

A NEM-KONJUGÁLT EPESAVAK GÁTOLJÁK A KOLON EPITÉL SEJTEK SAV-BÁZIS TRANSPORTEREINEK AKTIVITÁSÁT



GÁL ELEONÓRA

I.sz. Belgyógyászati Klinika
Pancreas munkacsoport:
Pallagi-Kunstár Éva
Prof. Hegyi Péter

Biológia BSC III. évfolyam
Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatika Kar
2012.

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések a dolgozatban	4
Absztrakt	5
Bevezetés	6
<i>A vastagbél epitélsejtek iontranszporterei</i>	<i>8</i>
<i>Epesavak</i>	<i>10</i>
Célkitűzés	11
Anyagok és módszerek	12
<i>Etikai megfontolások</i>	<i>12</i>
<i>Humán beválasztás</i>	<i>12</i>
<i>Kolon kripták izolálása</i>	<i>13</i>
<i>Kísérletben felhasznált anyagok és oldatok.....</i>	<i>14</i>
Módszerek	14
<i>Az intracelluláris pH (pH_i), Ca^{2+} - koncentráció ($[Ca^{2+}]_i$) és az ATP-szint (ATP_i) meghatározása mikrofluorometriás módszerrel</i>	<i>14</i>
<i>A kolon epitél sejtek sav/bázis transzportereinek aktivitás-mérése</i>	<i>16</i>
<i>Morfológiai változások nyomon követése</i>	<i>17</i>
<i>A mitokondrium transzmembrán potenciál (MTP) vizsgálata</i>	<i>17</i>
<i>Statisztikai analízis</i>	<i>17</i>

Eredmények	18
<i>Akut CDC kezelés gátolja az ion transzporterek aktivitását</i>	18
<i>Krónikus epesavterhelés csökkenti a kolon kripták iontranszportereinek aktivitását</i>	21
<i>A CDC koncentráció – függően emeli az $[Ca^{2+}]_i$</i>	23
<i>Nagy koncentrációjú (1 mM) CDC mitokondrium – károsodást okoz</i>	25
<i>A CDC kezelés jelentősen csökkentette az ATP_i szintet</i>	26
<i>Az epesav csökkenti a mitokondrium transzmembrán potenciát</i>	27
<i>Az ATP_i szint csökkentése mimikája a CDC sav/bázis transzporterekre gyakorolt gátló hatását</i>	28
 Összefoglalás, Konklúzió	 30
 Nyilatkozat	 36
 Irodalomjegyzék	 37
 Köszönetnyilvánítás	 38

Rövidítések a dolgozatban

AE: Cl⁻/HCO₃⁻ cserélő (Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger)

BCECF: 2',7'-bis-(2-karboxietil)-5(6)-karoxyfluoreszcein-acetoximetilészter

CDC: kenodezoxikólsav

DMEM: Dulbecco's modified eagle's medium

DMSO: dimetil szulfoxid

FBS: Fetal bovine serum (borjúsérum)

GCDC: glikokenodezoxikólsav

HBSS: Hank's balanced salt solution

HOE-642: 4-izopropil-3-metilszulfonilbenzoi-guanidin metánszulfonát

MTP: mitokondrium transzmembrán potenciál

NHE: Na⁺/H⁺ cserélő (Na⁺/H⁺ exchanger)

pH_i: intracelluláris pH

ROI: Region of interest

Absztrakt

Bevezetés, célkitűzés: Az elektroneutrális NaCl felszívásért a kolonban a Na^+/H^+ (NHE) cserélők és a Cl/HCO_3^- cserélő (AE) együttes működése felelős. Ezen iontranszporterek károsodott működése hozzájárul a különböző hasmenéssel járó betegségek megjelenéséhez. Ismert továbbá, hogy ha az epesavak nagy koncentrációban jutnak a kolonba (pl. ileum-rezekció, kolecisztektómia esetén) az krónikus hasmenés kialakulásához vezethet. **Célul** tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az epesavak kolon epitél sejtek ion-transzport mechanizmusára gyakorolt hatását.

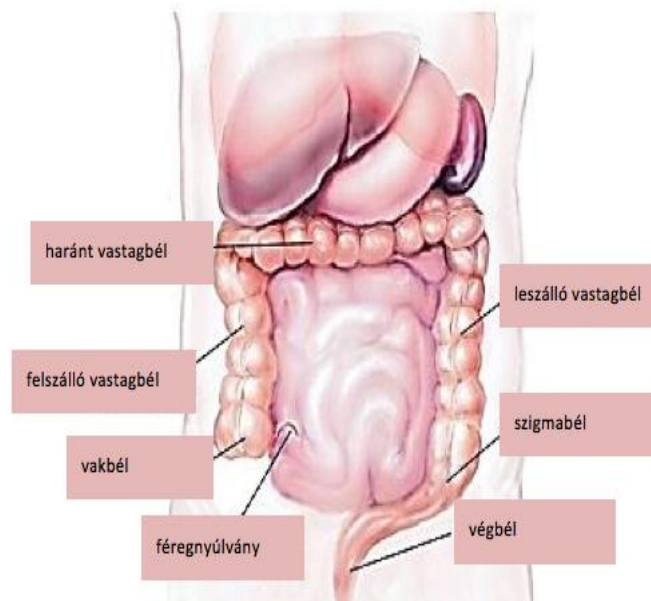
Metodika: Humán biopsziás mintából kollegenázos emésztéssel kolon kriptákat izoláltunk, majd mikrofluorimetriás módszerrel intracelluláris pH-t (pH_i) és ATP-t (ATP_i) mértünk. Az NHEk és az AE aktivitásait az extracelluláris folyadék ionkoncentrációjának változásával mértük. Konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk a mitokondrium transzmembrán potenciál (MTP) változását. Transzmissziós elektronmikroszkóppal morfológiai vizsgálatokat végeztünk. Az epesavak közül a nem-konjugált kenodezoxikólsavat (CDC) és a konjugált glikokenodezoxikólsavat (GCDC) használtuk (0,1-1mM).

Eredmények: A colon epitél sejtekben 0,3 mM CDC szignifikánsan gátolta a vizsgált ion transzporterek aktivitását. 0,3 mM és 1 mM CDC irreverzibilis ATP_i csökkenést okozott. 1 mM CDC súlyos mitokondrium-károsodást idézett elő, mely nem volt megfigyelhető alacsonyabb koncentrációjú CDC vagy GCDC esetén. A CDC minden koncentrációban MTP csökkenést váltott ki. Szignifikánsan alacsonyabb NHE és AE aktivitásokat figyeltünk meg ileum-rezekált/kolecisztektomizált hasmenéses betegeknél.

Konklúzió: A humán kolon epitél sejtekben a nem-konjugált CDC ATP-szint csökkenését és mitokondriális károsodást okoz, valamint gátolja a sav/bázis transzporterek aktivitását. Ezek a káros folyamatok csökkenthetik a vastagbél folyadék és elektrolit-felszívását és hozzájárulhatnak a krónikus hasmenés kialakulásához.

Bevezetés

A vastagbél a gasztrointesztinális traktus utolsó, a csípőbélből a végbélig terjedő kb. 1,5 m hosszú szakasza. A vakbelet (coecum) a hasüreg jobb oldalán elhelyezkedő felszálló (ascendens) szakasz, azt pedig a keresztbe futó haránt (transversum) vastagbél követi. Ez a hasüreg bal oldalán lefelé haladó leszálló (descendens) vastagbél szakaszban folytatódik, amit a szigmabél és a végbél (rectum) követ (1. ábra).



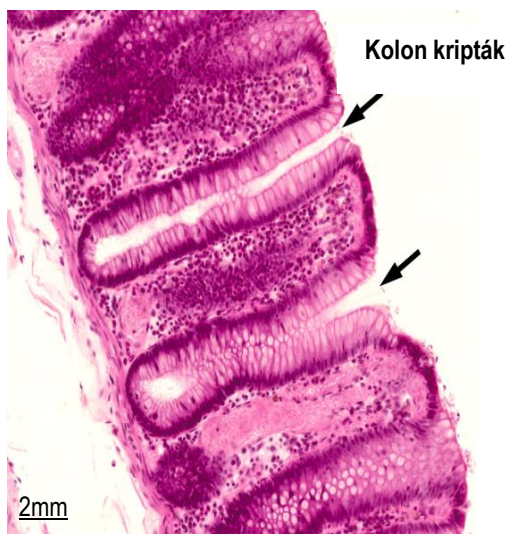
1. ábra: A vastagbél anatómiai felépítése.

Forrás: <http://www.doctorismedici.hu>

Az ileocaecalis billentyűtől a végbélnyílásig terjedő vastagbélnek három alapvető funkciója van:

1. nagy mennyiségű (napi 1 liter) víz és elektrolit felszívása
2. a vastagbél baktériumflórája számára az életfeltételek biztosítása
3. a meg nem emésztett salakanyagok, a fel nem szívódott béltartalom rendezett, alaklomszerű kiürítése a külső környezetbe.

A vastagbél funkciójából következően különböző jellegzetességeket figyelhetünk meg falának felépítésében. Ilyen például, hogy a nyálkahártya felszíne sima, a Krecking-féle redők és a bélbolyhok hiányoznak, valamint a tunica muscularis külső, hosszanti rétege nem folytonos, hanem három egymástól egyforma távolságra futó kötegből áll. A vastagbél nyálkahártyájának hámrétege egyrétegű hengerhám sok kehelysejttel. A lamina propriát sűrűn egymás mellé illeszkedő csöves mirigyek, Lieberkühn-kripták töltik ki (2. ábra). A kripták hámrétegét rezorpciós hámsejtek és kehelysejtek vegyesen alkotják. A sejtek luminális membránjában már nincsenek emésztő enzimek, viszont a bazolaterális membránjukban továbbra is zajlik aktív transzporttal a Na^+ -kipumpálása (Na^+/K^+ ATPáz) a sejtől, ami vízmolekulákat visz magával. A kehelysejtek nagy számban vannak jelen a hámban, sűrűségük egyre nő a végbél irányába. Fontos funkciójuk, hogy az általuk termelt nyák csúszós bevonatot képez a kolon belső felszínén és ezzel lényegesen megkönnyíti a béltartalom továbbítását.



1. ábra: Kolon kripták keresztmetszeti képe.

Forrás: <http://www.siumed.edu>

A vastagbél epitelsejtek iontranszporterei

A vastagbélben az ionok és a folyadék felszívása ion transzporterek segítségével történik. Fiziológias körülmények között a széklettel naponta 100-200 ml folyadék távozik, mely kb. 1,5 -2 liter NaCl-ban és KCl-ban gazdag folyadék abszorpciója révén valósul meg. Az epitél sejtek polarizáltsága lehetővé teszi az ionok irányított transzportját. A Na^+ -abszorpció elektroneutrális (Na^+/H^+ -cserélők és $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ cserélők) és elektrogenikus (epitélialis Na^+ -csatorna) úton történhet [Dudeja et al., 1994.]. Állatkísérletes modellekben szignifikáns különbséget mutattak a NaCl abszorpció mechanizmusában a vastagbél proximális és disztális szakaszán [Mahajan et al., 1996.]. A Na^+ felszívásának jelentős részéért a kolonociták felszínére lokalizált HCO_3^- - függő elektroneutrális NaCl abszorpció a felelős, mely elsősorban a vastagbél proximális szakaszára, míg az elektrogenikus folyamat a disztális szakaszra jellemző.

Na^+/H^+ - kicserélők (NHE)

Az NHE géncsaládnak nélkülözhetetlen szerepe van az emlős bélben a neutrális nátrium felszívásban. Az NHE-k családját baktériumokban, élesztőben, növényekben, állatokban és emberben egyaránt azonosították. Emberben ezt a géncsaládot SLC9A-nak nevezzük, az első NHE-t 1989-ben fedezték fel Sardet és munkatársai. Kilenc tagot különböztetünk meg a géncsaládban, kategorizálásuk a sejten belüli lokalizációjuk révén valósul meg (3. ábra).

Vannak plazmamembrán izoformák (NHE1 bazolaterális, NHE2 apikális, NHE3) illetve intracelluláris izoformák (NHE6,-7,-8.). Az NHE3 megtalálható az endoszomális kompartmenteken és a sejtek apikális membránján is.

