komplex kialakításáért, amely biztosítja a CFTR apikális membránban való lokalizációját. A NHERF-1 szerepét a pankréaszban még nem vizsgálták, ennek ellenére az biztos, hogy a HCO_3^- szekréciónban kulcs fontosságú CFTR-t szabályozza ez a citoszolikus adaptor fehérje. Mindezek alapján az eredeti munkatervtől eltérően a NHERF-1 szerepét vizsgáltuk a pankréasz HCO_3^- és folyadék szekréciónjában a DRA helyett, mivel a DRA génkiütött (KO) egerek nem voltak sokáig életképesek, születésük után 2-3 héttel elpusztultak.

A CFTR-nak fontos szerepe van az akut hasnyálmirigy gyulladás kialakulásában is (Cavestro és mtsai., 2010, Hegyi és mtsai., 2011). Az akut hasnyálmirigy gyulladás fő kórokai közé tartoznak az epekövesség és a túlzott mértékű alkoholfogyasztás (Pandol és mtsai., 2007). A specifikus és nem specifikus gyulladásos reakciók mellett, a pankréasz által termelt tripszinogén korai, sejten, illetve szöveten belüli aktivációja figyelhető meg (Hofbauer és mtsai., 1998; Saluja és mtsai., 1997). Az enzimaktivációval párhuzamosan a pankréaszban aktiválódik a NF- κ B transzkripcións faktor is (Rakonczay és mtsai., 2008), mely számos pro-inflammatorikus gén kifejeződéséért felelős.

Eredmények

1. mRNS expresszió vizsgálata egér hasnyálmirigy vezetéksejtekben

Vad típusú (VT) egerekből (n=6) izolált duktuszokban megvizsgáltuk a CFTR, a DRA, a PAT-1, a NHERF-1, NHERF-2 és NHERF-3 mRNS expresszióját. Az izolált duktuszokban mind a NHERF-3 kivételével mindegyik mRNS expressziója kimutatható volt. Meglepő módon a legnagyobb mennyiségben a NHERF-1 volt megfigyelhető (kb. tízszer több, mint a CFTR).

2. CFTR lokalizációjának vizsgálata

Immunhisztokémiai eljárással meghatároztuk a CFTR expresszióját VT és NHERF-1 KO egerek hasnyálmirigyében. Kísérleteink során kimutattuk, hogy a VT egerekben a CFTR nagyrészt a hasnyálmirigy vezetéksejtek apikális membránjára lokalizálódott. Ezzel ellentétben a NHERF-1 KO egerekben a CFTR mennyisége az apikális membránban csökkent, festődése sokkal diffúzabb volt.

3. Fiziológiai vizsgálatok

a. Duktális HCO_3^- szekréció vizsgálata

A kísérletek megkezdése előtt a korábban tengerimalacra alkalmazott hasnyálmirigy duktusz izolálási eljárást optimalizáltuk egér hasnyálmirigyre. Kísérleteink során meghatároztuk az egér hasnyálmirigy vezetéksejtek kezdő intracelluláris pH (pH_i) és puffer kapacitás (β) értékét mikrofluorometriás módszerrel BCECF fluoreszcens festék segítségével. PAT-1 egerek esetében a kezdő pH_i érték standard HEPES oldatban 7.31 ± 0.01 a VT és 7.29 ± 0.03 a PAT-1 KO egerekben. A NHERF-1 egerek esetében HEPES oldatban végzett kísérletekben kimutattuk, hogy a kezdő pH_i érték 7.39 ± 0.02 (n=4) a NHERF-1 KO állatokban, és nem volt szignifikáns különbség megfigyelhető a VT egerek esetében (7.43 ± 0.02 , n=4) a NHERF-1 KO állatokhoz képest.

A pufferkapacitás értékekben sem volt szignifikáns eltérés a VT (149 ± 20 mM/pH egység) és a NHERF-1 KO (158 ± 16 mM/pH egység) egerek esetében 6.5 - 7.3 pH_i tartományban.