A különböző NHE izoformák eltérő funkcióval bírnak. A bazolaterálisan elhelyezkedő NHE1 legfontosabb feladata a pH_i regulációja és a homeosztázis fenntartása, emelett gyulladásos folyamatokban vesz részt (Akhter et al., 2000.). A Na^+ - felszívásért leginkább az NHE3 tehető felelőssé, legfontosabb szerepe az elektroneutrális NaCl abszorpció, melyet az anion cserélővel együttesen lát el (Maher et al., 1996.). Az NHE2 fiziológiai szerepe kevésbé ismert. Korábbi tanulmányok szerint szintén az apikális membránon lokalizálódik, nagy mennyiségben van jelen a kolonban, illetve kis mértékben részt vesz az elektroneutrális NaCl abszorpcióban.

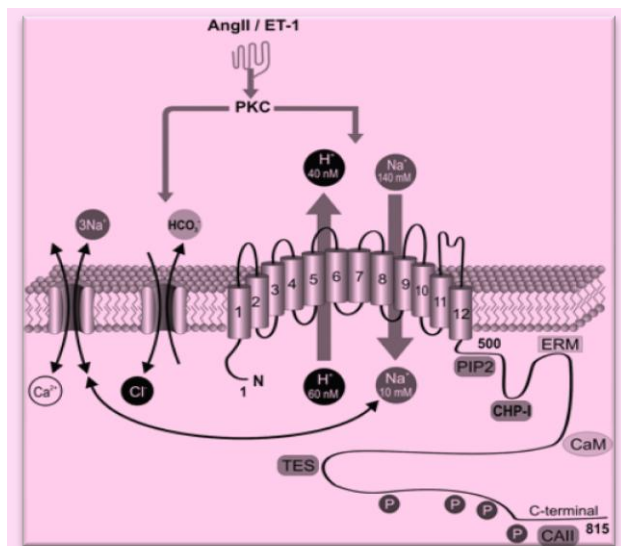
Strukturális felépítésükre jellemző, hogy kb. 645-898 aminosavat tartalmaznak és két doménből épülnek fel. Az N-terminális domén egy transzmembrán domén, amely a Na^+ és H^+

kicserélődését irányítja 1:1 arányban. C-terminális domén ezzel szemben a növekedési faktorok és protein-kinázok általi regulációban vesz részt.

Az NHE-k vastagbél betegségben betöltött szerepét számos állatkísérletes modell igazolta. Egér proximális vastagbél szakaszában igazolták, hogy az NHE3 70%-ban hozzájárult a Na^+ abszorpcióhoz (Barmeyern et al., 1997.). Az NHE3 $-/-$ egerekben súlyos hasmenés alakult ki a Na^+ abszorpció zavara miatt. Humán sejtvonalon végzett kísérletek feltételezik, hogy egyes iontranszporterek (pl.: NHE-k) szabályozzák a gyulladásos sejtek, beleértve a monociták, makrofágok és neutrofil granulociták gyulladásos funkcióit (Németh et al., 2001.).

Cl/HCO_3^- cserélő (AE)

Ezeknek a transzportereknek több formája ismert, amelyek többek között sztöchiometriájukban, illetve szövetspecifitásukban különböznek. A kolonban a DRA, még a pancreasban a PAT-1 az uralkodó izoforma. Fontos szerepük van az elektrolit, folyadék és bikarbonát szekréció és abszorpció folyamatában. A transzporter működéséhez szükséges HCO_3^- jelenlétéről a citoplazmában elhelyezkedő szénsavanhidráz gondoskodik. A keletkezett H^+ az NHE segítségével távozik a sejtől. A Cl^- effluxhoz hasonlóan a HCO_3^- szekréció is folyadék szekréciót generál. A kloridcsatornák is kulcsszerepet játszanak az anion szekrécióban.



PIP2: inozitol4,5-biszfoszfát

CHP-1: kalcineurin homológ fehérje

ERM: ezrin, radixin, moezin

CaM: kalmódulin

TES: teskalnin

CAII. karbon-savanhidráz II.

2. ábra: Na^+/H^+ cserélő (NHE) és $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ cserélő felépítése és működése.

Forrás: <http://www.uric.ahajournals.org>

Az NHE3 és AE NaCl abszorpcióban betöltött szerepét hangsúlyozza továbbá néhány korábban publikált tanulmány, amely arról számol be, hogy ezen ion transzporterek funkciója károsodott bizonyos hasmenéssel járó betegségekben, például colitis ulcerosa illetve szekretoros hasmenés (Yeruva S et al.; Farkas K et al., Makela S. et al.)

Az epesavak

Az epesavak a koleszterinből származó molekulák, funkciójuk:

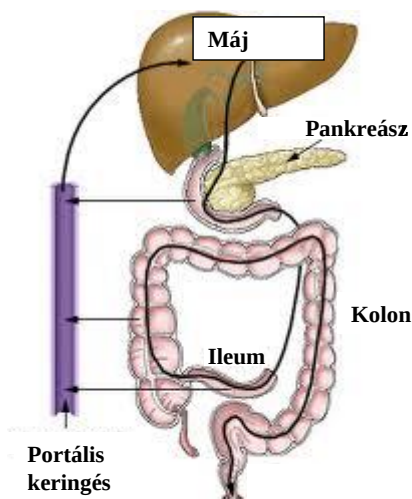
1. *A zsírok emésztését segítik, mivel poláros és apoláros csoportokat is tartalmaznak, detergens tulajdonságokkal rendelkeznek. Az emulgáló hatáson kívül a lipidek emésztését is gyorsítják, mert közvetlenül aktiválják a lipáz enzimet.*
2. *Fontos feladatuk, hogy oldatban tartsák a foszfolipidekkelegyütt az epében kiválasztandó koleszterint, így megakadályozzák annak kiválását.*
3. *Biztosítják a koleszterin kiürülést, mivel a koleszterin gyűrűs váza miatt a szervezetben nem tud lebomlani.*

A máj hepatocitái naponta átlagosan 0,6 g epesavat termelnek, ezek az elsődleges epesavak. A szintézis során a koleszterin szteránvázának oldallánca megrövidül, és a 24-es pozícióban karboxilcsoport alakul ki. A szteroid intermedier két további pozícióban, a 7. és/vagy 12. C-atomokon hidroxilálódhat. Ezek a reakciók két primer epesav, a kólsav és a kenodezoxikólsav keletkezéséhez vezetnek. A hidroxilcsoportok számának növekedése következtében az epesavak hidrophil jellege az eredetileg hidrofób koleszterin molekulákhoz képest növekszik.

Az elsődleges epesavak aminosavakkal konjugálódnak, így másodlagos epesavak keletkeznek. A konjugáció glicinnel vagy taurinnal történhet, a folyamat pedig növeli az epesav vízoldékonyságát. Az epesavak 20-25%-a az ileumban lévő baktériumok hatására bomlik (dekonjugálódik), leválik róluk a glicin és taurin. További bakteriális enzimek hatására a primer epesavak 30%-a átalakul szekunder epesavakká. Tehát a kólsavból dezoxikólsav, a kenodezoxikólsavból litokólsav lesz. A dezoxikólsav visszaszívódik és portális keringésen keresztül visszajut a májba, majd ismét kiválasztódik. A litokólsav rosszul oldódik és legnagyobb része kiürül a széklettel.

Az epesavak a vékonybél utolsó szakaszán, a terminális ileumban speciális epesav transzporterek segítségével visszaszívódnak, majd a portális keringésen keresztül visszajutnak a májba. Ezt nevezzük enterohepatikus körforgásnak (4. ábra). Ennek köszönhetően egy-egy

epesav molekula naponta átlagosan 6-10-szer, egy-egy étkezés során 3-4-szer vesz részt a körforgásban. Az enterohepatikus körforgás zavarát okozza, ha eltávolítják a terminális ileumot (pl: gyulladásos bélbetegségekben esetén gyakori ez az eljárás), így kiiktatódik az a terület, amely az epesavak visszaszívásáért felelős.



4. ábra. Az enterohepatikus körforgás

Forrás: <http://trinityhealth.ca>

A fiziológias epesav koncentráció a proximális kolonban (coecum) egy zsírban dús étkezés után eléri az 1 mM-t. Ismert, hogy az epesavak, ha abnormálisan magas koncentrációban jutnak a kolonba, az hasmenés kialakulásához vezet. Azt azonban nem tudjuk, hogy az epesavak hogyan, milyen mechanizmuson keresztül képesek kiváltani ezt a hatást. Mivel ez a terület igen intenzíven kutatott, több korábbi állatkísérletből, vagy sejtkultúrás végzett vizsgálatból származik adat az epesavak kolon epitél sejtekre kifejtett hatásáról. Ezekből az derül ki, hogy az epesavak serkentik a folyadék- és ion szekréciót a kolonban (Keely SJ et al, Keating N et al, Mauricio AC et al). Humán vizsgálatból származó adat azonban igen kevés áll rendelkezésre, azok is igen régi *in vivo* kísérletek voltak, de itt is az epesavak proszekretoros hatását figyelték meg (Mekhijan HS et al.) Mivel azonban a humán *in vitro* vizsgálatok hiányoznak és keveset tudunk az epesavak humán kolon epitél sejtek abszorpciót befolyásoló hatásáról, érdemesnek tűnt elindulni ezen a vonalon.

Célkitűzés

Ebben a projektben azt tűztük ki célul, hogy megvizsgáljuk az epesavak kolon epitél sejtek ion-transzport mechanizmusára gyakorolt hatását.

Anyagok és módszerek

Etikai megfontolások

A projektet a Szegedi Tudományegyetem Etikai Bizottsága jóváhagyta. Az összes beteg hozzájárulását adta a kutatási célokra történő biopsziás mintavételhez. A páciensek szóbeli tájékoztatást követően beleegyező nyilatkozatot írtak alá.

Humán beválasztás

A kísérletben részt vevő betegeket három csoportba osztottuk. Az első csoporthoz azok a páciensek tartóznak, akik ileum-rezekción/cholecystectomián estek át és a műtét után hasmenés alakult ki. Azért ezeket a betegeket választottuk, mert róluk feltételeztük, hogy krónikusan sok epesav jut el a vastagbélükbe. A második csoportban szintén az ileum-rezekált/cholecystectomizált betegek vannak, de hasmenés nélkül. A harmadik csoport az úgynevezett kontroll csoport, a kolonoszkópia nem mutatott ki kóros eltérést, gasztrointesztinális sebészeti beavatkozáson nem estek át. Minden egyes betegről 3-6 kolon biopsziás mintát vettünk. A kolonoszkópiás beavatkozásokat az I. számú Belgyógyászati Klinikán végezték. Egyik páciensnél sem találtak makroszkópikus (endoszkópia általi) sem mikroszkópikus (hisztológiai vizsgálatok általi) gyulladásra utaló nyomokat a bélben (5. ábra). A normál endoszkópiás eredménnyel rendelkező betegeket rákszűrés és egyéb hasi panaszok miatt vizsgálták.



5. ábra: Normál vastagbél kolonoszkópiás vizsgálata.

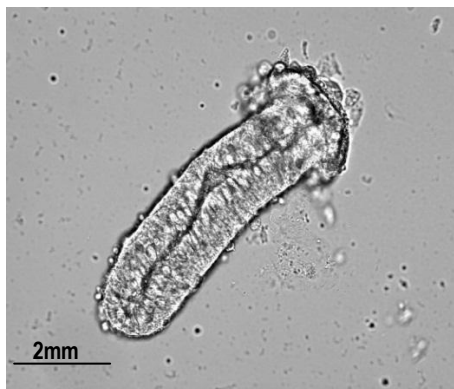
Forrás: <http://www.endoscopy.ysolutions.hu>

Kolon kripták izolálása

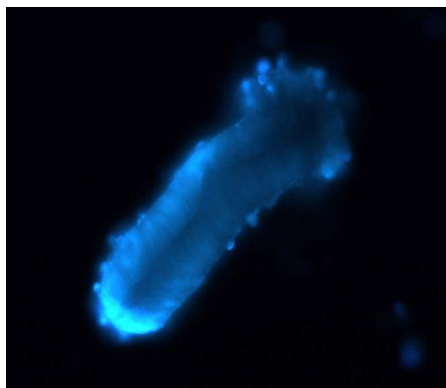
A kolon kriptákat biopsziás mintákból nyertük (6. ábra). A minták a proximális (coecum vagy aszcendens kolon) vastagbélből származnak. A szöveti mintákat azonnal jéghideg NaHCO_3 tartalmú oldatba helyeztük (Hank's balanced salt solution-HBSS). A mintákat 3x mostuk HBSS-sel, majd apró darabokra vágtuk egy borotvapenge segítségével. Ezután inkubáció következett, melyet HBSS-ben feloldott 1 mM ditiotritolban (DTT) végeztünk 15 percen keresztül, majd 2x 30 percig enzimatikus emésztést végeztünk 0,38 mg/mL kollagenáz A-val 37° C-on folyamatos gázoltatás mellett (5% CO_2 /95% oxigén). Az izolálás végén a szövetdarabokat Pasteur pipettával felszuszpendáltuk, hogy a kripták különváljanak, majd 40 másodpercig ülepedni hagytuk. A felülúszó óvatos leszívása után az izolátumhoz tápoldatot adtunk és jégen tároltuk a kísérlet megkezdéséig. A fluoreszcens kísérletekhez a kriptákat 4° C-on az előírt tárolási körülményeknek megfelelően tartottuk három órán keresztül.

A tároló oldat (culture oldat) összetétele: Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), 10% borjúsérum (FBS), 2 mM L-glutamin, 100 U/mL penicillin, 100 mg streptomycin.

Fáziskontraszt kép



Fluoreszcens kép



6. ábra: Kollagenáz A-val végzett izoláció során kinyert kolon kripa elektronmikroszkópos képe.

A kísérletben felhasznált anyagok és oldatok

A kísérletben felhasznált anyagok és oldatok nagy részét a Sigma-Aldrich biztosította. A kollagenáz A-t Roche Diagnostic-tól rendeltük. HOE-642 (4-izopropi 1- 3 metilszulfonilbenzol-gianidinmetálszulfonát) a Sanofi Aventis (Frankfurt, Németország) cégtől kaptuk. BCECF-AM (20, 70 – biszkarboxietil - 5 (6) karboxifluoreszcein-acetoximetilészter), FURA-2-AM (2 - (6-bisz) karboximetil) amino) 5 - (2-) 2-(bisz)karboximetil)amino)-5-metilfenoxi)-ethoxi)-2-benzofuanil)-5-oxazolkarboxil acetoximetil észter, BAPTA-AM (1,2-bisz(o-aminofenoxi)etán-N,N,N9,N9-teraszav), Magnesium-green és TMRM (tetrametilrodamin metilészter) az Invitrogéntől (Eugene, OR) lett rendelve. A sejt és szöveti ragasztó a Becton Dickinson Bioscience-től (Cell Tak, Bedford, MA) származik. A BCECF-AM, a TMRM és a BAPTA-AM DMSO-ban, a Magnesium-green és a FURA-2-AM pluronsavban és DMSO-ban lett feloldva.

Módszerek

Az intracelluláris pH (pH_i), Ca^{2+} - koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) és az ATP-szint (ATP_i) meghatározása mikrofluorometriás módszerrel

A kísérletek során felhasznált oldatok összetételét az *1. táblázatban* láthatjuk. A Hepes puffer oldat pH-ját 7,4-re állítottuk NaOH vagy HCl segítségével. A HCO_3^- puffer oldatot 95% CO_2 és 5% O_2 gázzal áramoltattuk 37⁰ C-on, így a pH-t szintén 7,4-re állítottuk be. A kolon kriptákat Cell Tak segítségével rögzítettük egy 24 mm átmérőjű fedőlemezre 3 órával az izoláció után, majd behelyeztük egy perfúziós kamrába, amit az invertált mikroszkóp tárgyasztalához rögzítettünk. A kriptákat különböző fluoreszcens festékekkel inkubáltuk, ezek lipid oldékony festékek, amik gyorsan bejutnak a sejtbe, ahol az észterázok lehasítják az AM-csoportot, ezáltal hidrofíllé válnak és csapodázódnak a sejtben. A kísérlethez Excellence képalkotó programot használtunk (Olympus, Bp., Mo.).

a) Intracelluláris pH (pH_i) mérése:

Először a kolon kriptákat Hepes-oldatban mostuk 37° C-on, majd inkubáltuk pH-érékeny fluoreszcens festékkel, a BCECF-AM-mel 20-30 percen keresztül. A kriptákra az oldatokat

folyamatosan áramoltattuk (4-5 ml/perc sebeséggel). Három különböző területet (kripta alap, középső területek és a felszín) tanulmányoztunk minden kriptán 495 nm és 440 nm hullámhosszú fénnel gerjesztettük a fluoreszcens festéket, az így keletkezett emissziós rátát 535 nm-en detektáltuk. Az aktuális pH_i-t a 440 nm és a 495 nm emissziójának hányadosa alapján számoltuk ki.

b) Ca²⁺-koncentráció [(Ca²⁺)_i] vizsgálata:

A következő kísérlet sorozatban a sejteket egy Ca²⁺ érzékeny fluoreszcens festékkel, FURA-2-AM-mel (5 nmol/l) inkubáltuk 60 percen keresztül. A Ca²⁺ koncentrációban bekövetkező változásokat az F340/F380 fluoreszcens ráta alapján számítottuk ki, amit 510 nm-en detektáltunk.

c) ATP-szint meghatározása mikrofluorometriás módszerrel:

Az ATP-szint meghatározásához Magnesium-green fluoreszcens festéket használtunk, amely segítségével nyomon tudtuk követni az ATP-szintben bekövetkező változásokat. A kísérletek standard Hepes-puffer oldatban zajlottak. A sejtben az ATP Mg²⁺-hoz van kötve, ha csökken az intracelluláris ATP, a Mg²⁺ felszabadul, így nő a festék fluoreszcens intenzitása. Ezzel a változással indirekten detektáljuk az ATP-t, mert közvetlenül a szabad magnéziumot mérjük vele.

mM	Hepes oldat	HCO ₃ ⁻ - oldat	Na ⁺ mentes Hepes	Cl ⁻ - mentes HCO ₃ ⁻ - oldat	NH ₄ Cl - Hepes	NH ₄ Cl /HCO ₃ Hepes
NaCl	140	115	—	-	110	95
KCl	5	5	5	-	5	5
Hepes	10	-	-	-	-	-
CaCl ₂	1	1	1	-	1	1
MgCl ₂	1	1	1	-	1	1
Glükóz	10	10	10	10	10	10
Hepes acid	—	—	10	10	10	10
NH ₄ Cl	-	-	-	-	20	20
NaHCO ₃	-	25	-	25	-	25
Ca-glükonát	—	-	-	6	-	-
Mg-glükonát	-	-	-	1	-	-
Na-glükonát	-	-	-	115	-	-
K ₂ -szulfát	-	-	-	2,5	-	-
NMDG	-	-	140	-	-	-

1. számú táblázat: A kísérletek során felhasznált oldatok összetétele

A kolon epitél sejtek sav/bázis transzportereinek aktivitás-mérése

Az ion transzporterek aktivitásának meghatározásához a sejtek pH-ját mértük, hiszen az NHEk és az AE részt vesznek a pH_i szabályozásában, és a pH_i megváltozásából következtetni tudunk ezen ion transzporterek aktivitásának megváltozására. A pH_i görbék adott szakaszára illesztett egyenes meredekségéből számoltuk az egyes transzporterek aktivitását.

Az intracelluláris pH-t meghatározó kísérletek során 3 perces 20 mM NH_4Cl tartalmú HCO_3^- oldattal perfundáltuk a kriptákat. A sejtbe diffundál az oldatban lévő gázhalmazállapotú NH_3 és H^+ -al egyesülve NH_4^+ -ot képez, így szabad HCO_3^- halmozódik fel a sejtben. Ez a folyamat hirtelen alkalinizációt eredményez. Az ammónium elvonása gyors acidózist okoz. Az így előidézett acidózisból való regenerációért az NHEk felelősek. Az NHEk-et a savas pH aktiválja.

Amikor az egyes NHE izoformák aktivitását szeretnénk mérni, HEPES oldatot használtunk és az ammónium elvonásával egyidejűleg a nátriumot is kivontuk az extracelluláris oldatból. Ezekkel blokkoltuk a sav/bázis transzporterek működését (sem nátrium, sem bikarbonát nem volt jelen az oldatba), így a pH-szint beállt egy tartóan savas értékre.

Az extracelluláris nátrium visszaadása lehetővé tette, hogy az NHEk működésbe lépjenek és elkezdjék regenerálni a sejt pH-ját. A különböző NHE izoformák aktivitását egy izoforma szelektív NHE inhibitor, HOE-642 segítségével határoztuk meg. 1 μM HOE-642 az NHE1-t gátolta, 50 μM HOE-642 mind az NHE1 mind az NHE2-t gátolta, de az NHE3-t nem. Habár kilenc különböző NHE izoforma van az emésztő traktusban, csak az NHE1-NHE2-NHE3 található a sejtek membránján. 50 μM koncentrációban a Na^+ visszaadása után (Hepes-oldat) a görbe meredeksége az NHE3 aktivitására utal, míg 1 μM -ban alkalmazva a 2 és 3-as izoforma együttes aktivitását adja. NHE2-es izoforma aktivitását úgy kapjuk meg, hogy a második szakasz meredekségéből (1 μM HOE-642) kivonjuk a harmadikat (50 μM HOE-642), az NHE1 aktivitását úgy kapjuk meg, hogy az első szakasz meredekségéből (inhibitor mentes) kivonjuk a másodikat (1 μM HOE-642).

Az NHE izoformák aktivitása (A) kiszámítható a helyreállási értékekből:

$$A_{NHE1} = R_{0 \mu M \text{ HOE-642}} - R_{1 \mu M \text{ HOE-642}}$$

$$A_{NHE2} = R_{1 \mu M \text{ HOE-642}} - R_{50 \mu M \text{ HOE-642}}$$

$$A_{NHE3} = R_{50 \mu M \text{ HOE-642}}$$

Az NHEk mellet vizsgáltuk az AE aktivitását is. Erre alkalmas egyrészt a fent részletezett ammonium-pulzus technika, ekkor az NH_4Cl által kiváltott alkalózisból való regenerációs szakaszból számítottuk ki az AE aktivitását. A másik technika az AE vizsgálatára a Cl^- -elvonásos módszer. Tömören összefoglalva, ha a kloridot elvonjuk a standard $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ puffer oldatból alkalizáció következik be, a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ cserélő aktivitása megfordul, így emelkedik a pH_i. Az alkalizáció kezdő pontjából kiszámítható a transzporter aktivitása.

Morfológiai változások nyomon követése

Transzmissziós elektronmikroszkóp segítségével vizsgáltuk a kolon epitél sejtek különböző sejt organelumaiban bekövetkezett morfológiai változásokat. A biopsziák felszálló alkoholsorban lettek inkubálva, majd epon keverékbe lettek beágyazva. Ebből 70 µm vastag félvékony metszetek készültek LEICA Reichert Ultracut S típusú mikrotom segítségével. A metszeteket Toluidin-kék festékkel festettük meg majd ultravékony (70 nm) metszeteket készítettünk, azokat egylyukú hártásított rácslemezre vittük fel. Utolsó lépésként a minta kontrasztosítását végeztük: a mintát 0,25%-os uranyl-acetát oldatba 30 percen keresztül 40 °C-ra helyezzük, majd 5 percig 20 °C-on Reynolds-féle ólom-citrát oldatban inkubáltuk. Phillips CM 10 típusú elektronmikroszkópot használtunk. A képeket analySIS nevű program segítségével 1450-45000 nagyításban készítettük el.

A mitokondrium transzmembrán potenciál (MTP) vizsgálata

Az MTP-ben bekövetkező változásokat a TMRM fluoreszcens festék segítségével tanulmányoztuk (standard Hepes-puffer oldatban feloldva) Olympus Fluoview FV10i konfokális mikroszkóp program segítségével.