Az apikális membránon történő HCO_3^- szekréció vizsgálatára 3 módszert használtunk:

1. Az **inhibitor stop metodika** során a HCO_3^- akkumulációjában szerepet játszó bazolaterális transzportereket, a Na^+/H^+ cserélőt (NHE) illetve a NBC-t, 0,2 mM amilorid, valamint 0,2 mM H_2DIDS 5 percen át történő adásával gátoltuk. Ezen technika segítségével kimutattuk, hogy mind a 3 gén (CFTR, PAT-1, illetve NHERF-1) hiánya esetén szignifikánsan csökkent az apikális membránon történő HCO_3^- szekréció a VT állatokban mért értékekhez képest.
2. Az **alkalózisból történő regenerációs** kísérletekben a ductuszokat 3 percig 20 mM NH_4Cl -tartalmú $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ oldattal perfundáltuk. Kimutattuk, hogy az alkalózisból való regeneráció a PAT-1, a CFTR, illetve a NHERF-1 KO egerekben is szignifikánsan kisebb volt a VT állatokhoz képest, amiből arra következtethetünk, hogy a HCO_3^- szekréció mértéke kisebb a PAT-1 és NHERF-1 KO állatokban a VT egerekhez képest.
3. A **Cl^- elvonásos technika** során optimalizáltuk a korábban tengerimalacra beállított mikroperfúziós technikát (Hegyi és mtsai., 2005). A Cl^- luminalis oldalról történő elvonása leállítja, majd megfordítja az anion cserélők működését. Az alkalózis mértékéből következtethetünk a luminális anion cserélő aktivitására. Hasonlóan a korábbi 2 metodikánál kapott eredményekhez, a NHERF-1 KO egerekben szignifikánsan alacsonyabb volt az alkalózis mértéke, tehát a HCO_3^- szekréció a VT állatokhoz képest. Mindezen eredményeket figyelembe véve megállapíthatjuk, hogy az általunk vizsgált fehérjék (**CFTR, PAT-1 és NHERF-1**) **genetikai deléciója szignifikáns csökkenést okoz a pankreász ductális HCO_3^- szekréciójában.**

b. Folyadék szekréció vizsgálata

Az *in vitro* kísérletekhez az izolált ductuszokat egy éjszakán át inkubáltuk, majd ezt követően használtuk fel őket. Az inkubálás alatt a két végük leforrt. Az így kialakult zárt belső térbe történő folyadékszékreció mértékét video mikroszkópia segítségével vizsgáltuk (Fernandez-Salazar és mtsai., 2004). A kísérlet elején a sejteket standard HEPES oldattal perfundáltuk, majd a folyadékot standard $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ oldatra cseréltük. Ennek során nem volt megfigyelhető belső térfogat növekedés HCO_3^- oldatban sem a VT sem a CFTR, PAT-1 vagy NHERF-1 KO egerekben. A ductuszokat ezután 5 μM forskolinral stimuláltuk, aminek hatására fokozatos térfogatonövekedéssel („hízással”) válaszoltak a VT típusú állatból izolált ductuszok, ami a zárt térbe történő folyadék szekrécióval magyarázható. Ezzel ellentétben a CFTR, PAT-1 vagy NHERF-1 KO egerekből izolált ductuszok esetében ez a gyors hízás nem

volt megfigyelhető. Összességében tehát elmondható, hogy **a folyadék szekréció mértéke is szignifikánsan kisebb a CFTR, PAT-1 és NHERF-1 KO állatokban.**

A továbbiakban *in vivo* folyadékszékreciós kísérleteket végeztünk uretánnal (1,5 g/kg i.p.) altatott VT és NHERF-1 KO egereken. Kísérleteink során a VT állatokban az alap szekréció $0,12 \pm 0,02$ $\mu\text{l}/\text{óra}/\text{g}$ testtömeg volt, NHERF-1 KO egerekben nem sikerült detektálni. Intravénás (i.v.) szekretin (0,75 CU/kg) adagolása után kb. négyszeresére ($0,52 \pm 0,02$ $\mu\text{l}/\text{óra}/\text{g}$ testsúly) nőtt a szekretált hasnyálmirigy nedv mennyisége VT állatokban, míg a NHERF-1 KO egerekben $0,17 \pm 0,01$ $\mu\text{l}/\text{óra}/\text{g}$ testtömeg mértékű szekréció volt megfigyelhető. **A folyadék szekréció mértéke tehát szignifikánsan kisebb a NHERF-1 KO állatokban a VT egerkhez képest, mind nyugalmi, mind szekretin-stimulált állapotban.**

4. Patofiziológiai vizsgálatok

a. A HCO_3^- és folyadék szekréció vizsgálata ceruleinrel-kezelt (akut pankreatitiszes) VT és CFTR KO egerekben

VT és CFTR KO egerekben 8, óránkénti cerulein injekcióval (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per injekció) akut pankreatitist váltottuk ki. A kontroll állatok cerulein helyett fiziológiás sóoldatot kaptak. Az állatokat az első injekció után 9 órával feláldoztuk, és intra-, ill. interlobuláris duktuszokat izoláltunk, majd egy éjszakán át tartó inkubáció után használtuk fel őket a kísérletekhez.