Statisztikai analízis

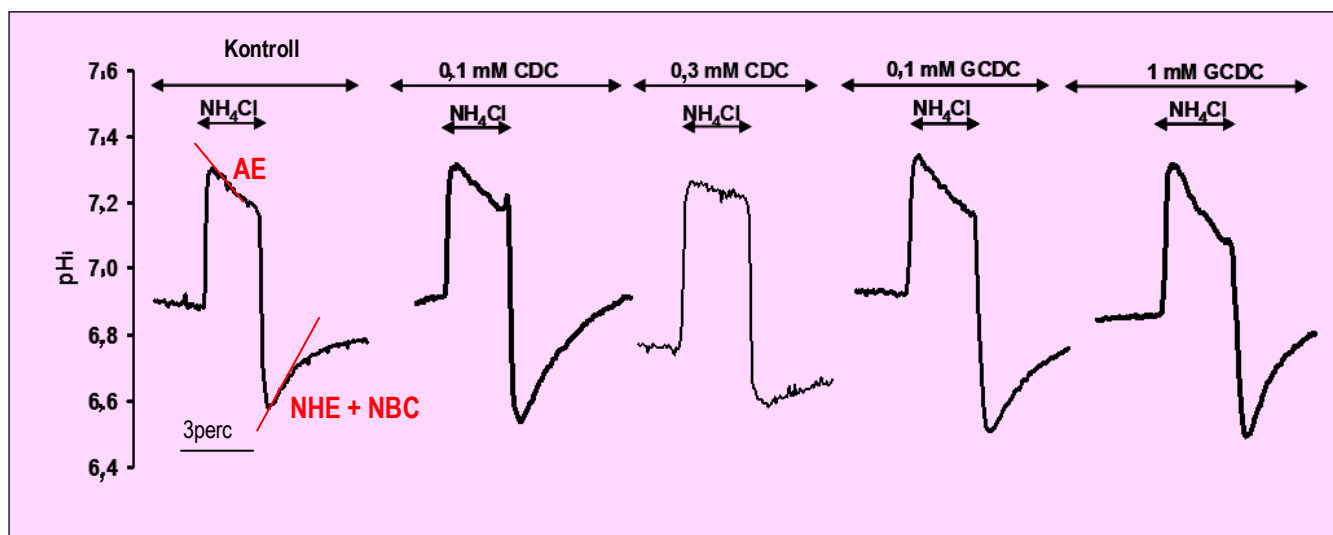
Az adatokat átlag ± átlag szórása (standard error of mean, S.E.M.) formátumban adtuk meg. Statisztikai összehasonlításra variancia analízist (ANOVA) használtunk. $p < 0,05$ értéket vettük szignifikánsnak.

Eredmények

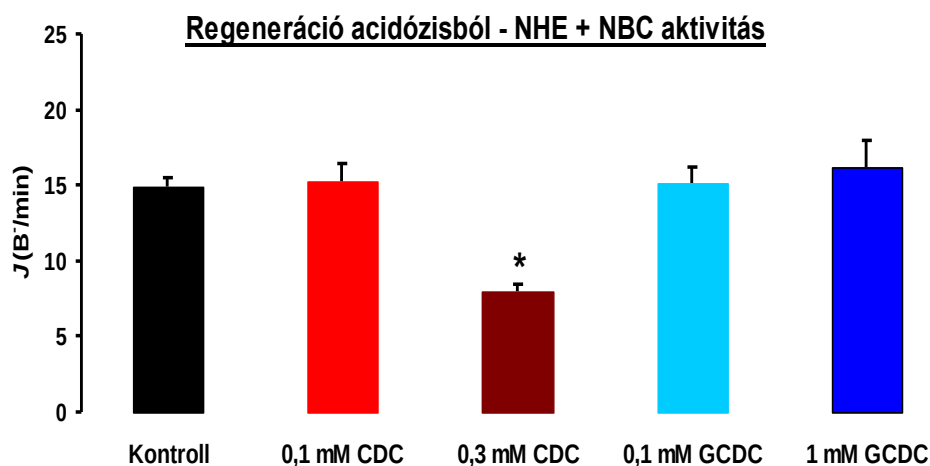
Akut CDC kezelés gátolja az iontranszporterek aktivitását

Két technikával vizsgáltuk az akut epesavkezelés hatását kolon kripták sav/bázis transzportereire. Az első az ammónium pulzus technika volt, ezekhez a kísérletekhez kontroll páciensekből izolált kolon kriptákat használtunk. Az ammónium pulzus technika alkalmazásakor előidézett acidózisból való regenerációért az NHEk felelősek. A kriptákat különböző koncentrációban alkalmazott nem – konjugált kenodezoxikólsavval (CDC) és a konjugált glikokenodezoxi-kólsavval (GCDC) 10 percig kezeltük. 0,3 mM CDC szignifikáns gátlást idézett elő a kolon kripták sav/bázis transzportereinek aktivitásában. 0,1 mM CDC és GCDC nem volt hatással a vizsgált ion transzporterek működésére (7.-8. ábra). (NBC: $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ kotranszporter, a bazolaterális oldalon van jelen és a transzepitélialis ionszekréciót segíti azzal, hogy behozza a nátriumot és a bikarbonátot, ezáltal szubsztrátot ad az AE-nek.)

n = 3-6 beteg/6-12 kriptá/12-40 ROI és *p<0,05 a kontrollhoz képest

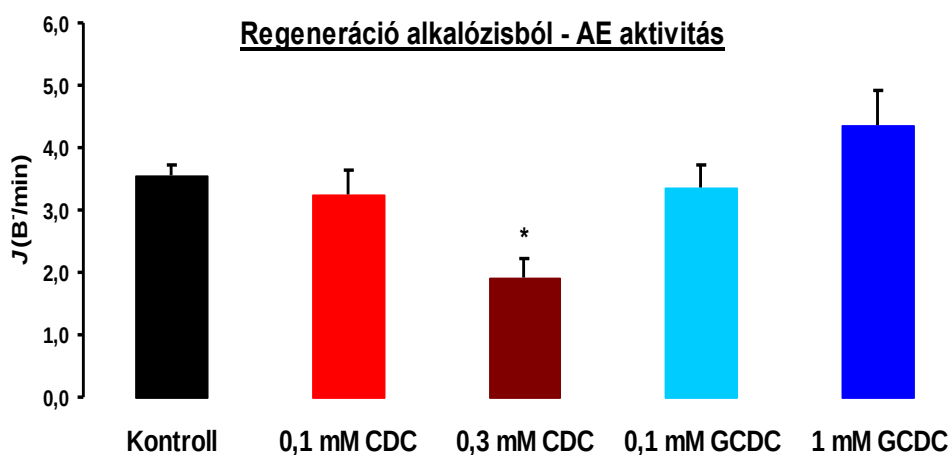


7. ábra: Reprezentatív pH_i görbék: az NHE, AE és NBC aktivitásokat szignifikánsan csökkentette a 0,3 mM CDC-és kezelés.



8/a ábra: Összefoglaló diagram a fenti kísérletekről.

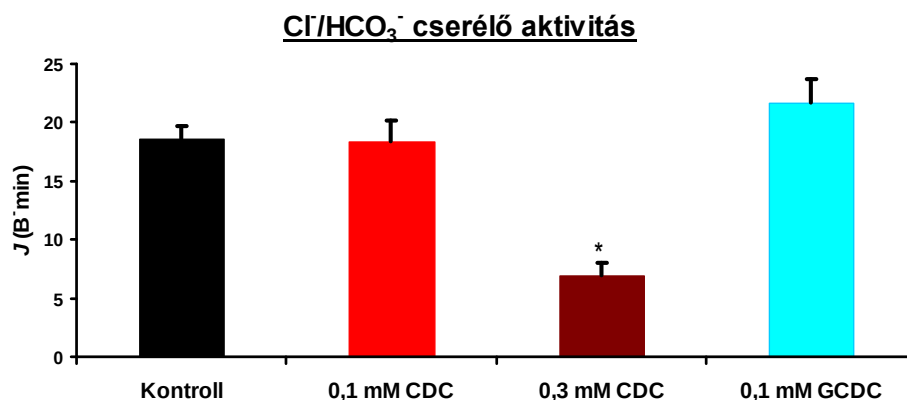
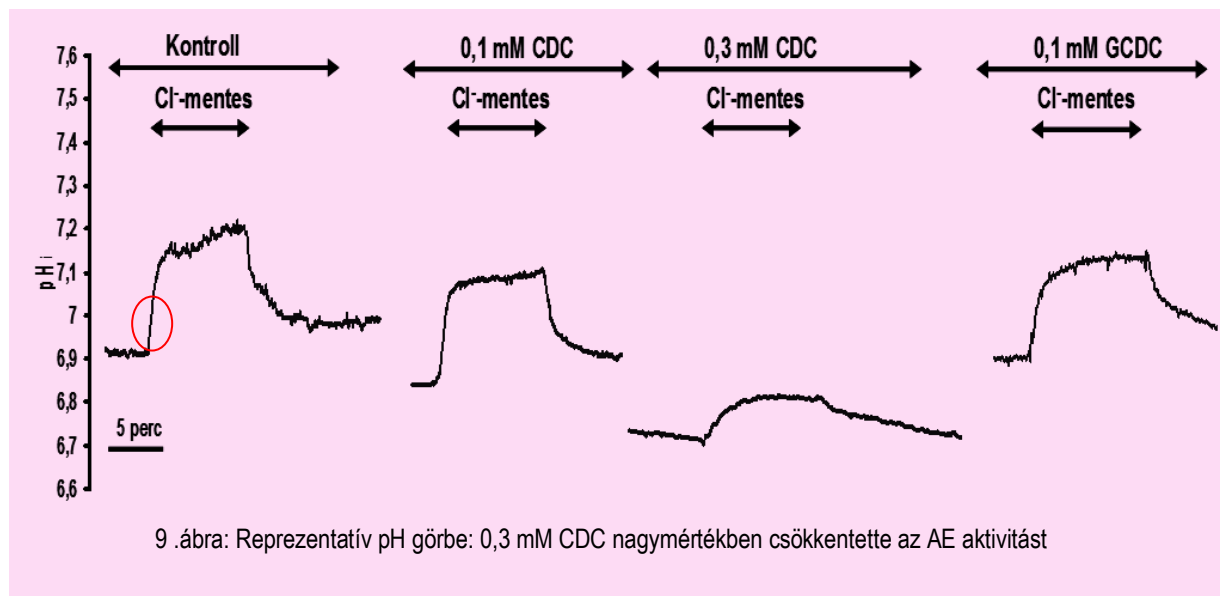
0,3 mM CDC szignifikánsan csökkentette az NHEk és NBC aktivitását



8/b ábra: Összefoglaló diagram a mért AE aktivitásokról.

0,3 mM CDC gátolta az AE aktivitást

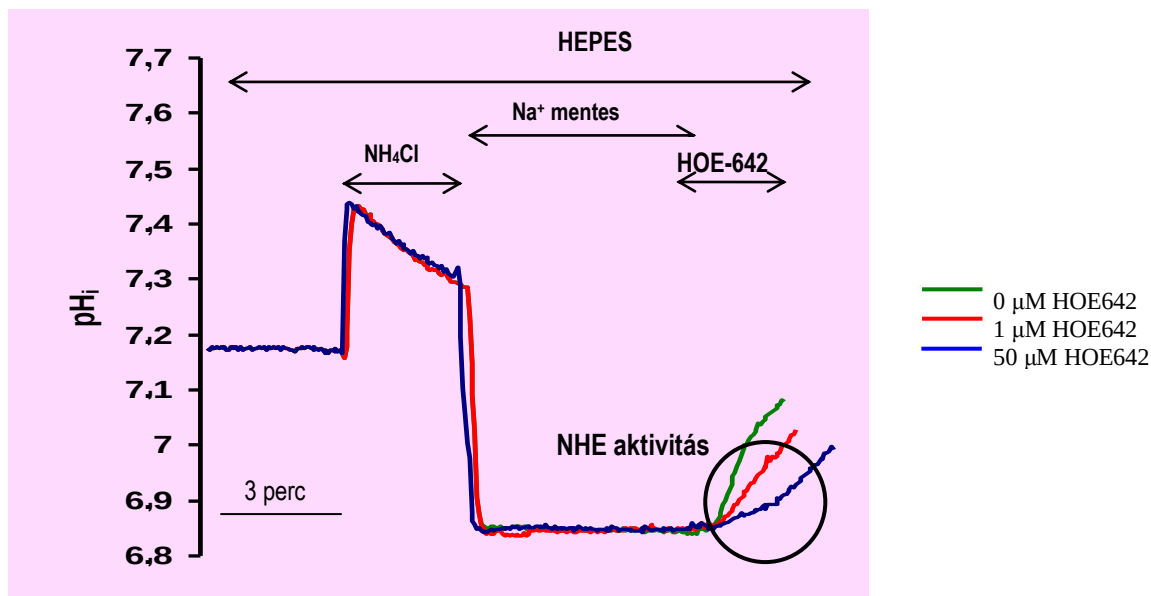
A második technika, amit alkalmaztunk a sav/bázis transzporterek aktivitásának mérésére, az a klorid-elvonásos technika volt. Itt is azt tapasztaltuk, hogy 0,3 mM CDC jelentősen csökkentette az AE aktivitását, míg ugyanezen epesavaknak alacsonyabb koncentrációban, vagy GCDC-nek nem volt gátló hatása (9-10. ábra). n=3-4 beteg/4-6 kripta/6-12 ROI, *p<0,05, kontrollhoz képest.



10. ábra. Összefoglaló diagramm a kalkulált AE aktivitásokról.

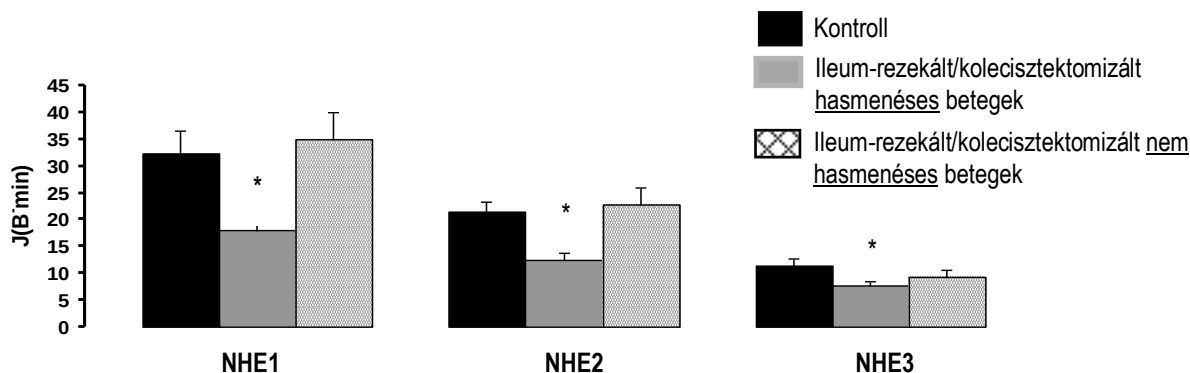
Krónikus epesavterhelés csökkenti a kolon kripták iontranszportereinek aktivitását

A kísérletekhez biopsziás mintát ileum-rezekált/kolecisztektomizált páciensektől kaptunk, hogy tanulmányozhassuk a különböző NHE izoformák aktivitását. Ezeket a betegeket azért választottuk, mert róluk feltételeztük, hogy krónikusan sok epesav jut el a vastagbelükbe. Azt tapasztaltuk, hogy az ileum-rezekált/kolecisztektomizált hasmenéses betegek kolon kriptái esetén minden vizsgált NHE izoforma aktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollhoz képest (11-12. ábra). n = 5-6 beteg / 16 – 24 kriptá / 70 – 89 ROI, *p < 0,05 a kontrollhoz képest



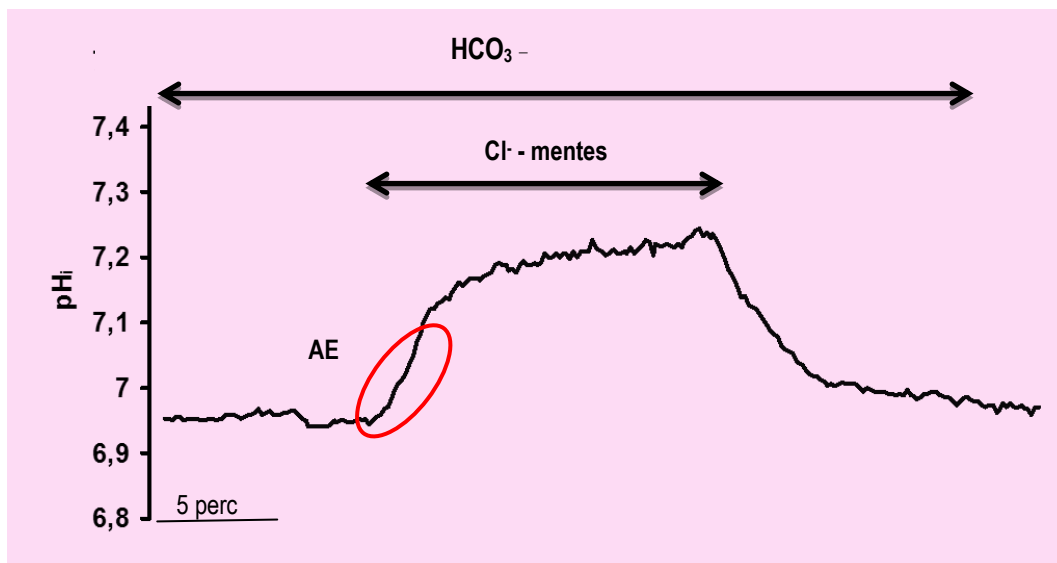
11. ábra: Reprezentatív görbe a mért NHE aktivitásokról.

1 μM HOE-642 az NHE1-t gátolja, 50 μM HOE-642 mind az NHE1-t, mind az NHE2-t gátolja.

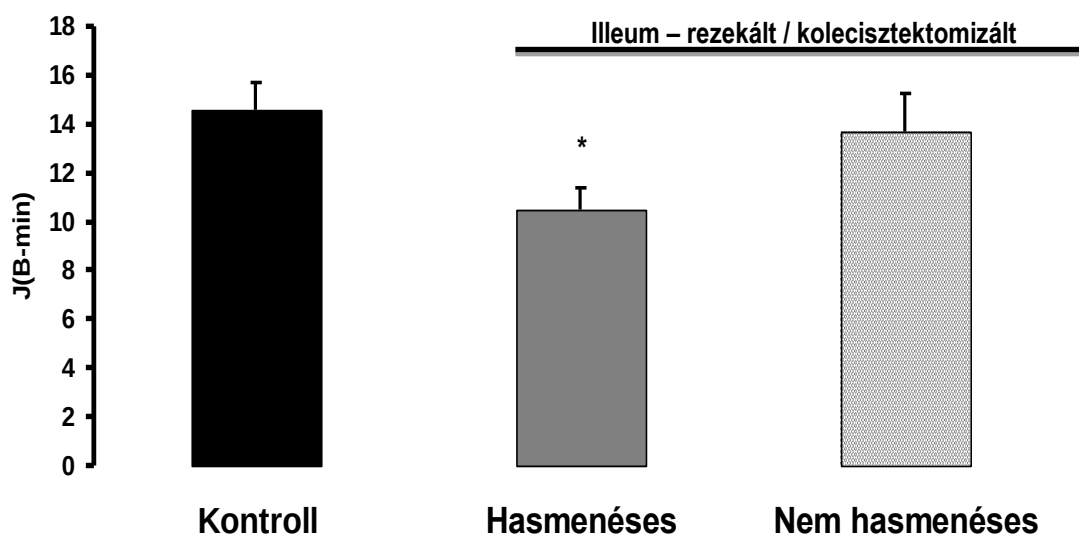


12. ábra: Összefoglaló diagramm a mért NHE aktivitásokról.

Az NHE aktivitások mellett vizsgáltuk az ileum-rezekált/kolecisztektomizált hasmenéses betegekből izolált kripták AE aktivitását. Kísérleteinkből kiderült, hogy a krónikus epesavterhelésnek kitett kripták AE aktivitása szignifikánsan alacsonyabb a kontroll betegeknél mért értékekhez képest (13-14. ábra). $n=3-4$ beteg/6-10 kript/12-14 ROI, $*p < 0,05$ a kontrollhoz képest.



13. ábra: Reprezentatív pH_i görbe, az AE aktivitásának mérése klorid-elvonásos technikával.

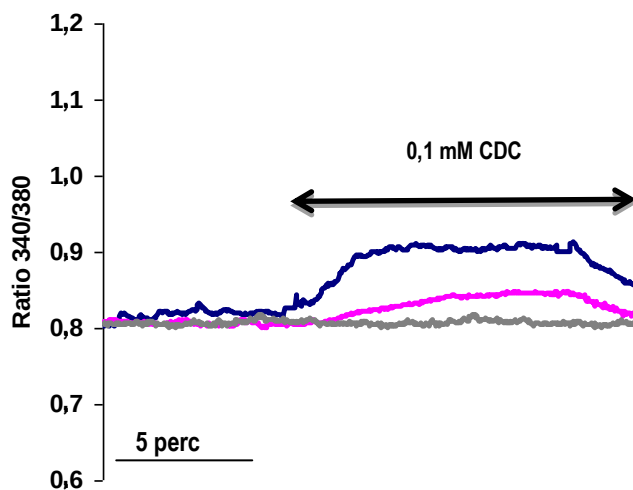


14. ábra: Összefoglaló diagram a mért AE aktivitásokról. Krónikus epesav terhelésnek kitett kolon kripták AE aktivitása szignifikánsan alacsonyabb a hasmenéses betegeknél a kontrollhoz képest.

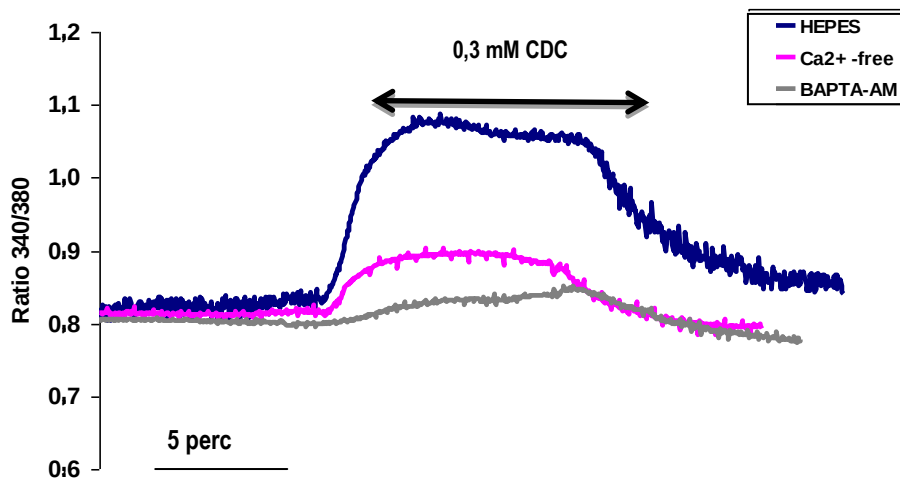
A CDC koncentráció – függően emeli az ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t)

Különböző koncentrációkban (0,1 mM, 0,3 mM és 1 mM) alkalmazott CDC kezelés az intracelluláris szabad kalcium szint $[\text{Ca}^{2+}]$ emelkedését idézte elő egészséges kolon epitél sejtek

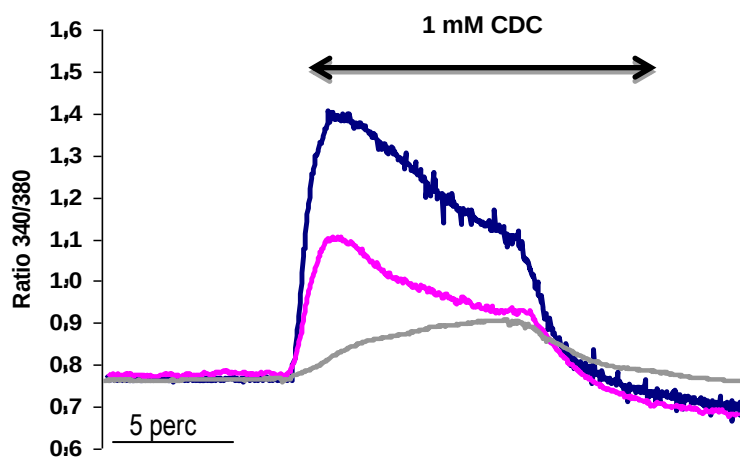
esetén (13/a,b,c- és 14.ábra). Ez a folyamat részben gátolható volt, ha az extracelluláris Ca^{2+} -t elvontunk a rendszerből vagy BAPTA-AM kalcium kelátort alkalmaztunk (intracelluláris Ca^{2+} -ot köt).
BAPTA – AM = 40 $\mu\text{mol/L}$, n = 2-4 beteg / 5-10 kripta / 10-21 ROI