A HCO_3^- szekréciót **inhibitor stop methodika** segítségével vizsgáltuk a fentebb leírt módon. Ezen technika segítségével kimutattuk, hogy HCO_3^- szekréció mértéke szignifikánsan alacsonyabb a pankreatitiszes állatokból izolált duktuszokban a kontroll egerekhez képest, ugyanakkor nem volt szignifikáns különbség megfigyelhető a ceruleinrel-kezelt VT és CFTR KO egerek között.

Az *in vitro* folyadék szekréciót **videó mikroszkópiával** vizsgáltuk a fent leírt módon. Habár ezekben a kísérletekben nem volt kimutatható szignifikáns különbség a ceruleinrel-kezelt VT és CFTR KO állatok között, a forskolin stimulációra bekövetkező folyadék szekréció kis mértékben nagyobb volt a ceruleinrel-kezelt VT állatokban a CFTR KO-hoz képest.

b. A cerulein-indukálta akut pankreatitisz súlyosabb NHERF-1 KO egerekben a VT-hoz képest

VT és NHERF-1 KO egerekben 10, óránkénti cerulein injekcióval (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per injekció) akut pankreatitist váltottuk ki. A kontroll állatok fiziológiás sóoldatot kaptak

cerulein helyett. Az állatokat az első injekció után 12 órával feláldoztuk. Hisztológiai vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a fizioiógias sóoldattal oltott állatok pankreászában patológiás elváltozás nem volt megfigyelhető. Ezzel szemben a cerulein kezelés komoly acinus sejt károsodást okozott mind a VT, mind a NHERF-1 KO egerkben. A nekrozis mértéke szignifikánsan nagyobb volt a ceruleinnel kezelt NHERF-1 KO ($49 \pm 5,5$ %) egerekben a VT-hoz ($27 \pm 3\%$) képest. A nekrozishoz hasonlóan az apoptózis ráta NHERF-1 KO egerekben szignifikánsan magasabb (189 ± 54 sejt/mm²) volt a VT állatokhoz képest (114 ± 10 sejt/mm²). Nem volt megfigyelhető szignifikáns különbség a cerueinnel-kezelt VT és NHERF-1 KO állatok között az intersticiális ödéma ($2,0 \pm 0,11$, VT és $2,2 \pm 0,2$, KO) és a leukocita infiltráció mértékében ($1,72 \pm 0,08$ VT és $1,95 \pm 0,13$ KO; $P=0,08$).

Egyik laborparaméter értékben sem volt szignifikáns különbség a kontroll (fizioiógias sóoldattal kezelt) VT és NHERF-1 KO állatok között, kivéve a I κ B- β expressziót, ahol a NHERF-1 KO állatban szignifikánsan magasabb I κ B- β szintet detektáltunk a VT-hoz képest.

A szérum amiláz aktivitás szignifikáns mértékben megemelkedett a ceruleinnel-kezelt (VT: 27000 ± 1100 U/l és NHERF-1 KO: 36000 ± 3400 U/l) állatokban a kontroll-hoz (VT 2700 ± 235 U/l és NHERF-1 KO: 2400 ± 480 U/l) képest, valamint szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető a szérum amiláz aktivitásban a ceruleinnel-kezelt NHERF-1 KO egerekben a VT-hoz képest.

A pankreász tömeg/testtömeg hányados (pt/tt) és a mieloperoxidáz (MPO) aktivitás értéke szignifikánsan nőtt a ceruleinnel-kezelt csoportokban (pt/tt: $1,39 \pm 0,05$ VT és $1,32 \pm 0,06$ NHERF-1 KO; MPO: $13,22 \pm 4,1$ U/mg fehérje/perc VT és $16,54 \pm 3,35$ U/mg fehérje/perc NHERF-1 KO) a kontrollhoz képest (pt/tt: $0,75 \pm 0,04$ VT és $0,7 \pm 0,06$ NHERF-1 KO; MPO: $1,29 \pm 0,18$ U/mg fehérje/perc VT és $1,77 \pm 0,41$ U/mg fehérje/perc NHERF-1 KO), de nem volt szignifikáns változás a ceruleinnel-kezelt VT és NHERF-1 KO egerk között.