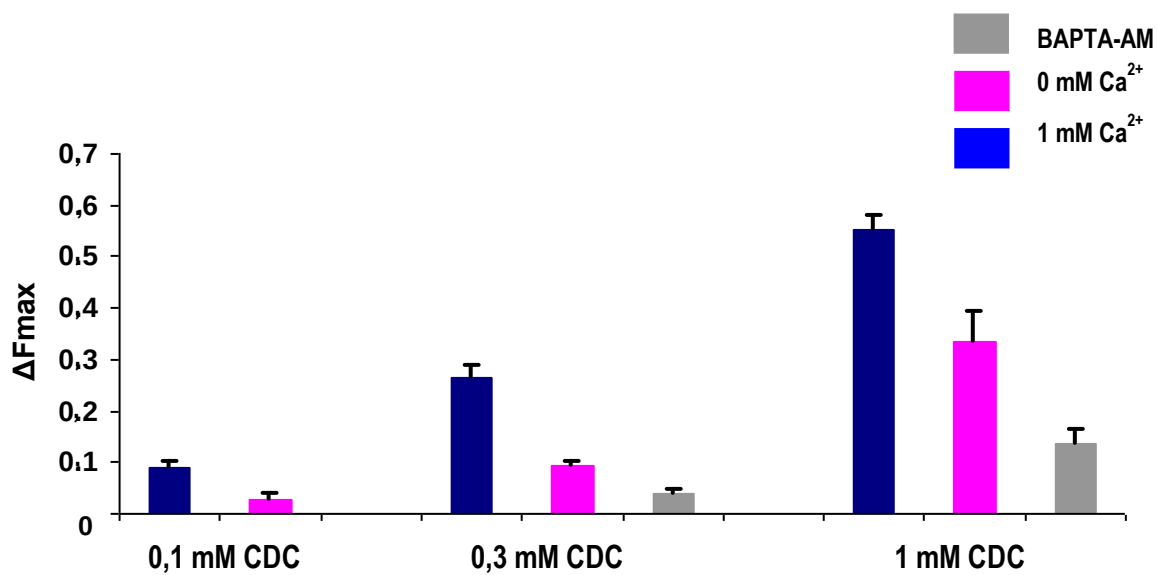
13/a ábra: Reprezentatív görbe. 0,1 mM CDC $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedést okoz



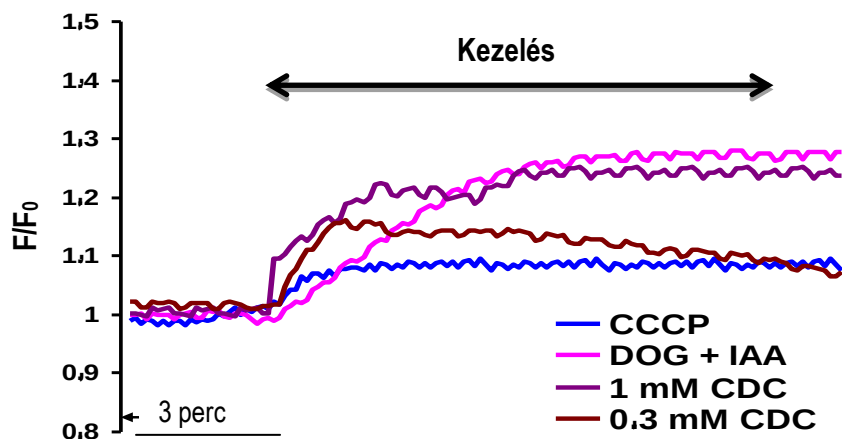
13/b ábra: Reprezentatív görbe. 0,3 mM CDC $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -emelkedést okoz



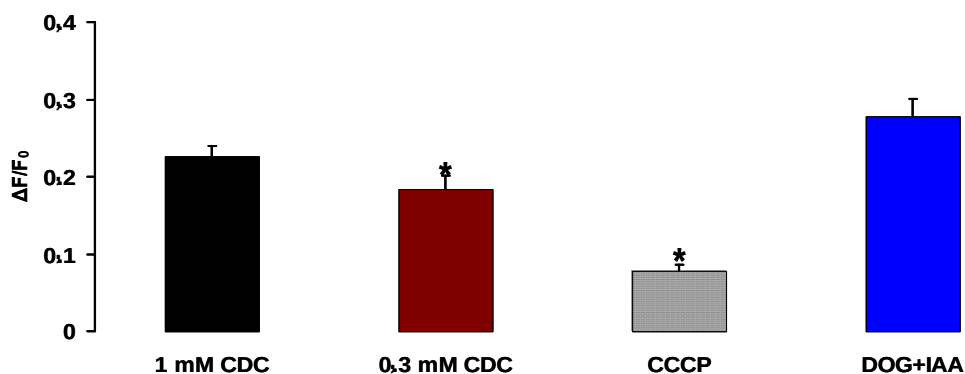
13/c ábra: Reprezentatív görbe. 1 mM CDC $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedést okoz



14. ábra: Összefoglaló diagram. A CDC koncentráció-függően emeli a $[Ca^{2+}]_i$ -t



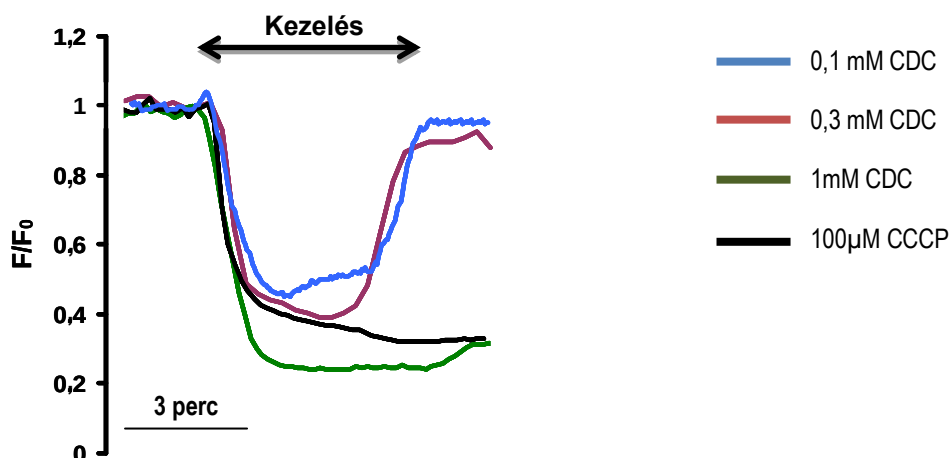
16. ábra: Reprezentatív görbék az ATP_i mérésről. 1 mM és 0,3 mM CDC jelentős ATP_i csökkenést okozott



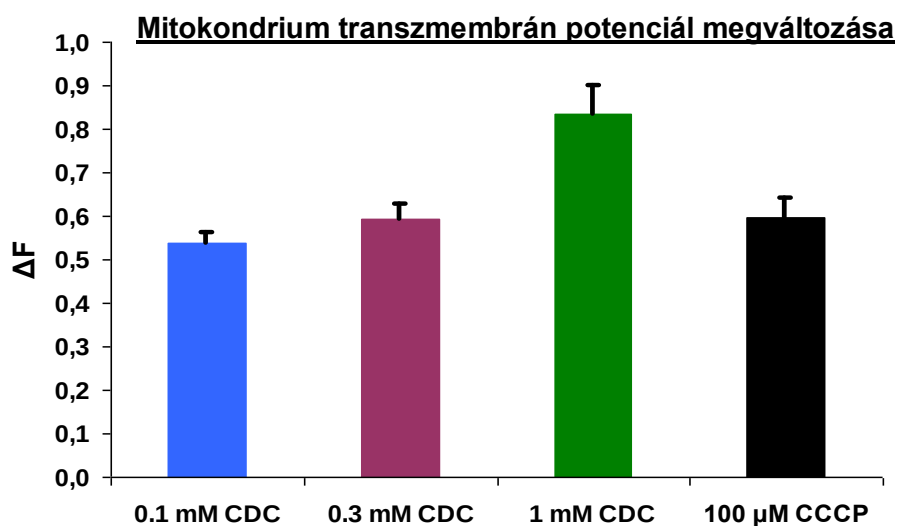
17. ábra: Összefoglaló diagram a maximális fluoreszcencia-intenzitás változásokról

A CDC csökkenti a mitokondrium transzmembrán potenciált

A kísérletek során nem-konjugált kenodezoxi-kólsavval (CDC) kezeltük a kolon kriptákat. A CDC kezelés jelentős csökkenést idézett elő a mitokondrium transzmembrán potenciálban (MTP), de 0,1 mM és 0,3 mM koncentrációk esetén a károsodás visszafordítható volt. 1 mM CDC által okozott MTP csökkenés irreverzibilisnek bizonyult (18-19. ábra). Ismét a mitokondriális toxin CCCP-t használtunk pozitív kontrollnak. n= 2 beteg/ 2-3 kripa / 13-17 ROI



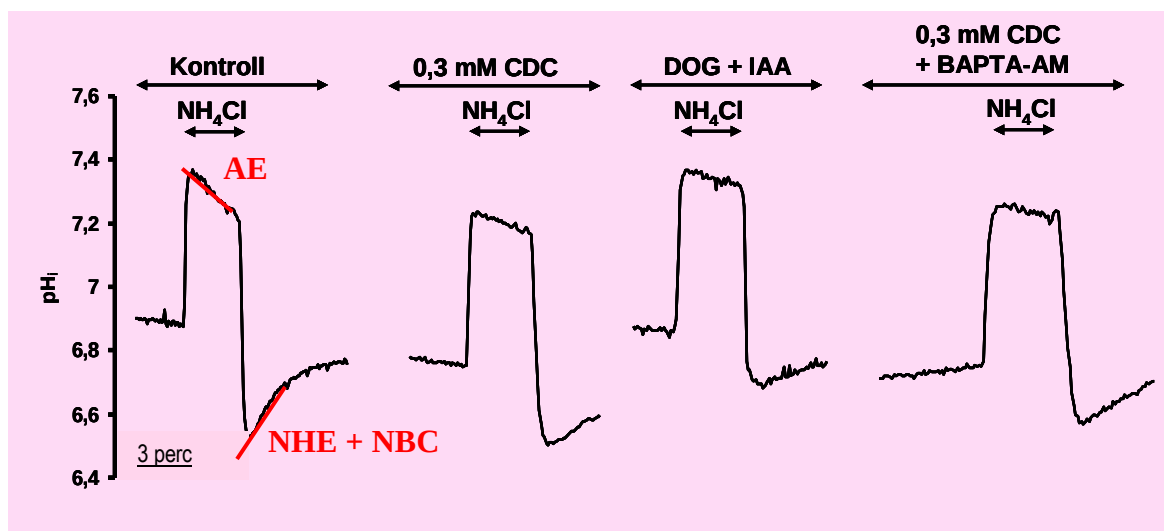
18. ábra: Reprezentatív görbe az MTP-mérésről. 0,1 és 0,3 mM CDC kezelés reverzibilisen csökkentette az MTP-t



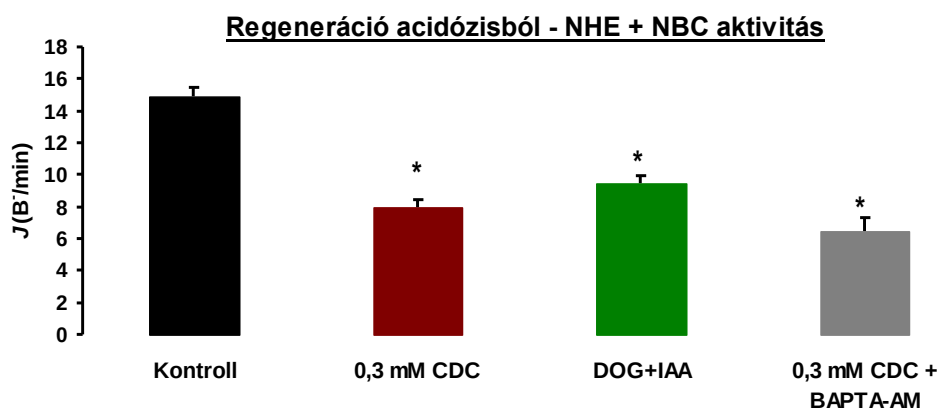
19. ábra: Összefoglaló diagram az MTP változásokról. 1 mM CDC irreverzibilis MTP csökkenést okozott

Az ATP_i szint csökkentése mimikálja a CDC sav/bázis transzporterekre gyakorolt gátló hatását

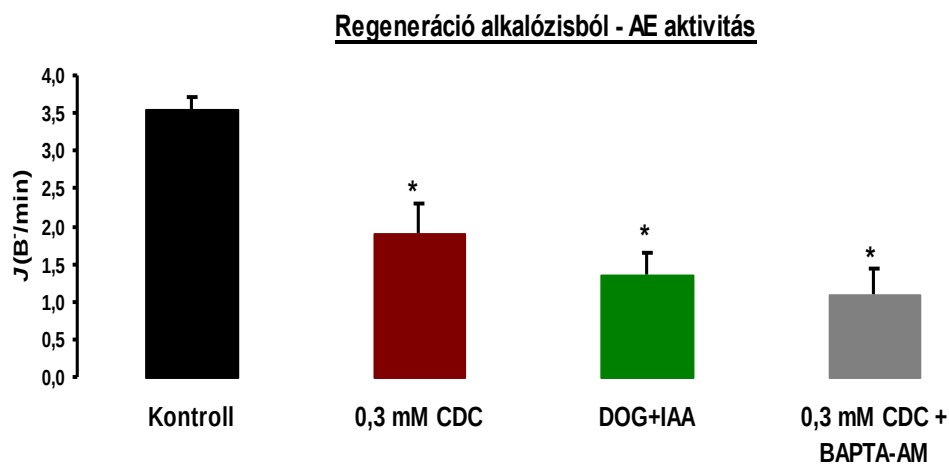
Az intracelluláris mechanizmusokat követően visszatértünk az iontranszporter aktivitás méréséhez. Azt tapasztaltuk, hogy az ATP_i csökkenés ugyanolyan mértékben csökkentette a sav/bázis transzporterek aktivitását, mint ahogyan 0,3 mM CDC kezelést követően láttuk. Az [Ca²⁺]_i kelátor BAPTA-AM előkezelés azonban nem tudta kivédeni a CDC gátló hatását (20-21 ábra).