A pankreatikus tripszin aktivitás és az I κ B- α és I κ B- β szint vizsgálatához 1×50 μ g/kg ceruleinnel oltottuk be az állatokat, majd fél óra múlva feláldoztuk. A tripszin aktivitás szignifikáns mértékben megemelkedett a ceruleinnel-kezelt ($69 \pm 20,5$ pmol/mg fehérje VT és $66 \pm 19,1$ pmol/mg fehérje NHERF-1 KO) állatokban a kontroll-hoz ($14 \pm 2,5$ pmol/mg fehérje VT és $15 \pm 2,4$ pmol/mg fehérje NHERF-1 KO) képest, azonban nem volt szignifikáns különbség megfigyelhető a tripszin aktivitásban a ceruleinnel-kezelt NHERF-1 KO egerekben a VT-hoz képest. **Mindez azt mutatja, hogy az NHERF-1 expresszió nem befolyásolja a tripszinogén aktivációját.** Hasonló eredményt kaptunk az interleukin (IL1)- β esetében is.

Az I κ B- α szintek szignifikáns mértékben csökkentek a ceruleinrel-kezelt ($3,2 \pm 1,3$ tetszőleges egység VT és $11,1 \pm 0,5$ tetszőleges egység NHERF-1 KO) állatokban a kontrollhoz ($10,1 \pm 2,6$ tetszőleges egység VT és $11,1 \pm 0,4$ tetszőleges egység NHERF-1 KO) képest, azonban nem volt szignifikáns különbség megfigyelhető az I κ B- α szintben a ceruleinrel-kezelt NHERF-1 KO és VT egerek között. Hasonló eredményt kaptunk az I κ B- β expresszió esetében is. Az I κ B fehérjék degradációjának mértékéből az NF- κ B aktiváció mértékére következtethetünk. **Megállapíthatjuk tehát, hogy az NHERF-1 expresszió nem befolyásolja az NF- κ B aktivációt.**

Végül megvizsgáltuk az acinus sejtek cerulein (10^{-8} - 10^{-12} M) érzékenységét, hogy kizárjuk a NHERF-1 génkiütése lehetséges szerepét a CCK receptorok funkciójára. Kísérleteink során bebizonyítottuk, hogy az acinus sejtek amiláz szekréciójának mértékében nem volt különbség VT és NHERF-1 KO egerek között cerulein kezelést követően.

Összességében ezek az adatok azt mutatják, hogy a CCK receptor funkciójára nincsen hatással a NHERF-1 fehérje, illetve a korai tripszinogén és NF- κ B aktivációban sincsen különbség a VT és NHERF-1 KO állatokban.

c. A 4%-os Na-taurokólsav intraduktális adagolása nagyobb fokú acinus sejt nekrozist okozott NHERF-1 KO egerekben

A cerulein modell-specifikus hatását kizárandó megvizsgáltuk még egy akut nekrotizáló pankreatitisz modell súlyosságát is VT és NHERF-1 KO egereken. A fizioiógias sóoldat (50 μ l/5 perc) intraduktális infúziója enyhe fokú ödémát és gyulladásoos sejtes beszűródést okozott a hasnyálmirigy feji részében. A hasnyálmirigy farkában nem okozott lényegi eltérést. Ezzel ellentétben a 4%-os Na-taurokólsav (TC) (50 μ l/5 perc) adása akut nekrotizáló hasnyálmirigy gyulladást eredményezett a pankreász feji részében, míg a farki rész itt is megkímélt volt. A későbbi vizsgálatokhoz ezért csak a feji részt használtuk. Az állatokat a fizioiógias sóoldat vagy TC adása után 24 órával áldoztuk fel. A hisztológiai vizsgálatokban a fizioiógias sóoldattal intraduktálisán oltott állatokban nem láttunk nekrozist, azonban a gyulladásoos sejtes beszűródés mértéke szignifikánsan magasabb volt a NHERF-1 KO egerekben ($1,6 \pm 0,36$) a VT-hoz ($0,8 \pm 0,3$) képest. Ezzel szemben a TC kezelés komoly acinus sejt nekrozist okozott mind a VT, mind a NHERF-1 KO egerekben. A nekrozis mértéke szignifikánsan nagyobb volt a TC-vel kezelt NHERF-1 KO (47 ± 5 %) egerekben a VT-hoz (24 ± 9 %) képest.

Egyik laborparaméter értékben sem volt szignifikáns különbség a kontroll (fizioiógias sóoldattal infundált) VT és NHERF-1 KO állatok között. A szérúm amiláz aktivitás

szignifikáns mértékben megemelkedett a TC-vel kezelt (22300 ± 3400 U/l VT és 24280 ± 4450 U/l NHERF-1 KO) állatokban a kontrollhoz (2410 ± 60 U/l VT és 3120 ± 170 U/l NHERF-1 KO) képest, de nem volt szignifikáns különbség a szérum amiláz aktivitásban a TC-vel kezelt NHERF-1 KO egerekben a VT-hoz képest.

A pankreatikus MPO aktivitás szignifikánsan megemelkedett a TC-vel kezelt NHERF-1 KO ($9,34 \pm 1,29$ U/mg fehérje/perc) állatokban a NHERF-1 KO kontrollhoz ($4,72 \pm 1,05$ U/mg fehérje/perc), valamint a TC-vel kezelt VT-hoz ($5,75 \pm 1,22$ U/mg fehérje/perc) képest.

A pankreatikus IL-1 β expressziója szignifikánsan megemelkedett a TC-vel kezelt (184 ± 51 VT és 231 ± 103 NHERF-1 KO) állatokban a kontrollhoz ($23,2 \pm 5,59$ VT és $47,9 \pm 13,4$ NHERF-1 KO) képest, de nem volt szignifikáns különbség a IL-1 β szintben a TC-vel kezelt NHERF-1 KO egerekben a VT-hoz képest.

Fenti eredményeinket összegezve elmondhatjuk, hogy a NHERF-1 expresszióknak jelentős fokú védő hatása van az acinus sejtek nekrozisával szemben.

Összefoglalás

Kutatásaink során összességében fontos élettani és kóreltani információkat szereztünk a CFTR, az SCL26A6 (PAT-1) és a NHERF-1 hasnyálmirigy duktális epitél sejtek HCO₃⁻ és folyadék szekréciójában betöltött szerepéről. A CFTR, PAT-1 és NHERF-1 csökkent expressziója a pankreász vezetéksejtek HCO₃⁻ és folyadék szekréciójának a csökkenéséhez vezet egér pankreászban. A NHERF-1 központi szerepet játszik a CFTR apikális membránba való kijutásában, és biztosítja a CFTR apikális membránban való lokalizációját. Kimutattuk azt is, hogy a NHERF-1 génkiütött egerekben az akut hasnyálmirigygyulladás (főleg az acinus sejtek károsodása) két modellben is súlyosabb volt a vad-típusú állatokhoz képest. Az *in vivo* adatok alátámasztják, hogy a pankreász duktális sejteknek fontos szerepük van az akut pankreatitisz patogenezisében. Végző soron eredményeink utat nyithatnak egy új terápiás lehetőség felé (duktális szekréció fokozása) a pankeász gyulladós megbetegedéseinek kezelésében.

Referenciák

Cavestro GM, Zupardo RA, Bertolini S, Sereni G, Frulloni L, Okolicsanyi S, Calzolari C, Singh SK, Sianesi M, Del Rio P, Leandro G, Franze A, Di Mario F. Connections between

genetics and clinical data: Role of MCP-1, CFTR, and SPINK-1 in the setting of acute, acute recurrent, and chronic pancreatitis. *Am J Gastroenterol.* 2010; 105:199-206.

Hegyi P, Ordog B, Rakonczai Z, Jr., Takacs T, Lonovics J, Szabolcs A, Sari R, Toth A, Papp JG, Varro A, Kovacs MK, Gray MA, Argent BE, Boldogkoi Z. Effect of herpesvirus infection on pancreatic duct cell secretion. *World J Gastroenterol.* 2005; 11:5997-6002.

Hegyi P, Pandol S, Venglovecz V, Rakonczay Z Jr. The acinar-ductal tango in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gut.* 2011; 60:544-552.

Hofbauer B, Saluja AK, Lerch MM, Bhagat L, Bhatia M, Lee HS, Frossard JL, Adler G, Steer ML. Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1998; 275:G352-G362.

Fernández-Salazar MP, Pascua P, Calvo JJ, López MA, Case RM, Steward MC, San Román JI. Basolateral anion transport mechanisms underlying fluid secretion by mouse, rat and guineapig pancreatic ducts. *J Physiol.* 2004; 556: 415–428.

Pandol SJ, Saluja AK, Imrie CW, Banks PA. Acute pancreatitis: bench to the bedside. *Gastroenterology.* 2007; 132: 1127-1151.

Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Takács T, McCarroll J, Saluja AK. The role of NF- κ B activation in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gut.* 2008; 57: 259-67.

Steward MC, Ishiguro H, Case RM. Mechanisms of bicarbonate secretion in the pancreatic duct. *Annu Rev Physiol.* 2005;67:377-409.

Saluja AK, Donovan EA, Yamanaka K, Yamaguchi Y, Hofbauer B, Steer ML. Cerulein-induced in vitro activation of trypsinogen in rat pancreatic acini is mediated by cathepsin B. *Gastroenterology.* 1997; 113:304-10.