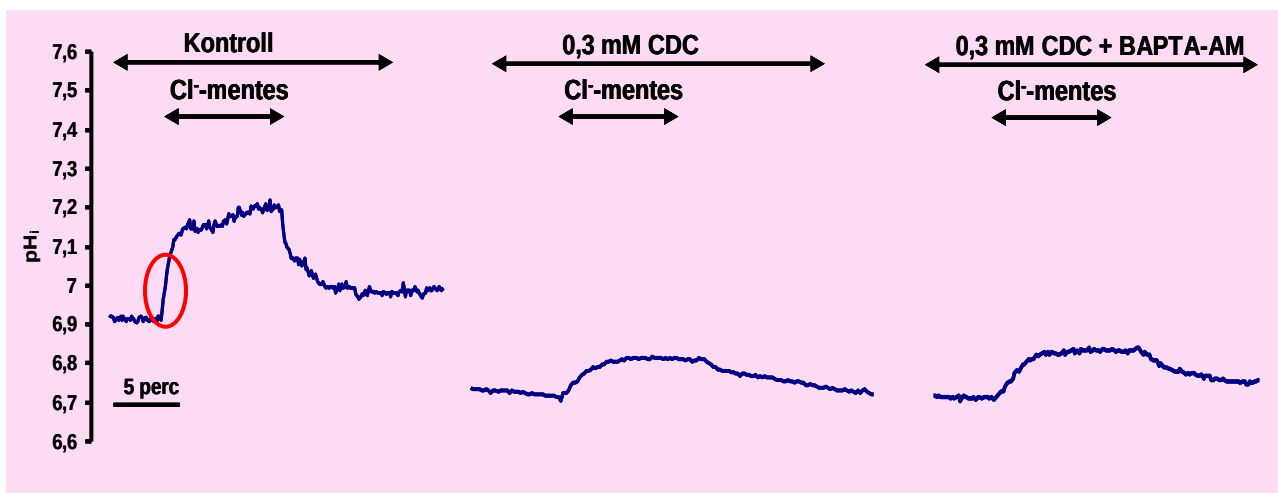
20. ábra: Reprezentatív pH_i görbék. A DOG + IAA kezelés gátolta az alkalózisból és acidózisból való regenerációt



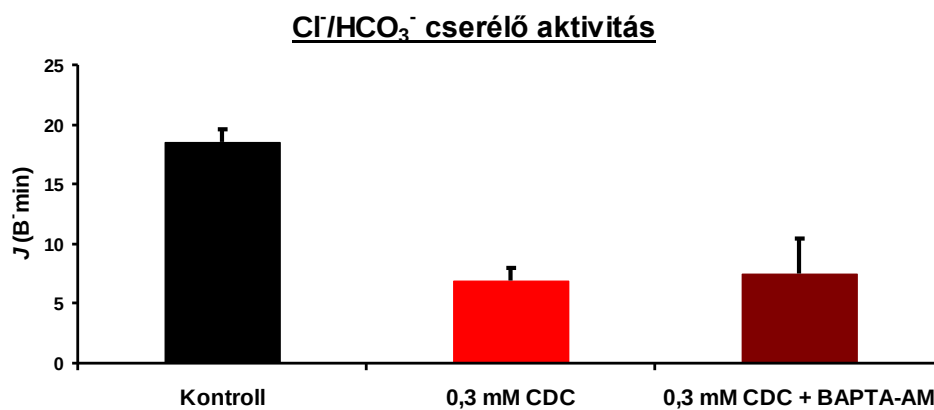
21/a ábra: Összefoglaló diagramm a számított NHE és NBC aktivitásokról



21/b ábra: Összefoglaló diagramm a kalkulált AE aktivitásokról.



22. ábra: Reprezentatív pH_i görbe a klorid-elvonásos kísérletekről. 0,3 mM CDC jelentősen csökkentette az AE aktivitását, a [Ca²⁺]_i-kelátor BAPTA-AM előkezelés azonban nem tudta kivédeni a CDC gátló hatását.



23. ábra. Összefoglaló diagramm a klorid-elvonásos kísérletekből számolt AE aktivitásokról.

Összefoglalás, konklúzió

A vastagbél kulcsfontosságú szerepet játszik a szervezet folyadékháztartásának fenntartásában azzal, hogy napi szinten csaknem 1 liter vizet és ionokat szív vissza. Ezt a folyamatot, azaz az ionok meghatározott irányba történő mozgatását a polarizált epitél sejt réteg teszi lehetővé, mely a különböző transzporterek membránspecifikus elhelyezkedését biztosítja. Az ion transzporterek közül az elektroneutrális NaCl felszívásban a Na^+/H^+ cserélő 3-as izoformája (NHE3) valamint a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ cserélő DRA (DownRegulated in Adenoma, anion exchanger, AE) játssza a legfontosabb szerepet. E két ion transzporter működése egymással kapcsolt (Musch MW et al.). Korábbi tanulmányokban ezen ion transzporterek károsodott működését írták le bizonyos hasmenéssel járó betegségekben (Yeruva S et al., Farkas K et al., Makela S. et al.). Az is ismert, hogy az epesavak is képesek hasmenést okozni, amennyiben túl magas koncentrációban érik el a vastagbelet. Ilyen pathológiás körülmény léphet fel az enterohepatikus körforgás sérülése, például ileum-rezekció esetén, amikor kiiktatják a vékonybél epesav-visszaszívásért felelős szakaszát, így több epe jut a kolonba. Kolecisztektómiát követően is igen gyakori a krónikus epés hasmenés, amit valószínűleg a bélbe folyamatosan csordogáló epesav okoz. Májig sem sikerült fényt deríteni arra, hogy az epesavak hogyan okoznak hasmenést, miként befolyásolják a kolon epitél sejtek funkcióját. Néhány rendelkezésünkre álló állatkísérletes, valamint sejt kultúrán végzett kísérletről tudjuk, hogy az epesavak proszekretoros hatást fejtenek ki a vastagbélben, fokozzák a folyadék- és elektrolit szekréciót (Keely SJ et al, Keating N et al, Mauricio AC et al). Néhány, évtizedekkel ezelőtti *in vivo* humán tanulmány is azt igazolja, hogy az epesavak magas koncentrációban serkentik a folyadék szekréciót a kolonban (Mekhjian HS et al.). Az azonban nem ismert, hogy az epesavak hogyan befolyásolják a humán kolon epitél sejtek abszorptív folyamatait, és mivel az *in vitro* humán vizsgálatok szinte teljesen hiányoznak, mi azt tűztük ki célul, hogy megvizsgáljuk az epesavak humán kolon epitél sejtek ion transzport mechanizmusaira gyakorolt hatását. Kísérleteinkhez humán kolon biopsziás mintákból izoláltunk egyedi kriptákat.

A kísérletek első szériájában arra szerettünk volna választ kapni, mi történik a sav/bázis transzporterekkel, ha egészséges páciensekből izolált kriptákat kezelünk epesavval. Két koncentrációt használtunk, egy alacsonyabbat (0,1 mM) és egy magasabbat (0,3 mM). Azt az eredményt kaptuk, hogy akut kezelés 0,3 mM nem konjugált kenodezoxikólsavval (CDC) jelentős mértékben csökkentette a NaCl felszívásért felelős sav/bázis transzporterek, az NHE izoformák és az AE aktivitását. A következő lépésben tudni szerettünk volna, vajon hogyan hat a krónikus epesav terhelés a kolon epitél sejtek ion transzportereire. Ehhez a kísérletsorozathoz olyan pácienseket kerestünk, akik ileum-rezekción vagy kolecisztektómián

estek át és hasmenés alakult ki náluk a műtétet követően. Azért ilyen betegekre volt szükség, mert róluk feltételezzük, hogy a vastagbelük krónikusan magas epesav koncentrációnak van kitéve. Korábbi publikációkban már bizonyították, hogy a kolecisztektómián átesett hasmenéses betegek vastagbelében kontroll páciensekhez képest akár 10-szer több epesav lehet (Arlow FL et al.). Az ileum-rezekált vagy kolecisztektomizált hasmenéstől szenvedő betegeknél szignifikánsan csökkent NHE és AE aktivitásokat mértünk a kontroll páciensek kriptáin kapott értékekhez képest.

Láttuk tehát, hogy az epesavaknak mind rövid, mind pedig hosszú ideig kitett kolon epitél sejtek ion transzport mechanizmusa jelentős mértékben gátolt. Felmerült a kérdés, hogy hogyan képesek az epesavak kifejteni ezt a gátló hatást, milyen intracelluláris mechanizmusokon keresztül csökkentik a sav/bázis transzporterek aktivitását. Erre szerettünk volna választ kapni.

Először az Ca^{2+}_i -t vettük célba, mint potenciális résztvevőt az epesavak által befolyásolt sejten belüli folyamatokban. Ezt arra alapoztuk, hogy korábban már kimutatták, hogy az epesavak kalcium-szignalizációt indukálnak más sejttypusokban, nyelőcső epitél sejtekben valamint pankréász duktális epitél sejtekben (Goldman A et al, Venglovecz et al.). Fontos tudni azt is, hogy nemrég közölt tanulmányokban az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -emelkedés NHE3-ra és AE-re kifejtett gátló hatásáról számolnak be (Cinar A et al, Lamprecht G et al.). Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy kolon epitél sejtekben a CDC koncentráció-függő emelkedést váltott ki az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ban, mely részben kivédhető volt az Ca^{2+}_i -kelátor BAPTA-AM előkezeléssel, vagy pedig a Ca^{2+} extracelluláris oldatból történő elvonásával.

Tovább kutatva azon intracelluláris mechanizmusok után, melyeken keresztül a CDC kifejtheti ion transzportereket gátló hatását, megnéztük, hogyan befolyásolja az epesav-kezelés a kolon epitél sejtek energiaszintjét illetve sejtorganellumait. Az ion transzporterek működése közvetlenül, vagy közvetve ATP-t igényel. Alapul szolgált továbbá egy nemrég publikált tanulmány, miszerint pankréász duktális sejteknél nagy dózisú epesav kezelés rongálta a mitokondriumokat, valamint ATP-csökkenést okozott (Maléth et al.). Kontroll páciensekből izolált kolon kripták esetén azt tapasztaltuk, hogy nagy koncentrációjú (1 mM) CDC 10 perces kezelést követően szembetűnő, súlyos károsodást okozott a mitokondriumokban: felhíztak, belső membránjaik széttöredeztek. A károsodás mértéke összehasonlítható volt a mitokondriális toxin cianid CCCP ártalmas hatásával. Alacsonyabb koncentrációjú CDC kezelés, vagy a konjugált GCDC-vel való inkubálást követően nem figyeltünk meg eltérést egyik sejtalkotóban sem. A mitokondriumokon kívül az 1 mM CDC-nek nem volt hasonló toxikus hatása más sejtorganellumokra nézve. Ez nincs teljesen összhangban más munkacsoportok által végzett hasonló vizsgálatokkal, hiszen Byrne AM és munkatársai HCT116 kolon epitél sejt vonalon Golgi-fragmentációt is leírtak 0,3 mM dezoxikólsavas kezelést követően. Valószínűleg ezen hatás érzékenyebb technikával történő vizsgálata szükséges a humán kolon epitél sejtek esetében is.

Ezt követően kíváncsiak voltunk, hogy a mitokondrium strukturális károsodása funkcióvesztéssel jár-e, tehát vizsgáltuk a CDC-nek a sejtek ATP-tartalmára kifejtett hatását. A CDC mind 0,3 mind pedig 1 mM koncentrációban jelentősen csökkentette a kolon epitél sejtek ATP-szintjét. Ez a csökkenés 1 mM CDC esetén irreverzibilis volt.

A mitokondrium transzmembrán potenciál (MTP) volt vizsgálódásunk következő célpontja, hiszen a negatív MTP megléte az ATP szintézis feltétele. 0,1, 0,3 és 1 mM CDC kezelést követően is MTP csökkenést figyeltünk meg. Ez a hatás 0,1 mM és 0,3 mM CDC esetén reverzibilis volt, az MTP regenerálódott az epesav elvonása után. 1 mM CDC az MTP-t irreverzibilisen csökkentette, az epesav elvonása után sem tért vissza a kiinduló értékre.

A fenti eredményeket összefoglalva, bár 0,3 mM CDC nem okozott látható strukturális mitokondrium-károsodást, de csökkentette mind az ATP-szintet, mind pedig az MTP-t, tehát képes kárt tenni a sejtek energiaszintjében. Láttuk azt is, hogy a CDC $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedést is indukál. Visszatértünk tehát az ion transzporter aktivitás-mérésekhez, hogy megvizsgáljuk, vajon $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedés vagy ATP-csökkenés áll a CDC gátló hatása mögött.

A kolon kriptákat glikolízis-gátlókkal kezeltük (10 mM DOG + 5 mM IAA), melyekről már bizonyítottuk, hogy ATP-csökkenést váltanak ki kolon epitél sejtekben. Ebben az esetben ugyan olyan mértékű aktivitás-csökkenést tapasztaltunk a sav/bázis transzporterek működésében, mint amit 0,3 mM CDC kezelésnél mértünk. Az Ca^{2+} -kelátor BAPTA-AM-mel való előkezelés azonban nem volt képes arra, hogy kivédje a 0,3 mM CDC ion transzportereket gátló hatását.

Eddigi eredményeink fényében levonható tehát a konklúzió, miszerint humán kolon epitél sejtekben a nem-konjugált CDC mitokondriális károsodást, az ATP-szint és a mitokondrium transzmembrán potenciál csökkenését okozza, valamint gátolja a sav/bázis transzporterek aktivitását. Ezek a káros folyamatok csökkenthetik a vastagbél folyadék és elektrolit-felszívását és hozzájárulhatnak a krónikus hasmenés kialakulásához.

Nyilatkozat

Alulírott, **GÁL ELEONÓRA** Biológia szakos hallgató, kijelentem, hogy a TDK dolgozatban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel.

Munkáim: kolon kriptá izolálás, Ca^{2+} -koncentráció mérés, intracelluláris pH-mérés és mitokondrium transzmembrán potenciál vizsgálatok.

Szeged, 2012. november 5.

Irodalomjegyzék

- AKHTER S, CAVET ME, TSE CM ET AL.: C-terminal domains of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 are involved in the basal and serum-stimulated membrane trafficking of the exchanger. *Biochemistry* 39: 1990–2000, 2000.
- ANTAL BAJOR, PER-GÖRAN GILLBERG, HASSE ABRAHAMSSON ET AL.: Bile acids: short and long term effects in the intestine. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 45:645-664, 2010
- ARLOW FREDA ET AL.: Bile Acid Mediated Postcholecystectomy Diarrhea, *Arch Intern Med* 1987;147:1327-1329
- BACHMANN O, RIEDERER B, ROSSMANN H ET AL.: The Na⁺/H⁺ exchanger isoform 2 is the predominant NHE isoform in murine colonic crypts and its lack causes NHE3 upregulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: 125-133, 2004.
- BARMEYER C, HARREN M, SCHMITZ H ET AL.: Mechanism of diarrhea in the interleukin-2 deficient mouse model of colonic inflammation. *Gastrointest Liver Physiol* 286:
- BINDER HJ, FOSTER ES, BUDINGER ME ET AL.: Mechanism of electroneutral sodium chloride absorption in distal colon of the rat. *Gastroenterology* 93: 449–455, 1987.
- BOOKSTEIN C, DEPAOLI AM, XIE Y ET AL.: Na⁺/H⁺ exchangers, NHE-1 and NHE-3, of rat intestine. Expression and localization. *J Clin Invest* 93: 106–113, 1994.
- BOOKSTEIN C, XIE Y, RABENAU K ET AL.: Tissue distribution of Na⁺/H⁺ exchanger isoforms NHE2 and NHE4 in rat intestine and kidney. *Am J Physiol Cell Physiol* 273:C1496– C1505, 1997.
- BOOTH C, PATEL S, BENNION GR ET AL.: The isolation and culture of adult mouse colonic epithelium. *Epithelial Cell Biol* 4: 76-86, 1995.
- BREUER R, SCHILLI R, DUNN K ET AL.: Fecal fluid composition in Crohn's disease of the colon (CDC) differs from that in ulcerative colitis (CUC). *Gastroenterology* 83: 1025, 1982.
- C. MAURICIO, M. SLAWIK, D. HEITZMANN ET AL.: DOC affects the transport properties of distal colon. *Pflügers Arch-Eur J Physiol* 439:532-540, 2000
- CINAR A., CHEN M., Riederer B et al. NHE3 inhibition by cAMP and Ca²⁺ is abolished in PDZ-domain protein PDZK1-deficient murine enterocytes. *J Physiol*, 2007; 581: 1235-1246.
- CIVITELLI R, TEITELBAUM SL, HRUSKA KA ET AL.: IL-1 activates the Na⁺/H⁺ antiport in a murine T cell. *J Immunol* 143: 4000–4008, 1989.

- DUDEJA PK, HARIG JM, BALDWIN ML ET AL.: Na⁺ transport in human proximal colonic apical membrane vesicles. *Gastroenterology* 106: 125-33, 1994.
- EVANS GS, FLINT N, SOMERS AS ET AL.: The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures. *J Cell Sci* 101: 219-31, 1992.
- GOLDMAN A. ET AL.: A novel mechanism of acid and bile acid-induced DNA damage involving Na⁺/H⁺ exchanger: implication for Barrett's oesophagus
- HEGYI P, RAKONCZAY Z JR., GRAY MA ET AL.: Measurement of intracellular pH in pancreatic duct cells: A new method for calibrating the fluorescence data. *Pancreas* 28: 427-434, 2004. 27
- HOOGERWERF WA, TSAO SC, DEVUYST O ET AL.: NHE2 and NHE3 are human and rabbit intestinal brush-border proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 270: G29– G41, 1996.
- JORGENSEN PL: Sodium and potassium ion pump in kidney tubules. *Physiol Rev* 60: 864–917, 1980.
- KAWAMATA K, HAYASHI H, SUZUKI Y: Chloride-dependent bicarbonate secretion in the mouse large intestine. *Biomed Res* 27: 15-21, 2006.
- KLAUDIA FARKAS,SUNIL YERUVA,ZOLTÁN RAKONCZAY,JR ET AL.: New therapeutic targets in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2010.
- KUNZELMANN K, MALL M: Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev* 82: 245-289, 2002.
- LAMPRECHT G., HSIEH CJ. ET AL. Intestinal Anion Exchanger Down-regulated in Adenoma (DRA) Is Inhibited by Intracellular Calcium, *JOURN OF BIOL CHEM.* 284,. 29, 19744–19753, 2009
- MAHAJAN RJ, BALDWIN ML, HARIG JM ET AL.: Chloride transport in human proximal colonic apical membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1280: 12-8, 1996.
- MAHER MM, GONTAREK JD, BESS RS ET AL.: The Na⁺/H⁺ exchange isoform NHE3 regulates basal canine ileal sodium absorption in vivo. *Gastroenterology* 112: 174–183, 1997.
- MALÉTH J.,VENGLOVECZ V. ET AL.: Non-conjugated chenodeoxycholate induces severe mitochondrial damage and inhibits bicarbonate transport in pancreatic duct cells. *Gut*, 2010; 60(1):136-8
- MARK W. MUSCH, DONNA L. ARVANS, GARY D. WU ET AL.: Functional coupling of the downregulated in adenoma chlorid/base exchanger DRA and the apical Na⁺/H⁺ exchangers NHE2 and NHE3. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296: G202-G210, 2010

- MUSCH W. MARK ET AL.: Functional coupling of the downregulated in adenoma Cl⁻/base exchanger DRA and the apical Na⁺/H exchangers NHE2 and NHE3
- NIAMH KEATING AND STEPHEN J. KEELY: Bile acids in regulation of intestinal physiology. *Current Gastroenterology Reports* 11:375-382, 2009
- NIAMH KEATING, MAGDALENA S. MROZ, MICHAEL M. SCHARF ET AL.: Physiological concentrations of bile acids down-regulate agonist induced secretion in colonic epithelial cells. *J.Cell. Mol. Med.* 2293-2303, 2009
- PEDERSEN G, SAERMARK T, GIESE B ET AL.: A simple method to establish short-term cultures of normal human colonic epithelial cells from endoscopic biopsy specimens - Comparison of isolation methods, assessment of viability and metabolic activity. *J Cell Sci* 101: 219-231, 1992.
- POTTER GD, BURLINGAME SM: Ion transport by neonatal rabbit distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 250: G754–G759, 1986.
- ROEDIGER WE, LAWSON MJ, KWOK V ET AL.: Colonic bicarbonate output as a test of disease activity in ulcerative colitis. *J Clin Pathol* 37: 704-707, 1984. 28
- ROLFE MW, KUNKEL SL, ROWENS B ET AL.: Suppression of human alveolar macrophage-derived cytokines by amiloride. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6: 576–582, 1992.
- SANJEEV PATTNI, JULIAN R. F. WALTERS ET AL.: Recent advances in the understanding of bile acid malabsorption. *British Medical Bulletin* 92: 79-93, 2009
- SCHULTHEIS PJ, CLARKE LL, MENETON P ET AL.: Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *Nat Genet* 19:282–285, 1998.
- SCHULTHEIS PJ, CLARKE LL, MENETON P ET AL.: Targeted disruption of the murine Na⁺/H⁺ exchanger isoform 2 gene causes reduced viability of gastric parietal cells and loss of net acid secretion. *J Clin Invest* 101: 1243–1253, 1998.
- SEIDLER U, LENZEN H, CINAR A ET AL: Molecular mechanisms of disturbed electrolyte transport in intestinal inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1072: 262-75, 2006.
- SELLIN JH, DE SOIGNIE R: Short-chain fatty acids have polarized effects on sodium transport and intracellular pH in rabbit proximal colon. *Gastroenterology* 114: 737–747, 1998.
- STEPHEN J. KEELY, MICHAEL M. SCHARL, LONE S. BERTELSEN ET AL.: Bile acid-induced secretion in polarized monolayers of T84 colon epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G290-G297, 2007
- THOMAS JA, BUCHSBAUM RN, ZIMNIAK A ET AL.: Intracellular pH-measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. *Biochemistry* 18: 2210-2218, 1979.

VENGLOVECZ V. ET AL.: Effects of bile acids on pancreatic ductal bicarbonate secretion in guinea pig secretion in guinea pig secretion in guinea pig, Gut 2008;57:1102–1112. doi:10.1136/gut.2007.134361

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőimnek **PALLAGI-KUNSTÁR ÉVA** és **PROF. HEGYI PÉTER** szakmai irányítását és rengeteg segítségét.

Szegedi Tudományegyetem

I.számú Belgyógyászati Klinika

Prof. Dr. Wittmann Tibor
Prof. Dr. Takács Tamás
Dr. Rakonczay Zoltán Jr.
Prof. Dr. Lonovics János
Dr. Farkas Klaudia
Fuksz Zoltánné
Tóth Krisztina

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Prof. Dr. Varró András
Dr. Venglovecz Viktória

Sebészeti Klinika

Prof. Dr. Lázár György
Dr. Simonka Zsolt

Pathológiai Intézet

Dr. Tiszlavicz László